

酞菁类光敏剂单重态氧量子产额的 激光诱导 ESR 研究

陈暨耀 陆亚蒙 陈士明 陈开泰 蔡怀新

(上海复旦大学物理系分析测试中心, 200433)

摘要: 本文应用激光诱导 ESR 波谱法研究酞菁类光敏剂的光动力反应动力学过程, 对几种酞菁的单重态氧(1O_2)相对量子产额进行了测定比较。

关键词: 酞菁, 单重态氧, 电子自旋共振(ESR)

ESR study on singlet oxygen quantum yield of phthalocyanines (PC) induced by laser

Chen Jiyao, Lu Yameng, Chen Shiming, Chen Kaitai, Cai Huixin

(Physics Department, Analysis and Measurement Centre, Shanghai Fudan University)

Abstract: The kinetics of photodynamic reaction of several phthalocyanine (PC) photosensitizers were studied by laser induced ESR spectrum, and the measured results of the relative quantum yields of singlet oxygen of several phthalocyanine were compared.

Key words: phthalocyanine, singlet oxygen, electron spin resonance.

应用血卟啉衍生物(HPD)激光光动力疗法治疗肿瘤已取得令人瞩目的成就^[1], 近年来对酞菁类新光敏剂的探索也在逐步增多^[2]。在生物体系中, 光敏剂主要是通过光动力反应生成单重态氧(1O_2), 进而敏化损伤癌细胞^[3], 1O_2 的生成能力是评价光敏剂敏化能力的重要参量, 1O_2 的量子产额则是比较、筛选光敏剂的主要指标之一。在以往此类研究中大多使用白光^[4]或红光^[5]作为激发诱导光, 但由于各光敏剂吸收光谱的不同, 很难比较各自光子数吸收的差异, 故不能定量得出 1O_2 的相对量子产额或误差较大; 虽然进一步的研究使用了单色仪, 将激发诱导光的带宽减至8 nm^[6], 但对吸收光子数(8 nm内)的校正计算仍是十分繁复的。本文利用激光单色性的优点, 使用 He-Ne 激光作为激发诱导光源, 可简便地比较各光敏剂吸收的光子数, 结合 ESR 波谱法的 1O_2 测定, 研究酞菁光敏剂光动力反应的动力学过程, 比较几种酞菁的 1O_2 相对量子产额, 探讨结构因子的影响。

实 验 方 法

几种水溶性的酞菁(PC)为: 磺酸基铝酞菁(AlSPC)^[7]、磺酸基锌酞菁(ZnSPC)、磺酸基非金属材料酞菁(H_2 SPC)、磺酸基铜酞菁(CuSPC)、羧基镍酞菁(NiOPC)、羧基锌酞菁(ZnCPD)。前4种由上海染料所合成提供,后2种由第二军医大学抗疟药研究室合成提供。

1O_2 的测定参照 Lion 的方法^[8], 以 2,2,6,6-四甲基-4-羟基哌啶醇(TMHP)为探针, 用 ESR 探测 TMHP 被 1O_2 氧化后生成的氮氧自由基。实验时, 将 He-Ne 激光束导入 ESR 谱仪微波腔照射含有 TMHP 及 PC 的样品管, 从零时起(未照光)测量本底信号, 然后在照射过程中定时自动采样, 记录波谱信号。测量是在等光密度条件下进行的, 实验前调整各 PC 光敏剂的浓度, 使其对 He-Ne 激光有相等的透射率(即吸收相同的激光光子数), 以便比较 1O_2 的相对量子产额。

ESR 谱仪为 ER 200 D-SRC, 测量使用 X 波段, 微波功率 20 mW, 调制频率 100 kC, 调制幅度 0.25 mT, 室温下测量。He-Ne 激光器为 1000 B 型(上海激光技术研究所), 照射功率 12 mW。吸收光谱由 SHIMADZU UV 240(日本)分光光度计测定, 荧光光谱由 HITACHI 850(日本)荧光光度计测量。

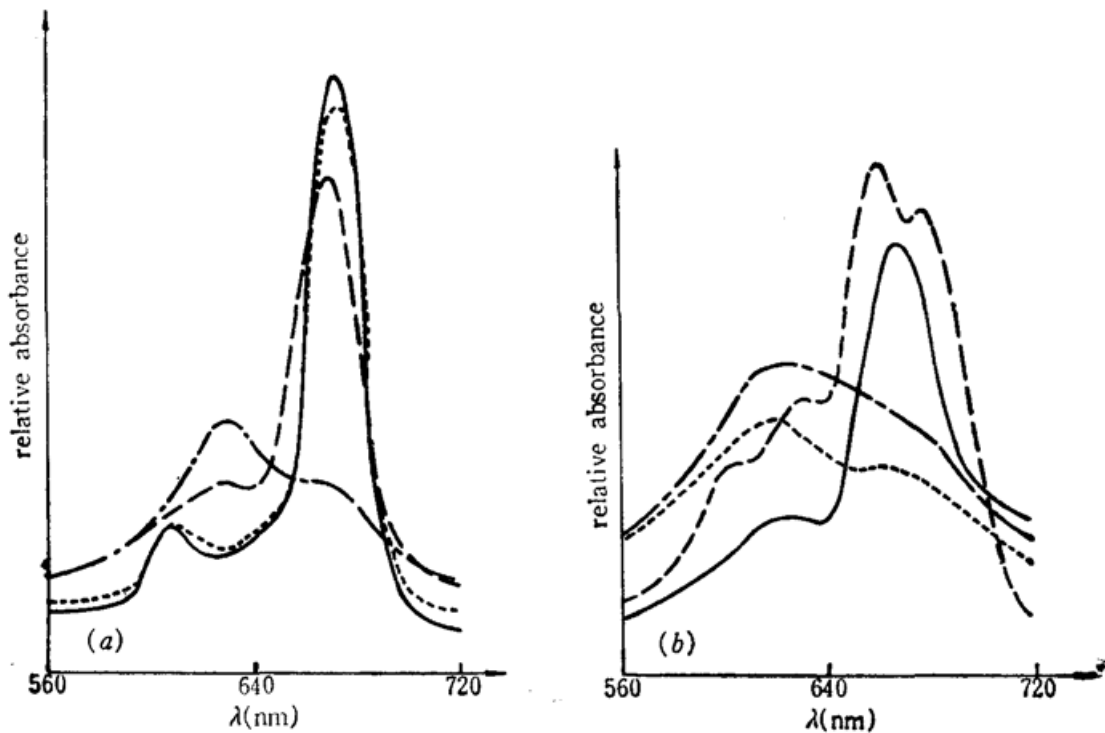


Fig 1. Absorption spectra of several PC in different solvents

- (a): — ZnSPC (50% methanol- H_2O); (b): — H_2 SPC (50% methanol- H_2O);
 - - - ZnSPC (aqueous solution); - - - H_2 SPC (aqueous solution);
 — AlSPC (50% methanol- H_2O); — CuSPC (50% methanol- H_2O);
 AlSPC (aqueous solution). CuSPC (aqueous solution).

concentration: $6 \mu mol/L$

结 果 和 讨 论

1. PC 的聚集状态

已知 PC 的聚集状态对 $^1\text{O}_2$ 的产额有很大影响, 以单体状态光敏效果最佳^[2], Moan^[9] 已证实 AISPC 进入细胞后是以单体状态存在于细胞内, 并继而进行光敏作用, 故对各 PC 光敏剂的评价比较应在单体状态下进行。多数 PC 类化合物在水溶液中以二聚体为主, 有机溶液的添加能使它们解聚为单体, 其聚集状态可由吸收光谱确定, 在 PC 红光的主吸收区内, 较长波长处为单体吸收率, 较短处为二聚体的吸收峰^[10]。图 1 的结果显示(略去两图), 除 AISPC 外, 其余几种 PC 在水溶液中均以二聚体为主, 有机溶液的添加使其吸收峰红移, 解聚成单体。在以下 $^1\text{O}_2$ 的 ESR 测定中, H_2SPO 的溶剂为 50% 乙醇水溶液(此处乙醇解聚效果优于甲醇), 其余 PC 的溶剂均为 50% 甲醇水溶液或水。由图可见, 虽然单体 PC 化合物的主吸收峰位于 660~680 nm 间, 但由于吸收峰较宽, 在 632.8 nm 处均有相当的吸收, 故可用此波长激发诱导其光动力反应。

2. 光动力反应过程

6 种 PC, TMHP 反应体系, 除 NiCPC 外, 其余经 He-Ne 激光激发诱导后均出现典型的氮氧自由基 ESR 波谱信号(图 2(上)), 说明光动力反应生成 $^1\text{O}_2$ 中间产物。在等光密度条件下[各自浓度: AISPC 为 61×10^{-6} Mol; ZnSPO 45×10^{-6} Mol; ZnCPC 18×10^{-6} Mol; H_2SPO 30×10^{-6} Mol; CuSPO 51×10^{-6} Mol; NiSPO 55×10^{-6} Mol, 激光对 1 cm 光经各溶液的透射率均为 15%], 氮氧自由基 ESR 中场信号强度(h_0)随照射时间的增长过程见图 2, 各组 h_0 信号的增长均与光照剂量呈线性关系。PC, TMHP 体系的光动力反应可表示如下:

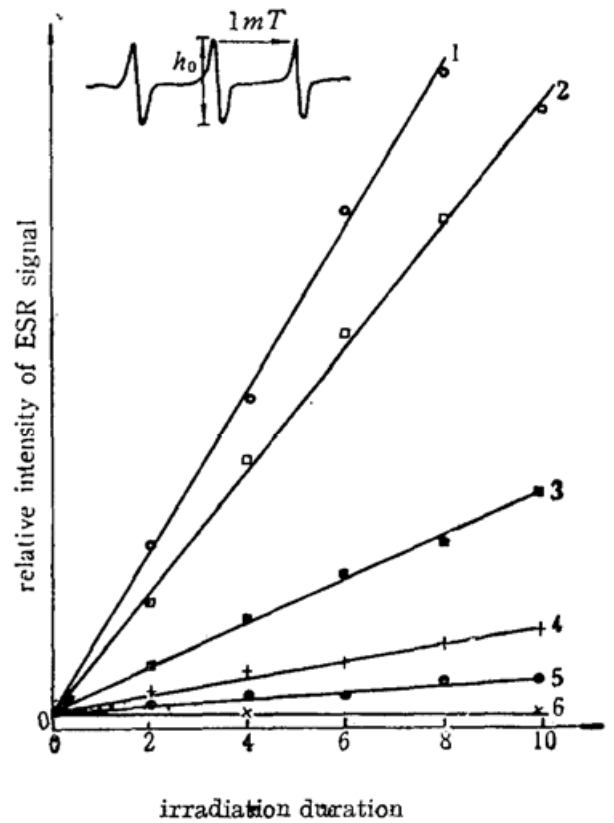
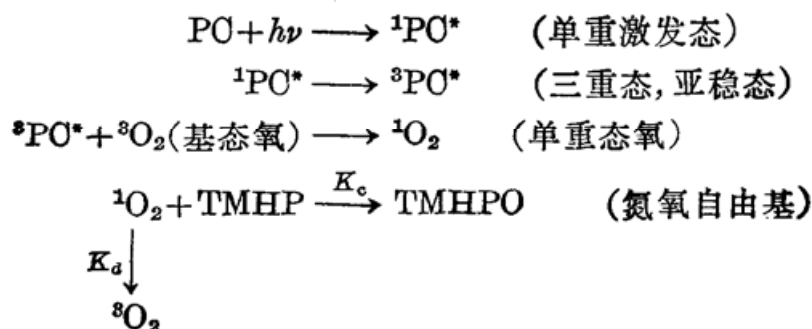


Fig. 2 Kinetics of several PC photodynamic reaction

1—AISPC; 2—ZnSPO; 3—ZnCPC;
4— H_2SPO ; 5—CuSPO; 6—NiCPC,
TMHP: 10^{-4} mol/L

在氧气充分的条件下,考虑以上过程, TMHP 的消耗速率可表达为下式:

$$\frac{d[\text{TMHP}]}{dt} = -\frac{[I]\Phi}{N_0} \frac{K_c \cdot [\text{TMHP}]}{K_c \cdot [\text{TMHP}] + K_d} \quad (1)$$

式中 $[I]$ 为光敏剂 PC 每秒吸收的激光光子数, Φ 为 PC 吸收每个光子的 $^1\text{O}_2$ 量子产额, N_0 为阿伏加德罗常数。由于与 $^1\text{O}_2$ 的消激发常数 $K_d \sim 10^5 \text{s}^{-1}$ ^[11] 相比, $K_c \cdot [\text{TMHP}]$ ($^1\text{O}_2$ 与 TMHP 的作用常数 $K_c \sim 10^5 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[12], 此处 $[\text{TMHP}] \sim 10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 量级) 的值可忽略不计, 且考虑初始的稳态过程, 由方程 (1) 解得

$$[\text{TMHP}] = [\text{TMHP}]_0 \exp\left(-\frac{[I]K_c\Phi t}{N_0K_d}\right) = [\text{TMHP}]_0 \left(1 - \frac{K_c t}{N_0K_d} [I]\Phi\right) \quad (2)$$

TMHP 的消耗即为 TMHPO 的生成, 有

$$[\text{TMHPO}] = [\text{TMHP}]_0 - [\text{TMHP}] = [\text{TMHP}]_0 \cdot \frac{K_c t}{N_0K_d} [I]\Phi \quad (3)$$

实验中有 $[\text{TMHPO}]$ 的 ESR 信号强度 h_0 随照射时间的线性增长规律可由此式反映。式 (3) 还表明图 2 中各 h_0 增长线的斜率 (即 $\frac{[\text{TMHPO}]}{t}$) 正比于各自吸收的光子数 $[I]$ 与 $^1\text{O}_2$ 量子产额 Φ 之乘积, 由于实验条件已保证各组 PC 所吸收的光子数 $[I]$ 相同, 且 $[\text{TMHP}]_0 \cdot \frac{K_c}{N_0K_d}$ 为常数, 故由各组 PC 的 $h_0 \sim t$ 线斜率之比, 得各 PC 光动力反应 $^1\text{O}_2$ 相对量子产额之比 (表 1)。

Table 1

Photosensitizer	AlSPC	ZnSPC	ZnOPC	H ₂ SPC	CuSPC	NiOPC
Φ (relative value)	9.1±1.3	6.9±0.8	2.5±0.3	1.0±0.1	0.45±0.07	0

Table 2

	AlSPC	ZnSPC	H ₂ SPC	CuSPC
Photon yield (Triplet formation)	0.4	0.56	0.22	0.92
Triplet lifetime(μs)	500	245	170	0.065

3. 中心配合物的作用

表 1 的结果显示, PC 的中心元素对 $^1\text{O}_2$ 量子产额有重要的影响, 由以上光动力反应式可知, PC 的三重态对 $^1\text{O}_2$ 的产生有着直接的关系, 表 2 列出了四种酞菁三重态的特性^[13]。由表可见, AlSPC, ZnSPC 除有较高的三重态形成量子产额外, 能级寿命均较长, 为其与基态氧发生能量转移产生 $^1\text{O}_2$ 提供了条件; 而 H₂SPC 与 CuSPC 的三重态, 则或三重态形成量子产额偏低或三重态寿命太短。本文的 $^1\text{O}_2$ 量子产额的实验结果与对应的酞菁光敏剂的三重态物理特性自洽。三重态的形成及三重态的寿命均与单重态至三重态、三重态至基态(单重)系间交叉的无辐射跃迁几率关联, 而系间交叉、电子自旋状态的反转是由电子自旋与轨道间的相互作用诱发的, 此无辐射跃迁几率可表示为

$$P \propto |\langle \psi_s | H' | \psi_T \rangle|^2 \quad (4)$$

式中 ψ_s 与 ψ_T 为 PC 分子处于单重激发态与三重激发态的电子波函数, H' 为电子自旋角动量

与轨道角动量相互作用的哈密顿算符

$$H' = \frac{1}{2m^2c^2} \sum_i \frac{1}{r_i} \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \mathbf{L}_i \cdot \mathbf{S}_i \quad (5)$$

式中 $V(r_i)$ 是电子的势能, r_i 是电子与核的距离。

自旋与轨道相互作用的结果之一便是“重原子”效应,对电子壳层闭合的 PC 分子体系,内部电子均键连,只有外部的大 π 环 π 电子离域围绕整个分子运动,对此类共轭有机分子,主要是由 π 电子决定分子的能级结构,但这些外 π 环电子与中心原子间隔较远,内电子的屏蔽效应较大,故“重原子”效应虽然仍起作用,但其效应相对较弱,如从 Al 至 Zn,其三重态形成量子产额的增加及寿命的减少均较缓。对 CuPC, NiPC,它们极差的 1O_2 生成能力是由于三重态寿命太短,当 Cu, Ni 络合进 PC 中心后,均有未键连的 d 电子,形成开壳层体系,虽然此体系仍由大环 π 电子起主导作用,但 d 电子与 π 电子将发生中心金属 α 轨道与外环大 π 轨道的轨道混合,电荷转移交换相互作用,这将影响电子自旋与轨道角动量的相互作用,此时 H' 中应该包含两项。

$$H' = \frac{1}{2m^2d^2} \left(\sum \frac{1}{r_{i\pi}} \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_{i\pi}} \mathbf{L}_\pi \cdot \mathbf{S}_\pi + \sum \frac{1}{r_{id}} \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_{id}} \mathbf{L}_d \cdot \mathbf{S}_d \right) \quad (6)$$

对 π 电子及 d 电子的势能函数 $V(r_i)$ 作库仑场近似,有

$$H' = \frac{1}{2m^2c^2} \left(\sum \frac{1}{r_{i\pi}^3} \mathbf{L}_\pi \cdot \mathbf{S}_\pi + \sum \frac{1}{r_{id}^3} \mathbf{L}_d \cdot \mathbf{S}_d \right) \quad (7)$$

两项量值的差异主要来自 $\frac{1}{r_i^3}$ 项,以二价 Cu 离子的 $3d$ 轨道半径及大环轨道半径值代入, $r_{id} \approx 0.07 \text{ nm}$, 而 $r_{i\pi} \approx 0.3 \text{ nm}$, 跃迁几率正比于 H' 的平方,有 $\left(\frac{r_{i\pi}}{r_{id}}\right)^6 = \left(\frac{3}{0.7}\right)^6 \approx 6 \times 10^3$, 差异达 3~4 个数量级,可见对开壳层 PC 分子,由中心金属未键连电子的自旋与轨道角动量相互作用对 H' 作主要贡献,并由此急剧地缩短三重态的寿命。比较 CuPOS 与 ZnPCS, Cu 与 Zn 原子序数只差 1, ZnPCS 为闭壳层体系,而 CuPCS 为开壳层体系,两者系间交叉无辐射跃迁几率的差异即为 6×10^3 , 由表 2 ZnPCS 的三重态寿命为 $245 \mu\text{s}$, 而 CuPCS 为 $0.065 \mu\text{s}$, 两者相差倍数为 $\frac{245}{0.065} \approx 4 \times 10^3$, 与上理论估算值基本吻合。

4. 外环取代基的影响

ZnSPC 与 ZnCPC 的 1O_2 量子产额之比为 6.9:2.5, 发现两者对人体肝癌细胞的光敏杀伤也有同样的趋势(表 3), 反映外环取代基(磺酸基(SO_3)或羧基(COOH))的不同也会对其光物理敏化特性带来影响。本实验还对二聚体 CuSPC 及 CuCPC 1O_2 量子产额进行了测量比较(因羧基铜酞菁与甲醇不相容,测量在水溶液中进行), 得到类似的规律,前者与后者之比为 2.5 倍, Rosenthal^[14] 注意到外环取代基对锌酞菁光敏效应的影响, 发现带有羟基(OH)的锌酞菁比 ZnSPC 对细胞有更佳的光

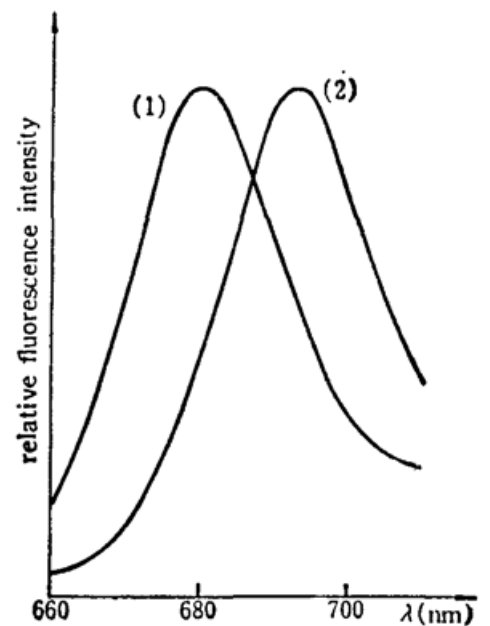


Fig 3. Fluorescence spectra of ZnSPC(1) and ZnCPC(2)
Excitation wavelength: 360° nm ;
Solvent: 50% methanol- H_2O ;
Concentration: $6.5 \mu\text{mol/L}$

敏杀伤效率, 本实验则进一步发现配带羧基劣于配带磺酸基。故在对 PO 类光敏剂探索时, 除了需考虑中心元素的作用, 也要注意外环取代基的影响。

图 3 示出了 ZnSPC 及 ZnCPC 的荧光光谱, 两者的荧光峰位有明显的移动 ($\Delta\lambda \sim 13 \text{ nm}$) 提示不同的外环取代基对锌酞菁的能级位置产生影响, 并可能由此影响到单重激发态至三重态的系间窜越, 改变三重态的特性, 导致 $^1\text{O}_2$ 生成能力的变化。

几种酞菁对人体肝癌细胞的光敏杀伤由表 3 所示, 虽然光敏杀伤是 $^1\text{O}_2$ 产额、细胞对光敏剂的吸收、结合部位等因素的综合效应, 但表 3 的结果与表 1 基本一致, $^1\text{O}_2$ 产额过低则对细胞无效 (CuSPC), 稍低则杀伤效果较差 (ZnCPC), 只有具备较高的 $^1\text{O}_2$ 生成能力才能获得有效的细胞光敏化效果。AlSPC 的 $^1\text{O}_2$ 量子产额仍不够理想 (绝对值小于 0.4), 可 PO 类化合物有着庞大的分支, 含有多于 60 种的中心金属配合物, 从中探寻高效光敏剂是很有潜力的, 但如何筛选至今还处于比较盲目的阶段。由以上研究分析, 本文的结论是: 金属酞菁首先需满足闭合壳层结构, 结合选择较“重”的中心金属配合物, 使之在具有较长三重态寿命的同时具有更高的三重态形成量子产额, 以获得更高的 $^1\text{O}_2$ 量子产额。此两方面的综合考虑, 应是高效光敏剂的探索开拓方向。

Table 3

Photosensitizer	AlSPC	ZnSPC	ZnCPC	CuSPC
Survival rate of cells (%)	24.0 ± 9.3	18.6 ± 7.4	79.3 ± 8.6	96.0 ± 2.6

(Incubation concentrations of phthalocyanine are $2.5 \times 10^{-6} \text{ Mol}$; light irradiation doses, 3 J/cm^2)

参 考 文 献

- 1 Dougherty T. J., *Photochem. Photobiol.*, **45**, 879 (1987)
- 2 Spikes J. D., *Photochem. Photobiol.*, **43**, 691 (1986)
- 3 Foote C. S., *Free radical in biology*. New York. Academic Press., **1976**, 85
- 4 吴世康 *et al.*, *化学学报*, **43**, 10 (1985)
- 5 Langlois R. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **44**, 117 (1986)
- 6 Wagner J. R. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **45**, 587 (1987)
- 7 蔡怀新 *et al.*, *生物化学与生物物理学报*, **20**, 562 (1988)
- 8 Lion Y. *et al.*, *Nature.*, **263**, 442 (1976)
- 9 Berg K. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 587 (1989)
- 10 Harriman A. *et al.*, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **76**, 1618 (1980)
- 11 Rodger M. A. J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5541 (1982)
- 12 Lion Y. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **31**, 305 (1980)
- 13 Darwent J. R. *et al.*, *Coordination Chemistry Reviews.*, **44**, 83 (1982)
- 14 Rosenthal I. *et al.*, *Photochem. Photobiol.*, **46**, 959 (1987)