

磺酸基邻苯二甲酰亚氨甲基酞菁锌的合成 及光动力抗肿瘤活性研究

0614241
R979.1

刘尔生* 黄剑东 戴志飞 杨素苓 吴谊群 陈耐生 黄金陵

(福州大学化学系,福州大学功能材料研究所,福州 350002)

黄自强[✓] 孙建成 许建华

(福建医科大学肿瘤药理研究室,福州 350004)

合成了含不同数目磺酸基(以S表示)和邻苯二甲酰亚氨甲基(以P表示)的酞菁锌配合物的混合物,采用反相高效液相色谱进行分离,得到的D组分,经元素分析其组成为 $ZnPcS_2P_2$ 。两亲性配合物,对该配合物进行了IR、UV/Vis光谱表征,并研究了其在体对 S_{180} 和 U_{14} 实体瘤的光动力活性和机理。

锌酞菁

抗肿瘤活性

关键词:

两亲性酞菁锌

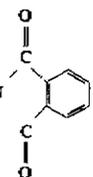
合成

光动力活性

抗肿瘤机理

酞菁及其金属配合物不仅广泛用作染料、催化剂、光电材料以及天然大环化合物的生物活性模型物^[1],而且在肿瘤光动力治疗(Photodynamic PDT)中,可望取代目前临床应用的血卟啉衍生物(HPD),成为第二代光敏剂^[2]。在前文^[3]已报道了我们新合成的一种带有亲水性磺酸基($-SO_3$,以下表示为S)和亲脂性邻苯二

甲酰亚氨甲基($-CH_2-N$),以下表示为



P)的两亲性酞菁锌($ZnPcS_2P_2$),在不同波长光激发下光敏化能力和作为PDT光敏剂的离体抗癌活性,本文报道了以无取代基的酞菁锌($ZnPc$)、邻苯二甲酰亚氨、聚甲醛、发烟硫酸为原料,采用“一锅法”合成了含不同数目磺酸基

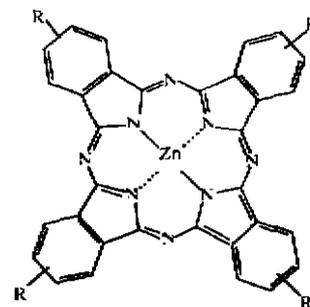


图1 磺酸基邻苯二甲酰亚氨甲基酞菁锌的分子结构图

Fig. 1 Chemical structure of sulfonated phthalimide-methyl zinc phthalocyanines

和邻苯二甲酰亚氨甲基酞菁锌的混合物(见图1),并通过高效液相色谱(HPLC)进行分离,得到组成为 $ZnPcS_2P_2$ 组分,测定了它的IR、UV-Vis光谱,并研究了该组分在体对 S_{180} 和 U_{14} 实体

收稿日期:1997-02-09。 收修改稿日期:1997-07-21,

福建省科委资助项目和厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室部分资助项目。

* 通讯联系人。

第一作者:刘尔生,女,55岁,副教授,研究方向:配合物物理化学。

瘤的光动力活性和机理。

1 实验部分

1.1 原料及试剂

1,8-二氮杂双环[5.4.0]-十一碳烯-7(简称 DBU Aldrich 公司);邻苯二甲腈(Aldrich 公司);聚甲醛(超纯,Merck 公司);乳化剂(一种蓖麻油衍生物 Cremophor EL, Sigma 公司);血卟啉衍生物(HPD,为北京医药工业研究所生产,批号 950311);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器及方法

C,H,N 含量分析用日本 MT-3 型元素分析仪;红外吸收光谱测定用英国 Perkin-Elmer PE-983G 红外光谱仪(KBr 压片);物种分析和半制备分离用日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪(HPLC,ODS 柱);紫外可见光谱测定用德国 Perkin-Elmer Lambda 9 UV/VIS/IR 光谱仪;在体实验照射光源采用中国科学院电学研究所生产的 KDH-B 型红光治疗仪(波长 600-750 nm)。

1.3 原料 ZnPc 的合成

参考日本 Tomada, H.^[4]方法进行合成,具体作法是:在装有搅拌装置和回流冷凝管的三颈瓶中,依次加入无水氯化锌 0.34 g(2.5 mmol),邻苯二甲腈 1.28 g(10 mmol),正戊醇 40 ml 和 DBU 1.5 ml(10 mmol),在搅拌下加热回流 6 h,然后冷却,吸滤得晶状产物,依次用正戊醇、3%盐酸、水和无水乙醇洗涤,再用氯仿萃取纯化,产物经干燥后,通过 UV-Vis、IR 表征,并进行元素分析证实其组成 $ZnC_{22}H_{16}N_8$,实验值(%):C, 65.98; H, 2.60; N, 18.98; 计算值(%):C, 66.51; H, 2.79; N, 19.39。

1.4 标题化合物的合成和 $ZnPcS_2P_2$ 的分离

在三颈瓶中依次加入 1.34 g(2.32 mmol)ZnPc, 5 ml 浓 H_2SO_4 ,室温下搅拌 20 min 后,再加入 0.41 g(2.79 mmol)邻苯二甲酰亚氨、0.12 g(4 mmol)聚甲醛、9 ml 发烟硫酸(含 SO_3 50%),在 80℃下反应 5 h,然后冷却至室温,将产物倒入 200 ml 冰水中,生成蓝色絮状沉淀,过滤并依次用 1 mmol/L H_2SO_4 和二次蒸馏水洗涤,洗涤后的沉淀溶于 1 mol/L KOH 溶液中,过滤除去碱不溶物,收集滤液,用稀 H_2SO_4 调溶液 pH 值至 7 左右,转移到旋转蒸发仪中蒸发、浓缩和真空干燥后再用甲醇提取、除盐,提取液减压除去甲醇,即得含不同数目磺酸基和邻苯二甲酰亚氨甲基酞菁 锌配合物的混合物。

$ZnPcS_2P_2$ 的分离条件是:半制备—ODS 柱,直径 20 mm,长 25 cm,ODS 的粒度为:直径 15 μm 、孔径 100 \AA ,洗脱液为甲醇-磷酸钠缓冲溶液(pH=5)在 90 min 内甲醇浓度从 0~95%线性梯度洗脱,洗脱速度为 5 ml/min,检测波长 674 nm,柱温 30℃,根据不同的保留时间 R_t ,依次收集各组分。

1.5 $ZnPcS_2P_2$ 在体光动力活性及对皮肤的光毒性试验

药剂配制采用 Cremophor EL 为乳化剂,1,2-丙二醇和生理盐水为稀释剂,实验选用同一性别小鼠,接种瘤块(S_{180} 和 U_{14})后 5-6 天,待瘤块长至直径达 0.5 cm 左右,用 2.5% Na_2S 脱去瘤块部位的毛,按瘤块大小随机分成若干组,每组 10 只小鼠。实验组腹腔注射系列浓度药液,对照组为同浓度(按体积比)乳化剂,以 HPD 为阳性对照。腹腔给药后,移至暗室继续喂养,2 天后用红光治疗仪照射肿瘤部位,照射完即移回暗室喂养,一周左右处死小鼠,剥取瘤块,称重,计算抑瘤率 $(1-T/C)\%$: $(1 - \text{实验组动物平均瘤重} / \text{对照组动物平均瘤重}) \times 100\%$ 。

对皮肤光敏毒性试验,具体做法是把小鼠随机分成若干组,每组5只,实验组腹腔注入 ZnPcS_2P_2 2 mg/kg,阴性对照组注入等量生理盐水,以HPD作为阳性对照,注入量为16 mg/kg。继而把实验小鼠移入暗室喂养,逐日各取出一组,罩以园形玻璃缸给予照光。光源为500W碘钨灯,光照距离1 m 照光2小时后取出小鼠,用直径为6 mm 打孔器于耳中部固定部位打孔,分别称两耳重量(mg),以其平均值被体重除,求得耳指数(Ear Index, 简称EI)。

2 结果与讨论

2.1 ZnPcS_2P_2 的分离及其表征

从本方法合成的产物进行HPLC分析表明,产物为含S与P基团摩尔比不同的五个主要组分的混合物,而且它们在上述HPLC分离条件下,随淋洗液中甲醇浓度的增大出现分段洗脱现象,因此,可根据不同的保留时间(R_t),依次收集A(22-40 min)、B(41-60 min)、C(61-65 min)、D(66-79 min)和E(80-86 min)五个主要组分。这些组分随保留时间的增加,所含亲水性基团S的数目逐渐减少,亲脂性基团P的数目依次增加,即首先洗脱出的主要是含水溶性S基团的酞菁锌,最后洗脱出的主要是含脂溶性P取代基团的酞菁锌,中间流出的是同时含有S和P基团的两亲性酞菁锌。其中D组分脱盐后进行元素分析,结果表明(见表1)其组成相应于 ZnPcS_2P_2 。

表1 ZnPcS_2P_2 的元素分析数据
Table 1 Date of Element Analysis for ZnPcS_2P_2

| | C | N | S | H |
|-----------------|-------|-------|------|------|
| found(wt%) | 52.36 | 14.43 | 5.98 | 2.85 |
| calculated(wt%) | 54.04 | 13.87 | 5.77 | 2.54 |

另外,从该组分的IR谱看,除了可见酞菁环的 1006 cm^{-1} 、 1090 cm^{-1} 、 870 cm^{-1} 特征吸收外,亦可见在 3042 cm^{-1} 和 2914 cm^{-1} 处分别对应于亚甲基的 $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ 吸收峰,以及 1329 cm^{-1} 和 1168 cm^{-1} 处对应于磺酸基的 $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_2)$ 的吸收峰,因此,可以认为该组分的配合物中含有S、P取代基,与文献报道^[5]的类似配合物的特征吸收峰很相似,因此可以认为该组分的配合物中,每个酞菁锌分子环周边上含有两个磺酸基和两个邻苯二甲酰亚氨基,其化学式为 $\text{C}_{50}\text{H}_{20}\text{O}_{10}\text{N}_{10}\text{S}_2\text{K}_2\text{Zn}$ 。通过研究 ZnPcS_2P_2 在甲醇溶液中的UV/Vis谱^[3]可见,在溶液中存在单体与二聚体的平衡,其单体最大吸取波长为667 nm,二聚体最大吸收波长为634 nm,且在溶液中主要以单体形式存在,这与 ZnPcS_2P_2 的单体在670 nm波长附近具有最强的光敏化能力的实验结果是一致的。

2.2 ZnPcS_2P_2 的在体光动力活性

表2为 ZnPcS_2P_2 与对照组HPD作为光动力治疗光敏剂在小鼠体内对 S_{180} 和 U_{14} 实体瘤的光动力活性。

从表2可看出 ZnPcS_2P_2 对 S_{180} 和 U_{14} 的抑瘤率分别达68.7%,和76.7%,显示出明显的疗效,而阳性对照组(HPD)在同等条件下其抑瘤率仅分别为36.3%和53.2%。说明本文合成并分离得到的 ZnPcS_2P_2 配合物的疗效高于HPD。

表 2 ZnPcS₂P₂ 与 HPD 对在体 S₁₈₀ 和 U₁₄ 实体瘤的光动力活性Table 2 In Vivo Photodynamic Activity of ZnPcS₂P₂ and HPD against S₁₈₀ and U₁₄ Carcinoma in Mice

| photosensitizer | S ₁₈₀ | | U ₁₄ | |
|-----------------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | MWT | (1-T/C) × 100% | MWT | (1-T/C) × 100% |
| ZnPcS ₂ P ₂ | 0.800 | 68.7 | 0.542 | 76.7 |
| HPD | 1.630 | 36.3 | 1.008 | 53.2 |

MWT, Mean Weight of Tumor

(1-T/C) × 100%: (1-MWT of Treated Group/MWT of control Group)100%

Drug: ZnPcS₂P₂ 2 mg/kg, HPD 16 mg/kg

Irradiated in two days after drug given

Light Intensity: 252 J/cm²

2.3 ZnPcS₂P₂ 对皮肤光敏毒性

研究结果(见表 3)表明,给药后第一天,经光照后可见小鼠皮肤对 ZnPcS₂P₂ 及 HPD 有明显的光毒反应,表现为耳部皮肤血管扩张、充血及水肿,耳廓变厚,而阴性对照组几乎无改变。但第四天后,ZnPcS₂P₂ 与阴性对照组几乎无区别,而 HPD 组仍表现较强的光毒性。这个结果首先是由于 ZnPcS₂P₂ 的最大吸收波长(λ_{max} = 667 nm)位于近红外区,而 HPD λ_{max} ≈ 400 位于近紫外可见光区。同时也反映了 HPD 的代谢比 ZnPcS₂P₂ 慢,易长期滞留于皮肤中,说明 ZnPcS₂P₂ 比 HPD 更适于在 PDT 中作为光敏剂。

表 3 ZnPcS₂P₂ 和 HPD 对小鼠皮肤的光毒性Table 3 Mouse Skin Photocytotoxicity Induced by ZnPcS₂P₂ and HPD

| time(day) | ear index(x ± s, n = 5) | | |
|-----------|-------------------------|-----------------------------------|-------------|
| | control | ZnPcS ₂ P ₂ | HPD |
| 1 | 0.45 ± 0.05 | 0.85 ± 0.20 | 0.90 ± 0.15 |
| 2 | 0.43 ± 0.02 | 0.62 ± 0.13 | 0.85 ± 0.10 |
| 3 | 0.42 ± 0.03 | 0.52 ± 0.06 | 0.75 ± 0.05 |
| 4 | 0.41 ± 0.02 | 0.42 ± 0.03 | 0.72 ± 0.05 |
| 10 | 0.41 ± 0.05 | 0.41 ± 0.07 | 0.55 ± 0.03 |

2.4 ZnPcS₂P₂ 光动力抗肿瘤活性机理探讨

肿瘤的光动力治疗(PDT)是基于光敏剂注入肌体后,可选择性滞留在肿瘤中,当以特定波长的光照射时,便产生一系列光化学反应,从而达到杀伤所在部位肿瘤细胞和破坏肿瘤组织的一种新方法。其中的光化学反应属 II 型机理^[2],即一般认为光敏剂(基态)在特定波长的光照射下,首先通过产生的激发三线态光敏剂与肿瘤组织中基态氧分子(³O₂)发生能量交换,产生单线态¹O₂(或称为¹Δ_g 活性氧),然后,这种¹O₂ 通过氧化作用杀伤肿瘤细胞和破坏肿瘤组织,达到治疗的目的。

在 PDT 中最关键的是光敏剂。理想的光敏剂应具有以下特征:(1)肿瘤选择性摄取率高,而且易于代谢;(2)Q 带最大吸收波长应位于穿透组织能力强的红光区;(3)在红光激发下三线态量子产率高,寿命长;(4)对自然光吸收弱,对皮肤的光毒性小;(5)化学性质稳定、低毒。本文合成并分离得到的配合物 ZnPcS₂P₂ 与 HPD 相比,首先由于同时含有亲水性基团和亲脂性基团,因此它易与高、低密度脂蛋白结合,通过肿瘤细胞膜进入细胞内,并滞留在其中,即易被肿

瘤细胞和组织所摄取,当受光照后,即产生光动力作用。这从肿瘤组织的切片在透射电镜观察到肿瘤细胞的凋亡现象也可得到证明。其次,ZnPcS₂P₂最大吸收波长(667 nm 位于红光区),比HPD的最大吸收波长(405 nm 位于紫光区),有较大红移,因而不仅皮肤光毒性小,而且其穿透肌体组织能力强。同时,ZnPcS₂P₂中心离子Zn²⁺为d¹⁰构型,因而它的激发三线态量子产率高、寿期长,光敏化能力强。另外,在化学稳定性上,ZnPcS₂P₂也高于HPD。综上所述,可以认为ZnPcS₂P₂是可望取代目前临床应用的HPD,成为新一代的抗癌光敏剂。

参 考 文 献

- [1] Simic-Glavaki, B.; Leznoff, C. C.; Lever, A. B. P. (ed.); *Phthalocyanines, Properties and Applications*, Vol. 3, VCH Publishers; New York, 1993.
- [2] Ben-Hur, E.; Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. (ed.); *Photodynamic Therapy, Basic principles and Clinical Applications*, Marcel Dekker; New York, 1992, 63.
- [3] 黄剑东、刘尔生、杨素苓等,物理化学学报,1997,13(3),247.
- [4] Tomoda, H.; Saito, S.; Shiraishi, S. *Chem. Lett.*, 1983, 313.
- [5] Paquette, B.; Boyle, R. W.; Ali, H. et al *Photochemistry and photobiology*, 1991, 53(3), 323.

STUDIES ON THE SYNTHESIS AND PHOTODYNAMIC ANTITUMOUR ACTIVITY OF SULFONATED PHTHALIMIDOMETHYL PHTHALOCYANINE ZINC

Liu Ersheng Huang Jiandong Dai Zhifei

Yang Suling Wu Yiqun Chen Naisheng Huang Jinling

(Department of Chemistry, Institute of Functional Materials, Fuzhou University, Fuzhou 350002)

Huang Ziqiang Sun Jiangcheng Xu Jianhua

(Cancer Pharmacology Research Section, Fujian Medical University, Fuzhou 350004)

Zinc phthalocyanines substituted to different degrees with hydrophilic sulfonic acid and hydrophobic phthalimidomethyl groups were synthesized and separated on a semi-preparative reverse phase HPLC column packed with ODS(C-18) spherisob. The ZnPcS₂P₂ was obtained and characterized by elemental analyses, IR spectra and UV/Vis spectra. The photodynamic therapy effects of ZnPcS₂P₂ in vivo showed that growth of S₁₈₀ and U₁₄ solid carcinoma was inhibited significantly. The inhibitory rate was 76.7% and 68.7% respectively. Its antineoplastic mechanism by PDT was also researched preliminarily.

Keywords: hydrophilic-lipophilic zinc phthalocyanine synthesis photodynamic activity antineoplastic mechanism