

鬼臼毒素及其衍生物的瞬态粒子分析

汪世龙, 王 玫, 孙晓宇, 张 震, 李 敏, 倪亚明

(同济大学化学系测试中心, 上海 200092)

姚思德, 王文峰

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室, 上海 200180)

摘要 分析了鬼臼毒素及其衍生物与还原性自由基(氢自由基、水合电子)作用、氧化性自由基羟基自由基和激光等作用后产生的各种瞬态粒子, 对各粒子的生成和衰减过程进行跟踪, 获得了各瞬态粒子的生成和衰减速率常数, 进一步探讨了鬼臼毒素治疗肿瘤的构效关系

关键词 鬼臼毒素及其衍生物; 脉冲辐解; 激光光解; 瞬态粒子

中图分类号 R914.5

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2003)11-2014-05

鬼臼毒素(Podophyllo toxin, PPT)是从小檗科桃儿七等植物中提取分离出来的一种具抗肿瘤活性的天然物质^[1], Wessely等^[2]早在20世纪30年代就对鬼臼毒素进行了研究。直到20世纪70年代,才发现它有8种同分异构体,且这8种物质在临床实验中都表现出一定抗肿瘤活性,但同时也发现它们对生物体具有很大的毒性^[3,4],因而化学工作者试图通过对鬼臼毒素的结构修饰获得既具有高的抗肿瘤活性,又对生物体低毒的鬼臼毒素衍生物^[5-7]。迄今为止,已有许多研究者从鬼臼毒素的结构入手,分析它们的构效关系,从而为合成高效低毒的鬼臼毒素衍生物提供了指导。本实验室在此方面已做了一定的工作^[8-10]。本文运用电子脉冲辐解技术和激光光解技术对鬼臼毒素及其衍生物在极端条件下产生的各种瞬态粒子进行了全分析,并对各瞬态粒子的生成和衰减过程进行了跟踪研究,获得了各粒子的生成和衰减速率常数,进一步探讨了鬼臼毒素治疗肿瘤的构效关系,从而为合成高效低毒的鬼臼毒素衍生物和进一步了解鬼臼毒素治疗肿瘤的机理提供理论指导。

1 实验部分

鬼臼毒素和去甲表鬼臼毒素(4'-Demethyl epipodophyllo toxin, DMEP)等原料从中国医药工业研究院购入后直接使用,用高效液相色谱检测其纯度达到99.9%以上;叔丁醇使用前经蒸馏纯化;高氯酸、氢氧化钾和磷酸盐均为分析纯,用于调节溶液的pH值;N₂和N₂O为99.99%的高纯气体,用于溶液脱氧或除去水合电子。

脉冲辐解所用电子加速器产生能量为10 MeV,脉冲宽度为8 ns的电子束脉冲。单脉冲剂量为5~50 Gy连续可调,用空气饱和的0.01 mol/L KSCN水溶液作为脉冲电子剂量剂。时间分辨分光光度检测系统为:500 W 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20 mm的石英样品池,进入44 W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,存储于计算机中,并由计算机作数据处理。

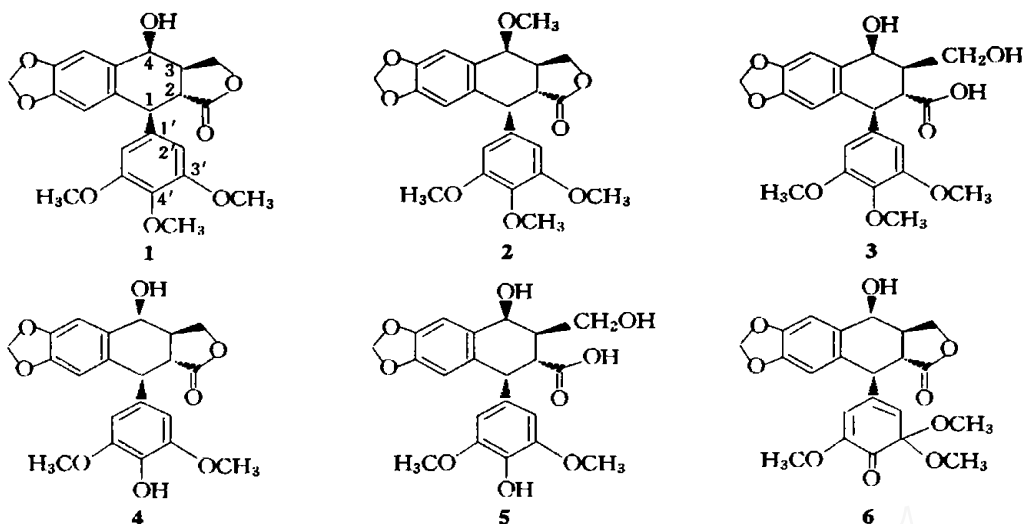
激光光解所用的激光器为KrF气体激光器,波长为248 nm,脉冲宽度为20 ns,每个脉冲的输出能量为50 mJ,检测和数据处理装置同脉冲辐解装置^[11],所有的溶液均用三次蒸馏水配制。所有实验均在室温(约20℃)下进行。

实验中所用的几种物质的结构式如下:

收稿日期: 2002-08-08

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20077019)资助

联系人简介: 汪世龙(1964年出生),男,博士,教授,主要从事天然药物的活性研究



2 结果与讨论

2.1 鬼臼毒素阴离子自由基的产生

将 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 鬼臼毒素(1)水溶液用氢氧化钾调节 pH 值为 12, 通入氮气除氧 20 min, 加入 0.1 mol/L 特丁醇以清除水辐解产生的羟基自由基, 此时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 1 所示 可见, 其最大吸收峰在 370 nm 处, 在较短的时间内可以观察到水合电子的特征吸收峰 随着时间的增长该吸收峰消失 若将鬼臼毒素的 C-1 苯环改成其它结构(6), 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, 其生成瞬态粒子的过程如下式

分析 370 nm 处瞬态粒子的生成和衰减(如图 2

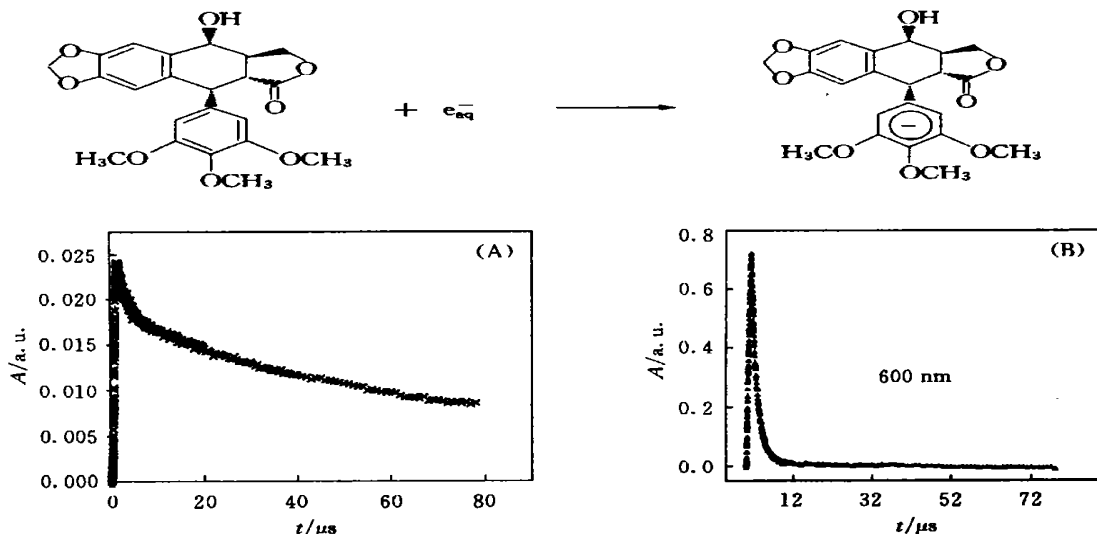


Fig 1 The transient absorption spectrum after pulse radiolysis of $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ podophyllotoxin + 0.1 mol/L t-BuOH aqueous solution Saturated with N_2 at pH= 12 a 1 μs ; b 5 μs

Fig 2 The forming and decay traces after pulse radiolysis of $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ podophyllotoxin + 0.1 mol/L t-BuOH aqueous solution

Saturated with N_2 , pH= 12, at 340 nm (A) and 600 nm (B).

所示), 用动力学拟合后可知, 其符合一级反应, 表观生成速率常数为 $1.69 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, 表观衰减常数为 $4.54 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. 若改变鬼臼毒素溶液的浓度, 以表观速率常数对浓度作图, 其直线斜率即它们的绝对生成和衰减反应速率常数(分别为 4.2×10^{10} 和 $1.14 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

用同样方法处理去甲表鬼臼毒素(4)生成的瞬态粒子, 其绝对生成和衰减反应速率常数分别为 4.8×10^{10} 和 $7.1 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. 由此结果可以看出, 鬼臼毒素的C-1 苯环极易与水合电子作用, 生成鬼臼毒素阴离子自由基, 而DNA 分子中的磷酸根离子是一个电子库, 从而揭示了鬼臼毒素及其衍生物易与DNA 作用的原因

2.2 与还原性自由基氢原子作用生成的瞬态粒子

将 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 鬼臼毒素水溶液用高氯酸调节 pH 值为 1, 加入 0.1 mol/L 的特丁醇, 通氮气饱和 20 min, 该体系经电子脉冲辐解后, 产生的初级粒子仅有氢原子自由基, 因而生成的产物是氢原子自由基加成到鬼臼毒素上形成的产物, 其瞬态粒子的瞬态吸收光谱如图 3 所示. 由图 3 可见, 瞬态粒子的最大吸收峰在 340 nm 处, 若用内酯环破坏的鬼臼毒素衍生物(结构 3 和 5)做此实验则得不到此吸收峰, 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:

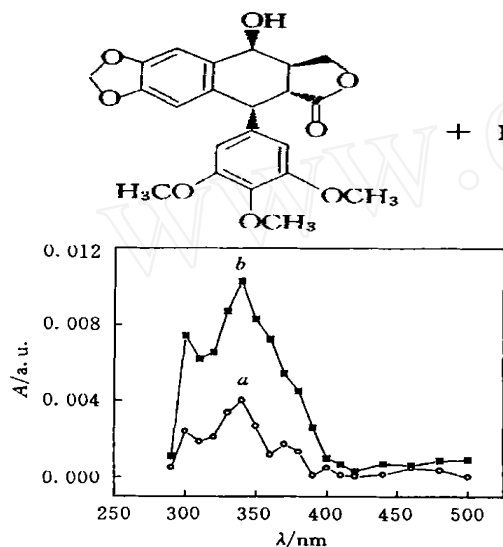


Fig 3 The transient absorption spectrum after pulse radiolysis of $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ podophyllotoxin + 0.1 mol/L *t*-BuOH aqueous solution

Saturated with N_2 at pH = 1. a: $1 \mu\text{s}$; b: $5 \mu\text{s}$

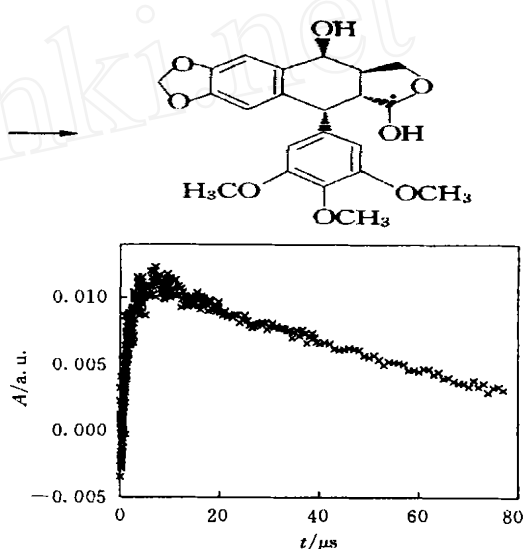


Fig 4 The forming and decay traces after pulse radiolysis of $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ podophyllotoxin + 0.1 mol/L *t*-BuOH aqueous solution

Saturated with N_2 at pH = 1 and 340 nm.

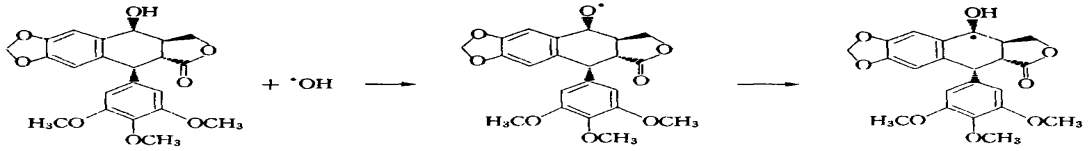
动力学分析此瞬态粒子(图 4)可得, 鬼臼毒素与氢自由基的表观生成速率常数为 $5.27 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, 表观衰减速率常数为 $1.82 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. 若用去甲表鬼臼毒素反应, 其表观生成速率常数为 $4.64 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, 表观衰减速率常数为 $1.61 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$.

鬼臼毒素及其衍生物与氢自由基作用这一结论, 与DNA 分子中有多个给氢的活性点导致鬼臼毒素及其衍生物易与DNA 作用是一致的

2.3 与氧化性羟基自由基生成的瞬态粒子

以NaOH 调节 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的鬼臼毒素水溶液的 pH 值为 12, 通 N_2O 气体 20 min, 除去水辐解产生的水合电子, 仅存在的初级粒子为羟基自由基. 图 5 为羟基自由基与鬼臼毒素反应所得的瞬态吸收光谱. 由图 5 可见, 瞬态的最大的吸收峰为 300 和 320 nm, 若用 C-4 位羟基保护的化合物(2)做此实验则得不到任何吸收峰. 表明羟基自由基的作用机理是先抽去 C-4 位羟基上的氢, 生成苯氧自由基, 最终获得处于 C-4 位的中性自由基. 其反应机理见 Scheme 1.

分析 300 和 320 nm 的瞬态粒子可得图 6 的生成曲线, 经过动力学分析处理, 得 300 和 320 nm 处的瞬态粒子的表观生成速率常数分别为 9.75×10^5 和 $8.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.



Scheme 1 Reaction mechanism of hydroxy radical and podophyllotoxin

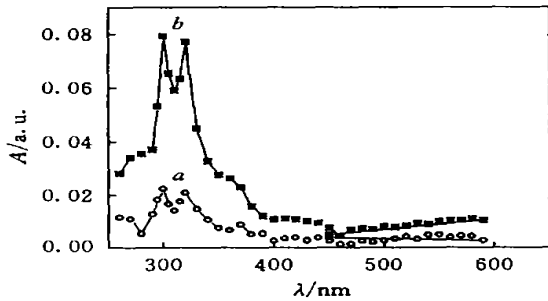


Fig 5 The transient absorption spectra after pulse radiolysis of 1×10^{-5} mol/L podophyllotoxin aqueous solution

Saturated with N_2O at pH= 12 a. $1 \mu s$; b. $5 \mu s$

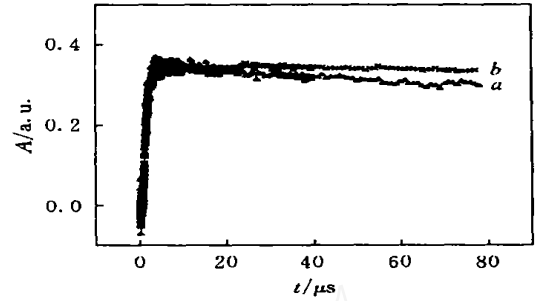


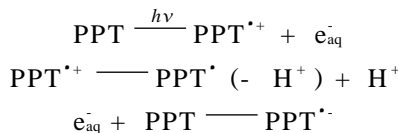
Fig 6 The forming and decay traces after pulse radiolysis of 1×10^{-5} mol/L podophyllotoxin aqueous solution

Saturated with N_2O , pH= 12 a. 300 nm; b. 320 nm.

鬼臼毒素及其衍生物易与羟基自由基或具有氧化性的自由基作用这一特点表明它们可清除生物体内的一些氧化性的自由基，从而达到不损伤机体的目的

2.4 与激光作用产生的瞬态粒子

配制 1×10^{-5} mol/L 的鬼臼毒素水溶液，通入 N_2 气饱和 20 min，用激光光解可得图 7 所示的瞬态吸收光谱图，可见，在激光光解 $0.1 \mu s$ 后即生成 300 和 720 nm 处的 2 个吸收峰， $5 \mu s$ 后又有 3 个吸收峰出现，分别位于 320, 420 和 370 nm 处，且前 2 个吸收峰消失。图 7 的分析结果表明，鬼臼毒素及其衍生物在激光照射下，立即发生光电离，生成 300 nm 处鬼臼毒素阳离子和水合电子。鬼臼毒素阳离子通过分子内转换，再解离生成 320 nm 处的鬼臼毒素中性自由基。生成瞬态粒子的过程可描述如下：



分析 300 和 320 nm 处的瞬态粒子可以发现，300 nm 处瞬态粒子的生成速率常数和 320 nm 处瞬态粒子的衰减速率是一致的，其数值皆为 $9.34 \times 10^9 L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ 。分析 420 nm 处的瞬态粒子发现，它与 320 nm 处的瞬态粒子具有相同的生成和衰减速率常数，二者为同一瞬态粒子的共振形式

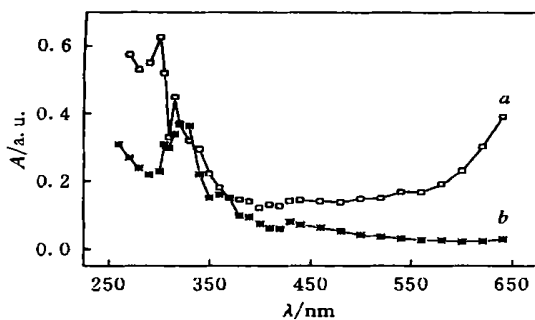


Fig 7 The transient absorption spectra after laser photolysis of 1×10^{-5} mol/L podophyllotoxin aqueous solution

Saturated with N_2 at pH= 7. a. $0.1 \mu s$, b. $5 \mu s$

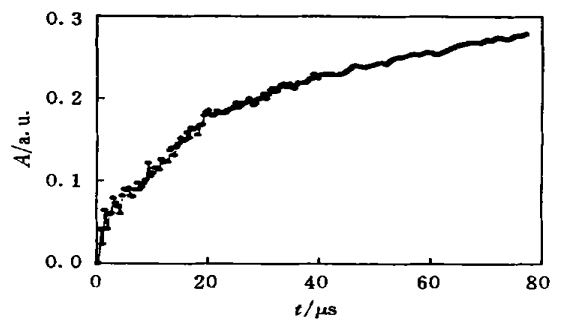


Fig 8 The forming trace after laser photolysis of 1×10^{-5} mol/L podophyllotoxin and 1×10^{-5} mol/L $C(NO_2)_4$ aqueous solution

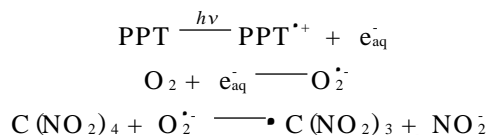
Saturated with O_2 at pH= 7, 350 nm.

370 nm 处的瞬态粒子为水合电子与鬼臼毒素作用生成的鬼臼毒素阴离子自由基的吸收峰

若在上述体系中, 改通氧气饱和, 发现溶液中存在有大量的超氧阴离子, 超氧阴离子是杀灭肿瘤细胞和造成毒性的原因, 通过对不同结构的鬼臼毒素衍生物进行比较发现, 鬼臼毒素发生电离的活性基团在 C-4 位, 去甲表鬼臼毒素的活性基团在 C-4 和 C-4' 位, 且 C-4' 比 C-4 更活泼, 这也许是鬼臼毒素和去甲表鬼臼毒素的抗肿瘤活性与毒性不同的原因

2.5 超氧自由基的验证

向 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 鬼臼毒素水溶液中加入 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的四硝基甲烷水溶液 ($\text{pH} = 7$), 通氧气饱和, 激光光解后观察 350 nm 处瞬态粒子的生成 (图 8). 由图 8 可见, 350 nm 处的瞬态粒子有一缓慢的生成过程, 是三硝基甲烷自由基的特征吸收^[12], 说明鬼臼毒素在激光照射时, 伴随着大量超氧阴离子的生成, 其反应机理可描述如下:



参 考 文 献

- [1] WANG Zhi-Guang (王志光), YN Shu-Fan (尹述凡). Chinese J. Pharmaceuticals (中国医药工业杂志) [J], 1992, 23(2): 65—67
- [2] Spath E., Wessely F., Kornfeld L.. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [J], 1932, 65(2): 1 544—1 549
- [3] Aiyar N. V., Chang F. C.. J. Org. Chem. [J], 1977, 42(2): 246—249
- [4] Aiyar N. V., Chang F. C.. J. Org. Chem. [J], 1975, 40(16): 2 384—2 406
- [5] WANG Yan-Guang (王彦广), TAO Lan (陶 兰), PAN Jian-Lin (潘建林) *et al.* Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 1997, 18(7): 1 061—1 066
- [6] L U Xue-Jun (刘学军), CHEN Ru-Yu (陈茹玉), YANG Yuan-Yuan (杨媛媛). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2002, 23(7): 1 299—1 303
- [7] Loike J. D., Horwitz S. B.. Biochem. [J], 1976, 15: 5 443—5 448
- [8] WANG Shi-Long (汪世龙), WANG Mei (王 玫), SUN Xiao-Yu (孙晓宇) *et al.* Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2000, 21(1): 66—69
- [9] Wang S. L., Yao S. D., Wang M. *et al.* Radiat. Phys. Chem. [J], 1998, 53: 623—628
- [10] Wang S. L., Sun X. Y., Zhang C. J. *et al.* Science in China, Series B [J] 2002, 45(4), 394—397
- [11] DONG Wen-Bo (董文博), WANG Shu-Hui (王淑惠), YAO Si-De (姚思德) *et al.* Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2002, 23(10): 1 896—1 900
- [12] Schuchmann M. N., Schuchmann H. P.. J. Am. Chem. Soc. [J], 1991, 113: 6 934—6 937

Analyses of the Transient Species of Podophyllotoxin and Its Derivatives

WANG Shi-Long*, WANG Mei, SUN Xiao-Yu, ZHANG Zhen, LI Ming
(Analysis and Research Centre, Department of Chemistry, Tongji University, Shanghai 200092, China)

YAO Si-De, WANG Wen-Feng

(Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear Research,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract The transient species of podophyllotoxin and its derivatives were analyzed by pulse radiolysis and laser photolysis. The podophyllotoxin and its derivatives can react with hydrated electron, hydrogen radical and hydroxyl radical, and they can be photo-ionized by laser. We have studied their reaction mechanism and gotten their forming and decay rate constants.

Keywords Podophyllotoxin and its derivatives; Pulse radiolysis; Laser photolysis; Transient species

(Ed: K, G)