

抗肿瘤药物氮三乙酰肼和金属离子 配位能力的研究*

黄仲贤 徐息良 吴 隧

(复旦大学化学系, 上海)

本文研究了抗癌药物氮三乙酰肼(Nitrilotriacetic hydrazide, NTH)和生命必需元素以及 Al^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} 的配位能力并用pH电位法测定了它们在生理条件下(37°C, $I = 150\text{mM dm}^{-3}\text{NaCl}$)的配合物生成常数。电位滴定数据是用 ZPLOT, MINQUAD, ESTA 等计算机程序处理的。实验结果表明NTH与它的非生理活性的母体化合物氮三乙酸相比较, 对 Zn^{2+} , Mn^{2+} 等过渡元素的配位能力表现较大的差异性。这种情况在 Revercan, ICRF-198, ICRF-236 和 5-烯去甲基斑蝥酸等其他抗肿瘤活性化合物中也曾观察到。

NTH与三价金属 Fe^{3+} , Ga^{3+} , Al^{3+} 和 In^{3+} 等有较强的配位能力, 这与它的烯醇式结构有关。由于这些配合物在广泛的 pH 范围内生成, 以及它的高稳定性, 因此有可能被用作为肿瘤定位试剂或生物体营养元素铁传输的有效载体。

关键词: 氮三乙酰肼 抗癌药物 抗癌药物的金属配位能力

Furst 曾提出一个很有预见性的论断:“配位作用在癌症中扮演着十分重要的角色。”并指出许多有效的抗肿瘤药物是事实上的或是潜在的螯合剂。它们可以与生物体内的生命必需金属元素发生配位作用, 从而影响生物体正常的新陈代谢^[1]。事实上, 一些蛋白水解酶及核酸的合成过程都可以为一些配合剂如乙二胺四乙酸等所抑制^[2]。按照这些想法, Creighton 设计并合成了双-3,5-二氧哌嗪系列的化合物(Bisdioxopiperazines)^[3], 其中丙亚胺[(±)-1,2-Bis-(3,5-dioxopiperazin-1-yl)propane]目前已作为急性白血病及胃癌、肺癌的治疗和防止转移的有效药物。有关丙亚胺在体内的代谢产物——1,2-丙二胺 N , N' -二乙酰胺, N , N' -二乙酸与生命必需金属元素的配位行为也进行了深入的研究^[4]。

胍类化合物本身是细胞代谢过程中的能量物质。许多胍的化合物是药物。例如治疗肺结核病的异菸胍和治疗何杰金氏病的苄甲胍和维丙胍等。有研究表明氮三乙酰肼(Nitrilotriacetic hydrazide, NTH)具有抗肿瘤活性, 目前已进入临床试验^[5]。考虑到氮三乙酰肼与丙亚胺类抗癌药物具有类似的多胺多羧酸的分子主骨架, 它的母体氮三乙酸在生物体内并不表现抗肿瘤活性。为了能为阐明这些多啮配位体在癌治疗中可能的作用机制提供有用的信息, 因此用pH电位法研究了氮三乙酰肼与生命必需金属元素及 Al^{3+} , Ga^{3+} 和 In^{3+} 等金属离

子在生理条件下的配位能力,并研究了它们的配位离子的分布图。

实 验

氮三乙酰胍的合成^[6] 50克氮三乙酸(0.26mole)溶于700ml乙醇中,滴加50ml浓 H_2SO_4 迴流十小时,蒸去大部分乙醇,然后用饱和 K_2CO_3 中和至 $\text{pH}=8$,用乙醚萃取数次,得无色有机相,蒸去乙醚,然后减压蒸馏得无色油状液体氮三乙酸三乙酯 $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5)_3$,馏出温度 $149-151^\circ\text{C}/1\text{ mmHg}$ 。

21克氮三乙酸三乙酯(0.076mole)和38克水合胍(0.76mole)溶于200ml甲醇,迴流五小时,蒸去甲醇,使体积为原来的 $1/3$,冰浴冷却,加少许晶种则有晶体析出。放置较长时间后得大颗粒的白色氮三乙酰胍晶体。用甲醇洗涤后真空干燥得固体15克,熔点 $120-122^\circ\text{C}$ 。元素分析结果为C: 30.89%, H: 6.53%, N: 42.24%; 理论值为C: 30.96%, H: 6.48%, N: 42.04%。

试剂 在整个实验过程中均使用分析纯试剂。标准 NaOH 溶液用固体 NaOH 配制,经 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 除去 CO_3^{2-} 根,过量的 Ba^{2+} 用国产732树脂除去,溶液浓度用邻苯二甲酸氢钾标定^[7]。标准盐酸用硼砂标定之。金属离子标准溶液除了 $\text{Fe}(\text{II})$ 用它的硫酸盐外,其他溶液都用它们相应的氯化物配制。 Ga^{3+} 、 In^{3+} 溶液用99.9999%高纯金属 Ga 、 In 溶于 HCl 中配制。 $\text{Fe}(\text{II})$ 使用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 氧化还原滴定法测定浓度,其他金属离子浓度均用配位滴定法标定^[8]。金属盐溶液中的游离酸浓度采用Gran-Plot求得⁹。配制溶液均使用去离子水($\text{pH}\sim 6$,电阻 $>10^6\Omega$)各溶液加入适量氯化钠之维持离子强度为 $150\text{mM dm}^{-3}\text{NaCl}$ 。

电位滴定 电位滴定是按下述电池反应进行的,即玻璃电极|配位体 M^{n+} , NaCl ($I=150\text{mM}$)||饱和 NaCl | Hg_2Cl_2 - Hg ,指示电极为Russell pH Ltd SW 757型玻璃电极,参比电极为Russell pH Ltd CR型饱和氯化钠甘汞电极。电位测量使用pHS-3型酸度计及Radiometer pHM 84 Research pH Meter其余条件同本实验室以往的工作。为了正确反映NTH和各金属离子在溶液中各种配位离子的生成,电位滴定是在NTH和金属离子以不同的浓度,不同的配比,在一个相当宽广的范围内进行的。由于玻璃电极的非理想化行为,实验中必须对玻璃电极的行为进行校正。本工作中使用标准强酸强碱进行滴定和标定。电极标定数据用MAGEC计算机程序处理^[10]。

电位滴定数据处理 NTH- M^{n+} 的表现配位常数是用ZPLOT^[11]程序在Canberra PDP 11/34计算机上处理的。按 n 半整数法求得表现配位常数。同时电位滴定数据用MINIQUAD程序^[10]进行Newton-Gauss非线性最小二乘方优化运算求得各体系的配位常数,并进行了配位离子化学模型的选择。不同条件下配位离子分布图是用ESTA程序算得的。MAGEC, MINIQUAD, ESTA程序都是在HONEYWELL DPS-8计算机上运行的。

吸收光谱 溶液中配合物在不同 pH 时的吸收光谱是在Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer(UV-240)分光光度计上测定的。

结果和讨论

氮三乙酰胍的质子配位常数及与金属离子的二元配合物的稳定常数见表1。

氮三乙酰胍可以结合四个质子成为 H_4L^{4+} 。它的第一,二级质子解离常数与三乙撑四胺

表 1 氮三乙酰胺的解离常数及二元配合物的稳定常数

Table 1 Dissociation Constants for NTH and Stability Constants for Binary Complexes

$$\beta_{pqr} = [L_p M_q H_r] / [L]^p [M]^q [H]^r, 37^\circ \text{C} \quad I = 150 \text{ mM dm}^{-3} \text{ NaCl}$$

体 系 system	p q r	$\log \beta_{pqr}$	标 准 误 差 standard error	残差平方和 residual sum square	R 因 子 MINIQUAD R factor	实 验 点 experimental point
NTH—H	1 0 1	8.903	0.025	5.586×10^{-6}	0.0087	304
	1 0 2	16.419	0.028			
	1 0 3	23.419	0.028			
	1 0 4	26.943	0.033			
NTH—Mg	1 1 1	11.979	0.058	2.737×10^{-6}	0.0127	271
	2 1 0	8.029	0.049			
	2 1 1	-1.319	0.058			
NTH—Ca	1 1 1	12.028	0.045	2.657×10^{-6}	0.0109	276
	2 1 0	7.918	0.042			
	2 1-1	-2.254	0.065			
NTH—Mn	1 1 0	8.457	0.079	6.805×10^{-6}	0.0205	260
	1 1-1	-0.290	0.083			
	2 1-1	3.760	0.100			
	2 2 2	35.424	0.130			
NTH—Fe(II)	2 1-1	4.382	0.090	1.315×10^{-5}	0.0242	289
	1 1 0	13.159	0.086			
NTH—(Cu)	1 1 1	20.980	0.069	1.140×10^{-6}	0.0980	263
	1 1-1	5.402	0.073			
	1 1 2	25.937	0.050			
NTH—Zn	1 1 1	13.410	0.096	4.100×10^{-5}	0.0360	270
	2 1 0	10.030	0.167			
NTH—Fe(III)	1 1 1	20.941	0.102	3.907×10^{-6}	0.0216	219
	1 1 2	25.811	0.076			
NTH—Al	1 1 0	12.839	0.032	1.170×10^{-6}	0.0044	425
	1 1 1	19.423	0.031			
	1 1 2	24.696	0.012			
	1 1 2	-2.301	0.036			
NTH—Ga	1 1 1	26.385	0.273	5.145×10^{-5}	0.0337	309
	2 1 1	30.476	0.375			
NTH—In	1 1 0	15.775	0.179	9.937×10^{-7}	0.0040	289
	1 1 1	24.066	0.015			
	1 1-1	11.696	0.082			
	2 1-1	8.358	0.056			

的前二级几乎相同。它们都是端-NH₃⁺上质子的解离。三乙撑四胺的后两级质子解离由于发生在仲胺上，因此就小得多了(见表 2)。

作为比较，由 ZPLOT 程序按照经典的 $\bar{n}$ 生成函数法计算得到的表现配位常数分别列在表 2, 3 中。就质子配位常数而言两者没有什么太大的差别，虽然实验结果的精度有很大的提高，然而对于配合物的稳定常数两者相差极大，这主要是由于 $\bar{n}$ 生成函数法考虑的仅仅是简单配合物的原因^[14]。这种简单配合物的假定与多螯配位体系中的配合物生成状况相去甚远。表 1 中每一个体系中配位离子的组成都是经过大量的，各种可能的化学模型的计算比较而确定的，如同前文所述。

作为配位体，NTH 由于分子内烯醇式转换而呈现与一般胺类配位体不同的性质。一个显著的特点是它对于不同性质的金属离子呈现不同的配位状况，所形成的配位离子也是多种

表2 氮三乙酰肼与若结干构类似配位体的解离常数

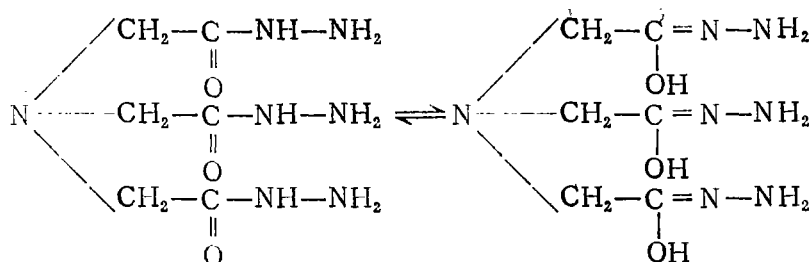
Table 2 Dissociation Constants for NTH and Some Structural analogues

	pK_1	pK_2	pK_3	pK_4
氮三乙酰肼 nitrilotriacetic hydrazide	3.524	7.000	7.516	8.903
氮三乙酰肼* nitrilotriacetic hydrazide	3.52	7.00	7.52	8.90
三乙撑四胺** triethylene-tetramine	3.32	6.67	9.20	9.92
氮三乙胺肼** nitrilotri ethylamine		8.56	9.59	10.29

**From Martell, A.E., Critical Stability Constants^[18]* $\bar{n}$ 半整数法求得 obtained by half integral method表3 $\bar{n}$ 生成函数法计算氮三乙酰肼配合物的稳定常数Table 3 Stability Constants for NTH Calculated by $\bar{n}$ Formation Function

	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{3+}
$\log \beta$	4.01	3.92	4.68	4.30	11.23	4.89	20.23

多样的:有众多的质子配合物,也有羟基配合物,甚至还有多核配合物(在NTH- Mn^{2+} 体系中)。毫无疑问,作为富含氮配位原子的配位体,它与 Cu^{2+} 离子有较高的配位能力。但是如果把NTH和它的母体氮三乙酸相比较(Nitrilotriacetic acid, NTA)则与金属离子的配位能力有很大的差异。例如 $Zn(NTH)_2$ 配合物要比 $Zn(NTA)_2$ 要小四个数量级,相应的 $MnNTH$ 的配合物要大一个数量级,而配合物 $Ca(NTH)_2$ 要小一个数量级^[18]。动物试验的结果表明氮三乙酸并不具有抗肿瘤活性^[6]。固然,产生这种状况的一个很重要的原因是由于NTA与乙二胺四乙酸一样是个极性很强的分子,它们无法透过脂质性的细胞膜进入细胞内,而它们极性较小的酰胺或酰肼类衍生物则对癌细胞表现了一定的细胞毒性。一个很值得注意的倾向是,在我们迄今研究过的四种抗癌药物中,它们除了具有上述特点外,它们和生命金属元素的配位能力都与其相应的非活性的结构类似物的配位能力呈现一定的差异,特别是 Zn^{2+} , Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 这些生命体内重要的过渡元素。例如抗癌药物Revercan对 Mn^{2+} 有异常的配位能力^[16],抗癌活性化合物丙亚胺类衍生物ICRF-198要比无抗肿瘤活性的结构类似物ICRF-226对 Zn^{2+} 的配位能力低两个数量级^[4];除了 Cu^{2+} 以外,(meso)-ICRF 236要比它相应的旋光异构体dl-ICRF 243对 Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} 等都表现较差的配位能力^[16],前者对癌细胞有很高的细胞毒性,而后者完全没有生理活性;抗癌活性化合物5-烯去甲基斑蝥酸对 Mn^{2+} 离子的配位能力甚至要比 Zn^{2+} 还要强⁰等等。到目前为止我们还无法对这些抗癌药物的金属配位能力和药物的生理活性之间得出简单而明确的结论,也无法确定药物作用的目标金属离子。但是如果说螯合作用确实在癌细胞的代谢过程中起着作用的话,那么,这些药物配体进入细胞内和各种生命元素,特别是微量元素的配位作用破坏了细胞内正常的平衡,导致细胞活性的丧失就是它必然的结果了。因为现已经知道细胞内许多金属酶起着极为重要的生理作用,例如以铜锌锰为辅基的超氧化物歧化酶承担着扑灭生物体内自由基的功能,它与癌症有紧密的关系^[17],而任何锌、锰、铜微量元素平衡的改变都可能影响它的活性,以至失活。



第三主族 Al^{3+} , Ga^{3+} 和 In^{3+} 与NTH也可以生成极稳定的配合物, 特别是 Ga^{3+} 和 In^{3+} 。这一点是受三价铁与NTH有极高的稳定常数所启发的。有研究已表明^{18,19} 镓、铟等对肿瘤组织有特殊的亲和能力, 常被用来作为肿瘤定位的示踪元素。本研究表明, 由于 Ga^{3+} -NTH(以及 In^{3+} -NTH)配合物的高稳定性, 它们也许可以被用作肿瘤定位的示踪化合物或者作为镓的载体。反过来, 利用镓、铟对肿瘤组织的亲和性, Ga^{3+} -NTH或 In^{3+} -NTH可能作为带导向抗肿瘤药物, 把药物带入肿瘤组织内, 使药物能有选择地杀死癌细胞。这些设想还有待于进一步的动物试验予以证实。

可以理解, 作为硬的Lewis酸, Fe^{3+} , Ga^{3+} 和 In^{3+} 它们之所以能和NTH生成高稳定性的配合物, 显然是由于NTH以烯醇式结构配位的缘故三价铁与NTH在 $\text{pH}=1$ 时就生成紫色配合物, 在520nm处有一个强的吸收峰, (见图1)。在 pH 为5—6时溶液转变为琥珀色, 吸收峰向460nm移动。这表明有第二种配位离子生成。审察用ESTA程序计算的 Fe^{3+} -NTH随着 pH 改变的配位离子分布图(图2), 可见它们分别是 $\text{Fe}^{3+}\cdot\text{NTH}\cdot 2\text{H}^+$ 和 $\text{Fe}^{3+}\cdot\text{NTH}\cdot\text{H}^+$ 配合物。

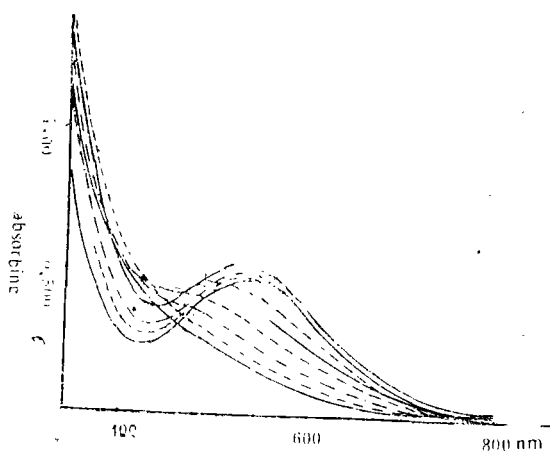


图1 Fe^{3+} -NTH 在不同 pH 时吸收曲线

Fig. 1 Absorption curve of Fe^{3+} -NTH at different pH

Fe^{3+} -NTH配合物在生物体内究竟起什么作用还不太清楚, 然而NTH的高度化溶性, Fe^{3+} -NTH配合物在相当广泛的 pH 范围内的配合物生成, 以及它高度的稳定性表明此类酰胺化合物是土壤中铁的优良载体, 这对于某些植物, 特别是柑桔类植物在生长过程中由于缺乏微量元素铁而产生的萎黄症的防治无疑具有极大的潜在作用^{20,19}。

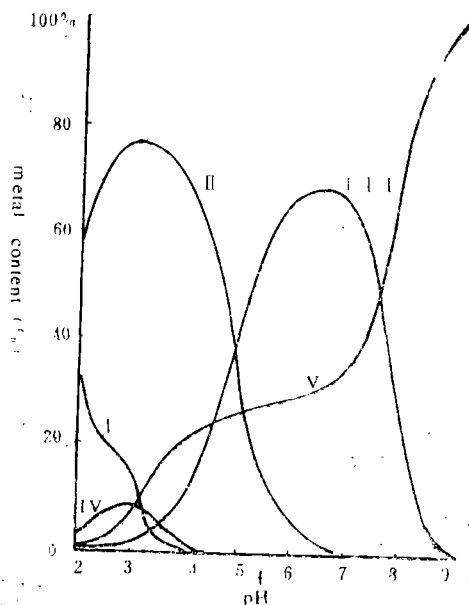
图2 Fe^{3+} -NTH 在不同pH时配位离子分布图

Fig. 2 Complex species distribution plot at different pH

参 考 文 献

- [1] Furst, A., *Chemistry of Chelation in Cancer*, Springfield, Thomas(1963).
- [2] Rubin, H., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 69, 712 (1972).
- [3] Creighton, A. M., Jeffery, W. A., and Long, J., *Med. Chem., Proc. Int. Symp.*, 6th 1978 (pub 1979) p281, Simkins, A. M., (Ed.).
- [4] Huang, Z. X. (黄仲贤), May, P. M., Quinlan, K. M., Williams, D. R. and Creighton, A. M., *Agents and Actions*, 12(4), 536 (1982).
- [5] 任云峰, 舒汉丽, 张覃沫, 陈正玉和林晨, *科学通报*, 17期, 1078页(1981).
- [6] Bersworth, F. C., US 3,351,658, Nov. 7, (1967).
- [7] Fritz, J. S. and Schenk, G. H., *Quantitative Analytical Chemistry*, Foruth Edition, Allyn and Bacon Inc., Boston, London, p170, (1979).
- [8] 杨德俊编著, *络合滴定的理论和应用*, 国防工业出版社, 北京(1965).
- [9] Rossotti, F. J. C., and Rossotti, H., *J. Chem. Educ.*, 42, 375 (1965).
- [10] Linder, P. W., et al., *Analysis using glass electrodes*, Open University Press, Stony Straford, Engl. (1984).
- [11] Williams, D. R., and Yeo, P. A., *J. Chem. Soc. Dalton*, 1988 (1972).
- [12] Sabatini, A., Vacca, A., and Gans, P., *Talanta*, 21, 53 (1974).
- [13] Martell, A. M., et al., *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York (1974).
- [14] Perrin, D. D., *Nature*, London, 206, 170 (1965).
- [15] Huang, Z. X., (黄仲贤), May, P. M. and Williams, D. R., *Inorg. Chim. Acta*, 56,

- 41 (1981).
- [16] Huang, Z. X. (黄仲贤), Creighton, A. M., and Williams, D. R., *Inorg. Chim. Acta*, 107 (4), L29—L32, (1985).
- [17] Westman, N. G., and Marklund, S. L., *Cancer Res.*, 41, 2962 (1981).
- [18] 黄仲贤. 自然杂志, (1), 26, (1983).
- [19] 邹正国, 谢毓元, 药学报, 19 (8), (1984), 630.
- [20] Martin, R. P., and Scharff, J. P., in *An introduction to bioinorganic chemistry*, Charles C Thomas Publisher, Springfield (1976).

METAL COMPLEXING ABILITY OF ANTITUMOUR DRUG NITRILOTRIACETIC HYDRIZIDE

Huang Zhongxian Xu Xilian Wu Biao

(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai)

The binding ability of a number of biological essential metals as well as the IIIA group metals— Al^{3+} , Ga^{3+} and In^{3+} to the antitumour drug Nitriлотriacetic hydrazide (NTH) has been studied. Formation constants of these NTH complexes have been measured potentiometrically at 37°C and $I = 150\text{mM dm}^{-3}$ NaCl. The potentiometric data were treated by the computer programs ZPLOT, MINQUAD and ESTA.

It has been shown that there is an abnormality on metal complexing ability between drug ligand NTH and its inactive parent compound Nitriлотriacetic acid, especially for biological trace metals such as Zn^{2+} and Mn^{2+} . This situation was also observed in the case of other antitumour agents such as Revercan, ICRF-198, ICRF-236, Oxabicyclo[2, 2, 1] hept-5-ene-2, 3-dicarboxylic acid. If the chelation does play role on the cancer the abnormality might be the one of reasons which are responsible for the difference in cytotoxicity exhibited by the antitumour agents and the inactive structural analogues.

NTH also shows the complex formation of high stability with Fe^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} and In^{3+} in a wide range of pH. These complexes might be valuable as a tumour-localizing agents and carrier of trace element.

Keywords nitriлотriacetic hydrazide antitumour drug metal complexing ability of antitumour drug