

ADE 光诱导原初过程的时间分辨研究: I. 合成及溶液中的光物理

潘景喜¹ 林维真¹ 韩镇辉¹ 李荣群¹ 王文锋¹
姚思德¹ 林念芸¹ 朱大元²

¹(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室 上海 201800)

²(中国科学院上海药物研究所 上海 200031)

摘要 利用纳秒级激光光解和脉冲辐解技术对放线菌素 D(AMD)的模型化合物 2-氨基-4,6-二甲基-3-吩噻嗪酮-1,9-二甲酸甲酯(ADE)的光物理性质进行了系统研究,确认了 ADE 光解时产生的瞬态物种,并测得了其激发三重态的自猝灭速率常数、摩尔消光系数和量子产额等重要光物理参数。这些结果将为详细了解 ADE 以及放线菌素 D 的光动力作用过程提供理论依据。

关键词 放线菌素 D,激光光解,激发三重态,光物理

中图分类号 O644.2

放线菌素 D(AMD)是一种临床应用的抗癌化疗药物,它的抗癌作用被认为是由于其能够与双链 DNA(dsDNA)结合进而阻止了 DNA 的复制引起的^[1,2]。后来出现了有关 AMD 的其它应用的报道,Gabbara 和 Davis 等^[3,4]发现,它可以有效抑制 HIV 病毒逆转录酶。由于 AMD 的发色团在可见光区有很强的吸收,Zhdanov 等^[5]做了细胞实验,首次报道了 AMD 的光动力作用可杀死逆转录病毒。本工作曾利用 EPR 技术研究了 AMD 的光动力作用过程,结果发现 AMD 在光激发下可以通过电子转移机制氧化 DNA^[6]。所有这些研究都为 AMD 将来开发成为光敏药物提供了理论依据。

为了更详细地了解 AMD 的光敏性质,合成了 AMD 的模型化合物 ADE。与 AMD 相比,ADE 只是吸收可见光的发色团部分,缺少了两个五肽内酯环。这种结构的改变使得 ADE 与 DNA 的相互作用没有了序列选择性,而且也不能抑制以 DNA 为模版的 RNA 的合成^[7],但它确实能和双链 DNA(dsDNA)发生嵌入或结合^[7]。利用激光光解技术对 ADE 激发三重态在溶液中的光物理性质进行了详细研究。

1 材料和方法

2-硝基-3-羟基-4-甲基苯甲酸, β -胡萝卜素为 Aldrich 公司产品。Pd/C(10%)从 Acros 公司购得。甲醇,浓硫酸均为分析纯。乙腈,苯,乙醇经过重蒸,二苯甲酮(BP)经重结晶。

激光光解实验所用激光器为 XeCl(308nm)和 N₂(337nm)准分子激光器,脉冲宽度为 20ns,单次脉冲最大能量分别为 40mJ 和 5mJ。脉冲辐解实验所使用的加速器为 10MeV 电子

国家自然科学基金(39830090)资助

第一作者:潘景喜,男,1973 年出生,2001 年毕业于中国科学院上海原子核研究所,辐射化学专业,博士

收稿日期:初稿 2001-12-18, 修回 2002-04-30

直线加速器,电子脉冲宽度为 8ns,单脉冲剂量为 10Gy,以空气饱和的 10mmol/L KSCN 水溶液作为化学剂量计,取 $\epsilon_{(\text{SCN})_2^{\cdot-}}(480\text{nm}) = 7600\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

2 结果和讨论

2.1 ADE 的合成

放线菌素 D 模型化合物 ADE 的合成参照文献[8,9]并作了适当改进。2-硝基-3-羟基-4-甲基苯甲酸(I)首先在 H_2SO_4 催化下进行酯化,产物 II 经 10%Pd/C 催化的氢化反应将分子中的硝基转化成胺基,得到的产物再经氧化二聚反应形成目标化合物 ADE。用乙酸乙酯将粗产品重结晶得到很好的桔红色针状晶体。合成 ADE 的整个过程可以用下式概括

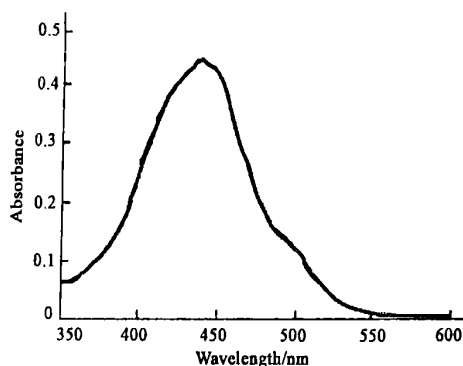
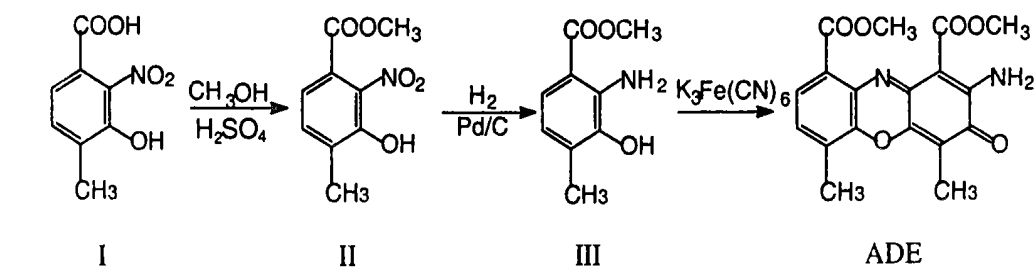


Fig.1 The absorbance spectrum of ADE at ground state

2.1.1 熔点 195—196℃(分解)(文献[10]中为 194—195℃)。CIMS 中分子离子峰为 357,说明 ADE 分子量为 356(理论计算值为 356.33)。NMR (CDCl_3): δ 2.23(3H, s, 4- CH_3), 2.52(3H, s, 6- CH_3), 4.00(3H, s, COOCH_3), 4.02(3H, s, COOCH_3), 7.32(1H, d, 7-H), 7.62(1H, d, 8-H)。IR (KBr): 3415.4, 3295.8, 1710.6, 1668.2, 1587.2, 1436.7, 1296.0, 1263.2, 1205.3, 1130.1, 1012.5 cm^{-1} 。

2.2 ADE 的激发三重态的特征吸收

2.2.1 ADE 激光激发所产生的瞬态吸收谱 氮气条件下,在 pH=7.0 的乙腈/水(V/V=4:1)溶液中,0.08mmol/L 的 ADE 激光(308nm)光解得到的瞬态吸收谱如图 2 所示。激光脉冲后 0.12 μs ,在 330nm 和 500nm 附近出现两个较强的吸收峰。30 μs 时,随着这两个吸收峰的衰减,出现了两个新的吸收峰(最大吸收波长约为 360nm 和 530nm)。由于新生成的瞬态物种在 500nm 基本上没有吸收,所以 500nm 处的衰减曲线(见图 3b)应归属为单纯的最初产生的瞬态物种的衰减,而在 340nm 处,最初产生和后来形成的瞬态物种都有吸收,所以该处的衰减曲线(见图 3a)是两者的叠加。按照吸收比例将图 3a 中叠加的衰减扣除,得到了新物种的生成曲线(见图 3c)。由于曲线 b 的衰减与曲线 c 的生成是完全同步的,可以认为新物种是由最初产生的物种反应以后生成的,而不是来自于激光的直接激发。

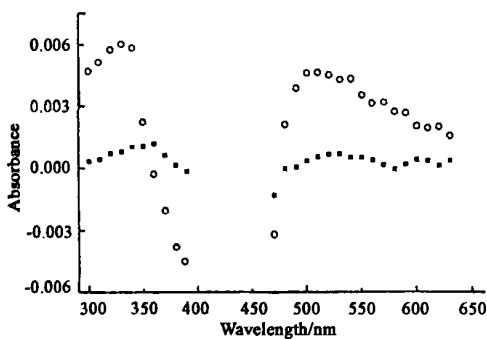


Fig. 2 Transient absorbance spectra from N_2 saturated 0.08 mmol/L ADE in acetonitrile aqueous solution 0.12 μs , ○, and 30 μs , ■. After the flash of 308 nm laser

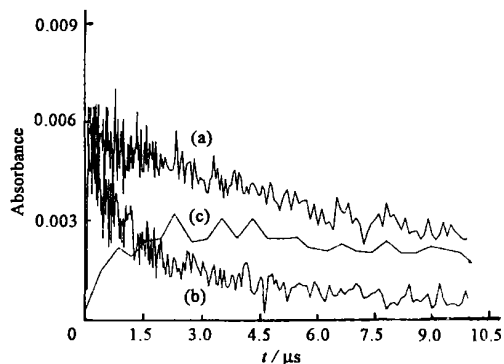


Fig. 3 Transient decay traces of N_2 saturated 0.08 mmol/L ADE in acetonitrile aqueous solution after the flash of 308 nm laser (a). 340 nm, (b). 500 nm, (c). the buildup trace obtained by subtracting trace b from trace a

2.2.2 ADE 激发三重态的验证 激发三重态的一个重要特征是能够被 O_2 猝灭,而生成的 $^1O_2$ 在可见光区没有吸收。在空气饱和条件下,我们确实发现该瞬态物种的衰减明显加快,2 μs 时已经完全衰减,所以将最初产生的吸收谱归属为 ADE 激发三重态($^3ADE^*$)的吸收。但由于一些自由基也能被 O_2 猝灭,因此还需要用别的方法来证明这一归属的正确性。

能量转移法是证明激发三重态的有效方法。 $^3ADE^*$ 可以将能量传递给三重态能量较低的化合物,同时 ADE 也可以从三重态能量更高的化合物接受能量形成 $^3ADE^*$,相反地,自由基则不会发生这种反应。图 4 给出了含有 ADE 和 β -胡萝卜素的溶液光解后得到的瞬态吸收谱,从图 4 中可以看出,激光脉冲后 8 μs ,随着 330 nm 和 500 nm 处瞬态吸收的衰减,在 520 nm 处出现了一个新生成物质的吸收,它与 β -胡萝卜素激发三重态的吸收是完全一致的。由于所用浓度的 β -胡萝卜素在 308 nm 处吸收很小,而且其直接激发三重态量子产额极低,所以该吸收是由于 $^3ADE^*$ 将能量传递给 β -胡萝卜素产生的。从图 4 中的生成-衰减曲线也可以清楚地看到这一能量转移过程。

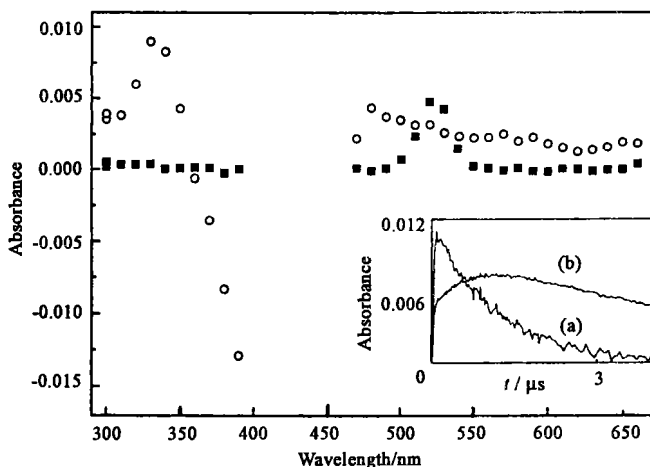
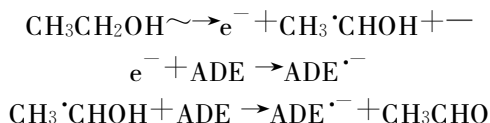


Fig. 4 Transient absorbance spectra from N_2 saturated ADE contained with β -carotene in acetonitrile aqueous solution 0.12 μs , ○, and 8 μs , ■. After the flash of 308 nm laser. Insert: traces obtained at (a). 490 nm, (b). 520 nm

另外,我们还用了蒽作为能量给体研究了它与 ADE 之间的能量转移反应。图 5 是含蒽(0.2mmol/L)和 ADE(0.02mmol/L)的乙腈溶液激光(337nm)脉冲后 5 μ s 的瞬态吸收光谱。由于在此条件下,激光首先被蒽吸收形成蒽的激发三重态,所以 $^3\text{ADE}^*$ 只能通过能量转移产生。图 5 中蒽的三重态衰减(曲线 a)和 $^3\text{ADE}^*$ 的生成(曲线 b)是同步的也说明了这一点。所有这些结果都表明,图 2 中最初产生的两个吸收峰为 $^3\text{ADE}^*$ 的吸收。

2.2.3 阴离子自由基的证明 脉冲辐解是产生 ADE 阴离子自由基($\text{ADE}^{\cdot-}$)的有效方法。脉冲电子与含有 ADE 的乙醇溶液作用时,发生如下反应



最终只有 $\text{ADE}^{\cdot-}$ 的吸收,如图 6 所示。图 2 中 $^3\text{ADE}^*$ 衰减后生成的新物种的吸收与该吸收谱是一致的,所以也应该归属为 $\text{ADE}^{\cdot-}$ 的吸收,它是由 $^3\text{ADE}^*$ 与基态的 ADE 发生反应所生成的。

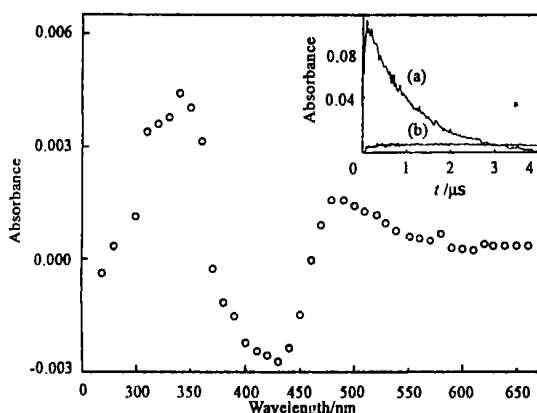


Fig. 5 Transient absorbance spectra from N_2 saturated 0.02mmol/L ADE contained with 0.2mmol/L anthracene in acetonitrile aqueous solution 5 μ s after the flash of 337nm laser. Insert: traces obtained at, (a). 270nm, (b). 340nm

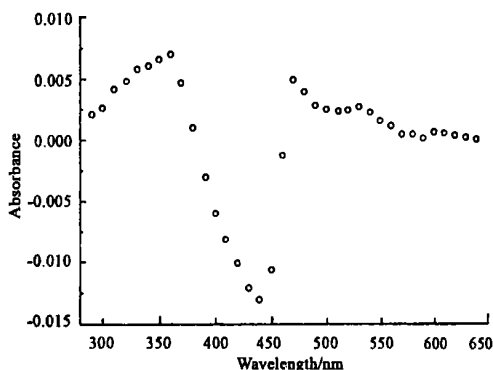


Fig. 6 Transient absorbance spectrum from N_2 saturated 0.05mmol/L ADE in acetone solution 3 μ s after the electron pulse

2.3 激发三重态的自猝灭机理

图 7 是 $^3\text{ADE}^*$ 在苯体系中的衰减曲线的动力学拟合情况,从图 7 中可以看出,其衰减很好地符合一级衰减动力学,说明其衰减主要是由 $^3\text{ADE}^*$ 与基态 ADE 分子之间发生碰撞引起的。因为被激发的 ADE 相对于处于基态的 ADE 分子来说可以忽略不计,基态 ADE 的浓度仍可以视为常数。而如果是 $^3\text{ADE}^*$ 分子之间的碰撞,则不能满足上述条件,也就不可能是一级反应。

而且我们发现,基态 ADE 浓度越高, $^3\text{ADE}^*$ 的衰减越快,这进一步说明 $^3\text{ADE}^*$ 的衰减主要是由它与基态 ADE 之间发生双分子碰撞引起的。以不同浓度下的表观速率常数·对浓度作图,求得 $^3\text{ADE}^*$ 的自猝灭速率常数为 $4.75 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ 。

2.4 $^3\text{ADE}^*$ 的摩尔消光系数

能量转移法是测定摩尔消光系数的方法中最常用的一种。在本研究中 β -胡萝卜素是一种优良的能量接受剂,它不但在研究所用激发波长(308nm)下吸收很小,且由于其三重激发态能量(75KJ/mol)低,使它们之间能够发生有效的能量转移,生成 β -胡萝卜素的三重激发态。

苯体系中, β -胡萝卜素激发三重态的吸收位于 525nm, 相应的摩尔消光系数为 $130000 \pm 10000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。配制一定浓度的 ADE 的苯溶液(0.1 mmol/L), 其中加入梯度稀释浓度的 β -胡萝卜素($0.025\text{--}0.125 \text{ mmol/L}$)。对实验所得 525nm 动力学曲线拟合, 求得能量转移的速率常数 $K_q = 2.0 \times 10^9 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。当 β -胡萝卜素的浓度为 0.125 mmol/L 时, 结合前面求得的自猝灭速率常数, 求得 $P_{\text{tr}} = 0.71 (P_{\text{tr}} = K_q[\beta - C] / \{ K_s[S] + K_q[\beta - C] \})$ 。根据公式 $\epsilon'_T = \epsilon_T (OD' / OD) P_{\text{tr}}$ 求得 ADE 激发三重态摩尔消光系数为 $45500 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

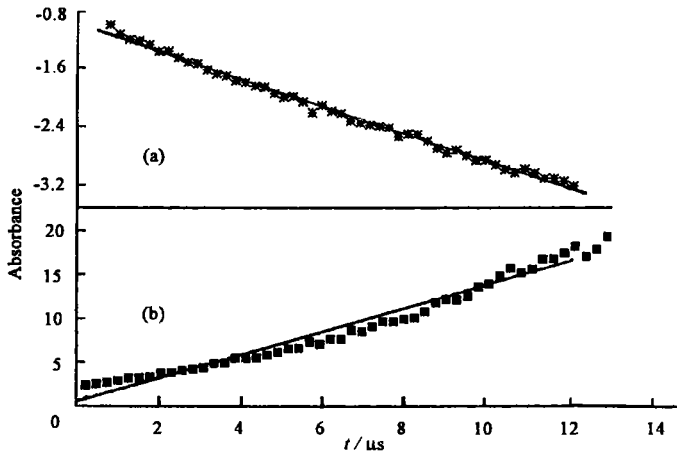


Fig.7 Computer analytic plots from laser photolytic induced transient trace of 0.25mmol/L ADE in benzene solution recorded at 490nm, (a). The first order decay, (b). The second order decay

2.5 激发三重态的量子产额

本研究以二苯甲酮(BP)为标准光敏剂, 它在苯中激发三重态量子产额为 1, 而且已知在 525nm 处的摩尔消光系数为 $7870 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [10]。图 8 给出了 BP 和 ADE 分别在 525nm 和 490nm 处的 OD 值对激光能量的相关线, 它们斜率由线性拟合求得。最后, 根据公式 $\Phi_{\text{待测}} = \text{Slope}_{\text{待测}}(\epsilon\Phi)_{\text{标}} / \text{Slope}_{\text{标}}(\epsilon\Phi)_{\text{待测}}$ 求得³ADE* 的量子产额, 与其它参数一并列于下表 1。

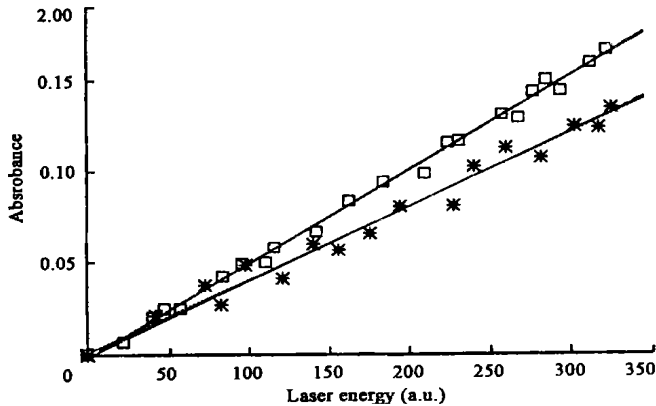


Fig.8 The linear relations between absorbance of triplet states of BP □ or ADE, * to laser energies, obtained at 525nm and 490nm respectively

Tab.1 The quantum yield of the triplet state ADE and its rate constants and ϵ value at 490nm

	Quantum yield	$K_s(\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$K_q(\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$	$\epsilon_{(490\text{nm})} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
ADE	0.128	4.75×10^8	2.0×10^9	45500

3 结论

本文成功合成了放线菌素 D 的模型化合物 ADE, 并利用纳秒级激光光解和脉冲辐解技术详细研究了 ADE 在溶液中的光物理性质; 确认了 ADE 光解时产生的瞬态物种主要是激发三重态, 并测得了其激发三重态的自猝灭速率常数、摩尔消光系数和量子产额等重要光物理参数, 这些结果将为详细了解 ADE 以及放线菌素 D 的光动力作用过程打下了基础。

参 考 文 献

- 1 White R J, Phillips D R. *Biochemistry*, 1988, **27**: 9122—9132
- 2 Sobell H M, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **82**: 5328—5331
- 3 Gabbara S, Davis W R, Hupe L *et al.* *Biochemistry*, 1999, **38**: 13070—13076
- 4 Davis W R, Gabbara S, Hupe D *et al.* *Biochemistry*, 1998, **37**: 14213—14221
- 5 Zhdanov V M, Yershov F I. *J Cell Physiol*, 1965, **65**: 433—434
- 6 Pan J X, Liu Y, Zhang S P *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1527**: 1—3
- 7 Ascoli F, Savino M, Liquori A M. *Nature*, 1968, **217**: 162—164
- 8 Angyal S J, Bullock E, Hanger W G *et al.* *J Chem Soc*, 1957, 1592—1602
- 9 Chu W, Kamitori S, Shinomiya M *et al.* *J Am Chem Soc*, 1994, **116**: 2243—2253
- 10 Wood P D, Johnston L. *J Photochem Photobiol*, 1997, **65**(5): 642—648

A TIME-RESOLVED STUDY ON THE PHOTODYNAMIC PRIMARY PROCESS OF ADE: SYNTHESIS AND PHOTOPHYSICS IN SOLUTION

PAN Jingxi¹ LIN Weizhen¹ HAN Zhenhui¹ LI Rongqun¹ WANG Wenfeng¹
YAO Side¹ LIN Nianyun¹ ZHU Dayuan²

¹ *Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research,
the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800*

² *Shanghai Institute of Materia Medica, Academy Sinica, Shanghai 200031*

ABSTRACT By using of laser flash photolysis and pulse radiolysis techniques, a study of photophysics of ADE, which is a kind of model compound of actinomycin D, was carried out in varied solutions. The transient species generated by photolysis were identified, and the self-quenching rate constant, extinction coefficient and quantum yield of the triplet state ADE were determined. These results will be helpful for understanding the photodynamic processes of ADE and actinomycin D.

KEYWORDS Actinomycin D, Laser flash photolysis, Excited triplet state, Photophysics
CLC O644.2