

# 光疗动力学过程光敏剂及抑制剂效果评价的实验研究

刘德启

(苏州大学化学化工学院 苏州 215006)

**摘要** 在光疗动力学过程或在生物体光敏氧化过程的控制中, 高效廉价的光敏剂或抑制剂的选择是技术的关键。利用光敏剂在光照条件下产生的活性氧化二苯基碳酰肼, 生成红色二苯基碳酰肼, 用三氯化碳萃取; 并以无光敏剂时的萃取液为参比, 在最大吸收波长 563.0nm 处测其吸光度值  $A_{563}$ ; 或在该体系中加入抑制剂, 以不加抑制剂为参比, 计算  $\Delta A_{563}$ 。实验证明, 相同的光照强度与光照时间, 用分光光度计测得的  $A_{563}$  或  $\Delta A_{563}/A_{563}$  值的大小作为快速筛选光敏剂、抑制剂及评价其效果的依据, 结果可靠, 方法快捷。

**关键词** 光动力学疗法, 光敏剂, 抑制剂, 筛选, 分光光度法

**中图分类号** R785.5, O64, TQ577.34

近年来, 分子氧的光敏氧化作用在生理及医疗方面的重要性日益受到关注, 单线态分子氧的反应动力学研究及过程的有效控制成为光化学和光生物学中的一个研究热点<sup>[1-4]</sup>。在对生物组织有害物的光清除方面, Keller 等<sup>[5]</sup>首次发现光动力作用对毛细血管瘤的消退作用; 杨耀武<sup>[6,7]</sup>, 顾英等<sup>[8]</sup>利用光动力疗法治疗鲜红斑痣也取得了满意的效果。在对生物组织或生物分子的光损伤方面, 刘剑波等<sup>[9]</sup>在反向胶束模拟系统中利用光敏剂对氨基酸进行了光敏氧化的实验研究。在生物体光敏氧化或在光敏氧化过程的控制中, 高效、廉价的光敏剂或抑制剂的选择是关键。因此, 快速筛选光敏剂或抑制剂方法的研究具有重要的理论与实际意义。

本工作提出了利用光敏剂在光照条件下产生的活性氧化二苯基碳酰肼, 生成红色二苯基碳酰肼, 用三氯化碳萃取, 并以无光敏剂时的萃取液为参比, 在最大吸收波长 563.0nm 处测其吸光度值  $A_{563}$ 。同时可在该体系中加入抑制剂, 以不加抑制剂为参比, 计算  $\Delta A_{563}$ 。实验证明, 相同的光照强度与光照时间, 用分光光度计测得的  $A_{563}$  或  $\Delta A_{563}$  值的大小作为快速筛选光敏剂、抑制剂及评价其效果的依据, 结果可靠, 方法快捷。同时, 也详细地研究了光敏氧化过程的影响因素。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 实验仪器与试剂

UV-2810 紫外可见分光光度计: HITACHI;  
SGY-1 型多功能光化学反应仪: 南京大学环境科学

院及江苏省环境科学研究所研制; 可见光源, 由不同功率的钨灯提供。单色光的选择, 由钨灯提供光源, 经棱镜分光后, 再聚焦, 提供某一单色光。光敏剂为: 亚甲基蓝 (MB)、玫瑰红 (RB)、吡啶橙 (RO), 生物染色试剂, 均为上海化学试剂三厂生产; 叶绿素-a (chl-a); 铜-叶绿素 (chla-Cu); La-叶绿素 (chla-La), 按照文献[10]方法制备。甘露醇, Sigma 公司; 抗坏血酸, Sigma 公司; 黄酮类抗氧化剂芦丁, 葛根素, Fluka 公司;  $\beta$ -胡萝卜素, Sigma 公司。

二苯基碳酰肼的乙醇溶液: 称取 60.6mg 的二苯基碳酰肼 (Sys-Diphenyl Carbazide) (DPCI) (A.R.), 用 15mL 的无水乙醇溶解, 再用 2 次重蒸水定容至 100mL, 就得到  $2.5 \times 10^{-3}$  mol/L 的二苯基碳酰肼的乙醇溶液, 避光保存、备用。萃取剂为三氯化碳 ( $\text{CHCl}_3$ , A.R)。实验用水为 2 次重蒸水。其余试剂均为分析纯。

### 1.2 光敏剂的筛选方法

将一组 10mL 石英光反应器中各加入 5mL 上述浓度的二苯基碳酰肼 (DPCI) 乙醇溶液, 再分别加入等摩尔浓度不同光敏剂, 混匀, 光照相同的时间。利用光敏剂在光照条件下产生的活性产物与 DPCI 反应, 生成棕红色的二苯基卡巴腓 (DPCO), 用三氯化碳萃取, 萃取液的最大吸收波长为 563.0nm。以无光敏剂的萃取液为参比, 在最大吸收波长 563.0nm 处测其吸光度值 ( $A_{563}$ )。以  $A_{563}$  值的大小为标准快速筛选光敏剂, 其值越大, 表明光敏剂的光敏化效率越高。向体系中加入抑制剂, 以不加抑制剂为参比, 计算  $\Delta A_{563}$ , 以  $\Delta A_{563}/A_{563}$  值的大小

第一作者: 刘德启, 男, 1963 年 7 出生, 1989 年在上海华东师范大学获博士学位, 环境科学专业, 副教授  
收稿日期: 初稿 2003-07-23, 修回 2004-01-15

作为加入抑制剂效果的评价参数,其值介于 0—1 之间,越接近于 1,抑制效果就越高,越接近于 0,则效果越差。

## 2 结果和讨论

### 2.1 光敏剂的筛选

光敏剂的筛选在钨灯提供的复合光下进行。在

Table 1  $A_{563}$  efficiency of different photosensitizer (photosensitizer concentration= $2.4 \times 10^{-5}$  mol/L; illuminating time=30min)

Illuminating intensity(lx)	Photosensitizers					
	MB	RB	RO	Chl-a	Chl-Cu	Chl-La
2000	0.256	0.151	0.802	0.341	0.935	0.545
3000	0.330	0.235	0.891	0.433	1.121	0.596

在光疗动力学过程中,光敏化效率与多种因素,如:体系转换量子产额,单线态氧、三线态氧量子产额,反应活性等有关。而这些因素又直接受到光照强度的影响,光照强度越强,光敏化效果越显著,这一点也可从表 1 中得到反映。同时,通过单色光实验发现光源提供的波谱与光敏剂吸收波谱的匹配性越好,光敏氧化效率也就越高。这是因为光敏氧化过程是光敏剂选择性地吸收一定波长的光后,通过电子跃迁等过程产生活性产物,氧化 DPCI,生成棕红色 DPCO。每一种光敏剂都有它特定的发色基团及其相应的最大吸收波长范围。以上光敏剂在可见光区的最大吸收波长范围,MB 为 580—700nm;RB 为 520—570nm;RO 为 360—540nm;叶绿素类光敏剂除在 620—700nm 范围有强吸收外,还在 400—510nm 范围有次吸收。

### 2.2 光敏剂浓度对 $A_{563}$ 的影响

相同的光源辐照相同的时间,光敏剂的浓度不同,反应体系产生活性产物的量也是不同的。以光敏剂 MB 为例,见图 1。当 MB 浓度在  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 以下时, $A_{563}$  随着 MB 浓度的增大而增大,且在  $0—1.2 \times 10^{-4}$  mol/L 范围内呈线性关系:

$$A_{563} = 0.0600 + 0.0652C_{MB} \quad (R=0.9971)$$

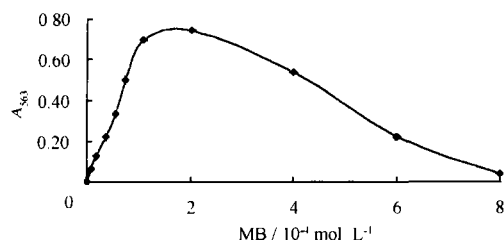


Fig.1 The relationship between the concentration of MB and  $A_{563}$

相同的光照强度、光敏剂浓度与光照时间下,比较了合成光敏剂 MB、RB、RO 及天然叶绿素类光敏剂光敏氧化 DPCI 产生  $A_{563}$  值的大小。结果表明,合成色素以 RO 的光敏氧化能力最强;天然色素以叶绿素铜为最强,与叶绿素相比,叶绿素铜是一种增敏剂(见表 1)。

当 MB 的浓度超过  $2.0 \times 10^{-4}$  mol/L 以上时, $A_{563}$  随着 MB 浓度的增大而降低,这可能由于亚甲基蓝浓度的增加,溶液遮光性增强,反应体系的透光率下降,从而影响 MB 总体的吸光性,因此体系的光量子产率反而下降,这一现象与文献[11]的结论一致。

### 2.3 光照时间对 $A_{563}$ 的影响

实验发现,在光敏剂的浓度一定时,将 DPCI 与光敏剂的混合溶液光照不同时间,光敏氧化效率可分为 3 个阶段,见图 2。从图 2 中可以看出,在 0—2min 内, $A_{563}$  曲线斜率很大,2min 时对 DPCI 已有 80% 的氧化效果,造成该现象的原因可能与在光照初期溶液中的溶解氧浓度较高,容易生成  $^1O_2$  有关。在 2—30min 内, $A_{563}$  与光照时间呈线性关系:

$$A_{563, MB} = 0.2400 + 0.0017t \quad (R=0.9932)$$

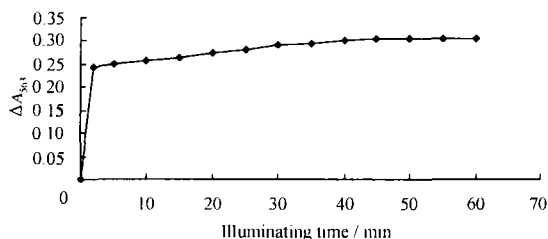


Fig.2 The relationship between  $A_{563}$  and illuminating time

但 30min 后, $A_{563}$  的增量与时间不再呈线性关系,有迅速变缓的趋势。因此, $A_{563}$  与光辐照时间的关系表明:在光疗过程中,光辐照的时间并不需要很长,一般控制 30min 左右就能够达到应有的效果。

### 2.4 分子氧对 $A_{563}$ 的影响

根据宋心琦等<sup>[12]</sup>的光敏化机制,在底物 DPCI

被光敏氧化的过程中一定得有氧的参与。为此，我们进行了不同条件的实验比较。一组利用氮气对反应体系除氧 10min 并且在氮气的保护下进行光照；另一组在通氧气的条件下光照。实验发现，以原体系相比，前者的  $A_{563}$  值最小，但不为零；后者也没有使  $A_{563}$  大幅度的增加，见表 2。这一点也支持了本文 2.3 中的论点，即体系中保证一定量的氧气有利于迅速产生足够的  $^1O_2$ ；但从通氧气的对照实验上看，光敏氧化过程对氧气的需要量又是有限的，文献[13]报告当氧气的浓度高于  $10^{-5}$  mol/L 时就能够获得较好的效果，这一特点为光动力学提供了便利的条件。

**Table 2 The effects of different conditions of  $O_2$  on  $A_{563}$  ( $C_{MB} = 2.4 \times 10^{-5}$  mol/L, 3000lx, 30min)**

Reaction conditions	$A_{563}$
DPCI+MB	0.330
DPCI+MB(loading $N_2$ )	0.049
DPCI+MB(loading $O_2$ )	0.356

### 2.5 抑制剂对光敏氧化过程的影响

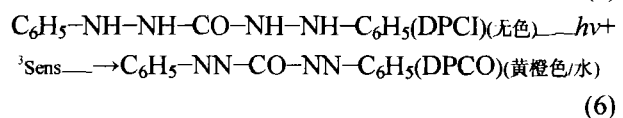
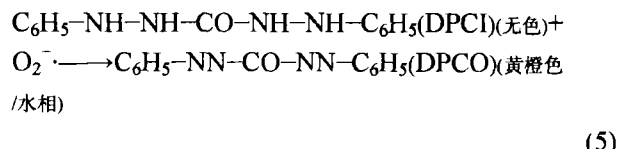
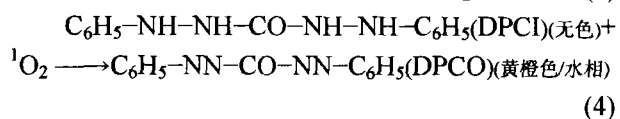
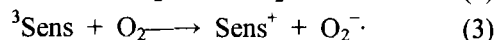
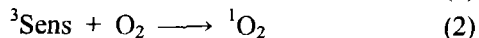
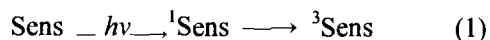
在该体系下，利用  $\Delta A_{563}/A_{563}$  值的大小来评价几种常见的抗氧化剂甘露醇、抗坏血酸、黄酮类抗氧化剂及类胡萝卜素等的抗氧化效果，见表 3。从表 3 中可以看出，在相同剂量下，类胡萝卜素是最好的天然抗氧化剂；黄酮类抗氧化剂及抗坏血酸的效果次之；甘露醇只有在较高的剂量下，才能获得较好的效果。从而可见不同的抗氧化剂的抗氧化机理不同，类胡萝卜素为三重态能量转移受体，对猝灭三重态有很好的效果；而黄酮类抗氧化剂属于自由基清除剂。因此，可以得出体系中 DPCI 被氧化为 DPCO 主要是通过单线态氧的氧化作用。

**Table 3 Contrasting effects of different antioxidants produced by photosensitizer MB during illuminating radiation ( $A_{563} = 0.330$ )**

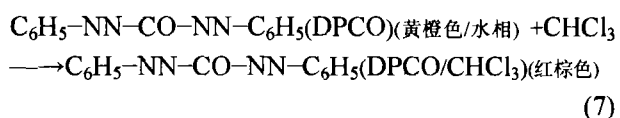
Antioxidants	Concentration level (mol/L)	$\Delta A_{563}$	$\Delta A_{563}/A_{563}$
Mannite	$200.0 \times 10^{-6}$	0.098	0.30
Vitamin C	$2.0 \times 10^{-6}$	0.106	0.32
Rutin	$2.0 \times 10^{-6}$	0.131	0.40
Puerarin	$2.0 \times 10^{-6}$	0.144	0.44
Carotenolds	$2.0 \times 10^{-6}$	0.201	0.61

通过以上对光敏氧化过程影响因素的综合分析，可以初步认为利用该体系中 DPCI 被氧化为

DPCO 建立的测试原理，其机理主要包括以下几个反应过程：



电子转移或氢转移



从活性氧的产生形式上看以 (2) 式为主，(3) 式次之；从活性氧对 DPCI 的氧化过程上看，单线态氧氧化过程占优势，自由基类活性氧氧化次之，光致质子转移过程可能也参与了 DPCI 向 DPCO 的转化过程。

### 3 结论

(1) 光敏剂在光照条件下产生的活性氧能够氧化二苯基碳酰肼，生成红色二苯基碳酰肼。利用其在最大吸收波长 563.0nm 处的  $A_{563}$  值可以作为快速筛选高效光敏剂的依据； $\Delta A_{563}/A_{563}$  可以作为快速筛选高效抑制剂的依据。

(2) 光敏剂浓度对  $A_{563}$  的影响结果表明，在光疗过程中光敏剂的浓度并不需要很高，就能够使反应体系产生足够的活性氧。

(3)  $A_{563}$  与光照时间的关系表明在光疗过程中，光辐照的时间并不需要很长就能够获得较好的效果。

### 参考文献

- Ochner M J. Photochem Photobil B: Biol, 1997, 39(1): 1-13
- Berg K, Moan J. Photochem Photobil, 1997, 65(4): 403-409
- Henderson B W, Dougherty T J. Photochem Photobil, 1992, 55(2): 1-6: 145-157
- Moan J, Berg K, Kvan E *et al.* Intracellular localization of photosensitizers. In: Bock G, Harnett S. (Eds), Photosensit-

- izing compounds: their chemistry, biology and clinical use, Wiley and Sons, New York, 1989. 95-111
- 5 Keller G S, Doirou D, Weingarten C *et al.* Arch Otolaryngol, 1985, **11**(7): 437-440
- 6 杨耀武, 吕春堂, 吴洋等. 第四军医大学学报, 1997, **18**(6): 582-585  
YANG Yaowu, LU Chuntang, WU Yang *et al.* J Fourth Military Medical University, 1997, **18**(6): 582-585
- 7 杨耀武, 吕春堂, 赵晋龙等. 华西口腔医学杂志, 2000, **18**(3): 159-162  
YANG Yaowu, LU Chuntang, ZHAO Jinlong *et al.* J Mouth Medical Science of WestChina, 2000, **18**(3): 159-162
- 8 顾英, 李峻亨, 陈华等. 中国激光医学杂志, 1992, **1**(2): 81-84  
GU Ying, LI Junheng, CHEN Hua *et al.* J Chinese Laser Med Surg, 1992, **1**(2): 81-84
- 9 LIU Jianbo, SONG Xinqi, ZHANG Fushi *et al.* Science in China (Series B) China, 1997, **40**(1): 192-196
- 10 洪法水, 魏正贵, 赵贵文等. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(3): 381-386  
HONG Fashui, WEI Zhengui, ZHAO Guiwen *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2001, **28**(3): 381-386
- 11 何锡文, 冯喜增, 沈含熙. 分析科学学报, 1995, **11**(4): 1-6  
HE Xiwen, FENG Xizen, SHEN Hanxi. J Analytical Science, 1995, **11**(4): 1-6
- 12 宋心琦, 周福添, 刘剑波. 光化学-原理·技术·应用. 北京: 高等教育出版社, 2001. 204-205  
SONG Xinqi, ZHOU Futian, LIU Jianbo. Photochemistry...Principles, Technigues, Applications...Beijing: Advanced Education Press, 2001. 204-205
- 13 Frimer A A. Singlet Oxygen. CRC Publishing, Boca Raton FT, 1985. 1-4

### Experimental study on photosensitizers and antioxidants and assessment of their effects in the photo-curing process

LIU Deqi

(The Chemical Department of University, Suzhou 215006)

**ABSTRACT** In the photo-curing dynamic process and the control of photo-oxidation, the selection of excellent photosensitizers is very important. The method of fast filtration photosensitizers and antioxidants has been brought forward in this paper. DPCO is produced from DPCI oxidized by activated oxygen, which is produced by photosensitizers during exposure to light, and the maximum wavelength of DPCO extracted by  $\text{CHCl}_3$  is 563.0nm. The fast, dependable, simple method of filtration photosensitizers is based on  $A_{563}$ , and antioxidants elected according as  $\Delta A_{563}/A_{563}$ .

**KEYWORDS** Photodynamic therapy(PDT), Photosensitizers, Antioxidants, Filtration, Spectrophotometric method  
**CLC** R785.5, O64, TQ577.34