

吩噻嗪类化合物的合成及其光化学病毒灭活活性研究

文 辉¹, 王小芳¹, 黄 毅², 王憬惺², 杨光中^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050;

2. 中国医学科学院、北京协和医学院输血研究所, 四川 成都 610081)

摘要: 光化学病毒灭活法目前被用于血液产品病毒灭活处理, 其中亚甲蓝 (MB) 光化学法能够有效地进行血细胞制品病毒灭活。以 MB 为先导物, 设计合成了 12 个新结构的吩噻嗪类化合物, 并进行了初步病毒灭活、红细胞损伤等实验, 结果显示测试样品中化合物 YWW-7 在活性和可能的副作用等方面的表现均优于 MB, 有望开发成为全新的血液产品病毒灭活剂。

关键词: 吩噻嗪; 病毒灭活; 合成

中图分类号: R916.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0072-05

Synthesis and photochemical virus inactivation of novel phenothiazines

WEN Hui¹, WANG Xiao-fang¹, HUANG Yi², WANG Jing-xing², YANG Guang-zhong^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Chengdu 610081, China)

Abstract: Virus inactivation with photochemistry is being suitable for blood or blood products, methylene blue (MB)/light treatment has been used for viral inactivation of cellular blood components. Twelve new phenothiazines derivatives were designed and synthesized, and were used to test viral inactivation and red cell damage preliminary. Results showed that compound YWW-7 has a satisfactory activity, it could be developed as a new viral inactivation agent for blood products.

Key words: phenothiazine; virus inactivation; synthesis

血液制品是一种特殊的药品, 在临床治疗和挽救生命方面具有重要的不可替代的作用。但因为血源的原因, 存在着血液制品被病毒污染的危险性, 常给使用者带来严重后果。如 20 世纪 80 年代, 美国尚未规定对血液制品进行 HIV 检验前, 使用未经病毒灭活处理的 VIII 因子制品的血友病患者, 有 85%~90% 受到 HIV 感染; 在法国, 巴黎国立输血中心也曾发生过使用 HIV 污染的凝血因子造成病人严重感染的事件; 在我国, 由于输血而感染丙型肝炎病毒的发生率高达 6.8%~17.7%^[1]。虽然对献血人员实行严格筛选可以降低血液制品传播病毒性疾病的危险性, 但因所用检测方法的灵敏度和特异性有一定的局限,

难以排除潜伏感染的可能性, 因此对采集的血液进行病毒灭活十分必要。

已知由血液和血液制品传播的病毒种类很多^[2], 其中危害较大的是: 乙肝病毒 (HBV)、丙肝病毒 (HCV) 和人类免疫缺陷病毒 (HIV)。这 3 种病毒和嗜 T 淋巴细胞病毒 (HTLV-I/II)、巨细胞病毒 (CMV) 以及 EB 病毒 (EBV) 都是脂包膜病毒, 而甲肝病毒 (HAV)、Jakob-Creutzfeldt 病毒和细小病毒 B₁₉ (PVB₁₉) 属非脂包膜病毒。非脂包膜病毒在供血者中的发病率和造成疾病的严重程度相对较低。

基于对病毒及其特性的了解, 现已开发出多种灭活血液制品中病毒的方法^[3-9] (表 1)。其中, 正在发展的光化学法, 即使用光敏药物, 同时辅以相应的紫外线或可见光照射的方法, 产生自由基或其他半衰期很短的活性中间体, 使病毒发生光氧化作用, 从而

收稿日期: 2009-09-25.

*通讯作者 Tel: 86-10-63165311, E-mail: yanggz@imm.ac.cn

有效灭活病毒, 这种光化学法是目前可用于血细胞成分病毒灭活处理前景最好的方法之一。

Table 1 Some methods for viral inactivation of blood components

Being used	Being researched
Pasteurization	Virus inactivation of photochemistry
Dry heat sterilization	Using sodium hypochlorite
Organic solvent/surfactant (S/D)	Using sodium caprylate
β -Propiolactone/UV	Using radiation (γ , UV)

光化学法灭活病毒使用的光敏剂, 最初大都是已经在临床上用于治疗某种疾病、毒副作用较小的化合物, 如用于治疗牛皮癣的补骨脂内酯类 (psoralens) 化合物 8-MOP、用于光化学疗法治疗白血病的部花菁类 (merocyanine) 化合物 MC540、抗肿瘤血卟啉类 (haematoporphyrin) 化合物以及临床解毒药物吩噻嗪类 (phenothiazine) 化合物亚甲蓝 (MB) 等, 对这些化合物进行进一步的结构修饰和优化, 希望可得到适用于血液制品病毒灭活的化合物。其中, 以化学改性的补骨脂内酯衍生物 (S-59) 为光敏药物, 结合 320~400 nm 波长紫外线照射的方法, 已成功用于血小板制品的病毒灭活处理, 被美国 FDA 批准临床使用^[10]; 以亚甲蓝 (MB) 加可见光照射, 用于单袋新鲜血浆的病毒灭活, 已在瑞士和德国被广泛应用于临床输血^[11]。

亚甲蓝 (methylene blue, MB) 属吩噻嗪类染料, 是一种临床上用于亚硝酸盐及氰化物中毒后解毒的静脉注射用药。经大量的实验室研究和临床研究, MB/光照处理的光化学技术已经被证明可用于血浆的病原体灭活, 它可使血浆内指示病毒的下降值大于 6LogTCLD50, 达到国际公认的血浆病毒灭活有效性指标; 它对抗体生物活性影响较小, 抗体仍具有特

异结合抗原的功能; 它对血浆中蛋白质有轻微影响, 尤其是对血浆中的凝血因子有一定影响, 蛋白质损失一般在 25% 以内, 对血浆的临床应用影响不大。

MB 光化学法可能是目前可用于血细胞制品病毒灭活的方法中前景最好的。MB (结构见图 1) 作为一个非常有价值的活性化合物, 其衍生物的优化和发展还有很大的空间, 对其做进一步的结构修饰及光化学法研究, 有望找到既能有效灭活血细胞制品中的病毒, 又能保持血细胞制品生物学功能的光化学病毒灭活剂, 使经过处理的血细胞制品临床使用更具安全性。

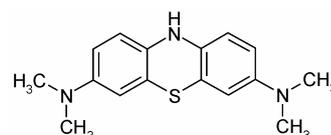
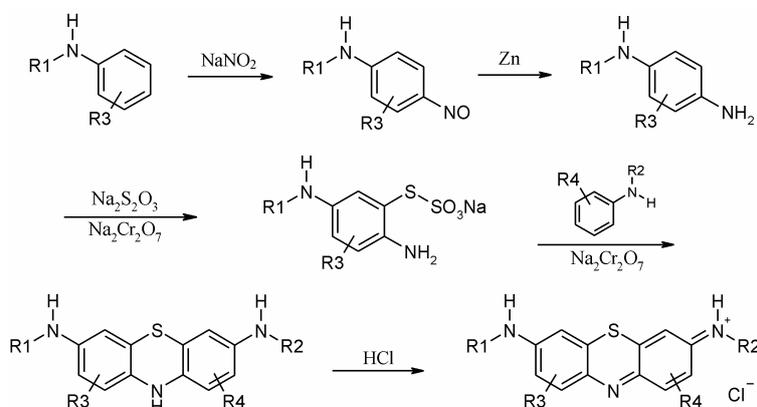


Figure 1 The structure of MB

在过去几年里, MB/光照处理血浆陆续在世界上的一些国家如瑞士等被用于临床。在中国的部分地区如河南省等也开始允许使用 MB/光照处理血浆。虽然 MB/光照处理的光化学技术具有诸多的优点, 但是它同时也有一些不足之处: 它较易灭活脂包膜病原体, 而对非脂包膜病原体作用有限; 它使血浆蛋白的含量和活性有所改变; 它不适用于其他血液成分, 如红细胞悬液 (RBCs)、血小板浓缩液 (PC); 美国的研究表明, MB 在人体内可以累积, 具有潜在的致突变的作用, 所以它没有获得美国 FDA 的许可。

作者以 MB 为先导物, 对其进行结构修饰和优化, 以研究分子的大小、电性、疏水性及苯环上取代基等对活性的影响。目标化合物的合成方法如合成路线 1 所示。



Scheme 1 The synthesis route for compounds YWW-1-YWW-16

结果与讨论

1 化学部分

本类化合物通过“一锅”合成法得到,通过对反应条件的研究发现,反应体系的 pH 值对反应影响较大,尤其在锌粉还原亚硝基化合物生成氨基化合物时, pH 值需要在 4~6 之间,体系 pH 值过大或过小均不能得到产物。可能原因是体系在合适的 pH 值范围内,可以形成反应中间体的 $ZnCl_2$ 盐,而形成的 $ZnCl_2$ 复合盐可以起到保护氨基的作用,从而避免发生副反应,产生副产物。

合成的化合物的波谱数据见表 2,理化常数和生物活性数据见表 3。

2 生物活性实验结果及构效关系分析

2.1 实验结果

通过检测血细胞制品中被灭活病毒的 lg 数和红细胞的生物学功能(包括:形态、钾泄漏、溶血、渗透脆性、ATP 和 2,3-DPG 水平、lgG 结合和红细胞抗原完整性等),研究不同光敏化合物进行光化学灭活病毒处理时对红细胞生物学功能的影响。化合物对病毒 $\Phi 6$ 噬菌体的灭活能力及对红细胞中钾泄漏的影响

Table 2 1H NMR (300 MHz, D_2O) and HR-MS data of synthesized compounds

Compd.	1H NMR	HR-MS, m/z [M] ⁺ (calcd.)
YWW-1	1.27 (12H, t, $J = 7.2$ Hz, $-CH_3 \times 4$), 3.60 (8H, q, $J = 7.2$ Hz, $-NCH_2 \times 4$), 7.06 (2H, s, Ar-H ₄ , H ₆), 7.22 (2H, d, $J = 9.6$ Hz, Ar-H ₂ , H ₈), 7.59 (2H, d, $J = 9.6$ Hz, Ar-H ₁ , H ₉)	340.185 4 (340.184 7)
YWW-2	1.22 (6H, t, $J = 6.9$ Hz, $-NCH_2-CH_3 \times 2$), 2.68 (3H, s, $-(NCH)-CH_3$), 3.62 (4H, m, $-NCH_2 \times 2$), 6.66 (1H, s, Ar-H ₄), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Ar-H ₂), 6.89 (1H, s, Ar-H ₆), 7.08 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H ₈), 7.33 (2H, q, Ar-H ₁ , H ₉)	298.137 8 (298.137 7)
YWW-3	1.21 (6H, t, $J = 6.6$ Hz, $-NCH_2-CH_3 \times 2$), 3.11 (6H, s, $-N-(CH_3)_2$), 3.55 (4H, q, $J = 6.3$ Hz, $-NCH_2 \times 2$), 6.87 (1H, s, Ar-H ₄), 6.98 (1H, s, Ar-H ₆), 7.05 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H ₂), 7.17 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, Ar-H ₈), 7.44 (2H, m, Ar-H ₁ , H ₉)	312.153 3 (312.153 4)
YWW-4	2.87 (3H, s, $-N(CH)-CH_3$), 3.12 (6H, s, $-N-(CH_3)_2$), 6.69 (1H, s, Ar-H ₄), 6.78 (1H, s, Ar-H ₆), 6.84 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Ar-H ₂), 7.00 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H ₈), 7.34 (2H, m, Ar-H ₁ , H ₉)	270.106 7 (270.106 4)
YWW-6	1.64 (3H, s, $-CH_3$), 1.85 (3H, s, $-CH_3$), 3.04 (6H, s, $-N(CH_3)_2$), 6.57 (1H, s, Ar-H ₆), 6.82 (1H, s, Ar-H ₁), 6.87 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, Ar-H ₈), 7.02 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H ₉)	284.121 9 (284.122 1)
YWW-7	1.12 (6H, t, $J = 7.2$ Hz, $-NCH_2CH_3 \times 2$), 2.35 (3H, s, $-CH_3$), 2.36 (3H, s, $-CH_3$), 3.71 (4H, q, $J = 7.2$ Hz, $-NCH_2 \times 2$), 7.38 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, Ar-H ₆), 7.43 (1H, q, $J_1 = 9.3$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, Ar-H ₈), 7.79 (1H, s, Ar-H ₁), 7.94 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, Ar-H ₉)	312.153 7 (312.153 4)
YWW-10	2.28 (6H, s, $-CH_3 \times 2$), 3.06 (12H, s, $-N(CH_3)_2 \times 2$), 6.58 (2H, s, Ar-H ₄ , H ₆), 6.77 (2H, s, Ar-H ₂ , H ₈)	312.153 2 (312.153 4)
YWW-11	2.64 (6H, s, $-CH_3 \times 2$), 3.30 (3H, s, $-NHCH_3$), 3.33 (6H, s, $-N(CH_3)_2$), 7.19-7.36 (4H, m, Ar-H), 7.89 (1H, m, Ar-H)	298.137 1 (298.137 7)
YWW-12	2.62 (3H, s, $-CH_3$), 3.30 (9H, s, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$), 7.16-7.28 (4H, m, Ar-H), 7.89 (1H, m, Ar-H)	284.121 9 (284.122 1)
YWW-13	2.30 (3H, s, $-CH_3$), 3.05 (6H, s, $-N(CH_3)_2$), 3.08 (6H, s, $-N(CH_3)_2$), 6.62 (1H, s, Ar-H ₄), 6.68 (1H, s, Ar-H ₆), 6.80 (1H, s, Ar-H ₂), 6.93 (1H, m, Ar-H ₈), 7.38 (1H, m, Ar-H ₉)	298.137 1 (298.137 6)
YWW-15	3.29 (6H, s, $-N(CH_3)_2$), 4.03 (3H, s, $-OCH_3$), 7.16-7.53 (4H, m, Ar-H), 7.91 (1H, m, Ar-H)	286.101 3 (286.101 4)
YWW-16	1.30 (6H, t, $J = 6.9$ Hz, $-NCH_2CH_3 \times 2$), 2.66 (3H, s, $-CH_3$), 3.31 (6H, s, $-N(CH_3)_2$), 3.72 (4H, q, $J = 6.9$ Hz, $-NCH_2 \times 2$), 7.09 (1H, m, Ar-H ₄), 7.23 (1H, m, Ar-H ₆), 7.32 (1H, s, Ar-H ₂), 7.36 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, Ar-H ₈), 7.92 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, Ar-H ₉)	326.168 9 (326.169 0)

Table 3 Physical data and bioactivity for **YWW-1**-**YWW-16**

Compd.	R1	R2	R3	R4	mp/ $^{\circ}C^a$	Yield/%	LogP	lg ^b	K ⁺ /mmol·L ^{-1 c}
YWW-1	-C ₂ H ₅ ×2	-C ₂ H ₅ ×2	-	-	215	3.6	1.04	1.12	5.0
YWW-2	-C ₂ H ₅ ×2	-CH ₃ , -H	-	-	210	4.6	-0.36	1.79	5.07
YWW-3	-C ₂ H ₅ ×2	-CH ₃ ×2	-	-	203	2.4	0.18	1.27	8.10
YWW-4	-CH ₃ ×2	-CH ₃	-	-	205	2.8	-1.61	1.84	13.70
YWW-6	-CH ₃ ×2	-H×2	-	2-CH ₃ , 4-CH ₃	185	11.5	-1.25	4.85	7.33
YWW-7	-C ₂ H ₅ ×2	-H×2	-	2-CH ₃ , 4-CH ₃	190	2.8	-0.25	5.61	4.43
YWW-10	-CH ₃ ×2	-CH ₃ ×2	9-CH ₃	1-CH ₃	230	5.1	0.16	3.58	5.33
YWW-11	-CH ₃ ×2	-CH ₃ , -H	9-CH ₃	1-CH ₃	193	2.5	-0.49	1.86	4.70
YWW-12	-CH ₃ ×2	-CH ₃ , -H	-	1-CH ₃	195	4.2	-1.05	2.55	5.47
YWW-13	-CH ₃ ×2	-CH ₃ ×2	-	1-CH ₃	210	6.7	-0.40	2.53	5.40
YWW-15	-CH ₃ ×2	-H×2	-	1-OCH ₃	180	7.1	-2.39	1.12	9.70
YWW-16	-CH ₃ ×2	-C ₂ H ₅ ×2	-	1-CH ₃	183	3.1	0.60	2.27	11.33
MB	-CH ₃ ×2	-CH ₃ ×2	-	-	-	-	-0.96	3.18	10.10

“-” : No substituent; a: Decomposition; b: Inactivate $\Phi 6$ bacteriophage (lg); c: K⁺ concentration in supernatant of red cells

见表 3。其中, 灭活病毒的 lg 数值越大, 表示化合物对病毒 $\Phi 6$ 噬菌体的灭活能力越强; 而红细胞上清液钾离子浓度越小, 表明化合物对红细胞生物学功能的影响越小。

在考察的化合物中, 化合物 **YWW-6**、**YWW-7** 和 **YWW-10** 对病毒灭活能力均强于对照物 MB, 对红细胞中钾泄漏的影响均小于 MB。其中, 化合物 **YWW-7** 的病毒灭活能力最强, 对红细胞损伤最小。进一步的药理实验显示, 化合物 **YWW-7** 能非常有效的灭活多种细胞内和细胞外、有包膜和无包膜的模型病毒 (在相同的条件下, VSV>6Log10, HSV-1>5Log10, Phi6>6Log10, R-17>8Log10)。在初步研究了它的分子机制后, 对它的光化学处理过程进行了优化。实验显示 **YWW-7** 对新鲜冰冻血浆 (FFP) 的生理活性无显著影响, 不产生异常抗体, 可用于临床输用。采用自行研制的 A8-3 添加液, 14 d 冷藏保存红细胞, 溶血 <1%, 钾外漏 7.8 mmol·L⁻¹, ATP>30 μmol·L⁻¹, 2,3-DPG 7.9 μmol·L⁻¹, 抗原强度和形态无显著变化, 直接抗球蛋白试验 (DAT) 阴性, 基本符合临床输注的要求。化合物 **YWW-7** 有望成为一个红细胞制品的病毒灭活剂, 进一步药理评价正在进行中。

2.2 构效关系初步分析

2.2.1 芳环上取代基对灭活病毒能力的影响

芳环上引入甲基对灭活病毒效果的影响较大, 其中甲基的数目和位置不同, 对活性的贡献也不同。一般来说, 增加甲基取代使活性增强, 2, 4-位引入甲基对病毒灭活的效果强于 1, 9-位甲基的作用, 如化合物 **YWW-6** 和 **YWW-7** 的灭活能力最强, 优于亚甲蓝。但引入甲基的数目和活性的关系尚未发现规律性变化。

2.2.2 N 上烷基取代对活性的影响

N 上烷基取代对病毒灭活作用也有影响, 但无显著规律。如化合物 **YWW-3**、**YWW-4**、**YWW-13** 分子中的 3 位或 7 位 N, N-二甲基变为 N, N-二乙基后, 对病毒灭活作用减弱; 而化合物 **YWW-6** 的 3 位 N, N-二甲基变为 N, N-二乙基后, 成为化合物 **YWW-7**, 对病毒灭活作用却增强。同样, 化合物 **YWW-4** 和 **YWW-11** 分子中的 3 位或 7 位 N-甲基变为 N, N-二甲基后, 对病毒灭活作用增强; 而化合物 **YWW-2** 和 **YWW-12** 分子中的 3 位 N-甲基被 N, N-二甲基取代得到的 **YWW-3** 和 **YWW-13**, 对病毒灭活效果却减弱或基本不变。

2.2.3 化合物对红细胞中钾泄漏的影响

化合物的分配系数 (logP) 数值较大或较小都会使红细胞中钾泄漏严重, 可能存在一个最佳的 logP 值范围, 使化合物对红细胞生物学功能的影响最小。

由构效关系分析得知: 芳环上引入甲基可使化合物灭活病毒能力增强; 芳环上 2, 4-位引入甲基对病毒灭活的效果强于 1, 9-位甲基的作用; 3 位或 7 位 N 上烷基取代对病毒灭活作用的影响无规律性变化; 化合物 logP 值与其灭活病毒能力间尚未发现显著相关性。

实验部分

1 主要仪器和试剂

Yanaco-500 型显微熔点仪 (温度未校正); Varian Mercury 300 型核磁共振仪, TMS 为内标; LC/MSD TOF 质谱仪 (Agilent Technologies)。柱色谱硅胶为 H 型 (青岛海洋化工厂); 阳性对照品 MB 购于上海晶纯试剂有限公司, 其他实验所用试剂均为市售化学纯或分析纯。

2 3,7-二 (N,N-二乙胺基) 吩噻嗪盐酸盐 (YWW-1) 的合成

N, N-二乙基苯胺 1.5 g (0.01 mol) 和浓盐酸 6.5 mL 溶于 8 mL 水中, 冰浴冷却到 0 °C, 缓慢滴加亚硝酸钠 0.71 g (0.01 mol) 溶于 5 mL 水中的溶液。加毕, 保持内温 0~15 °C 继续搅拌反应 1 h。然后慢慢加入锌粉 2 g (0.03 mol), 搅拌反应至反应液 pH 约等于 5。滤除未反应的锌粉, 滤液加水 30 mL, 冷至 0 °C, 加入硫代硫酸钠 2 g (0.008 mol) 溶于 6 mL 水中的溶液, 搅拌反应 15 min, 再加入 N, N-二乙基苯胺 1.5 g (0.01 mol) 溶于 0.5 mL 浓盐酸中的溶液和重铬酸钾 2.5 g (0.01 mol) 溶于 15 mL 水中的溶液, 继续搅拌反应 4 h, 室温放置过夜。将反应混合物加热煮沸 1 h, 再加入稀硫酸 (浓硫酸/水=2 mL/10 mL), 煮沸 1 h, 加氯化钠盐析, 滤集析出的固体, 溶于 5% 盐酸中煮沸, 再加氯化钠盐析, 滤集固体, 乙醇重结晶, 得暗绿色的 **YWW-1**。

化合物 **YWW-2**~**YWW-16** 合成方法同 **YWW-1**, 结构数据见表 3。

3 生物活性实验

将模型病毒 $\Phi 6$ 噬菌体加入血细胞制品中, 使其滴度达到 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-8}$ (用琼脂顶层技术, 以 HB10Y 宿主菌检测), 然后加入 4 μmol·L⁻¹ 光敏化合物, 选择光源 $\lambda = 660 \text{ nm}$ 的发光二极管点阵, 以 $3.24 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$ 的光照剂量进行光照处理 7 d。经检测处理后血细胞制品中的 $\Phi 6$ 噬菌体滴度, 算出被灭活病毒的 lg 数; 同时进行红细胞的生物学功能检测, 包括: 形态、钾泄漏、溶血、渗透脆性、ATP 和 2, 3-DPG 水平、IgG 结合和红细胞抗原完整性等。

References

- [1] Yang CM, Tian ZS. A few notable problems about blood transfusion services [J]. Foreign Med Sci (Blood Transfus Hematol) (国外医学 输血及血液学分册), 1994, 17: 130-131.
- [2] Li BH. Virus contamination and safety of blood products [J]. Chin J Biol (中国生物制品学杂志), 1995, 8: 97-100.
- [3] Friedman LI, Stromberg RR, Wagner SJ, et al. Reducing the infectivity of blood components—what we have learned [J]. Immunol Invest, 1995, 24: 49-71.
- [4] Lie J, Gu JF, Cai L, et al. The impact of virus inactivation for biomechanical properties of cortical bone [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2003, 13: 417-420.
- [5] Grass JA, Hei DJ, Metchette K, et al. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by psoralen plus UVA [J]. Blood, 1998, 91: 2180-2188.
- [6] van Rhenena DJ, Vermeij J, Mayaudonc C, et al. Functional characteristics of S-59 photochemically treated platelet concentrates derived from bully coats [J]. Vox Sang, 2000, 79: 206-214.
- [7] Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, et al. Functional characteristics of photochemically treated platelets [J]. Transfusion, 2004, 44: 313-319.
- [8] Floyd R, Schneider JE Jr, Dittmer DP, et al. Methylene blue photoinactivation of RNA viruses [J]. Antiviral Res, 2004, 61: 141-151.
- [9] Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes [J]. Transfus Med Rev, 2002, 16: 61-66.
- [10] Lin L, Cook DN, Wieseahn GP, et al. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light [J]. Transfusion, 1997, 37: 423-425.
- [11] Mohr H, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B, et al. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light [J]. Photochem Photobiol, 1997, 65: 441-445.