

从分子结构出发探索 TPP 分子用于生物成像与 光学治疗的潜能

张佳丽^{1,2} 孟晓青^{1,2} 孙枝红¹ 龚 萍¹

¹(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

摘 要 5-(4-羧基苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉(TPP)是具有高度对称性和大 π 共轭结构的分子, 属于卟啉衍生物。卟啉是血红素、叶绿素等多种生物成分的关键前体, 结构上的特殊性使其呈现出特征的光学特性。该文通过检测不同溶液条件下 TPP 的电子吸收和分子发射光谱的变化, 探讨溶液极性、pH 等对其光学性能的影响, 测量分子的质子化能力, 并与理论计算值互相推演, 探究可能出现这些现象的分子结构变化。最后, 根据体外溶液和肿瘤细胞中光动力效果预测其在肿瘤的光动力治疗方面的潜能。

关键词 5-(4-羧基苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉; 分子结构; 光谱; 质子化常数; 光动力反应
中图分类号 O 621.4 文献标志码 A

The Molecular Structure of TPP and Its Potential for Bio-Imaging and Photo-Therapy

ZHANG Jiali^{1,2} MENG Xiaoqing^{1,2} SUN Zhihong¹ GONG Ping¹

¹(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPP) is a porphyrin derivation with high symmetry and conjugated π bond. Porphyrins are critical precursor of many bio-compounds, such as heme and chloroplast. And its unique structure contributes to a special spectroscopy. In this article, the effect of polarity and pH of solution on the optical property of TPP was analyzed by detecting the absorption and emission spectra in different solvent. Then, we discussed how the molecular structure changed before and after protonation by theoretically circulating several basic parameter of different conformations. Finally, we predicted its prospects for photodynamic therapy according to the photodynamic reaction efficiency shown *in vitro*.

Keywords TPP; molecular structure; spectroscopy; protonation constant; photodynamic reaction

收稿日期: 2017-10-12 修回日期: 2017-12-15

基金项目: 科技部港澳台专项(2015DFH50230); 国家自然科学基金项目(21375141、81671758); 深圳市专项资金项目(JSJG20160331185422390、JCYJ20150403091443298、JCYJ20150521094519473、JCYJ20160429191503002)

作者简介: 张佳丽, 硕士研究生, 研究方向为小分子肿瘤诊疗技术; 孟晓青, 博士研究生, 研究方向为单分子探针肿瘤诊断技术; 孙枝红, 工程师, 研究方向为纳米材料的生物学应用; 龚萍(通讯作者), 研究员, 研究方向为生物影像及癌症诊疗技术, E-mail: ping.gong@siat.ac.cn.

1 引言

物质的光学特性来源于构成物质最小单位(分子、离子和原子)中的电子与能量相互作用过程中的状态改变。不同分子(离子、原子)的光谱特殊性来源于其特殊的电子排布方式,是结构的最好体现^[1],任何一点分子构型、构象上的改变都有可能造成电子吸收、分子发射光谱的较大变化。有机小分子抗干扰性能差,极易受到环境扰动,再加上机体是一个动态的系统,成分复杂且不断变化,因此,对于有机小分子类诊疗药物的研究,预先推测其分子结构在各种因素作用下可能产生的改变具有极强的指导意义和必要性。卟啉类分子不仅是血红素、叶绿体等多种生物活性大分子的类似物,还是历史最悠久的光敏剂,被广泛用于光动力治疗的研究^[2-4]。

目前临床应用的光敏剂大都是卟啉衍生物,按照历史沿革可大致分为三代。其中,第一代光敏剂是以血卟啉衍生物、二血卟啉醚和光卟啉为代表的混合制剂,穿透深度低于 0.5 cm,且需长时间避光;第二代光敏剂,如酞菁类、苯卟啉衍生物和亚甲基蓝等,比第一代光敏剂的光敏期更短、穿透深度更大、产生更多的单线态氧;第三代光敏剂则是对第二代进行改进,通过偶联一些具有识别特性的生物或化学分子,进一步提高肿瘤靶向性。从这一演进过程也可以看出,优良光敏剂应该具有:较长的激发波长(穿透深层组织)、较高的荧光量子产率(单线态氧产生效果)、较强的肿瘤靶向性以及较低毒性。因此,对光敏分子上述性能的评价是判断其生物应用效果的基础。

本文研究所用的卟啉分子经核磁氢谱确认,为 5-(4-羧基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉(5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-Triphenylporphyrin, TPP)^[5],属于第二代光敏剂。作为卟啉类衍生物,它与其同系物具有类似的光

化学性质,可以成为一种有机小分子前药。本文从分子结构角度出发,设计一系列实验检测 TPP 的相关性能,预测将其应用在生物成像与光学治疗方面的优势和局限^[6]。本实验依次探究了溶液极性、pH 对分子的紫外可见吸收和荧光光谱的影响,计算其表观质子化常数,推演质子化前后的稳态分子构象,并初步测定其在体外细胞水平的光动力效果。另外,从分子结构角度讨论造成上述实验现象的可能原因,预测将其用于诊疗领域所具有的优势和可能面临的问题。

2 材料与方法

2.1 主要仪器和材料

核磁共振波谱仪(Bruker AM-400, 瑞士布鲁克/Bruker);紫外分光光度计(Lambda 750, 美国珀金埃尔默/PerkinElmer);pH 计(Sartorius PB-10, 德国赛多利斯/Sartorius);荧光光谱仪(FSP920, 英国爱丁堡/Edinburgh Instruments);激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5, 德国莱卡/Leica)。

TPP 购于 Frontier Scientific;氘代氯仿(CDCl_3 , 含 TMS, 购自 Sigma);二甲基亚砜(DMSO, AR, 购自 Sigma);乳腺癌细胞(4t1 Cells, 购自中国科学院上海细胞库);细胞培养基(DMEM, 购自 Thermo Fisher);二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA, 购自 Sigma)。

2.2 方法

2.2.1 用核磁共振氢谱(^1H NMR)对 TPP 分子结构进行表征

作为 D_{2h} 点群分子,TPP 分子骨架具有高度立体对称性,3 个苯环取代基所处化学环境几乎相同,卟吩母环上的氢处于相似的屏蔽环境,且关于面对称。这些因素使分子内氢的振动频率可分为为数不多的几类,因此,用氢核磁共振波谱对其进行结构确认是一种较为简洁、高效的表征

方式。

主要操作步骤为：首先，试样经硅胶柱分离提纯、干燥；然后，取 0.9 mg 试样溶于 CDCl_3 ；最后，在相应磁场中扫描，16 次叠加后经傅立叶变换得到二阶信号，以便分析。

2.2.2 测定 TPP 在不同含水量溶液中的电子吸收光谱

本文首先研究了卟啉分子在不同比重的水、有机溶剂溶液中的吸收光谱变化。由于羧基取代基的存在，分子极性增大，选用极性有机溶剂才能保证较为理想的溶解效果，因此选择了极性非质子型的有机溶剂 DMSO 来使其充分溶解。虽然由此引入较强的溶剂效应使得光谱的精细结构消失，但本文主要目的是为了根据此结果选定适宜的溶剂含水量，用于后续质子化常数测定的实验，而非精确定量与定性，故只需得到分子特征吸收峰的变化趋势即可。

操作步骤为：(1) 将 TPP 溶解于 DMSO，制得浓度为 10 mmol/L 的母液，实验时稀释到所需浓度；(2) 配制不同比例的 DMSO、水(去离子)混合溶液(DMSO 体积分数依次为 100%、75%、65%、50%、33% 和 25%)，用该系列溶液将母液稀释至特定浓度(2.5 $\mu\text{mol/L}$)，依次测定其吸收光谱。

2.2.3 测定 TPP 在不同 pH 溶液中的电子吸收光谱

卟吩母环中心对称分布着 4 个氮原子。其中，2 个吡咯型的(=NH)有可能电离出质子形成 TPPH^- 或 TPP^{2-} 离子，另外 2 个吡啶型的(=N-)，在酸性介质中能形成质子化的阳离子 TPPH_3^+ 或 TPPH_4^{2+} 。本文采用光度法测定其表观质子化常数^[7]，并对 TPP 酸性环境中的特征吸收曲线进行分析，讨论造成这种现象的分子结构层面的原因。

操作步骤为：(1) 预先用 HCl/NaOH 调节 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液(按照标准文献配置)；(2) 配置 pH 值为 1.0~7.0，梯度为 0.1 的系列溶

液，再将其与 DMSO 等体积混合，得到含 50% DMSO 的系列 pH 梯度溶液，并用酸度计标定混合溶液的最终 pH 值；(3) 选取适宜 pH 的系列溶液稀释 TPP 原液至 10 $\mu\text{mol/L}$ ，25 $^\circ\text{C}$ 下依次测定其吸收光谱；(4) 计算该条件下 TPP 的质子化常数(Na^+ 作为活泼的单价态金属离子几乎不会影响卟啉类分子发生络合，因此这里选用 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲体系)。

2.2.4 测定 TPP 在不同溶液条件下的分子荧光光谱并计算不同状态下的分子稳态结构

卟啉呈现出非常有利于荧光发射的分子结构，可能具有很高的荧光量子产率。由于质子化前后的 TPP 分子能量、稳态构象都有较大变化，而分子结构的变化必然导致光学性能的改变。因此，本文通过实验观测溶液极性(含水量)和 pH 对分子荧光的影响，并根据理论预测值推演导致荧光信号改变的可能机理。本节通过计算质子化前后的分子处于最稳定状态时所具有的能量和结构构象，将理论模拟的结果与实验现象相互推演验证。

主要步骤为：不同含水量的 DMSO/ H_2O 的混合液以及不同 pH 的混合溶剂的配置方法与前两节相同，而后依次测量各溶液中 TPP 的荧光光谱，绘制荧光变化曲线。利用 Chem3D 对分子结构进行优化，计算质子化前后的分子处于最稳定状态时的理论结构参数和能量数值。

2.2.5 检测 TPP 在体外溶液和细胞水平的光动力反应

卟啉类的分子是一种历史悠久的光敏剂，吸收一定波长的光后到达激发单重态(S_1)的分子，一部分会通过非辐射或辐射(荧光)直接回到基态；另一部分会通过系间窜跃到达跃迁被禁阻的激发三重态(T_1)并将能量传递给周围的基态分子氧($^3\text{O}_2$)形成单线态氧($^1\text{O}_2$)。其中， $^1\text{O}_2$ 是一种最重要的活性氧(ROS)，在光动力治疗(PDT)中能够诱导细胞凋亡或导致细胞坏死，直接杀伤所定

位的细胞^[8-10]。

DCFH-DA 探针是一种被广泛用于检测细胞中活性氧水平的荧光探针。其主要原理是, 被活性氧氧化后生成具有荧光发射能力的二氯二氢荧光素(Dichlorofluorescein, DCF)分子(激发波长 488 nm、发射波长 523 nm), 通过检测 DCF 的特征荧光强度来检测活性氧水平, 该原理在体外试液中同样适用^[11]。

本文先后测定 TPP 分子在溶液和肿瘤细胞中可以达到的实际光动力效果, 评估 TPP 分子用于光学治疗, 尤其是光动力治疗的潜能。主要步骤(均在暗室中进行)如下:

(1) 体外溶液中的光动力反应效果测定: 配制 50% DMSO、pH 7.0 的混合溶剂将母液稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$, 分装到 2 mL 离心管中, 激光单独照射一定时间后立即进行荧光测量;

(2) 细胞中的活性氧产生的效果测定: 将乳腺癌细胞(4t1)与 TPP(5 $\mu\text{mol/L}$)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱(5% CO_2)中共孵育 30 min 后, 施加等时间间隔的激光照射, 观察 DCF 荧光(488 nm 激发、523 nm 发射)。

3 结果

3.1 TPP 分子的氢核磁图谱(¹H NMR)

用氘代氯仿(Chloroform-d)作溶剂时, 各组核磁峰的化学位移值(δ), 多重态(*s*-单重峰、*d*-双重峰、*m*-多重峰、*qt*-四个三重峰), 积分, 耦合常数(*J*)分别为: ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.98~8.78 (*m*, 8H), 8.53 (*d*, *J*=8.2 Hz, 2H), 8.38 (*d*, *J*=8.2 Hz, 2H), 8.31~8.19 (*m*, 6H), 7.79 (*qt*, *J*=7.5, 1.3 Hz, 9H), -2.75 (*s*, 2H), 具体归属情况如图 1 所示。

3.2 TPP 在不同含水量溶液中的电子吸收光谱

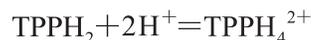
TPP 在不同比例混合溶液中的吸收曲线如图 2 所示。从图 2(a)可以看出, 当 DMSO 含

量为 100% 时, 418 nm 左右为最强吸收带(Soret 带, 为卟啉类物质的特殊 B 带), 同时 500~700 nm 范围内出现 4 个较弱的亚吸收带(Q_{IV-1} 带)。Soret 带源于电子由 $a_{1\mu}$ (HOMO 轨道的低能级)跃迁至 e_R^* (LUMO 轨道简并能级), 该过程电子在两个轨道中产生两个跃迁, 两个跃迁矩之间线性耦合, 跃迁几率大; 而 Q 带源于电子由 $a_{2\mu}$ (HOMO 轨道的高能级)至 e_R^* 的跃迁, 两个跃迁矩之间耦合相互抵消, 为弱吸收。因此, Soret 带虽为第二电子激发态, 强度仍是 Q 带的 10 倍左右, 这与同类物质的电子吸收光谱类似^[12]。图 2(b)显示, 随溶剂 DMSO 体积分数的降低(从 75% 降至 25%), 特征吸收峰强度明显降低且发生一定红移(约 16 nm)。由朗伯比尔定律可推知, 这极有可能是由于随着 DMSO 比例的减少, TPP 溶解度随之降低造成的。

3.3 TPP 在系列 pH 溶液中的电子吸收光谱及其质子化常数

由于羧基取代基的存在, 为保证吸收曲线随 pH 的变化能够用于反应吡啶型的氮原子(=N-)质子化过程, 需要使滴定前溶液的 pH 约等于或略低于 TPP 分子的表观解离常数, 即主要以 TPPH₂ 的分子态存在。参考苯甲酸在水中的电离常数($K_a=6.4\times 10^{-5}$, 25 $^{\circ}\text{C}$), 并通过反复优化, 将 pH 区间选定为 1.5~5.0, 测定该区间范围内的溶液中 TPP 分子的特征吸收峰强度随 pH 的变化, 结果如图 3(a)所示。需要说明的是, 在本小节中, TPP、TPPH₂ 均代表卟啉分子。

卟啉在不同 H⁺ 浓度的溶液中质子化反应为:



质子化常数和平衡体系中各物质浓度关系为:

$$\lg K = \lg \frac{[\text{TPPH}_4^{2+}]}{[\text{TPPH}_2]} + 2\text{pH}$$

在实验条件下, 物质浓度与吸光度近似遵循朗伯-比耳定律, 则在一定波长下有:

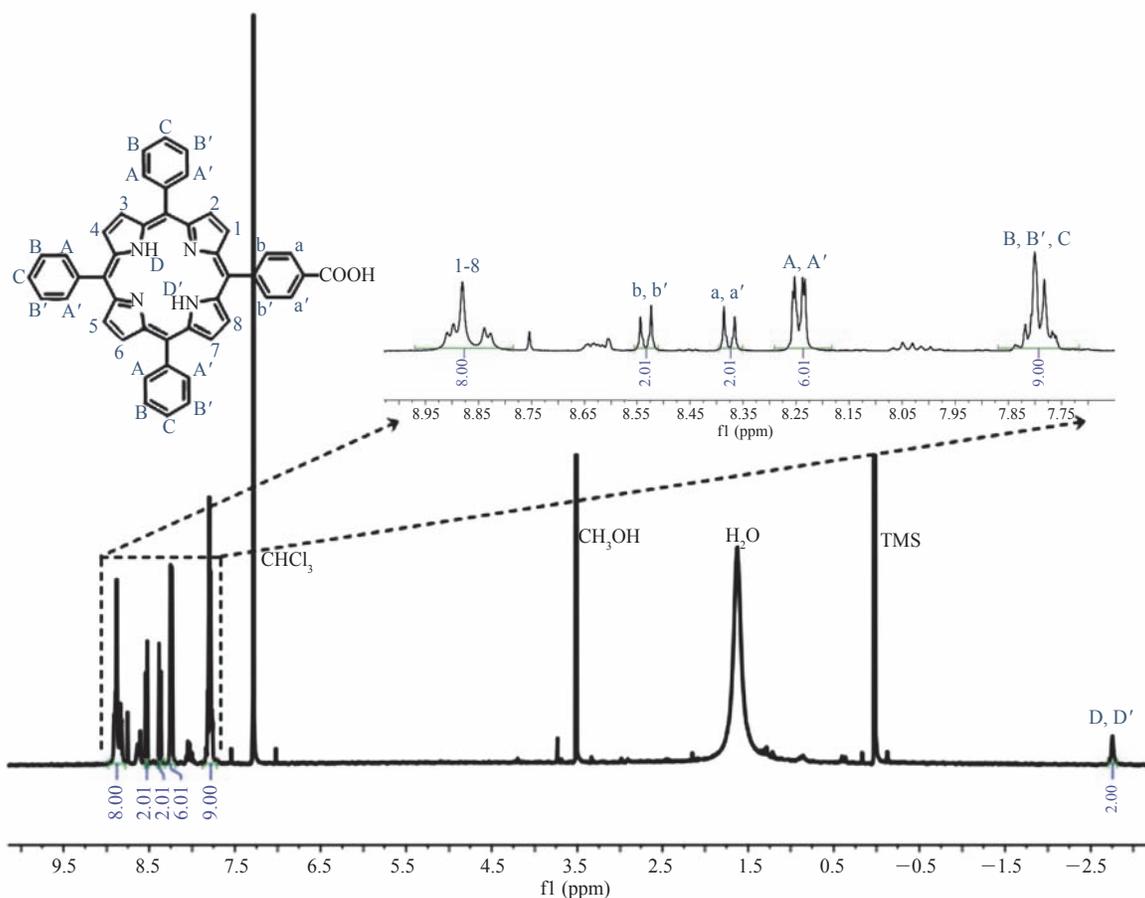
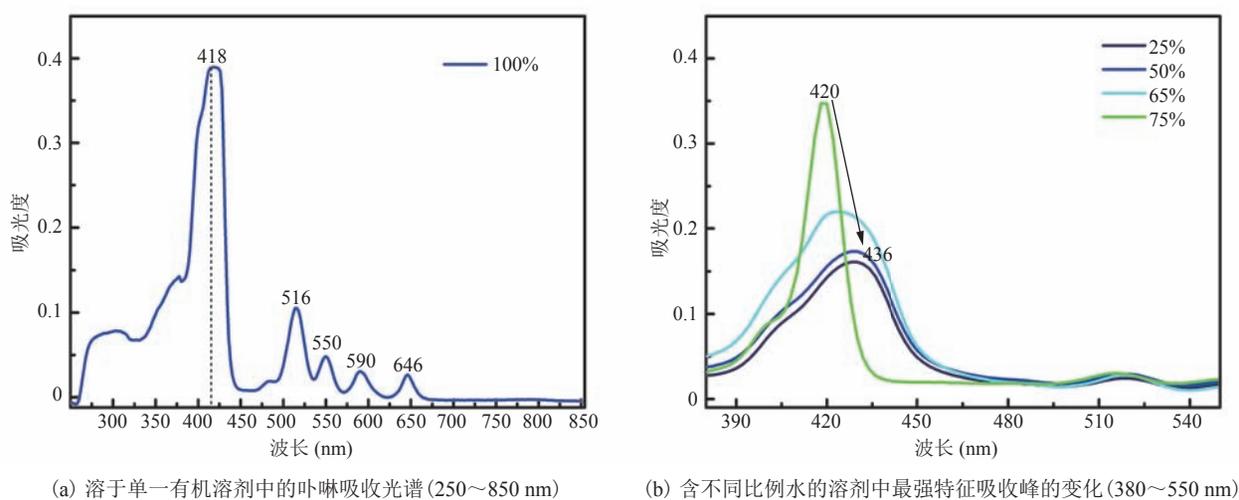


图 1 TPP 分子结构及其氢核磁谱表征

Fig. 1 Characterization of TPP molecular structure by ^1H NMR

(a) 溶于单一有机溶剂中的卟啉吸收光谱 (250~850 nm)

(b) 含不同比例水的溶剂中最强特征吸收峰的变化 (380~550 nm)

注: 百分比代表 DMSO 含量 ($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{DMSO}+\text{Water}}$)图 2 不同比例混合溶剂中卟啉 ($2.5 \mu\text{mol/L}$) 的紫外-可见光吸收光谱Fig. 2 UV-vis spectra of TPP in DMSO/Water mixture solvent ($C_{\text{TPP}}=2.5 \mu\text{mol/L}$)

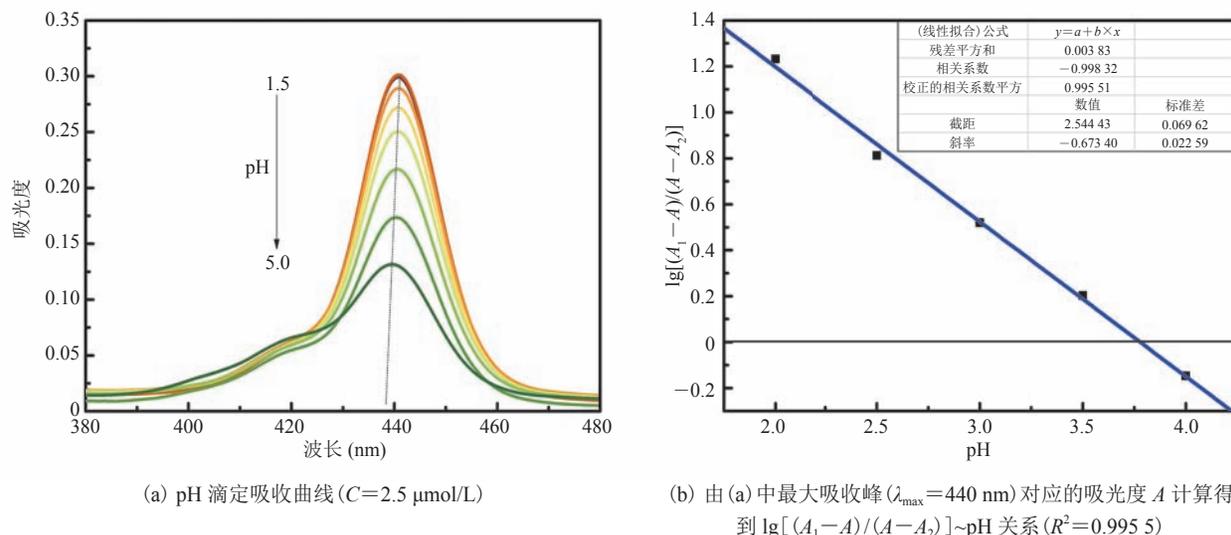


图 3 pH 滴定曲线及相对应的 $\lg[(A_1-A)/(A-A_2)] \sim \text{pH}$ 关系曲线

Fig. 3 Titration absorption curves of pH (1.5, 1.7, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0) (a) and corresponding plot of $\lg[(A_1-A)/(A-A_2)] \sim \text{pH}$ (b) at 25°C

$$\lg K = \lg \frac{A_1 - A}{A - A_2} + 2\text{pH}$$

其中, K 为质子化常数; pH 为酸度计测得的 DMSO 与磷酸盐缓冲液 (PBS) 体积比为 1:1 混合溶液的 pH 值; A_1 、 A 、 A_2 分别为 pH 5.0 (分子等电点)、一定酸度 (系列溶液测量值)、 pH 1.5 (完全酸化为 PH_4^{2+}) 时最大吸收峰 (440 nm) 处的吸光度。

计算结果如表 1 所示。由此绘制得到

表 1 不同 pH 溶液中的 $\lg[(A_1-A)/(A-A_2)]$ 值

Table 1 $\lg[(A_1-A)/(A-A_2)] \sim \text{pH}$ calculated from absorbances at 440 nm

pH	A	$\lg[(A_1-A)/(A-A_2)]$
1.5	0.303 0(A_2)	—
1.7	0.301 0	0.176
2.0	0.290 9	0.230
2.5	0.273 8	0.301
3.0	0.252 3	0.398
3.5	0.218 7	0.477
4.0	0.175 4	0.544
5.0	0.132 4	0.602
5.5	0.084 3(A_1)	—

$\lg[(A_1-A)/(A-A_2)] \sim \text{pH}$ 关系曲线 (图 3 (b))。通过计算可得: 当 $\lg[(A_1-A)/(A-A_2)] = 0$ 时, $\lg K (25^\circ\text{C}) = 2 \text{pH} = 7.557 0$ 。

3.4 质子化前后的分子的稳定结构参数及不同条件溶液中的荧光发射光谱

利用 Chem3D 软件依次计算 TPPH_2 和 TPPH_4^{2+} 分子经结构优化后的最理想状态下的构象及所具有的最低能量, 计算结果如表 2 所示。

表 2 TPPH_2 和 TPPH_4^{2+} 最稳定状态的结构构象和能量信息

Table 2 The molecular structure information of TPPH_2 and TPPH_4^{2+} after optimization

分子内作用力类型	能量 (kcal/mol)	
	TPPH_2	TPPH_4^{2+}
伸缩 (Stretch)	4.846 0	5.379 9
弯曲 (Bend)	50.486 6	51.940 6
伸缩-弯曲 (Stretch-Bend)	0.108 1	0.180 6
扭转 (Torsion)	30.439 6	27.491 1
非-1, 4 范德华力 (Non-1, 4 VDW)	8.576 5	13.621 7
1, 4 范德华 (1, 4 VDW)	39.907 5	39.649 2
电荷/电荷 (Charge/Charge)	—	53.651 4
电荷/偶极 (Charge/Dipole)	—	-36.238 2
偶极/偶极 (Dipole/Dipole)	2.493 6	1.206 4
分子总能量 (Total Energy)	136.857 8	156.882 7

图 4 为相应状态分子不同角度的三维模拟图。可以看到,即便处于能量最低状态,由于分子内结合氢离子数目的增加,TPPH₄²⁺ 分子的共平面性比 TPPH₂ 仍有所降低。这可能造成实际溶液条件下二者的构象差异更大,从而在不同质子化程度

下表现出极为不同的荧光量子产率。

图 5 为不同极性、pH 条件下的分子荧光光谱。图 5 显示,在 DMSO/H₂O 体系(室温)中,420 nm 激发光照下 TPP 分子的最强发射峰出现在 650 nm 附近,并在 720 nm 左右出现较弱的伴

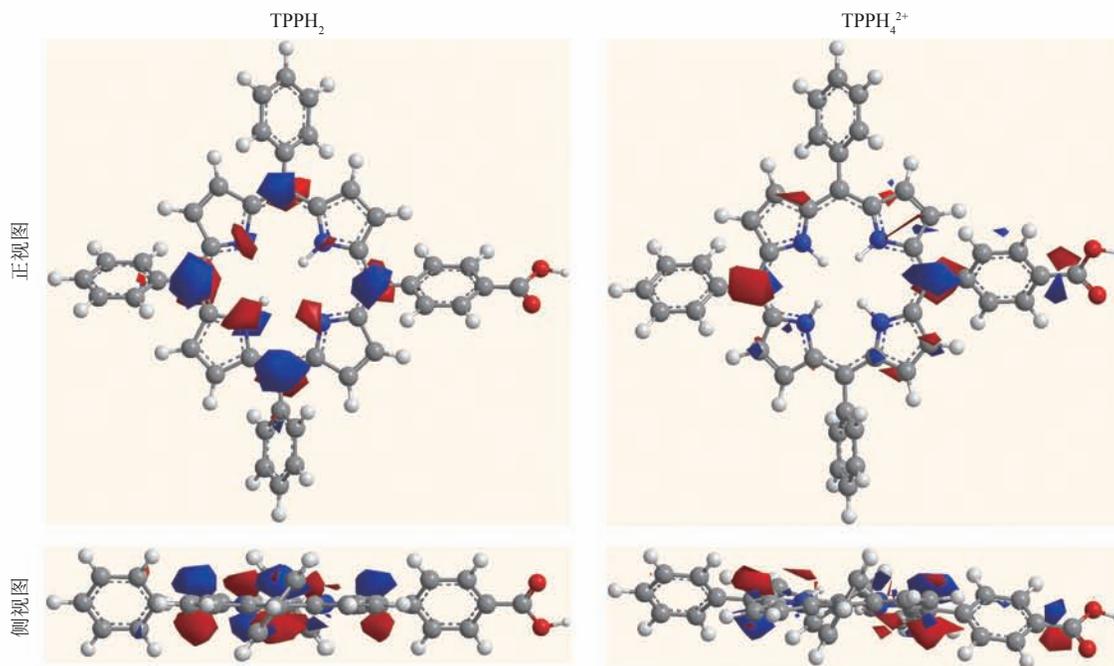
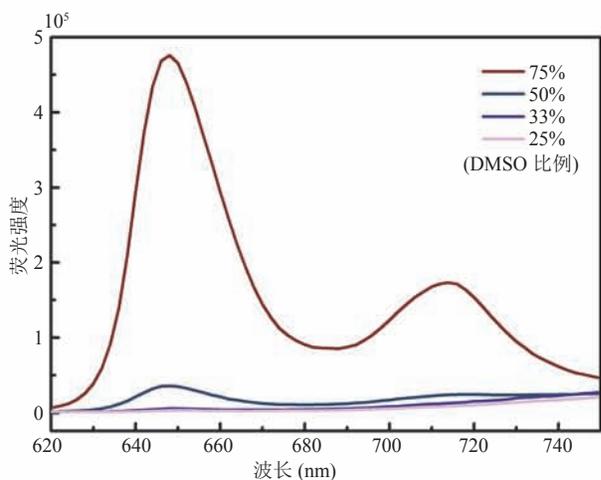
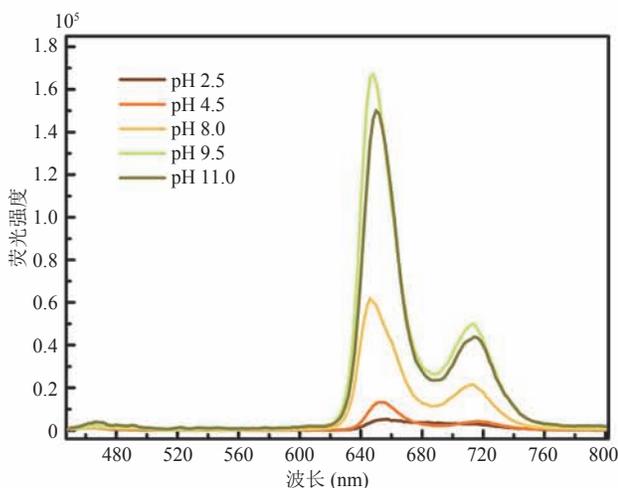


图 4 质子化前(TPPH₂)、后(TPPH₄²⁺)稳定状态下的模拟结构

Fig. 4 Optimized molecular structures of TPPH₂ and TPPH₄²⁺



(a) 不同比例混合溶剂中的荧光光谱



(b) 不同 pH 溶液中的荧光光谱(50% DMSO)

图 5 不同极性、pH 条件下的分子荧光光谱($C=2.5 \mu\text{mol/L}$)

Fig. 5 The fluorescent spectra of TPP in solvents with decreasing fraction of DMSO and different pH values

峰, 这两个特征峰是由 $S_1 \rightarrow S_0$ 跃迁产生, 对应吸收光谱中 Q 带; 同时, 440 nm 处在 pH 较高时有一个弱荧光发射峰, 这是由 $S_2 \rightarrow S_0$ 跃迁产生, 对应 420 nm 处的 Soret 吸收带。Soret 带的强吸收并没有产生该能级对应的强荧光, 而是在位移超过 200 nm 的位置荧光最强。这是因为, 强吸收并不意味着强发射——物质吸收光后电子由基态跃迁至不同的激发态, 但只有从由亚稳态再回到基态时才有荧光发射, 激发态电子需要以热辐射释放出能量转移到亚稳态, 这些能量损失就表现为吸收与发射光谱间的斯托克斯位移。

从图 5(a) 可以看到, 分子荧光强度随着溶液极性的增加(含水量提高)而迅速降低。当含水量超过 68% (DMSO 低于 33%) 时, 分子荧光降至基线。这是因为, 随着体系极性的增大, 探

针分子的聚集程度增大, 导致荧光淬灭。可推知, 卟啉分子在水溶液中的分散性较差, 则用于生物体时需要注意改造分子结构、选择适宜的给药方式。

由图 5(b) 可见, 在不同 pH 溶液(均含 50% DMSO)中, pH 2.5~9.5 范围内, pH 越高, 荧光强度越强, 且 pH 达 10.0 以上不再增加(pH 过高时有降低趋势)。这似乎与紫外吸收光谱的趋势相悖(图 3(a)), 但从分子质子化前后的三维结构模拟结果来看, 也许不难理解: 图 4(a) 显示, 完全质子化后的分子刚性降低, 且分子总能量增加, 卟啉分子内部及与介质之间的负面作用增加, 分子内转换几率增加, 使得荧光发射减弱。

3.5 体外溶液和肿瘤细胞中的光动力效果

图 6(a) 为含有过量 DCFH-DA (10 $\mu\text{mol/L}$) 的

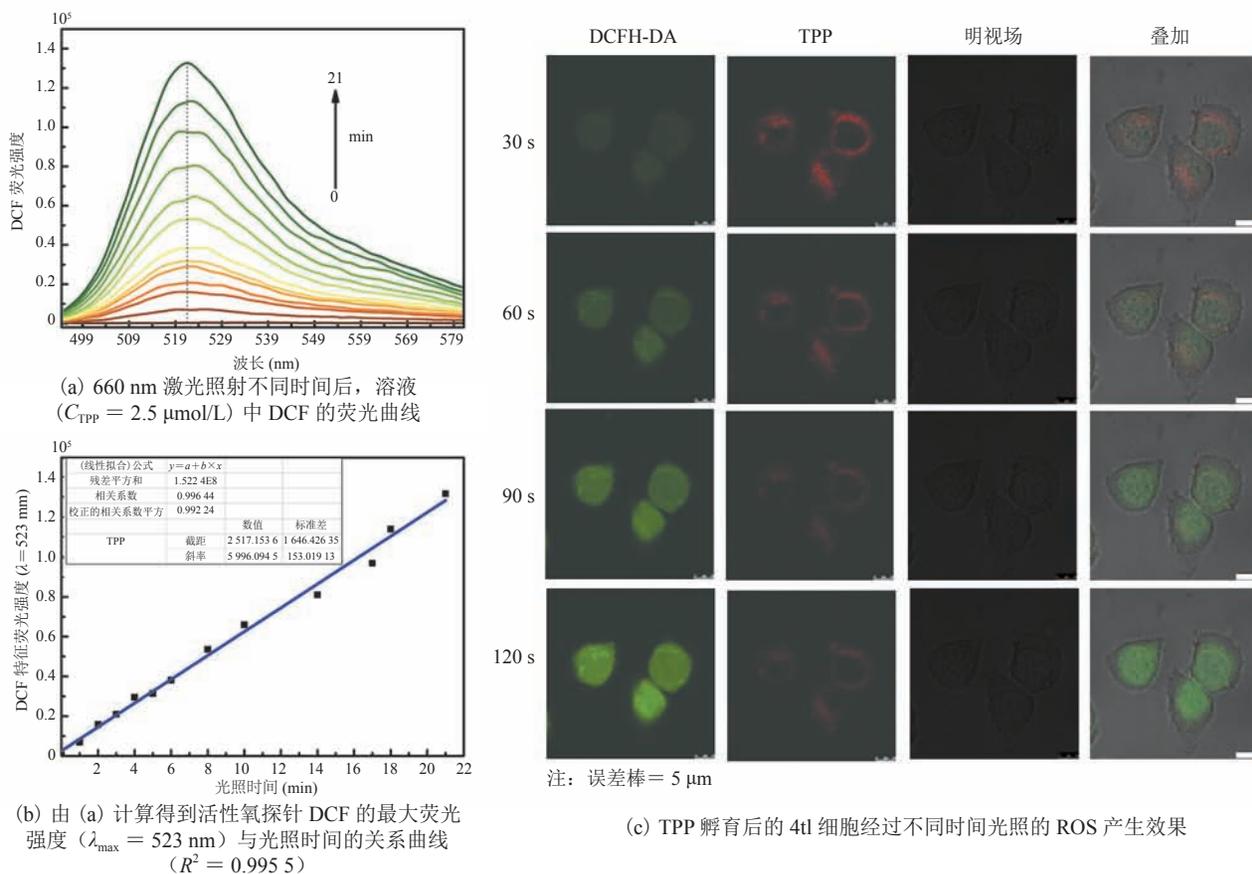


图 6 TPP 在体外溶液 (a, b) 及肿瘤细胞 (c) 中的光动力效果

Fig. 6 ROS production of TPP in DMSO/Water solution (a, b) and tumor cells (c) after different irradiation time

TPP (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 溶液, 经不同时间激光照射后, 检测得到的 DCF 分子特征荧光光谱 (ex 485 nm) 的变化; 图 6 (b) 是计算得到的 (a) 中最大发射波长 (523 nm) 处的荧光强度随光照时间的变化; 图 6 (c) 是对应的细胞水平光动力反应效果: 由 DCF 荧光强度的增加反映活性氧的产生。

4 讨论

4.1 溶液含水量对 TPP 吸收光谱的影响

含有共轭结构的有机分子外层价电子跃迁至激发态所需能量一般位于近紫外和可见光波范围, 因此紫外可见吸收常用于共轭分子特别是芳香性分子的定性定量分析^[13]。物质结构的细微改变都会导致吸收光谱有较大的改变。卟啉类物质的基本结构是在卟吩母环的不同位置共价键合各种取代基。其中, 卟吩是一个具有 11 个共轭双键的高度共轭环状分子, 为强发色基团, 环上氮 (N) 原子的孤对电子以及环外取代基可能具有的助色效应, 使分子的价电子发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量进一步降低, 最大吸收波长进一步红移, 从而呈现出独特的紫外-可见吸收光谱。

溶剂效应对卟啉类物质的 Soret 带影响较大: 随着含水量的增加, 最大吸收波长由 418 nm (100% DMSO) 逐渐移动到 436 nm (25% DMSO) 附近, 红移约 20 nm 且吸收强度明显降低 (图 2 (b))。这极可能是因为含水量增加时, 溶剂极性增大, 一方面 $\pi \rightarrow \pi^*$ 能级差减小, 价电子跃迁所需能量减少, 故吸收带红移; 另一方面, 极性增大导致分子聚集程度增加, 游离态分子的浓度降低, 由近似的 Lambert-Beer 定律可知分子的特征吸收强度将随之降低。

4.2 溶液 pH 对 TPP 吸收光谱的影响及其质子化能力

患病生物体内常呈现出特殊的 pH 水平。例如, 肿瘤和脓肿发生部位的组织液中都表现出

微酸性 (低于 6.0)^[14]。因此作为一种光学治疗试剂, 卟啉的质子化能力对于其在病灶部位的治疗 (特别是用于实体瘤的光动力治疗时) 效果有很大影响。此外, 机体中的存在着丰富的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 等各种金属离子, 而分子的质子化常数与其金属络合能力紧密相关^[15]。因此, 检测卟啉分子的质子化能力对于理解并预测其在生物体中可能产生的作用效果具有重要意义。

从 pH 滴定吸收曲线 (图 3 (a)) 可见, 在 pH 1.5~5.0 范围内, 随 pH 降低, 最大吸光强度显著增加。这可能主要有两个方面的原因, 一是在该区间内, 随 pH 降低, 分子内会逐渐形成 4 个吡咯型 (=NH) 氮, 电荷分布更加均匀, π 电子离域性增加, 跃迁几率增加, 因此特征吸收峰强度增加; 反之, 随 pH 增加, 质子化水平降低, 跃迁几率降低, 特征吸收减弱吸收。二是, 随酸度增加, TPP 溶解程度增加, 由朗伯比尔定律推知吸光度将显著增强。此外, 可以看到最大吸收峰位置在 pH 升高的同时发生蓝移, 但由于在所选 pH 范围内蓝移极小 (~ 2 nm), 故可将其视为扰动, 近似忽略, 仍将 440 nm 作为等吸收点, 根据此波长处的吸光强度计算质子化常数。

4.3 溶液含水量及 pH 对 TPP 荧光发射光谱的影响

荧光是一种被应用于材料、医药、检测等领域的光致发光现象, 具有瞬时性、可见性。能够发射较强荧光的有机分子, 都具有一些共性: (1) 分子是大 π 共轭结构, 这是因为共轭程度越大, 离域 π 电子分布越均匀就越容易被激发, 即电子激发的总数增加; (2) 刚性的平面共轭结构有助于减少激发态的分子内部及分子之间的其他能量耗散过程, 如振动弛豫、内转换、系间窜越等, 使激发态电子能够更多地从第一激发态 S_1 发射荧光返回基态 S_0 ; (3) 具有 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 等供电子型取代基, 进一步扩大分子的共轭程度。

尽管在上述因素的综合作用下, TPP 显示出了良好的荧光发射潜力, 但实验结果显示: 虽然 TPP 在人体体液的正常生理 pH 区间 (7.0~7.4) 内有较强的荧光信号, 但须注意 Q 带吸收的最大波长也只有 650 nm 左右, 则光穿透组织的深度理论上不足 0.7 cm, 且荧光发射波长所处波段与生物的背景荧光波段重合, 将受到很大干扰, 这使其在光学成像方面的应用具有很大局限^[16]。

4.4 体外的光动力反应效果

光动力反应有 3 个影响因素: 光敏剂、氧分子和光照^[17]。本文固定其他变量, 仅改变光照时间, 由图 6(a)、6(b) 可见, 随着激发光照时间的延长, 0~21 min 内 DCF 荧光持续地等比例增强, 且加入活性氧清除剂的对比实验结果显示荧光强度明显降低。这说明, DCF 的荧光强度可以反映溶液中的活性氧水平, 且激光照射时间越长, $^1\text{O}_2$ 产率越高。在长达 20 多分钟内, 这一趋势都几乎没有衰减。可见, 这种卟啉分子具有优良的光动力反应能力。此外, 细胞实验(图 6(c)) 效果也充分支持了这一结论: 在细胞耐受的光剂量内, 随着激光照射时间的延长, DCF 信号显著增强, 说明 ROS 产量随光照增加。

5 结 论

卟啉类分子被广泛应用到诸多领域, 如太阳能电池、仿生催化、分子识别等, 对其分子结构与性质的研究也较为透彻。Yao 等^[18]利用密度泛函理论对具有对称取代基的四苯基卟啉的几何构型、电荷密度、分子轨道进行计算, 并根据计算结果指认电子吸收和红外光谱的特征峰, 发现相关分子结构与光谱的变动范围随着 meso 位取代基吸电子能力单调增加, 说明取代基的电子效应对分子性质有很大影响。这可能是本文中的羧基取代四苯基卟啉与已经报道的其他四苯基卟啉的光学性能有所不同的重要原因。与胡珍珠等^[19]对

其他类似结构分子的研究结果对比, 本文分子具有更大的质子化常数(差值约 1.0)。造成这种显著差异的原因, 一方面来自温度、试剂等实验条件的改变, 另一重要方面则是取代基效应等对分子结构本身的影响。

5-(4-羧基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉(TPP) 分子荧光的最大激发和发射波长均位于可见光区, 并且紫外吸收和荧光发射光谱受环境溶液的极性、pH 影响很大, 若将其直接用于生物体成像, 很可能出现组织穿透力低、受机体荧光背景干扰严重等问题。在光动力效果方面, TPP 在溶液和细胞的前期实验中均展现了优异的活性氧产生能力, 可作为一种性能优良的光敏剂用于肿瘤的光学治疗。结合上述结果, 我们将寻找适宜的方法, 对 TPP 分子进行改造, 克服其结构上的弊端, 将其作为肿瘤的光学诊疗试剂开展进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Cid MM, Bravo J, Puzzarini C, et al. Computational Spectroscopy Tools for Molecular Structure Analysis [M]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014: 1274-1278.
- [2] Martinez SE, Huang D, Szczepaniak A, et al. Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation [J]. Structure, 1994, 2 (2): 95-105.
- [3] Zenkevich E, Sagun E, Knyukshto V, et al. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT [J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology, 1996, 33 (2): 171-180.
- [4] 邓晔, 郭瑶雪, 李春, 等. 血红素合成中间体——卟啉类化合物作为生物标记物的研究进展 [J]. 中南药学, 2015, 13(5): 509-512.
- [5] 侯安新. 两种中位不对称四苯基卟啉的氢谱解析 [J]. 大学化学, 2006, 21(5): 57-61.
- [6] Liu LH, Qiu WX, Li B, et al. A red light activatable

- multifunctional podrug for image-guided photodynamic therapy and cascaded chemotherapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(34): 6257-6269.
- [7] Tripathy U, Kowalska D, Liu X, et al. Photophysics of sorlet-excited tetrapyrroles in solution. I. metalloporphyrins: MgTPP, ZnTPP, and CdTPP [J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2008, 112(26): 5824-5833.
- [8] Ethirajan M, Chen YH, Joshi P, et al. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy [J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(1): 340-362.
- [9] Lovell JF, Liu TWB, Chen J, et al. Activatable photosensitizers for imaging and therapy [J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2839-2857.
- [10] Wang LY, Cao D. Research advances of porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy [J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2012, 32(12): 2248.
- [11] Rastogi RP, Singh SP, Hader DP, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 397(3): 603-607.
- [12] Wang DJ, Zhang J, Shi TS, et al. Transition identification of tailed porphyrin-Mn(III) complex in the near-UV and near-IR regions using surface photovoltage spectrum [J]. *Journal of Photochemistry & Photobiology A : Chemistry*, 1996, 93(1): 21-25.
- [13] Reichenbacher M, Popp J. *Electronic Absorption Spectroscopy* [M]. Springer Berlin Heidelberg, 2012: 145-214.
- [14] Yu XF, Yang XQ, Horte S, et al. A pH and thermosensitive choline phosphate-based delivery platform targeted to the acidic tumor microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 278-286.
- [15] Adeyemo A, Valiotti A, Hambright P. Kinetics of the reduction of cyano cobalt(III) porphyrins by dithionite [J]. *Inorganica Chimica Acta*, 1982, 64(6): L251-L253.
- [16] Yang QL, Ma ZR, Wang HS, et al. Rational design of molecular fluorophores for biological imaging in the NIR-II window [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(12): 1605497.
- [17] Zondag E, Posthuma J, Berends W. On the mechanism of a photodynamic reaction [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1960, 39(1): 178-180.
- [18] Yao P, Han SH, Zhang YX, et al. Structures and spectroscopic properties of meso-tetrasubstituted porphyrin complexes: meso-substitutional and central metallic effect study based on density functional theory calculations [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2009, 50(2): 169-177.
- [19] 胡珍珠, 朱志昂, 王传忠. 四苯基卟啉衍生物质子化热力学 [J]. *无机化学学报*, 2001, 17(2): 197-201.