

鬼臼毒素及其衍生物的化学活性研究^[20]

汪世龙 姚思德¹ 王 玫 李义久 张志成² 张曼维²

(同济大学测试中心 上海 200092)

¹(中国科学院辐射化学开放研究实验室, 上海原子核研究所 上海 201800)

²(中国科技大学应用化学系 合肥 230026)

摘要 运用脉冲辐解和激光光解技术, 对鬼臼毒素及其衍生物的光学活性和化学活性进行了详细的研究。结果表明: 它们不仅在激光作用下具有很强的光敏性, 而且还有多个活性基团分别与水合电子、氢原子、羟基自由基作用生成不同的瞬态粒子, 且推断了相应的反应机理。为医学工作者进一步了解和利用鬼臼毒素, 化学工作者合成更高抗肿瘤活性和低毒性物质提供参考。

关键词 鬼臼毒素及其衍生物, 脉冲辐解, 激光光解, 抗肿瘤活性

鬼臼毒素(Podophyllotoxin 简写 PPT) 是从我国西藏鬼臼等植物中提取分离的一种具有抗肿瘤活性的天然物质, 资源十分丰富^[1]。Wessely^[2]早在二、三十年代就对鬼臼毒素进行了研究。直到七十年代, 才在鬼臼毒素中分离出八种同分异构体^[3,4]。这八种物质在临床试验中都表现出一定的抗肿瘤活性, 但同时也发现它们对生物体具有很大的毒性。将这些物质进行一定的化学修饰, 使它变得既具有高的抗肿瘤活性, 又对生物体的毒性较低, 这一直是人们研究鬼臼毒素的热门课题。1972年, 半合成的依托泊甙(Etoposide VP-16) 研究成功并进入临床, 证明了 VP-16 是一种高活性的抗肿瘤药物, 它的作用机理与 DNA 有关^[5,6], 而且有别于上述鬼臼毒素的八种异构体。

近几年来, 上海医药工业研究院王志光等^[1,7]和国际上许多研究者对鬼臼毒素及其衍生物进行改性, 合成了许多新的抗肿瘤药物, 并进行了一些生理活性的研究^[8,9]。由于鬼臼毒素及其衍生物难溶于水, 这就阻碍了人们对其水溶液的研究, 尤其是对鬼臼毒素及其衍生物的各个活性基团尚未有完整的认识。而鬼臼毒素及其衍生物的生理作用都是在水溶液中进行的, 因而这方面的研究工作就显得十分重要。本文运用脉冲电子束辐解和激光光解时间分辨技术, 对鬼臼毒素及其衍生物水溶液的光学活性和化学活性进行了详细研究。证明鬼臼毒素的 C-4 位是一非常活泼的位置, 且具有很强的光敏性。同时发现鬼臼毒素及其衍生物的 C-1 位苯环、内酯环和 C-4 位的羟基可与水合电子、氢自由基和氢氧根自由基作用, 生成一系列的瞬态粒子, 从而可解释鬼臼毒素衍生物的毒性和抗肿瘤机理, 为鬼臼毒素的改性提供了一些证据。

1 实 验 部 分

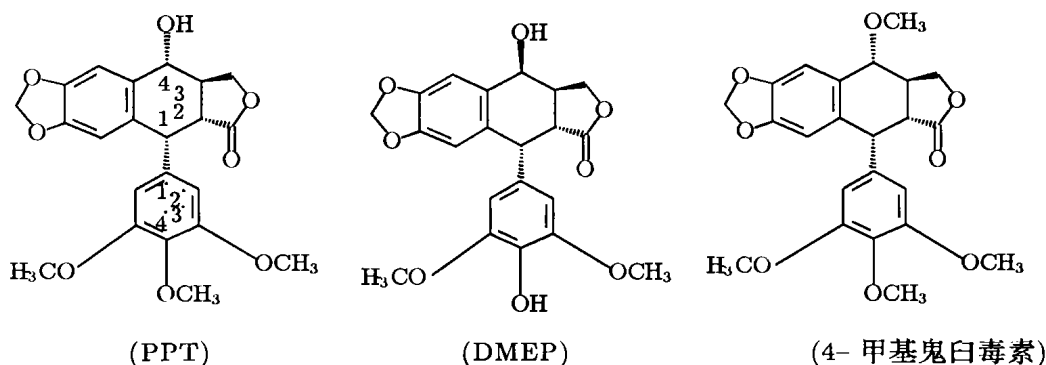
鬼臼毒素和去甲基表鬼臼毒素(4'-demethylepipodophyllotoxin 简写 DMEP) 经高效液相色谱检测均未发现任何杂质, 购入后直接使用, 4-甲氧基鬼臼毒素为自己合成。氢氧化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢钠、高氯酸均为分析纯, 未经纯化直接使用。所有溶液用三重蒸馏水配制, 在实验前用 99.99% 高纯氮气, 氧气或一氧化二氮鼓泡 20 min, 所有实验均在室温下进行。

[20] 收稿日期: 初稿 1996-04-02, 修回 1996-05-20

脉冲辐解所用的加速器为 10MeV 电子直线加速器, 电子脉冲宽度为 8ns , 单脉冲剂量为 $4\sim 45\text{Gy}$ 可调, 以空气饱和的 10mmol/L KCNS 水溶液进行单脉冲剂量测定。时间分辨分光光度检测系统为: 500W 氙灯产生的分析光(其强度在测量期间加亮 100 倍), 与脉冲电子束垂直相置, 经过光程为 20mm 的石英样品池, 进入 44W 型单色仪并用 IP28 光电倍增管检测。电信号由 HP54510B 数字示波器记录后, 存储于 486 计算机中, 并由计算机作数据处理^[10]。

激光光解所用的激光器是 KrF 气体激光器, 波长为 248nm , 脉冲宽度为 20ns , 每个脉冲的输出能量为 50mJ , 检测和数据处理装置同脉冲辐解装置^[10]。

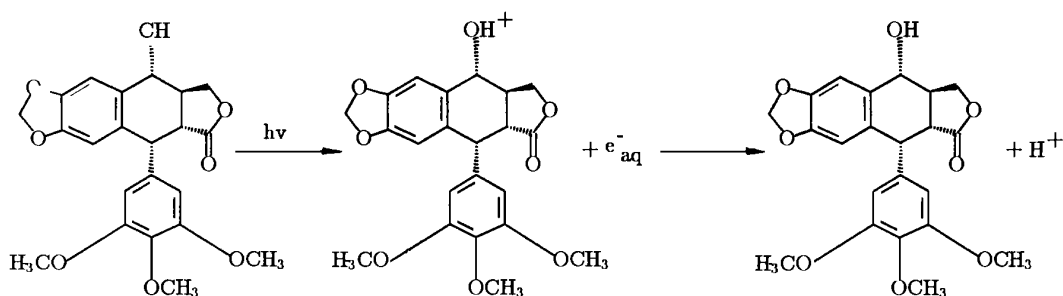
几种物质的结构式如下:



2 结 果 与 讨 论

2.1 光学活性的研究

配制 $1 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$ 的鬼臼毒素水溶液, 通氮气 20min 除氧, 经激光光解可得如图 1 所示的瞬态吸收光谱图, 从图上可以看出有 5 个吸收峰, 对此 5 个吸收峰进行详细的分析, 结果表明: 鬼臼毒素被 248nm 的激光电离, 生成一瞬态阳离子自由基和水合电子, 波长分别在 300nm 和 600nm 左右, 300nm 处的瞬态粒子不稳定, 在 $0.5\mu\text{s}$ 内就转化为 320nm 处的鬼臼毒素中性自由基, 且 300nm 处的衰减和 320nm 处粒子的生成是同步的。经反应动力学分析证明: 430nm 处的吸收峰是 320nm 处的一共振吸收峰, 370nm 处的吸收峰归为水合电子与鬼臼毒素作用所生成的鬼臼毒素阴离子自由基, 因 600nm 处粒子衰减和 370nm 处的粒子生成是同步的, 并与后面的脉冲辐解实验一致。改变溶液的 pH 值, 测出 320nm 处的瞬态粒子的最大吸收与 pH 的关系, 发现该瞬态阳离子自由基电离的 pK_a 为 8.57, 即在 $\text{pH}=8.57$ 时脱去质子生成中性自由基。若用 4-甲氧基鬼臼毒素做上述实验则得不到任何吸收峰, 比较两者的结构区别, 可以发现激光光解光电离是发生在 $\text{C}-4$ 位的羟基上, 随后分子内发生一系列的转化, 其具体反应机理可归纳如下:



在以氧气饱和的鬼臼毒素水溶液所做的激光光解实验中, 鬼臼毒素光电离产生的水合电子为氧气俘获转换成超氧自由基, 所以代表水合电子瞬态吸收的 600nm 水合电子亦以很高的反应速率常数与鬼臼毒素阳离子重合产生鬼臼毒素激发态, 此激发态可将激发能转移给氧生成单线态氧, 所以在此含氧体系中观察不到荧光。且超氧阴离子和单线态氧的存在已为其它实验所证明。实验证明鬼臼毒素在 248nm 的激光照射下, 由鬼臼毒素的浓度和生成水合电子的浓度求出光致电离产额超过 90% , 可以认为在含氧体系中鬼臼毒素水溶液的激光光解会产生高量子产额的超氧阴离子自由基和单线态氧, 这两者又是杀灭肿瘤细胞和正常细胞的最强的活性物质。这可能是鬼臼毒素的抗肿瘤机理和毒性机理。

若用去甲基表鬼臼毒素做上述实验, 结果表明 $\text{C}-4$ 位和 $\text{C}-4'$ 同时参加反应, 最大吸收在 310nm , 以 $\text{C}-4'$ 位的反应占主导地位, 由此看出去甲基表鬼臼毒素的 $\text{C}-4'$ 位的光敏性比 $\text{C}-4$ 更强。

2.2 化学活性的研究

2.2.1 与水合电子的作用 以氢氧化钾调节 $1 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$ 的鬼臼毒素水溶液的 $\text{pH}=12$, 通入 N_2 除氧 20min , 加入 $1 \times 10^{-2} \text{mol dm}^{-3}$ 特丁醇以清除水的辐解产物羟基自由基, 这样此体系中的主要反应是水合电子与鬼臼毒素的反应, 生成鬼臼毒素阴离子自由基, 该阴离子自由基的瞬态吸收光谱如图 2 所示: 由图 2 可以看出其最大吸收峰在 370nm 处, 在较短的时间

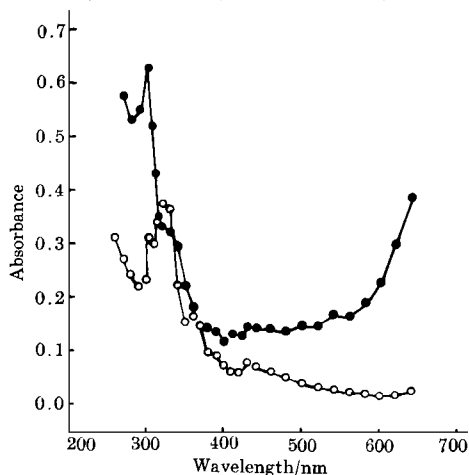


Fig.1 Transient absorption spectra after laser photolysis of 0.01mmol/L podophyllotoxin aqueous solution saturated with nitrogen at $\text{pH}=7$ (●) $0.1\mu\text{s}$ (○) $5\mu\text{s}$

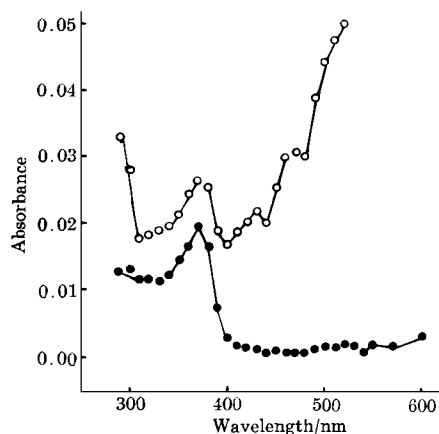
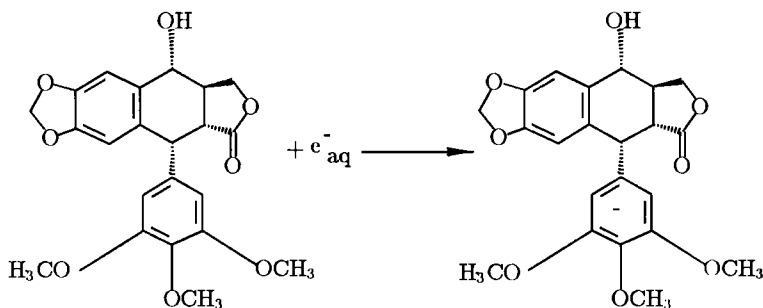


Fig.2 Transient absorption spectra after pulse radiolysis of 0.01mmol/L podophyllotoxin, 0.1mol/L t-BuOH aqueous solution saturated with nitrogen at $\text{pH}=12$ (●) $10\mu\text{s}$ (○) $5\mu\text{s}$



内可以观察到水合电子的特征吸收峰,随着时间的增加水合电子的吸收峰消失。若将鬼臼毒素的 C-1 苯环改成其它结构则得不到此吸收峰,由此可见水合电子进攻的是 C-1 位的苯环。通过对溶液 pH 值的改变,发现在 $\text{pH}=3.24$ 时,先有与 370nm 处粒子生成和衰减曲线一样的过程,紧接着又有与 340nm 处粒子一样的粒子生成,由此可以分析,整个过程是先生成瞬态阴离子再经质子化转换成寿命较长的中性自由基,其化学反应过程如上:

2.2.2 与氢原子的作用 以高氯酸调节 $1 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$ 的鬼臼毒素水溶液的 pH 值为 1, 加入 $1 \times 10^{-2} \text{mol dm}^{-3}$ 的特丁醇, 通氮气 20min , 这样该体系经脉冲辐解产生的初级粒子只剩下氢原子, 氢原子加成到鬼臼毒素上形成的自由基可得如图 3 所示的瞬态吸收光谱。从图 3 可以看出, 瞬态粒子的最大吸收在 340nm , 若将内脂环水解则得不到此吸收峰, 由此可以说明氢自由基进攻的是鬼臼毒素的内酯环, 其反应机理如下:

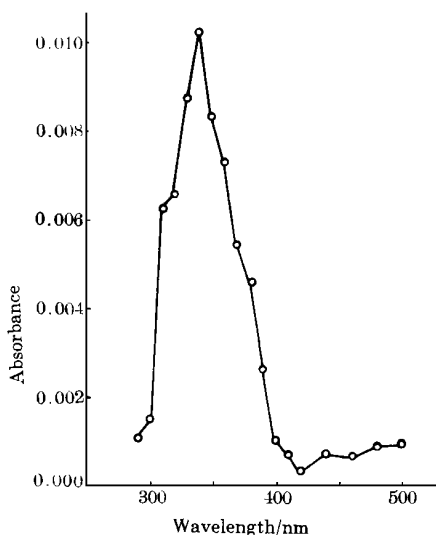
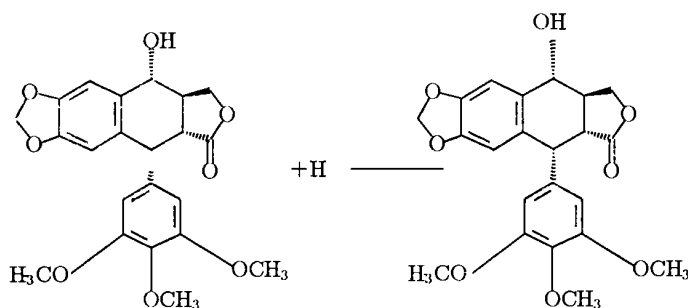


Fig.3 Transient absorption spectrum after pulse radiolysis of 0.01 mmol/L podophyllotoxin 0.1 mol/L $t\text{-BuOH}$ aqueous solution saturated with nitrogen at $\text{pH}=1$

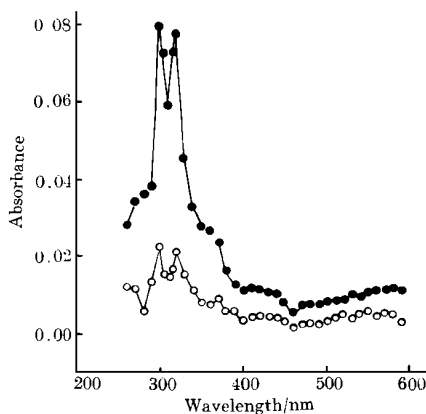
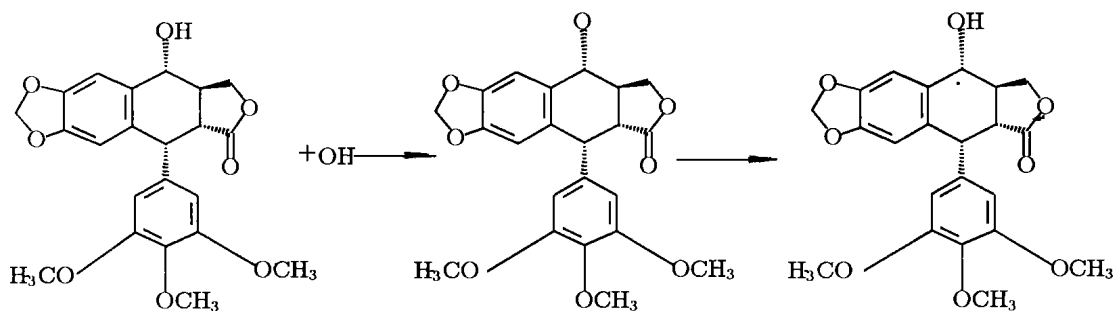


Fig.4 Transient absorption spectra after pulse radiolysis of 0.01 mmol/L podophyllotoxin aqueous solution saturated with nitrous oxide at $\text{pH}=12$

(●) $0.5 \mu\text{s}$ (○) $5 \mu\text{s}$

2.2.3 与羟基自由基的作用 以氢氧化钾调节 $1 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$ 的鬼臼毒素水溶液的 pH 为 12, 通 NO_2 20min , 除去水的辐解产物水合电子, 这样脉冲辐解后剩下的初级粒子只有羟基自由基了。羟基自由基与鬼臼毒素反应可得如图 4 所示的瞬态吸收光谱。

从图 4 中可以看出, 瞬态的最大吸收峰在 300nm 和 320nm , 其最大吸收峰虽与激光做用的最大吸收峰有相似之处, 但其生成过程和机理却不同。若用 4-甲氧基鬼臼毒素做此实验则得不到任何吸收峰, 由此发现羟基自由基作用的是 C-4 位羟基, 先抽去 C-4 位羟基上的氢, 生成苄氧自由基, 最终获得处于 C-4 位的中性自由基。其反应机理如下:



以上的脉冲辐解结果表明, 鬼臼毒素分子中可能有三个活性点: C-1 位的苯环、内酯环、C-4 位羟基。由这些活性点确定了鬼臼毒素及其衍生物的抗肿瘤活性和毒性, 改变不同的基团, 得到不同活性的鬼臼毒素衍生物, 是医学工作者和化学工作者努力的方向。

3 结 论

鬼臼毒素分子中有多个活性基团, 在 248nm 激光作用下可发生光致电离生成 300nm 处的阳离子自由基转化为 320nm 处的阳离子自由基, 再脱去质子成中性自由基; 在脉冲辐解过程中, 分别可以与水合电子、氢自由基、氢氧根自由基作用生成不同的瞬态中间体, 该分子既可以被氧化亦可以被还原, 具有保护和损伤组织分子的功能。人们可以将鬼臼毒素的活性基团进行改性, 增加其抗肿瘤活性, 减轻其毒性的目的。

致谢 中国科技大学结构中心李前荣为本实验提供了样品, 中科院上海原子核研究所辐化开放实验室郑智德、颜清泉、王在兰和董继荣等在脉冲辐解和激光光解实验中给予帮助, 特此感谢

参 考 文 献

- 1 王志光, 尹述凡等. 中国药医工业杂志, 1992, 23(2):65
- 2 Spath, Wessely Kornfeld. *Über die Konstitution, Von Podophyllotoxin and Pikropodoohyllotoxin*, 1932, 544
- 3 Aiyar V N, Frederic C C. *J Org Chem*, 1977, 42(2):246
- 4 Aiyar V N, Ferderic C C. *J Org Chem*, 1975, 40(16):2384
- 5 Gensler W J, Gatsonis C D. *J Org Chem*, 1966, 31:4004
- 6 John D, Loike, Susan B. *Biochem*, 1976, 15:5443
- 7 王志光. 中国医药工业杂志, 1992, 23(4):159
- 8 Ayres D C, *et al.* *J Chem Soc Perkin Trans*, 1973, 1:2059
- 9 Margaret B, Glinski, James C. *J Org Chem*, 1987, 52:2749
- 10 Yao Side, Sheng Shugang, Cai Jianhua, Zhang Jiashen, Lin Nianyun. *Radiat Phys Chem*, 1995, 46(1):105

(下转第 85 页 Continued to p85)

COMPARISON OF X- AND γ -RADIATION DAMAGE ON OPERATIONAL AMPLIFIERS

Chen Panxun

(*Institute of Applied Electronics, China Academy of Engineering Physics, Chengdu 610003*)

ABSTRACT Character change of operational amplifiers was compared in X-and γ radiation enviroments. Dose enhancement effect ofX- and γ - radiation was studied to opera-tional amplifiers. Relative dose enhancement factors (RDEF) measured are about 3.4~12.4 in the experiment. SiO₂/Si interface trapped hole charges and interfacestates are main failure model of operationalamplifiers in X-and γ radiation enviroments.

KEYWORDS Operational amplifier, X-ray, γ ray, Radiation damage, Dose enhance-ment effect

(上接第 90 页 Continued from p90)

STUDY ON THE CHEMICAL ACTIVITY OF PODOPHYLLOTOXIN AND ITS DERIVATIVES

Wang Shilong Yao Side⁽¹⁾ Wang Mei LiYijiu Zhang Zhicheng⁽²⁾ Zhang Manwei⁽²⁾
(*Analysis and Research Centre of TongJi University, Shanghai 200093*)

⁽¹⁾(*Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of NuclearResearch, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800*)

⁽²⁾(*Deparment of Application Chemistry, University of Science and Technolo gy of China, Hefei 230026*)

ABSTRACT The laser flash photolysis and pulse radiolysisof podophyllotoxin and its derivatives have been performed for the first time. The mechanism of photo-ionization has been confirmed and illustrated. Podophyllotoxin and its derivatives are high photosensitivity (UV) and can be readily photo-ionized to produce some transient species, which will be in-duced biological toxicities. In addition, they can react with hydrated electron, hydrogen radi-cal and hydroxyl radical. This will give chemist some advice to synthesize new derivatives of podophyllotoxin in cancer treatment.

KEYWORDS Podophyllotoxin and its derivatives, Pulse radiolysis, Laser flash photol-ysis, Anti-tumour activity