

新型胺羧单酯-酰胺钆配合物的合成及其对大鼠肝区 T_1 弛豫增强作用

俞开潮^{*,1,3} 万福贤¹ 张焱¹ 周锦兰¹ 卢广² 刘买利² 丁尚武^{*,2,3}

(¹ 华中科技大学化学系, 武汉 430074)

(² 中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉 430071)

(³ 高雄中山大学化学系与纳米科技中心, 台湾高雄 80424)

通过 DTPA、EDTA 单活化酯与双乳酸酐乙二胺二醇、双乳酸酐己二胺二醇反应, 合成了四种新型胺羧单酯-酰胺配体及其钆配合物。表征了配体和配合物的结构, 测定了钆配合物水溶液水质子的弛豫效能。选取其中一个配合物进行了动物急性毒性测试和活体 T_1 加权成像实验。结果表明: 该配合物无明显急性毒性, 且对大鼠肝区质子有明显的增强。

关键词: 酯-酰胺 钆配合物 肝靶向造影剂 弛豫效能 T_1 加权磁共振成像
分类号: O614.33*9

磁共振成像(MRI)自 1973 年^[1]实现以来, 以其无损伤、成像质量高等优点, 已发展成为应用广泛的生物医学影像新技术。MRI 的基本原理是在脉冲傅立叶 NMR 技术基础上, 于观察样品的三维空间内增设了线性梯度场, 使得处于不同空间位置的同种磁性核有不同的共振频率 (即空间编码)^[2,3]。临床 MRI 诊断通常采用自旋回波 (spin-echo, SE) 脉冲系列观测组织中水质子的信号强度。为提高 MRI 对软组织的分辨率, 常常需要借助造影剂来提高 MRI 影像的对比度 (>30 %, 且逐年增加)^[4-6]。临床用 MRI 造影剂是一类顺磁性金属配合物, 因能加快水质子的弛豫速率而增强 MRI 影像的对比度。自 1983 年首次使用二乙三胺五乙酸钆 (Gd-DTPA) 对脑肿瘤进行 MRI 诊断^[7]以来, 造影剂的研究和使用取得了极大进展, 目前已有 Gd-DTPA、Gd-DOTA 等 6 种造影剂应用于临床^[4]。

肝癌占致死癌患第三位, 早期诊断非常重要。而目前应用于临床的这些造影剂主要为非选择性的胞外试剂, 对肝胆道的成像对比效果差^[5,8]。因此, 对特定器官和组织 (尤其是肝胆道) 具有选择 (靶向) 性造影剂的研究一直是 MRI 领域最具挑战性的课题之一^[4-6]。通过对 DTPA、DOTA 等小分子配体的化学修

饰, 可赋予造影剂一定的组织选择性。药物研究的经验规律揭示, 当药物分子同时具有亲酯亲水组分即具有两亲性特征时, 它将倾向于被肝脏摄取并经肝胆道排泄, 而较少经肾排泄^[4,6]。为寻求对肝组织有靶向性的新型造影剂, 我们通过将二乙三胺五乙酸 (DTPA)、乙二胺四乙酸 (EDTA) 分子中的一个羧基活化单活性酯 (**1** 和 **2**), 再分别与两种含有酰胺基的酰胺二元醇 (**3** 和 **4**) 反应, 合成了分子中既含有酯基又含有酰胺基的 4 种新型胺羧配体 (**5a~5d**) 及其钆 (Gd^{III}) 配合物, 表征了配体和配合物的化学结构, 测试了配合物水溶液的纵向弛豫效能, 并选取一种钆配合物进行了动物急性毒性测试和 T_1 加权成像实验。

合成路线如图式 1。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Bruker FT EQUINOX55 红外光谱仪 (KBr 压片); Varian Mercury plus 300 NMR 波谱仪; Bruker BIOSPEC 47/30 磁共振成像仪; Carlo erba 1106 元素分析仪。

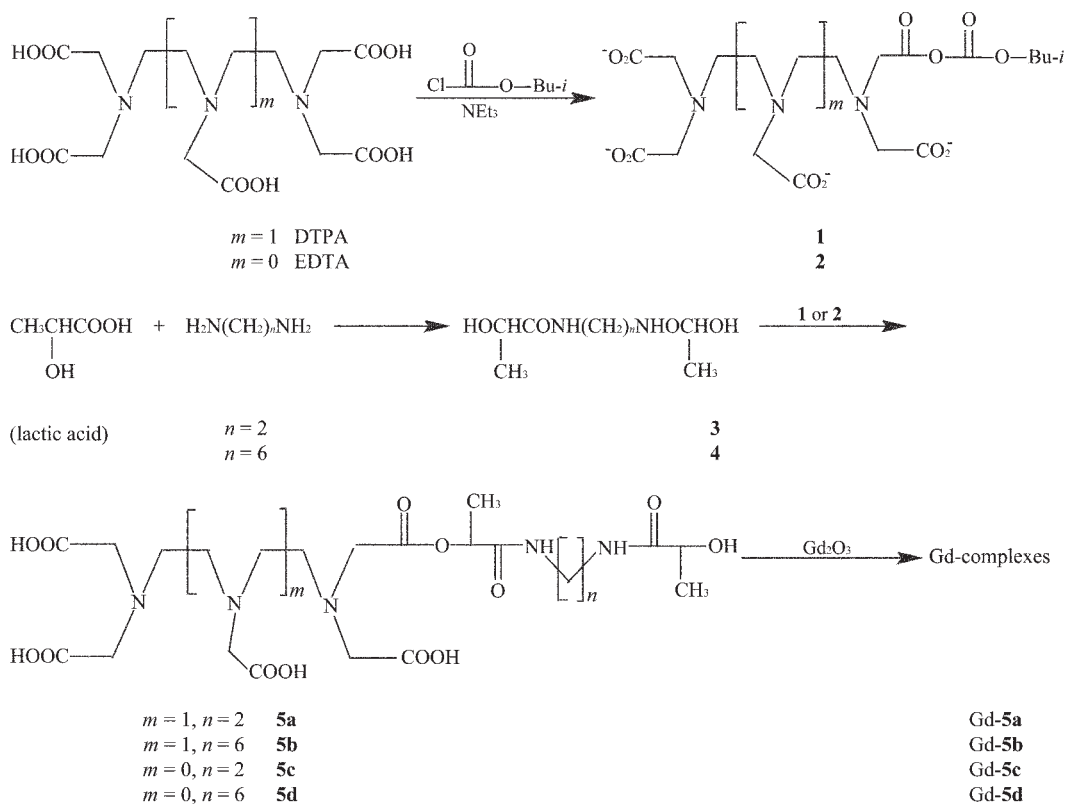
乙二胺、己二胺、三乙胺、异丁醇按文献^[9]方法

收稿日期: 2003-10-10。收修稿日期: 2003-12-08。

国家自然科学基金 (No.20275011)、台湾教育部“大学追求卓越计划” (No.A-91-N-FA01-2-4) 和波谱与原子分子物理国家重点实验室开放课题资助项目。

* 通讯联系人。E-mail: yuke@163.com; ding@mail.nsysu.edu.tw

第一作者: 俞开潮, 男, 47 岁, 博士, 副教授; 研究方向: 合成化学及波谱学应用。



图式 1 4 种酯-酰胺及其钆配合物的合成路线

Scheme 1 Synthetic route and structures of four ester-amid ligands and corresponding Gd(III) complexes

精制;其他试剂均为 A.R.级,溶剂用前均经干燥纯化处理。双乳酸酰乙二胺二元醇 **3**、双乳酸酰己二胺二元醇 **4** 参考文献^[10,11]方法合成。氯甲酸异丁酯由光气通入异丁醇中制得, b.p. 128~130 °C。经标定(氨解法)浓度为 6.50 mol·L⁻¹(即 0.888 g·mL⁻¹)。

1.2 DTPA 和 EDTA 羧基的活化

将 DTPA 2.0 g (5.1 mmol) 与 5 mL 三乙胺溶于 15 mL DMF 中,用冰盐浴冷却至 -15~-10 °C。搅拌下缓缓加入氯甲酸异丁酯 0.77 mL (5 mmol),于该温度下继续反应 0.5 h,反应中产生大量白色沉淀 (NEt₃·HCl)。快速过滤,含有 DTPA 单活化酯 **1** 的滤液于 -5~0 °C 放置并立即使用。

同法制取 EDTA 单活化酯 **2** 的 DMF 溶液,于 -5~0 °C 放置并尽快使用。

1.3 DTPA 单酯-酰胺小分子配体的合成

10 mL DMF 和 1.02 g (5 mmol) 双乳酸酰乙二胺二元醇化合物 **3** 放入三颈烧瓶中,室温搅拌至使其成均匀悬浮液。冷却至 -15~-10 °C,搅拌下将上节制备的 5 mmol DTPA 单活性酯 **1** 的 DMF 溶液分批加入。于 -10 °C 继续反应 1 h,然后于 0 °C 继续反应

0.5 h,室温下搅拌反应 2 h,反应液变为淡黄色澄清溶液。将此反应混合物滴入乙醇-乙醚 (1:1, V/V) 中,得到白色沉淀,再用 DMF-乙醇-乙醚混合溶剂重结晶,得白色粉末状固体 **5a** 2.6 g,产率为 90 %。测其熔点为 172~174 °C。

5b, **5c**, **5d** 仿照 **5a** 合成。**5b** 为淡黄色固体, m.p. 170~172 °C, 产率为 69.3 %。**5c** 为白色固体, m.p. 188~191 °C, 产率 71 %。该化合物在 188 °C 熔融时颜色变深。**5d** m.p. 184~186 °C, 产率为 78.7 %。这四种配体均易吸潮,且易溶于水,在熔融时颜色变深。

1.4 钆(III)配合物的制备

称取配体 **5a** 1.00 g (1.73 mmol) 溶于 20 mL 二次蒸馏水中,加入 Gd₂O₃ 固体粉末 0.31 g (0.86 mmol),于 50 °C 水浴中搅拌反应 6 h。反应过程中 Gd₂O₃ 逐渐溶解,得到澄清透明溶液。将透明溶液逐滴滴入乙醇-乙醚 (2:1, V/V) 混合溶液中,产生白色沉淀,过滤,用乙醇-乙醚混合溶剂洗涤,真空干燥。得白色晶状固体配合物 Gd-**5a**, 产量 0.55 g, 产率 42%。

同法合成配合物 **5b**, **5c** 和 **5d**。**5b** 的产量为

0.7g,产率 54.5 %; **5c** 的产量为 1.01 g,产率 73 %; **5d** 的产量为 1.15 g,产率 86 %。

1.5 钆配合物弛豫时间 T_1 的测定

将 4 种配合物及 Gd-DTPA 分别配制成一定浓度($\sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的水溶液($\text{pH} \sim 7$), 21°C 下以反转恢复法在 Bruker BIOSPEC 47/30 磁共振成像仪(4.7T)上测定这些配合物溶液中水质子的自旋-晶格弛豫时间 T_1 。

1.6 钆配合物对动物急性毒性的测定

选取由 DTPA 衍生的配合物中 R_1 较高者 Gd-**5a** 进行动物急性毒性测试^[12]和活体成像试验。

将 Gd-**5a** 配成 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生理盐水溶液,调 pH 为 7.2。取昆明种杂种小白鼠 20 只(体重 $20 \pm 2 \text{ g}$,雌雄兼用),从尾静脉注射 0.2 mL,腹腔注射 0.5 mL,连续观察 7 d。未见明显毒性反应。

1.7 钆配合物对动物活体 MRI 增强实验

取体重约 180~200 g Wistar 大白鼠 6 只,分为 2 组。腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,置入 Bruker BIOSPEC 47/30 磁共振成像仪(4.7T),分别观察尾静脉注射 Gd-**5a** 和 Gd-DTPA 前后,动物腹腔轴位 T_1 加权像。实验采用自旋回波脉冲系列,回波时间 $\text{TE} = 13 \text{ ms}$,重复时间 $\text{TR} = 500 \text{ ms}$,累加次数 $\text{NA} = 2$,片厚 $\text{SD} = 2 \text{ mm}$,每隔 5 min 采一次像。

2 结果与讨论

2.1 配体的合成与结构分析

在合成活化酯时,所用仪器和溶剂都应经过严格干燥。加入三乙胺有如下作用:其一是有助于 DTPA、EDTA 溶于 DMF 中,否则 DTPA、EDTA 即使在高于 50°C 的 DMF 中也很难溶解;其二是使生成的氯化氢以 $\text{NEt}_3 \cdot \text{HCl}$ 沉淀下来使反应完全。另外,生成的活化酯应立即使用(而且要在 -5°C 以下使用或短暂放置),因为所生成的活化酯很活泼且极易分解,在室温下很难保存。

配体的合成成为放热反应,开始体系温度要注意

控制在 -10°C 以下,以保证 DTPA、EDTA 活化酯对胺基的高反应选择性。所合成的配体很容易吸潮且与空气接触后颜色变深,故纯化配体时要用无水溶剂,并在干燥气氛中进行实验,真空干燥。

红外光谱中,4 种配体均有如下吸收带: $2\,500 \sim 3\,600 \text{ cm}^{-1}$ (OH , $-\text{CONH}-$, $-\text{COOH}$); $1\,632 \sim 1\,641 \text{ cm}^{-1}$ ($-\text{CONH}-$); $1\,731 \sim 1\,734 \text{ cm}^{-1}$, $1\,203 \sim 1\,226 \text{ cm}^{-1}$ ($-\text{COO}-$); $1\,395 \sim 1\,400 \text{ cm}^{-1}$ ($-\text{CH}_3$)。表明配体分子中同时含有酯和酰胺。 ^1H NMR 数据(H (溶剂 D_2O))列于表 1 中。元素分析测定值(% , 计算值): **5a** ($\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_{13}$): C 45.47 (45.59); H 6.68 (6.43); N 11.89 (12.08)。 **5b** ($\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_{13}$): C 48.91(49.13); H 7.42(7.14); N 10.76(11.02)。 **5c** ($\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{11}$): C 45.33(45.19); H: 6.46(6.32); N 11.95(11.71)。 **5d** ($\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{11}$): C 49.15 (49.43); H 7.44(7.16); N 10.30(10.48)。

2.2 配合物的合成与表征

在合成钆配合物时,配体 **5a**, **5b** 较易溶于水,反应温度可控制在 $45 \sim 50^\circ\text{C}$,溶解后加 Gd_2O_3 反应 4~5 h 即可,反应时间过长则会导致配体中酯基的水解。配体 **5c**, **5d** 则较难溶于水,可适当升高温度。

钆配合物的 IR 及元素分析数据列于表 2 中。红外光谱显示,在 $1\,600 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1\,400 \text{ cm}^{-1}$ 附近出现羧酸盐的特征吸收峰,说明 Gd(III)与配体配位,并形成盐。这几种配合物的红外光谱数据中,羧酸盐 $1\,600 \text{ cm}^{-1}$ 附近的特征峰与酰胺羰基的伸缩振动吸收峰重叠,形成稍宽的峰,前两种配合物的酯基峰也和酰胺峰、羧酸盐峰相重叠。在 $3\,000 \sim 3\,600 \text{ cm}^{-1}$ 处的宽吸收峰和偏高的氢含量显示结晶水的存在。

2.3 配合物的弛豫性能

在含不太高浓度顺磁性物种的水溶液中,可忽略溶质-溶质相互作用,水质子的纵向弛豫速率($1/T_1$)与顺磁性物种的浓度(c)呈如下线性关系^[9]:

$$(1/T_1)_{\text{obsd}} = (1/T_1)_d + R_1 c \quad (1)$$

式中, $(1/T_1)_{\text{obsd}}$ 和 $(1/T_1)_d$ 分别为溶液和纯溶剂质子的弛豫速率。弛豫效能 R_1 , 定义为(1)式中的斜率,反

表 1 配体的 ^1H NMR 数据

Table 1 ^1H NMR Data of Ester-amido Ligands (δ / ppm)

ligand	$-\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$	$-\text{NCH}_2\text{COOH}$	$-\text{CONH}(\text{CH}_2)-$	$-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$	$-\text{CONHCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{NHCO}-$	$-\text{CH}_3$
5a	4.03(q, 2H)	3.82(s, 10H)	3.32(s, 4H)	3.03(m, 8H)		0.96(d, 6H)
5b	4.04(q, 2H)	3.70~.95(m, 10H)	3.32(m, 4H)	3.03(m, 8H)	1.16(m, 8H)	0.94(d, 6H)
5c	4.05(q, 2H)	3.80(s, 8H)	3.30(m, 4H)	3.10(m, 4H)		0.95(d, 6H)
5d	4.03(q, 2H)	3.83(s, 8H)	3.30(m, 4H)	3.05(m, 4H)	1.16(m, 8H)	0.94(d, 6H)

表 2 配合物的 FT-IR 和元素分析数据
Table 2 FT-IR and Elementary Analysis Data of Gd(III) Complexes

complex (formula)	FT-IR / cm ⁻¹				elem. anal. meas. (calc.) / %		
	$\nu_{\text{OH}}, \nu_{\text{CONH}}$	ν_{COORD}	ν_{CO_2}	$\nu_{\text{CH}_2}, \nu_{\text{CH}_3}$	C	H	N
Gd-5a·4H ₂ O(C ₂₂ H ₄₂ N ₅ O ₁₇ Gd)	3 200~3 600	~1 740	1 593, 1 408	2 981	33.06(32.79)	5.51(5.25)	8.82(8.69)
Gd-5b·5H ₂ O(C ₂₆ H ₅₂ N ₅ O ₁₈ Gd)	3 150~3 600		1 595, 1 407	2 983, 2 940	35.67(35.49)	5.72(5.96)	8.04(7.96)
Gd-5c·4H ₂ O(C ₁₈ H ₃₅ N ₄ O ₁₅ Gd)	3 110~3 600	1 732	1 596, 1 406	2 972	30.54(30.68)	4.89(5.01)	8.03(7.95)
Gd-5d·4H ₂ O(C ₂₂ H ₄₃ N ₄ O ₁₅ Gd)	3 200~3 600	1 730	1 592, 1 406	2 980, 2 939	34.55(34.73)	5.98(5.70)	7.11(7.36)

表 3 弛豫时间 T₁ 测试值及计算出相应的弛豫效能 R₁
Table 3 T₁ Data and Calculated Relaxivities of Gd(III) Complexes^a

complex	<i>c</i> / (mmol·L ⁻¹)	<i>T</i> _{1(bsd)} / ms	<i>R</i> ₁ / (mmol ⁻¹ ·L·s ⁻¹)	enhancement / %
Gd-5a	1.90	79.1	6.45	129
Gd-5b	1.30	123.2	5.95	119
Gd-5c	2.50	56.5	6.93	139
Gd-5d	2.10	70.6	6.56	131
Gd-DTPA ^b	1.25	151.2	4.99	100

^a*T*₁₍₀₎ = 2.64 s, temperature: 21 °C, frequency: 200 MHz.
^bGd-DTPA was used as reference and enhancement was set to 100 %.

映造影剂的弛豫增强能力,单位为 mmol⁻¹·L·s⁻¹。本实验测得配合物水溶液的质子纵向弛豫时间,由式(1)计算出相应的纵向弛豫效能 *R*₁ 一并列于表 3 中。

实验结果显示,4 种 Gd(III)配合物的弛豫效能均比 Gd-DTPA 要高,EDTA 衍生的配合物 Gd-5c、Gd-5d 又较 DTPA 衍生物 Gd-5a、Gd-5b 略高。前者可能是生成衍生物后,结构的改变导致旋转相关时间延长所致;后者则是因为 EDTA 中的配位原子比 DTPA 少,配合物内界中水分子较多之故。

2.4 动物活体 MRI

在 MRI 实验中,当大鼠尾静脉分别注射相同剂量(0.1 mmol·kg⁻¹)的 Gd-5a 和 Gd-DTPA 后,大鼠肝区(实质细胞)水质子的 *T*₁ 信号都有增强。图 1 为注射 Gd-5a 前后动物腹腔同一轴位切片的 *T*₁ 加权成像对比图。在注射造影剂 0~25 min 时间段内,信号强度稳定上升,在 25~40 min 时间段内,观测到最高增强幅度,其平均值为:Gd-5a 达 24 %,Gd-DTPA 达 17 %。40 min 后开始降低。在 50~60 min 时,Gd-5a 和 Gd-DTPA 分别保持 116 %和 114 %。结果显示,与 Gd-DTPA 相比,DTPA 酯-酰胺-钆(III)配合物 Gd-5a 对大鼠肝区质子的 *T*₁ 信号表现出较大幅度的增强。其原因可能是与 Gd-DTPA 相比,酯-酰胺钆配合物更具有两亲性,使其能以较多比例被肝细胞摄取

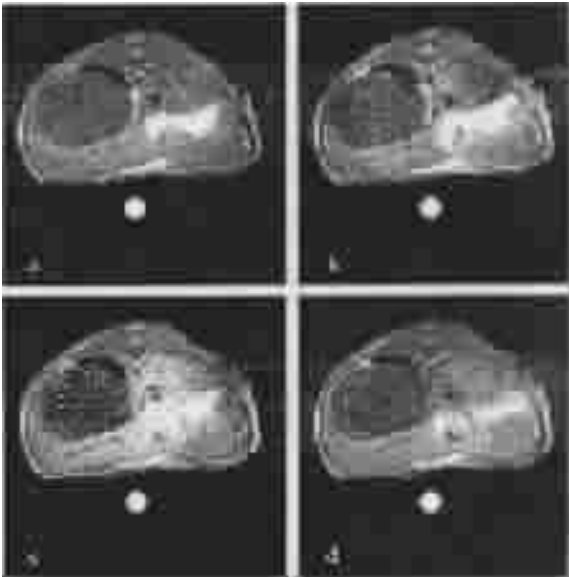


图 1 注射 Gd-5a 前(a)、注射 Gd-5a 后 5 min (b)、25 min (c) 和 55 min (d),一 Wistar 大鼠腹腔轴位 *T*₁ 加权成像对比图
Fig.1 MR *T*₁-weighted imaging for the same axial slice of a Wistar rat (200 g), before the injection (a), and 5 min (b), 25 min (c) and 55 min (d) after the injection of contrast agent of Gd-5a

而经肝胆道排泄^[6]。

3 结 论

合成并表征了4种新型含酯-酰胺的胺羧钆配合物,配合物都有较好的水溶性,并具有比Gd-DTPA较高的纵向弛豫效能。对由双乳酸酐乙二胺单-DTPA酯-钆配合物(Gd-5a)进行了急性毒性测试,未见明显毒性反应。进行了Gd-5a与d-DTPA的 T_1 加权成像定量对比实验。结果表明,与Gd-DTPA相比,由双乳酸酐乙二胺单-DTPA酯-钆配合物对大鼠肝区MRI信号有更大程度和相当时间的增强,显示了此类配合物具有用作新型MRI造影剂的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Lauterbur P. C. *Nature*, **1973**,**242**,190.
- [2] Liang Z. P., Lauterbur P. C. *Principles of Magnetic Resonance Imaging*, IEEE Press: New York, **2000**.
- [3] ZHAO Xi-Ping(赵喜平) *Principle, Equipment and Applications of Magnetic Resonance Imaging*(磁共振成像系统的原理及其应用), Beijing: Science Press, **2000**.
- [4] Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Lauffer R. B. *Chem. Rev.*, **1999**,**99**,2293.
- [5] ZHANG Shan-Rong(张善荣), REN Ji-Min(任吉民), PEI Feng-Kui(裴奉奎) *Huaxue Jinzhan (Progress in Chemistry)*, **1995**,**7**,98.
- [6] Lauffer R. B. *Chem. Rev.*, **1987**,**87**,901.
- [7] Weinmann H. J., Brasch R. C., Press W. R., Weskey G. E. *Am. J. Roentgenol*, **1984**,**142**,619.
- [8] Laing A. D. P., Gibson R. N. *J. Magn. Reson. Imag.*, **1998**,**8**, 337.
- [9] Perrin D. D., Armarego W. L., Perrin D. R. *Purification of Laboratory Compounds (2nd Ed.)*, Pergamon: New York, **1980**,p487.
- [10] LIU Xiao-Bo(刘孝波), ZHANG Jun-Hua(张军华), YANG De-Juan(杨德娟) et al *Hecheng Huaxue (Chin. J. Syn. Chem.)*, **1998**,**6**,339.
- [11] Sureschandra B., Jedlinski Z. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **1993**,**31**,731.
- [12] XU Shu-Yun(徐叔云), BIAN Ru-Lian(卞如濂), CHEN Xiu(陈修) *Methodology of Pharmacological Experiments 2nd Ed.* (药理实验方法学), Beijing: People's Health Press, **1991**,p201.

Synthesis and MRI Relaxation Enhancement of Mono-ester-amido Gadolinium Complexes

YU Kai-Chao^{*,1,3} WAN Fu-Xian¹ ZHANG Yan¹ ZHOU Jin-Lan¹

LU Guang² LIU Mai-Li² DING Shang-Wu^{*,2,3}

(¹Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

(²Laboratory of Magnetic Resonance & Atomic and Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

(³Department of Chemistry and Center for Nanoscience and Nanotechnology, National Sun Yat-Sen University, Kaohsiung 80424, Taiwan)

Four new ester-amido ligands were synthesized by esterification of mono-iso-butyl diethylenetriaminepentaacetate and mono-iso-butyl ethylenediaminetetraacetate with N,N' -ethylene bis-lactamide and N,N' -1,6-hexamethylenebis-lactamide, respectively. The corresponding Gd(III) complexes were made by reacting the ligands with Gd_2O_3 . All ligands and complexes were characterized by FT-IR, 1H NMR and elemental analysis. The measured longitudinal relaxivity of these complexes were all higher than that of Gd-DTPA. The investigation on acute toxicity and T_1 -weighted imaging of complex derived from mono- N,N' -ethylenebis-lactamide ester diethylenetriaminepentaacetate were performed. No acute toxicity was found. The tested complex exhibited the higher enhancement on MRI signal intensity in rat liver, comparing with Gd-DTPA.

Keywords: ester-amido gadolinium complex liver-selecting contrast agent relaxivity T_1 -weighted imaging