

分类号 O62

密级

UDC

编号 B978004402

中国科学院 博士学位研究生学位论文

新型卟啉的合成及性质研究

成 昊

指导教师 马金石 (研究员)

中国科学院感光化学研究所

申请学位级别 博士学位 学科专业名称 有机化学

论文提交日期 2000.6.12 论文答辩日期 2000.6.20

学位授予单位 中国科学院感光化学研究所

答辩委员会主席

分类号 O62

密级

UDC

编号 B978004402

中国科学院 博士学位研究生学位论文

新型卟啉的合成及性质研究

成 昊

指导教师 马金石 (研究员) ^{KG21/01}

中国科学院感光化学研究所

申请学位级别 博士学位 学科专业名称 有机化学

论文提交日期 2000. 6. 12 论文答辩日期 2000. 6. 20

学位授予单位 中国科学院感光化学研究所

答辩委员会主席

中文摘要

卟啉化合物因其生物活性以及结构上的特殊性,在很多领域内都引起广泛的关注。本文以卟啉为研究对象,进行了如下的研究工作:

1. 依照目前普遍接受的观点,具有适当亲水亲脂特性的光敏剂是最具前景的光疗药物。我们以简单易得的四苯基卟啉为母体化合物,通过一系列反应,合成了十二个卟啉化合物,并通过红外、紫外、质谱、核磁、元素分析等手段进行了表征。其中七个为未见文献报道的新化合物。两个终产物的溶解性质有很大改变,已具有某些亲水-亲脂特性,其中首次合成的 5-对-[N-(2-吡咯烷酮基)]苯基-10,15,20-三苯基卟啉 和 5, 10, 15, 20-四-对-[N-(2-吡咯烷酮基)]苯基卟啉,正如我们预想的由于吡咯烷酮的特殊性质,使它在极性溶剂中具有良好溶解性,比以前的卟啉在溶解行为上有很大的不同。
2. 采用紫外、荧光、闪光光解等手段对合成的化合物进行了光物理方面的研究。为化合物的进一步研究提供依据。一般来讲,由于溶剂与溶质分子间形成氢键、偶极化的影响,可以使溶质吸收波长发生位移。我们通过实验发现,尾链对卟啉结构的光谱行为的影响很小,且各化合物并未发现有溶剂效应。
3. 组成反胶束的表面活性剂对水团中的分子或离子的状态和性能影响很大,可用来研究分子的有序化和活动性。我们利用合成的两亲性的 5-对-[α -(三乙胺)乙酰胺基]苯基-10, 15, 20-三苯基卟啉盐酸盐进行了其在反胶束体系中的行为研究,推断了卟啉在该体系中处于反胶束的膜层,并未分散在有机相或水相中。这个结果说明它易于在细胞膜富集。
4. 利用合成的 5-对-[α -(三乙胺)乙酰胺基]苯基-10, 15, 20-三苯基卟啉盐酸盐的两亲性进行了其对脂溶性四苯基卟啉(TPP)的增溶行为研究,发现它对 TPP 很好的增溶,每一个 5-对-[α -(三乙胺)乙酰胺基]苯基-10, 15, 20-三苯基卟啉盐酸盐分子可增溶两个以上 TPP 分子。它的这种作用,可将某些优良性能的脂溶性卟啉的应用性扩展。
5. 卟啉化合物的聚集行为研究多在极性相差较大的两种溶剂中进行,我们利用

合成的 5, 10, 15, 20-四-对-[N-(2-吡咯烷酮基)]苯基卟啉进行了它在醇-水体系中的行为研究。通过对不同比例的醇-水体系进行实验, 发现随水含量的增加, 卟啉发生了聚集。导致紫外-可见光谱中 Soret 带吸收位置的红移和摩尔消光系数的降低。而荧光峰位置未发生变化, 但荧光强度变小。通过半经验量化计算, 给出了它的结构模型, 解释了分子偶极矩大的原因。

6. 卟啉化合物由于其特殊的络合结构, 引起人们的关注。本文也进行了卟啉化合物作为络合试剂用 HPLC 法检测痕量金属离子的研究。首次用合成的不对称尾式卟啉做络合试剂, 改进了络合物形成方法, 比较方便的进行了检测。通过与对称性的卟啉做比较发现, 不对称卟啉的应用更符合快速简便的要求。

7. 还进行了光敏剂作为绿色农药的初步研究。通过一系列合成的光敏剂进行了杀灭棉铃虫、蝗蝻和粘虫的实验, 部分光敏性化学物质能显著抑制棉铃虫幼虫的发育, 尤其对低龄棉铃虫幼虫和蝗蝻的作用更明显, 有可能成为有效控制害虫种群数量的光化学农药。和化学农药混合使用, 具有显著的增效作用。杀死粘虫的实验表明, 光敏剂对粘虫具有良好的毒力作用。以上实验国内外未见报道。

关键词: 卟啉 光物理 分析

Abstract

Cheng Hao (Organic Chemistry)

Directed by Professor Ma Jinshi

Porphyrins, an important kind of life-substance, have been widely used in many fields. Herein we reported our investigations on synthesis and property studies of some new porphyrins:

1. According to the acceptable point of view that the most promising photosensitizers used in PDT treatment should have suitably properties of amphiphilic. We synthesized 12 new porphyrin derivatives and the structures were confirmed by UV-VIS、IR、¹HNMR、MS and E.A. Thereinto two compounds, 5-p-[N-(2-pyrrolidinone)]phenyl-10,15,20-triphenylporphyrin and 5,10,15,20-tetra-p-[N-(2-pyrrolidinone)]phenylporphyrin, have good amphiphilic properties as expected. They have favourable solubility in polar solvents because of the special character of bearing 2-pyrrolidinone.
2. The spectral properties of these compounds were studied by UV-VIS、Fluorescence and Laser flash photolysis. Usually the absorption wavelength shifted on changing the solvents because the interaction between solutes and solvents. But as we observed, the tail-porphyrins doesn't have effect on the spectra.
3. Reversed micelles can be used to study the behavior of order and movement of molecules, in which the molecular or ionic conformation and properties may be affected by the surfactant. The behavior of synthesized 5-[p- α -(triethylamine)acetamide] phenyl-10,15,20-triphenylporphyrin chloride was studied in reversed micelles. We deduced that it contained in the membrane layer of reversed micelles, and didn't come into water phase or organic phase. The result showed the assemble ability of it in cell membrane.
4. We studied the interaction between 5-[p- α -(triethylamine)acetamide] phenyl-10,15,20-triphenylporphyrin chloride and TPP in water. We found that the 5-[p- α -(triethylamine)acetamide] phenyl-10,15,20-triphenylporphyrin chloride can

increase the solubility of TPP and one 5-[p- α -(triethylamine) acetamide] phenyl-10,15,20-triphenylporphyrin chloride molecule can make two TPP molecule to be solved. This function can enlarge the applied area of some lipophilic porphyrins.

5. The aggregation of porphyrins often being performed in the system contained two solvents that have great different polarity. We studied the assemble behavior of 5,10,15,20-tetra-p-[N-(2-pyrrolidinone)] phenylporphyrin in different proportions of ethanol-water system. This alcohol soluble porphyrin assembled with increasing the content of water. The Soret band bathochromically shifted and the molar absorptivity reduced in UV-Vis spectra. The position of fluorescence spectra didn't change and the intensity decreased. Semi-empiristic computation with AM1 method provided reasonable structural model and elucidated the large dipolarity of molecules.
6. Considering the remarkable high stability of metal porphyrin chelates and the similarity of the chelates absorbance, porphyrins are an ideal chelating reagent for determination of metal ions by HPLC. In our study the unsymmetrical tail-possessing porphyrins as chelating reagent gave successful determination of metal ions for the first time. Comparing with the symmetrical porphyrins, they gain better result in rapid determination, and the method is sample and easy.
7. Photoactivated pesticides have many advantages compared with traditional pesticides. The photoactivated pesticides may have great potential in development of green agriculture. A series of synthetic compounds were applied to pest control experiments. The preliminary studies showed that photosensitizers can perish most of pests during a short time. More experiments in laboratory and fields are undergoing.

Keywords: Porphyrin Photophysics Analysis

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 绪论	1
第一节 光动力疗法简介	
第二节 课题的提出与意义	
第二章 卟啉化合物的合成	15
第一节 实验部分	
第二节 结果与讨论	
第三章 卟啉化合物的光物理行为	27
第一节 卟啉化合物的吸收光谱研究	
第二节 卟啉化合物的荧光光谱研究	
第三节 卟啉化合物在醇-水体系中的光谱行为	
第四节 卟啉化合物的激光光解研究	
第四章 卟啉化合物在反胶束体系中的行为研究	47
第一节 引言	
第二节 实验部分	
一.实验方法	
二.结果与讨论	
第五章 卟啉化合物作为络合试剂在 HPLC 中的应用研究	57
第一节 引言	
第二节 实验部分	
一 实验方法	
二 结果与讨论	
第六章 光敏剂作为绿色农药的研究	78
第一节 引言	
第二节 实验部分	

一 实验方法	
二 结果与讨论	
致谢	94
作者简历和发表文章	95

第一章 绪论

第一节 光动力疗法简介

光动力疗法 (Photodynamic therapy, 简称 PDT) 是一种正在研究发展中的新技术, 是将光与药剂相结合用以治疗癌变细胞或组织的医学方法。光动力治疗成为继手术疗法、化学疗法和放射疗法之后第四种癌症疗法。光动力现象的发现已经有 100 年的历史。但直到 70 年代, 光动力疗法才得到了迅速的发展并在以后被应用于临床, 取得了另人瞩目的成就。这是因为与其他治疗癌症的方法如: 手术, 化疗和放疗等相比, 光动力疗法具有独特之处。光动力疗法结合了放疗和化疗的长处, 在光疗中同时需要光敏剂和光, 它具有双重选择性 (选择性富集和选择性光照激活), 使得光疗比一般的方法更易将药物作用点控制在病灶部位。达到选择性高, 副作用小, 方法简便, 见效快等优点。特别是对于大多数用传统治疗无效的晚期癌症患者和不适于手术, 放疗, 化疗的病人。光动力疗法是一种理想的选择。

光动力疗法的基本过程是: (1) 选择一种对病体组织具有选择性的光敏剂; (2) 将光敏剂引入体内 (通常为静脉注射) 并让它在组织间进行分布; (3) 当光敏剂在靶体和非靶体中的浓度比达到最大时, 用敏化剂所需的光照射靶体, 通过产生各种有损于细胞功能的活性氧和氧化物, 使靶体遭受破坏。

研究证明, PDT 治疗肿瘤的作用机理主要有两个方面: 一是对肿瘤细胞的直接杀伤作用[1]; 二是通过作用于肿瘤组织的微血管造成血管完全闭合, 从而使肿瘤组织缺氧和营养枯竭, 导致肿瘤坏死[2]。两种作用中何种为主, 依不同光

敏剂而异[3]。

光动力疗法的基础是靶体中生物物质的光敏氧化。这些特定的靶分子包括有光敏性的氨基酸（色氨酸、半胱氨酸等）、核酸碱基、不饱和脂肪酸、胆固醇及一些肽。光疗的结果将会引起病灶组织内酶的失活，核酸和生物膜的破坏及 DNA 的损伤。PDT 的原理十分复杂，没有任何简单的机理可以解释光动力效应。在研究 PDT 机理时，必须同时考虑分子反应的电子机制、光敏剂的传输和定位以及光物理过程。

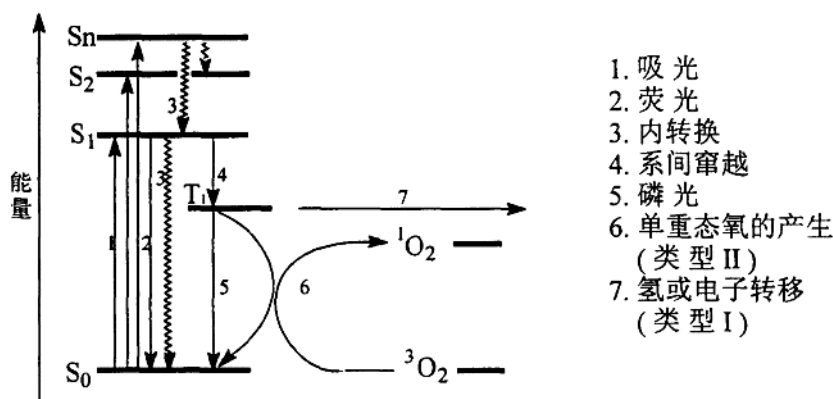


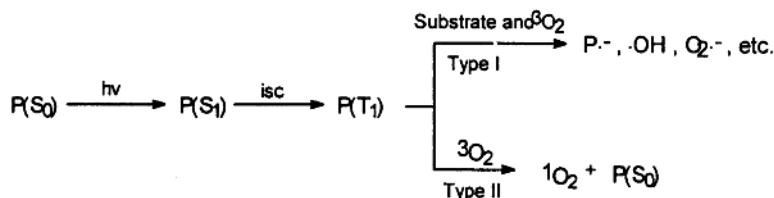
图 1 光敏剂吸光后的光物理过程示意图

图 1 是典型光敏剂的 Jablonski 变形图，描绘出分子被激发前后主要的光物理过程[4]。对 PDT 而言最重要的部分是处于激发态的光敏剂经系间窜越(ISC)，转变为三线态的过程，这是自旋禁阻的过程。之后分子从三线态经两条路线弛豫：发射磷光的辐射过程，或与另一个三线态分子发生自旋交换的非辐射过程。

由于发射磷光是自旋禁阻的过程，因此三线态的寿命较长（微秒数量级），

能有机会与附近的分子发生化学反应。光敏作用通常是通过光敏剂的三线态进行的。

光动力治疗机制主要包括 I 型反应和 II 型反应[5]。类型 I 机制是光敏剂的三重态与底物发生电子转移或抽氢作用[6]，产生底物和光敏剂的自由基或自由基离子，它们可以进一步与周围的氧反应生成氧化物。类型 II 机制是光敏剂的三重态与基态氧分子发生能量传递产生单线态氧 ($^1\text{O}_2$)，单线态氧是一种活性很高的亲电性物种，能和很多生物分子如不饱和脂肪酸、蛋白质、核酸等发生氧化、环加成等反应。一般认为，大多数光敏剂的类型 II 反应通常比类型 I 占优势[7]。上述过程可表示如下：



(式中：P 为光敏剂， S_0 和 S_1 为单线态基态和第一激发态， T_1 为第一三线态)

通常光敏作用同时包括 I 型机制和 II 型机制，它们的贡献相对大小取决于底物和光敏剂的特性和浓度、氧的浓度及光敏剂与底物间的键合作用[8]。实际上光疗效果与氧密切相关，且大多数反应中单线态氧是主要活性物质[9]。单线态氧的产生是 PDT 成功的关键。PDT 光物理过程的一个重要概念是单线态氧量子产率，即三线态光敏剂所吸收的能量转移给基态氧从而产生单线态氧的效率。当然，其它活性物质如超氧阴离子和羟基自由基也起作用[10]。

光动力疗法最根本的因素是光疗药物。根据光疗本身的要求，理想的光疗

药物应具有以下特点:

1. 在光疗窗口 (600-900) 有强的吸收。在光疗窗口范围内, 组织对光的散射少, 且内源生物分子的竞争吸收很小, (内源吸光分子主要有血色素、黑素等), 因而能使照射光穿透到组织深处, 使光疗有望用于许多临床难治的肿瘤[11]。
2. 三重态量子产率高, 三重态的能量大于 94kJ/mol。PDT 过程中, 光敏剂受光照激发到单重态, 但单重态寿命短, 然后经系间窜跃, 单重态光敏剂转变成寿命较长 (μ s-s) 三重态光敏剂; PDT 的反应主要发生在长寿命的三重态;
3. 在氧的存在下, 激发的三重态的光敏剂可通过光敏反应产生活性氧, 尤其是单重态氧。尽管还不清楚哪一个活性物种到底起多大作用, 但单重态氧的产生对于的成功与否都是极其重要的, 单线态氧与生物分子发生反应, 使得生物过程遭到破坏[12], 因此单线态氧是 PDT 过程中的主要光毒性物种。而且对新的光疗药物首先要测试的就是其产生单线态氧的能力[13]。而单线态氧的产生来源于三重态光敏剂与基态氧分子的能量转移反应。
4. 选择性高。好的疗效的实现, 一个重要的基础就是光敏剂能在肿瘤中选择性富集, 而正常组织或器官中的分布很少或无分布。从根本上保证对肿瘤的选择性杀伤。尤其是皮肤中, 要求光敏剂的分布水平要低, 以降低光敏皮炎作用。
5. 光毒性高而暗毒性低。这也是保证正常组织免受损伤而提高光疗选择性的一个方面。光疗之所以优于化疗, 也在于所用光疗药物在无光照时无作用, 而在对靶体组织选择性光照时, 靶体组织的光敏剂被激活而选择性的只在靶体

组织中发挥作用。

6. 从正常组织中快速清除。根据药物动力学的要求，光敏剂注射到体内以后，要求在肿瘤部位高浓度富集，而在正常组织分布低，且能快速清除。多余的药物应能很快从体内排泄。以降低光疗的副作用。
7. 容易大量合成，且药物的配方简单，容易保存。这也是使光疗药物全面推广的基本要求。

现在研究的比较活跃的光敏剂主要有以下几种：

1. 卟啉类化合物：包括血卟啉，四苯基卟啉衍生物，二氢卟吩衍生物，细菌叶绿素衍生物等。
2. 酞菁类化合物：包括金属酞菁，萘酞菁等。
3. 蒽醌类化合物：如柔毛霉素和蒽并吡唑等。
4. 醌类化合物：包括竹红菌素及其类似物。
5. 其它化合物：如，吩噻嗪，吡啶，等光敏剂。

这些光敏剂的结构及作用机制多样性[14]，给光动力治疗提供了很好的研究基础。

大多数第二代光敏剂的研究都集中在四吡咯体系，结合其它光敏剂的实验来看，这一现象似乎有点奇怪。尽管我们还不能下结论认为其它光敏剂不值得去研究，但很明显，大环四吡咯体系对 PDT 一定具有某种优越性（如图 2）。卟啉和其它具有四吡咯环结构的光敏剂（酞菁等）的特殊优越性表现在：它们都能有效产生单重态氧，在无光的时候是无毒的。另外，它们相当稳定。新开发的第二代光敏剂一般能从身体很快的清除。光敏剂具有光漂白性质 [15]，也是一个值得考虑的因素。

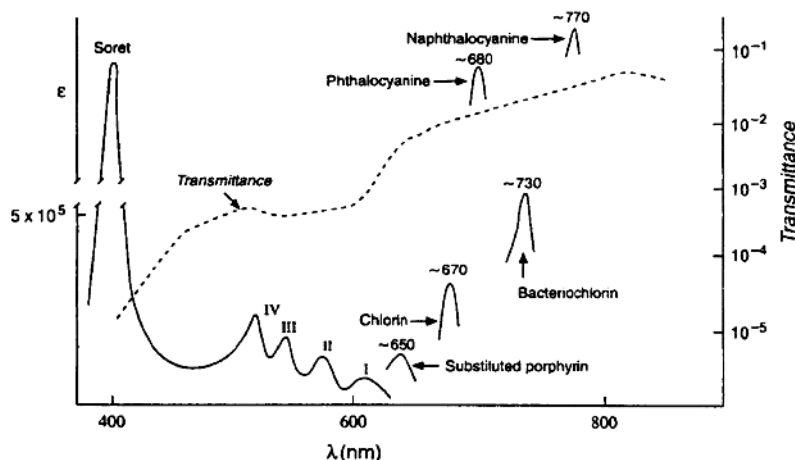


图 2 几种四吡咯体系的光敏剂吸收谱

开发优质光敏剂。一直是研究热点。下面主要就卟啉类光敏剂进行介绍。

卟啉类光敏剂是目前应用最广的光疗药物。早在本世纪初期, Mayer-Betz 就在自己身上注射血卟啉 (HP), 证明了 HP 的光毒性[16]。从那时起, 人们就开始对其进行研究。但最初, 人们只是将它作为肿瘤荧光定位诊断剂来使用。直到 1972 年, 才真正意义上开始了光疗的研究[17]。

一. 第一代光敏剂 (1961-1983)

虽然人们很早就认识到血卟啉的光毒性, 但对其深入的认识直到五十年代才有了进展。五十年代, Schwartz 发现的实验中起作用的不是血卟啉的单分子, 而是血卟啉的共聚混合物[18]。到了六十年代, Lipson 和他的同事们接着的工作对血卟啉的混合物进行了进一步的提纯, 制得了血卟啉衍生物 HpD(stage 1)[19]。这是真正意义上的第一个光疗药物。如图 3 所示。到了八十年代, Dougherty 等将它发展为 HpD(stage 2)[20]。

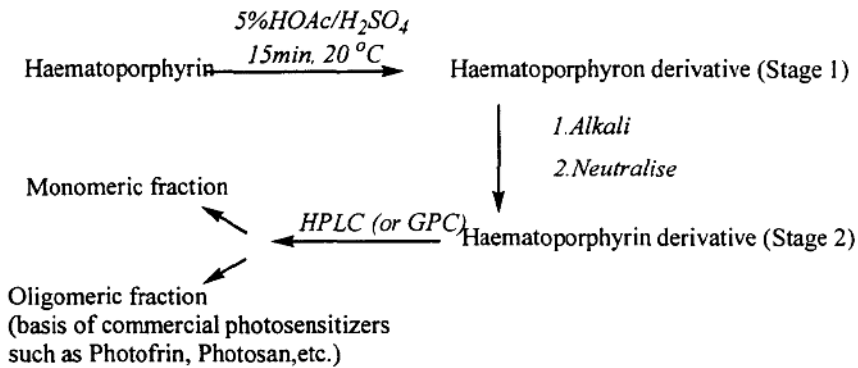


图 3 血卟啉衍生过程

Photofrin 的一个缺点是, 它的选择性不强, 在体内停留的时间长达 6 周[21], 因此用 Photofrin 治疗的病人对强光过敏。这个问题虽然比化疗的副作用要小得多, 但仍限制了它的应用。

Photofrin 的另一个缺点是, 使药物活化的激发光最大波长不在理想范围内。一般来说, 光的波长越长其穿透能力越强。因此理想的光敏剂应该在红光或近红外光区有吸收[86]。但 Photofrin 活化的最大吸收波长是 630nm, 该波长的光穿透组织的效率非常有限, 其原因可能是内源性发色团 (主要是血红蛋白) 的吸收和光散射[87]。

由于 HpD 本身的这些缺陷, 因而促使人们去寻找和研究新的光敏剂, 以期提高光动力治疗的效果。

二. 第二代光敏剂 (1980-)

在八十年代初, 有关改进光敏剂的工作就取得了很大的进展。由于 HpD 在光疗中所做的杰出贡献, 人们将其称为第一代光敏剂, 而将新出现的光敏剂称为第二代光敏剂。主要有以下几种:

1. 四苯基卟啉及其衍生物:

四苯基卟啉是最容易合成的卟啉类化合物[22, 23], 这使得它成为开发 PDT 药物的非常有用的前体而引起了人们的广泛关注。一系列四苯基卟啉的衍生物被合成出来进行研究, 并取得了很多成果。同时, 人们也认识到不对称的四苯基卟啉衍生物也具有特殊的生物活性。有关此类化合物的报道层出不穷[24-28]。但此类化合物在长波方向的吸收光的能力不强。

2. 二氢卟吩类光敏剂:

这一类化合物主要包括绿素类和细菌卟吩。是卟啉结构中一个吡咯环上的双键被还原后的产物。这类化合物具有很好的光物理性质[29, 30], 在可见区吸收波长长且吸收强。从理论角度讲, 这类化合物表现出了适合 PDT 药物的特性, 具有开发成 PDT 药物的巨大潜力。它们所存在的缺点各不相同, 如有的具有长期皮肤光敏性, 有的稳定性差。

3. 合成烷基卟啉衍生物:

就是指在吡咯环上有各种取代基的卟啉化合物。这类化合物的代表是八乙基红紫素锡。这是一个光疗性能很好的化合物[31], 它在光疗中不伤正常组织, 且皮肤光敏性反应小。其作用机理是引起细胞膜的损伤。但总的说来, 此类化合物的缺点也很突出, 合成步骤长且产率低, 产物稳定性差[32]。

4. 其它卟啉化合物:

主要包括卟啉与一些小分子如类固醇[33]、类脂[34]、多肽[35]、核苷[36]、核苷酸[37]、小分子糖[38]等的缀合物。经研究发现, 此类化合物可大大提高卟啉光敏剂对肿瘤细胞的选择性。因而引起人们广泛关注。这方面的工作正处于探索阶段。

第二节 课题的提出、设想和意义

卟啉化合物在用于光疗时, 一个很重要的问题就是如何将药物导入肿瘤细胞的有效部分而起作用。通常解决这个问题有以下方法:

1. 改善卟啉化合物本身的性质, 使其在体内环境中更好的运输。尽管光敏剂在肿瘤细胞中的富集机理还不太清楚, 但适当的亲水亲脂平衡被认为是影响光敏效率和肿瘤及细胞摄取的一个重要因素[48-53]。
2. 采取注射前将光敏剂与适当的输送体系结合而提高光敏剂对靶体的选择性。结合后可控制光敏剂在肿瘤周边组织的分布, 从而达到治疗肿瘤而不损伤周边正常组织的目的。如: 用聚苯乙烯微球体包裹光敏剂; 光敏剂与单克隆抗体以共价键结合直接导向癌细胞表面的抗原; 将光敏剂嵌入脂质体使之容易传输到低密度脂蛋白等[45]。

从目前的研究可以发现, 单纯脂溶的卟啉存在在体内环境中溶解性差, 易聚集的现象, 不利于光敏剂在体内定向传输和定点聚集[39]。而单纯水溶性的卟啉又存在代谢快, 不容易富集的缺点[40]。如, 酞菁环上的磺酸取代基决定了染料的溶解度、亲水、亲脂特性, 以及在细胞中的摄取和滞留特性[54], 而不同磺化程度的衍生物的光毒性顺序为 二磺酸衍生物>单磺酸衍生物>三磺酸及四磺酸衍生物[55, 48], 研究表明, 并非纯水溶性或纯脂溶性的光敏剂光疗效果最好, 两亲性的光敏剂更容易穿透细胞膜, 更容易被细胞摄取和滞留, 因而活性更大。大多数光敏剂都分布在细胞的核外区: 脂质体、线粒体、内质网、高尔基体和溶酶体[41]。光敏剂在细胞内的分布取决于光敏剂的化学性质(如电荷性质和两亲性)[42]。Moan 等指出, 脂溶性的阴离子染料一般分布在膜结构中, 而水溶