

Một số đặc điểm của purpurin-18 tổng hợp từ chlorophyll a tách chiết từ tảo *Spirulina*

Nguyễn Minh Hiếu¹, Lê Bình Dương², Mai Anh Tuấn², Nguyễn Thị Bình²,
Bùi Thị Thanh Phương², Phạm Hương Sơn², Nguyễn Thị Lại^{2*}

¹Trung tâm Nano và Năng lượng, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

Ngày nhận bài 28/12/2020; ngày chuyển phản biện 30/12/2020; ngày nhận phản biện 20/1/2021; ngày chấp nhận đăng 25/1/2021

Tóm tắt:

Việc nghiên cứu tổng hợp chất nhạy quang (PS) purpurin-18 (Pp-18) từ tự nhiên và xác định một số đặc điểm của nó là một trong những chủ đề được nhiều nhóm nghiên cứu quan tâm và phát triển. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, các tác giả đã xác định một số đặc điểm của Pp-18 tổng hợp được từ chlorophyll a, một chất được phân lập từ tảo *Spirulina*. Kết quả cho thấy, Pp-18 có khả năng phân tán tốt trong acetone tại bước sóng 478,5 nm ($R^2=0,98285$) và đạt 98%. Phổ huỳnh quang của Pp-18 trong acetone thực nghiệm được đo tại nồng độ 70 ppm và bước sóng 365,39, 417,62 và 557,96 nm. Thời gian sống của Pp-18 trong dung dịch acetone là 2,85 ns.

Từ khóa: chất nhạy quang, phổ hấp thụ UV-Vis, phổ huỳnh quang, Pp-18, *Spirulina*.

Chỉ số phân loại: 2.6

Đặt vấn đề

Liệu pháp quang động (Phytophotodynamic therapy - PDT) được coi là một phương thức sáng tạo và hấp dẫn để điều trị các tế bào bệnh lý tại chỗ và bề ngoài [1, 2]. Trái ngược với các phương pháp điều trị y tế thông thường khác, PDT không cần thiết phải giải phóng loại thuốc đã sử dụng và nó dựa trên đặc điểm các phân tử PS có thể tạo ra các loại oxy phản ứng khi chiếu xạ, chẳng hạn như 1O_2 hoặc các gốc tự do, có thể làm tổn thương không thể phục hồi các tế bào bệnh lý mà không làm hỏng các tế bào khỏe mạnh lân cận [3].

Các dihydroporphyrin tự nhiên đã thu hút nhiều sự quan tâm vì chúng có thể được sử dụng như PS hiệu quả để làm trung gian cho PDT [4]. Các hợp chất này thể hiện năng suất lượng tử cao trong việc hình thành oxy nguyên tử, độc tính thấp và hấp thụ mạnh trong vùng bước sóng 650-700 nm [5]. Pp-18 (hình 1) là một dẫn xuất của chất diệp lục, một dihydroporphyrin thứ vị để tạo ra chất PS như các dẫn xuất imide của Pp-18, hấp thụ ánh sáng trong vùng đỏ đến hồng ngoại và hoạt động chống khối u hiệu quả nên được dùng làm nguyên liệu ban đầu để tổng hợp các chất PS phức tạp hơn đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu [6-8].

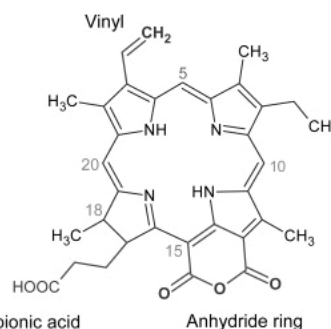
Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định một số đặc điểm của Pp-18 đã tổng hợp từ chlorophyll a thu được từ tảo *Spirulina*.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu Pp-18 được tổng hợp bởi Phòng Thí nghiệm Phát triển ứng dụng y sinh công nghệ cao, Viện Ứng dụng Công

*Tác giả liên hệ: Email: orchidnla@gmail.com



Hình 1. Cấu trúc hóa học của Pp-18 [9].

nghe. Các dung môi như H_2O , C_2H_5OH và $(CH_3)_2CO$ tinh khiết (Merck) được sử dụng để xác định khả năng phân tán của Pp-18.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu sự phân tán của Pp-18 trong dung dịch: trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng thiết bị đo kích thước hạt bằng máy Zetasizer nano ZS để đánh giá sự phân tán của Pp-18 trong các dung môi là: nước, acetone và C_2H_5OH . Phương pháp nghiên cứu quá trình phân tán của Pp-18 được tiến hành như sau: Pp-18 được cân định lượng và phân tán vào dung môi với các tỷ lệ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 70 ppm. Các dung môi chứa Pp-18 được đặt vào bể siêu âm và tiến hành siêu âm trong thời gian 30 phút với mục đích giúp Pp-18 phân tán tốt trong dung môi. Sau đó tiến hành đo phân bố kích thước hạt của các mẫu dung môi chứa Pp-18 tại các tỷ lệ khác nhau. Cuối cùng phân tích kết quả thu được từ thiết bị đo.

Some characteristics of purpurin-18 synthesised from chlorophyll a of *Spirulina*

Minh Hieu Nguyen¹, Binh Duong Le², Anh Tuan Mai²,
Thi Binh Nguyen², Thi Thanh Phuong Bui²,
Huong Son Pham², Thi Lai Nguyen^{2*}

¹Nano and Energy Center, University of Science,
Vietnam National University, Hanoi

²National Center for Technological Progress, MOST

Received 28 December 2020; accepted 25 January 2021

Abstract:

Research and synthesis of photosensitive purpurin 18 (Pp-18) from nature is one of the topics that many research groups are interested in and developing. In this study, the authors defined some characteristics of Pp-18 synthesised from chlorophyll a - a substance isolated from *Spirulina*. The results showed that Pp-18 had good dispersion in acetone at 478.5 nm ($R^2=0.98285$) and reached 98%. Fluorescence spectroscopy of Pp-18 in acetone was measured at a concentration of 70 ppm, wavelengths 365.39, 417.62, and 557.96 nm. The fluorescence lifetime of Pp-18 in acetone solution was 2.85 ns.

Keywords: fluorescence spectroscopy, photosensitizer, Pp-18, *Spirulina*, UV-Vis.

Classification number: 2.6

Phương pháp đo phổ hấp thụ UV-Vis: phổ UV-Vis hấp thụ được ghi lại trên máy UV 2450 của Nhật Bản (với tổng dải bước sóng từ 200 đến 1000 nm). Các bước sóng phát hiện từ 405,5 đến 696,5 nm được sử dụng đồng thời để phát hiện phổ.

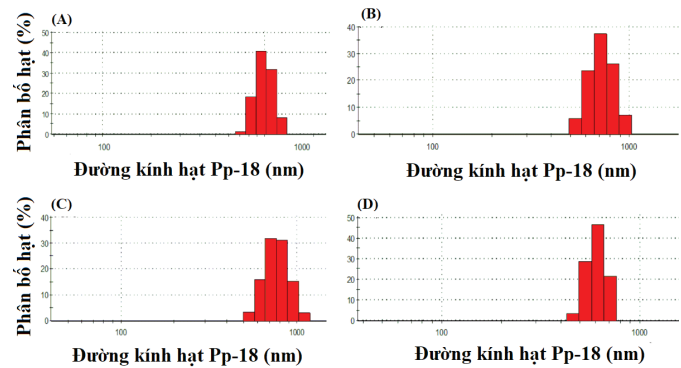
Phương pháp nghiên cứu khả năng phát huỳnh quang và thời gian sống: phổ huỳnh quang phân giải theo thời gian và đường cong phân rã huỳnh quang được đo bằng phương pháp đếm đơn photon tương quan thời gian [10], với bước sóng kích thích 300-700 nm. Phổ huỳnh quang được đo trên máy quang phổ huỳnh quang FL322 Horiba. Thời gian tồn tại của huỳnh quang được ước tính thông qua phép tính tích chập [11].

Kết quả và thảo luận

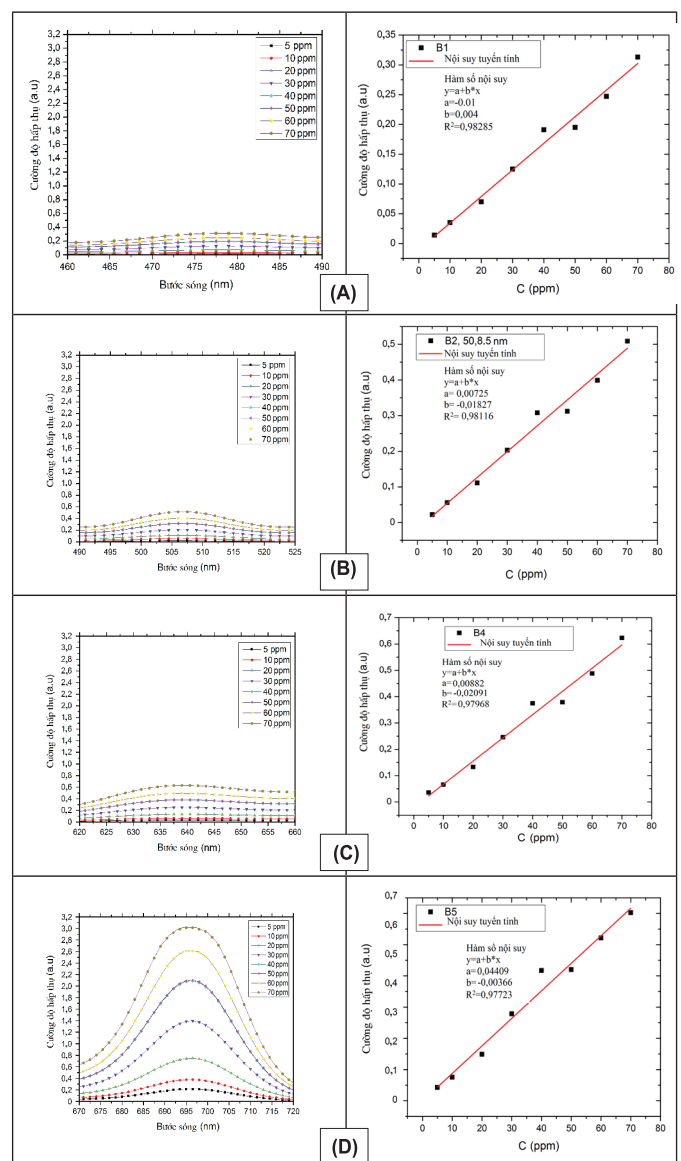
Một trong những đặc điểm cần quan tâm của PS để có thể ứng dụng cho phương pháp PDT là khả năng tan trong nước hoặc dung môi, khả năng phát quang và thời gian sống của nó.

Nghiên cứu sự phân tán của Pp-18 trong dung dịch

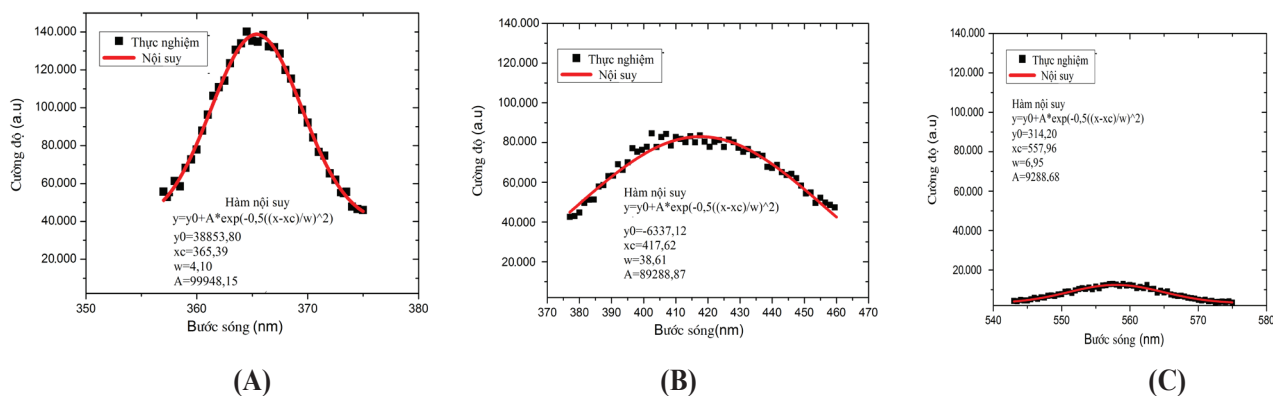
Với mẫu Pp-18 thu được, chúng tôi đã tiến hành đánh giá khả năng phân tán của Pp-18 trong các dung môi nước, ethanol, acetone.



Hình 2. Đồ thị phân bố kích thước hạt của Pp-18 trong nước DI, ở nồng độ khác nhau lần lượt là (A) 80 ppm, (B) 40 ppm, (C) 20 ppm và (D) 10 ppm.



Hình 3. Sự phụ thuộc của nồng độ Pp-18 trong acetone vào cường độ hấp thụ tại các bước sóng 478,5 nm (A), 508,5 nm (B), 642,5 nm (C) và 696,5 nm (D).



Hình 4. Phổ huỳnh quang của Pp-18 trong acetone thực nghiệm với nồng độ 70 ppm và kết quả fitting xác định vị trí đỉnh tại $X_c=365,39$ nm (A); $X_c=417,62$ nm (B); $X_c=557,96$ nm (C).

Nghiên cứu sự phân tán mẫu Pp-18 trong nước, chúng tôi đã xác định sự phân bố của các hạt Pp-18 tại nhiều nồng độ khác nhau (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 và 70 ppm). Mặc dù chúng tôi đã sử dụng phương pháp hỗ trợ siêu âm để phân tán Pp-18, tuy nhiên kết quả thu được là các hạt nhỏ Pp-18 với kích thước từ trên 500 đến 1100 nm, phân bố khác nhau tại các nồng độ khác nhau. Kết quả đo phân bố cho thấy, Pp-18 không tan trong nước (hình 2). Kết quả này có thể do cấu trúc phân tử của Pp-18 gồm các gốc carboxyethyl, ethenyl, dihydro, tetramethyl, porphine, dicarboxylic và anhydride. Trong khi đó, chỉ có gốc hydroxyl (OH^-) là góp phần vào việc phân tán trong nước, tuy nhiên các gốc còn lại chiếm ưu thế hơn nhiều trong cấu trúc của Pp-18, nên có lẽ đây là lý do dẫn tới Pp-18 tạo thành các hạt nhỏ trong nước.

Đối với dung môi $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, khả năng phân tán của Pp-18 tại các bước sóng hấp thụ khác nhau có hệ số R^2 tương ứng là 405,5 ($R^2=0,88076$), 508,5 ($R^2=0,94009$), 640,5 ($R^2=0,89182$) và 696,5 nm ($R^2=0,81564$). Kết quả cho thấy hệ số R^2 có giá trị thấp nhất tại 696,5 nm ($R^2=0,81564$) và cao nhất tại 508,5 nm ($R^2=0,94009$). Có thể thấy, Pp-18 có khả năng phân tán trong $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ và đường chuẩn có độ chính xác cao nhất tại bước sóng 508,5 nm ($R^2=0,94009$) ở nồng độ 70 ppm. Tuy nhiên, hệ số R^2 như trên cho thấy khả năng phân tán của Pp-18 trong $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ chỉ đạt cỡ 94%, do đó hòa tan chưa hoàn toàn.

Nghiên cứu sự phân tán của Pp-18 trong acetone với 8 nồng độ khác nhau tại các bước sóng hấp thụ khác nhau có hệ số R^2 tương ứng tại 478,5 ($R^2=0,98285$), 508,5 ($R^2=0,98116$), 642,5 ($R^2=0,97968$) và 696,5 nm ($R^2=0,97723$) cho thấy hệ số R^2 có giá trị thấp nhất tại 696,5 nm ($R^2=0,97723$) và cao nhất tại 478,5 nm ($R^2=0,98285$). Kết quả cho thấy, Pp-18 có khả năng phân tán tốt trong acetone đạt cỡ 98%, cao hơn mức 94% của $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ và đường chuẩn có độ chính xác cao nhất tại bước sóng 478,5 nm ($R^2=0,98285$) ở nồng độ 70 ppm (hình 3).

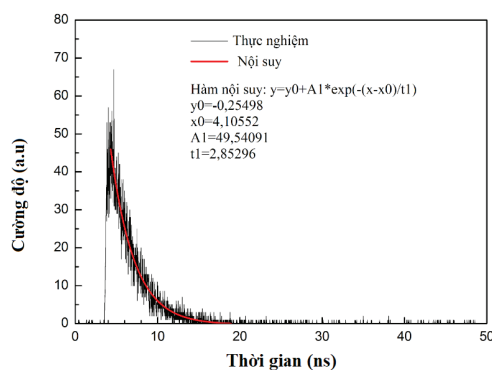
Kết quả trên cho thấy, khả năng phân tán của Pp-18 trong acetone là tốt hơn nhiều so với trong $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ và nước.

Nghiên cứu khả năng phát huỳnh quang của Pp-18

Phổ phát xạ huỳnh quang được đánh giá thông qua sự kích thích ở dải bước sóng từ 300 đến 700 nm. Sự thay đổi của bước sóng kích thích có ảnh hưởng đến quang phổ của Pp-18. Trong dải bước sóng thử nghiệm, chúng tôi thấy Pp-18 có khả năng phát huỳnh quang xung quanh các bước sóng: 365,39, 417,62 và 557,96 nm, trong đó mạnh nhất ở bước sóng 365,39 nm. Tuy nhiên, để có thể sử dụng được hợp chất này làm chất PS cho phương pháp PDT thì nó cần có khả năng phát quang ở bước sóng dài hơn, chính vì vậy chúng tôi nhắm mục tiêu vào tìm kiếm sự phát quang của Pp-18 tại bước sóng lớn nhất mà hợp chất có được. Kết quả cho thấy, phổ huỳnh quang tốt nhất của Pp-18 đạt được ở bước sóng 557,96 nm. Cường độ tương đối của Pp-18 tại các bước sóng này được thể hiện ở hình 4. Kết quả này của chúng tôi cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Hoober và cs (1988) [12] cho khả năng phát quang của Pp-18 ở dải sóng 417 và 557 nm.

Nghiên cứu thời gian sống của Pp-18

Kết quả đo thời gian sống của Pp-18 phân tán trong acetone được trình bày trên hình 5, sử dụng hàm phân bố EXPdecay1 trên cơ sở hàm phân bố này xác định được thời gian sống của Pp-18 trong dung dịch acetone là 2,85 ns với sai số chuẩn 0,057 ns.



Hình 5. Thời gian sống của Pp-18 trong acetone thực nghiệm với nồng độ 70 ppm và kết quả nội suy xác định thời gian sống của Pp-18 là 2,85 ns.

Để có thêm thông tin cho nhận định có thể đề xuất Pp-18 làm nền tảng tiềm năng trong PDT hay không, thời gian tồn tại huỳnh quang của Pp-18 cũng được đo trong các điều kiện thử nghiệm của chúng tôi. Hình 5 thể hiện các kết quả thu được cho sự phân rã huỳnh quang của Pp-18. Động học phân rã hàm mũ đã được quan sát cho thấy sự hiện diện của phân tử bị kích thích trong mẫu. Thời gian sống của Pp-18 thu được cho thấy, đây là khoảng thời gian tồn tại trung bình của một chất phát quang có nguồn gốc tự nhiên: 2,85 ns, phù hợp với nghiên cứu của Correia và cs (2014) [13] về thời gian tồn tại của huỳnh quang quan sát được đối với chlorophyll a dạng đơn phân tử và lưỡng phân tử.

Kết luận

Pp-18 có khả năng phân tán tốt trong acetone tại bước sóng 478,5 nm ($R^2=0,98285$) ở nồng độ 70 ppm và đạt 98%. Phổ huỳnh quang của Pp-18 trong acetone thực nghiệm với nồng độ 70 ppm thu được ở bước sóng 365,39, 417,62 và 557,96 nm. Thời gian sống của Pp-18 trong dung dịch acetone là 2,85 ns.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm thực hiện đề tài xin trân trọng cảm ơn Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí để chúng tôi thực hiện và hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] P. Meisel, T. Kocher (2005), "Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art", *J. Photochem. Photobiol. B*, **79**, pp.159-170.

[2] T.N. Demidova, M.R. Hamblin (2004), "Photodynamic therapy targeted to pathogens", *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **17**, pp.245-254.

[3] T.S. Mang, T.J. Dougherty, W.R. Potter, D.G. Boyle, S. Somer, J. Moan (1987), "Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy", *Photochemistry and Photobiology*, **45**, pp.501-506.

[4] K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guilar (2000), *The Porphyrin Handbook*, vol. 6, Academic Press, 346pp.

[5] R. Bonnett, et al. (2000), *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy - Advanced Chemistry Texts*, Vol. 1, CRC Press, 324pp.

[6] G. Zheng, W.R. Potter, A. Sumlin, T.J. Dougherty, R.K. Pandey (2000), "Photosensitizers related to purpurin-18- N-alkylimides: a comparative *in vivo* tumoricidal ability of ester versus amide functionalities", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **10(2)**, pp.123-127.

[7] A.N. Kozyrev, Y. Chen, L.N. Goswami, W.A. Tabaczynski, R.K. Pandey (2006), "Characterization of porphyrins, chlorins, and bacteriochlorins formed via allomerization of bacteriochlorophyll *a*. synthesis of highly stable bacteriopurpurinimides and their metal complexes", *Journal of Organic Chemistry*, **71**, pp.1949-1960.

[8] G. Zheng, et al. (2001), "Synthesis, photophysical properties, tumor uptake, and preliminary *in vivo* photosensitizing efficacy of a homologous series of 3-(1'-alkyloxy)ethyl-3-devinylpurpurin-18-N-alkylimides with variable lipophilicity", *Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, pp.1540-1559.

[9] N. Drogat, M. Barrière, R. Granet, V. Sol, P. Krausz (2011), "High yield preparation of purpurin-18 from *Spirulina maxima*", *Dyes and Pigments*, **88**, pp.125-127.

[10] Y. Shimada, T. Tsuchiya, S. Akimoto, T. Tomo, M. Fukuya, K. Tanaka, M. Mimuro (2008), "Spectral properties of the CP43-deletion mutant of *Synechocystis* sp. PCC6803", *Photosynth. Res.*, **98**, pp.303-314.

[11] D.V. O'Connor, D. Phillips (1984), *Time - Correlated Single Photon Counting*, Academic Press, DOI: 10.1016/B978-0-12-524140-3.X5001-1.

[12] J.K. Hooper, T.W. Sery, N. Yamamoto (1988), "Photodynamic sensitizers from chlorophyll: purpurin-18 and chlorin *p6*", *Photochemistry and Photobiology*, **48(5)**, pp.579-582.

[13] R.F. Correia, M.I. Viseu, S.M. Andrade (2014), "Aggregation/disaggregation of chlorophyll *a* in model phospholipid-detergent vesicles and micelles", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **13**, pp.907-916.