

含 4-乙基吡啶的抗转移 NAMI、NAMI-A 衍生物的 水解动力学及稳定性研究

梁曜华^{1,2,3} 毕 葳³ 梁国刚^{*,1,2,3} 张启伟³

(¹ 中药质量研究国家重点实验室, 澳门科技大学中医药学院, 澳门)

(² 澳门科技大学药物健康与应用研究所, 澳门)

(³ 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 制备了 *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)]Na·2DMSO (4-EtPy=4-乙基吡啶)(化合物 **1**) 和 *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)][(4-EtPy)H](化合物 **2**)。用 UV、NMR 研究了化合物在 pH 7.40 及 5.00 (0.15 mol·L⁻¹ NaCl, 37 °C) 缓冲液中的水解机理-动力学和溶液稳定性。测得各水解反应表观速率常数、半衰期。研究表明, 两个化合物的 I 氯、II 氯及 DMSO 水解反应机理均与 NAMI-A 相似, 但其各级水解速率比 NAMI-A 略快, 即用 4-EtPy 取代咪唑环, 可加快 NAMI-A 衍生物的 I 氯、II 氯及 DMSO 水解反应速率。在含氮配体相同时, NAMI-A 衍生物比相应 NAMI 衍生物的稳定性稍好。化合物在酸性溶液中的稳定性高于中性溶液。提供了用核磁法定量测定 NAMI-A 衍生物的水解机理-动力学。

关键词: 钌化合物; 4-乙基吡啶; 水解动力学; 稳定性; 核磁法

中图分类号: O614.82·1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2012)10-2049-10

Hydrolytic Kinetics and Stability of Antimetastasis NAMI and NAMI-A Derivatives Containing 4-Ethyl Pyridine

LIANG Yao-Hua^{1,2,3} BI Wei³ LIANG Guo-Gang^{*,1,2,3} ZHANG Qi-Wei³

(¹State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau, China)

(²Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macau, China)

(³Institute of Chinese Material Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)]Na·2DMSO (4-EtPy=4-Ethyl pyridine) (compound **1**) and *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)][(4-EtPy)H] (compound **2**) were synthesized. Their hydrolytic mechanism-kinetics in pH 7.40/5.00 buffer solution and solution stabilities were studied by UV and NMR spectroscopy. Observed rate constant (*k*_{obs}) and half-life time (*t*_{1/2}) of the compounds were measured and calculated respectively. The result shows that the 1st and 2nd chloro-hydrolysis as well as DMSO-hydrolysis mechanisms for two compounds are very similar to that for NAMI-A. However, the measured hydrolytic rates of two compounds are somewhat faster than that of related NAMI-A, which means that replacing imidazole ring by 4-EtPy containing electron donating group would accelerate hydrolytic rate of NAMI-A derivatives. With the same nitrogen-donor ligand, NAMI-A derivative seems a little bit more stable than related NAMI derivative. The NMR method to quantitatively determine the mechanism-kinetics of NAMI-A derivatives was also provided.

Key words: ruthenium complexes; 4-ethyl pyridine; hydrolytic kinetics; stabilities; NMR

收稿日期: 2012-05-23。收修改稿日期: 2012-05-31。

澳门科技发展基金(No.012/2009/A1)、中国中医科学院基本科研业务费自主选题(No.ZZ03064, Z02089)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: Lguogang200@126.com

0 引言

Alessio等科学家于20世纪90年代合成了NAMI和NAMI-A型化合物,发现该类化合物对肿瘤转移有明显的抑制作用^[1-6]。NAMI-A为首个通过I期临床并进入II期临床的金属钌配合物^[7-9]。实验表明,NAMI-A在体外试验中抗细胞增殖作用不显著,但对实验小鼠有明显的抗肿瘤转移作用。产生这种现象的原因可归结为化合物进入体内后,通过水解或者还原被激活后才产生药效^[10-11]。研究还表明,NAMI-A在pH值大于7.0的溶液中先后脱掉1个及2个氯,I氯及II氯水解产物被认为是抗转移作用的药效成分^[12-13]。在pH<6.0的溶液中DMSO水解,脱DMSO后的水解产物可能使药效降低^[3,4]。NAMI-A及其衍生物是否能水解、水解产物在溶液中的存在状态及时间是判断其作用机理、药效的重要依据。NAMI-A及其衍生物的稳定性的影响也明显影响药效^[14-15]。

Sava和Reedijk等曾分别用HPLC、NMR法研究了NAMI-A的I氯水解、DMSO水解反应和pH值对水解反应的影响^[15,14]。NMR法测定由于曲线拟合不好无法得到动力学参数;用HPLC测定NAMI-A的I氯水解反应时需加适量酸、碱以维持样品溶液pH值,分离条件也影响测定精度,因此测定精度较低^[14]。

Sava等曾在专利中制备过含有吡啶的NAMI衍生物,并证明含乙基吡啶的NAMI衍生物(钠盐)有显著抗肿瘤转移药效,但未指明乙基在吡啶环中的位置及提供结构鉴定数据^[16]。Alessio也制备过含4-EtPy的NAMI-A衍生物,但制备方法不详细(难于重复)。除X-射线衍射外也未给出更详细的结构鉴定参数^[17]。虽然NAMI衍生物的水溶性一般比相应NAMI-A衍生物好,但目前研究多集中于NAMI-A的水解和作用机理^[18-22],定量研究NAMI-A和NAMI衍生物水解机理-动力学的报道极少。更未见有同时定量比较含有相同含氮碱基的NAMI、NAMI-A衍生物水解动力学的文献报道。

国外许多学者及国内计亮年、刘杰等都认为NAMI-A及其衍生物有良好的研发前景^[9,23-27]。显然,制备更多的相关衍生物、深入研究其水解机理与药效、毒性的关系,就有可能发现药效更好的NAMI、NAMI-A衍生物。

NAMI-A中咪唑(Imidazole)基的碱性明显影响

配合物的水解速率,可用改变配位碱基的碱性调控NAMI-A衍生物的水解速率,达到增强抗转移活性和降低毒副作用的目的^[28]。本文用改进的方法合成了含4-EtPy的NAMI、NAMI-A衍生物(方法简便,收率较高),用UV-Vis、NMR定量测定了化合物的脱I氯、脱II氯水解、脱DMSO水解及溶液稳定性(目前暂未见有用核磁法定量测定NAMI-A及其衍生物水解动力学的报道^[5]),以比较外界阳离子对化合物的水解反应及稳定性的影响。并与NAMI-A的相关水解数据比较,为构效关系研究打下基础。

1 实验部分

$\text{RuCl}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ (水合三氯化钌)(Aldrich, purum, Ru~41%);4-乙基吡啶 (Alfer Aesar, 98%); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (International Lab USA);其余试剂均为分析纯。

$\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})_2][(\text{DMSO})_2\text{H}]$ ^[29,30]和 $\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})_2]\text{Na}$ ^[31]分别按文献方法制备。磷酸缓冲液(pH 7.40)和醋酸缓冲液(pH 5.00)也按文献方法制备^[10]。

美国Beckman公司紫外可见分光光度计DU 800(电子控温 $\pm 0.1^\circ\text{C}$);Carlo-Erba-1106型元素分析仪;INOVA-500型核磁共振仪,测定溶剂 $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (结构鉴定);Bruker Avance DRX-500(动力学);Perkin Elmer Spectrum BX II红外光谱测定仪,KBr压片;Stuart SMP10熔点测定仪;Beckman Φ 350 pH计。

1.1 化合物1的制备

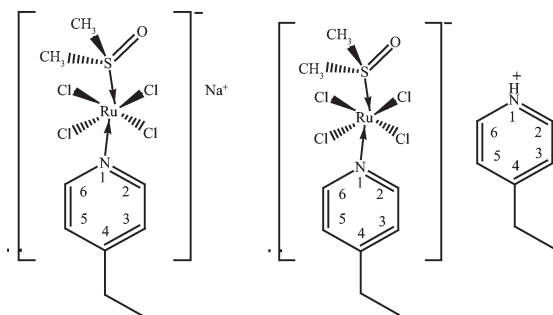
制备方法与Sava等制备 $\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{L})]\text{Na} \cdot 2\text{DMSO}$ (L=Im, Indazole, NH_3 , *N*-methyl-imidazole等)的方法相近,但略有改动以提高收率^[31]。

将化合物 $\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})_2]\text{Na}$ 0.10 g (0.24 mmol)溶于3 mL丙酮,加入0.14 mL 4-乙基吡啶(1.23 mmol)和0.33 mL DMSO,超声振荡3 h后过滤。滤液中加入二氯甲烷/乙醚(1:2,V/V)混合溶液1 mL。生成的黄色结晶过滤,用乙醚洗涤后硅胶干燥。得产物0.099 g。收率68%。m.p.:137~138 $^\circ\text{C}$ 。 $M_w=607.41$ 。元素分析实验值(%), $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{NCl}_4\text{O}_3\text{Ru(III)S}_3\text{Na}$ 计算值):C 25.70(25.71),H 4.43(4.48),N 2.71(2.31)。UV-Vis (25 $^\circ\text{C}$, H_2O), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ [$\epsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$]:395 (4 950),459(500)。 $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$:3 018,2 968,1 622,1 504,1 079(vs),1 025(vs),831,432。 ^1H NMR($\text{DMSO}-d_6$) δ : -0.54(Ru-4-EtPy' CH_2);-1.74 (Ru-4-EtPy' CH_3);-12.55 ($\text{DMSO CH}_3'$)。

1.2 化合物 2 的制备

与 Alessio 的制备方法不同^[17], 本法制备简单且收率由 75% 提高到约 90%。

称取化合物 *trans*-[RuCl₄(DMSO)₂][(DMSO)₂H] 0.78 g (1.40 mmol), 加 10 mL 丙酮和 0.63 mL (5.61 mmol) 乙基吡啶。密封搅拌 4 h, 生成的浅黄色粉末过滤。用丙酮和乙醚洗涤后硅胶干燥。得橘黄色粉末 0.68 g。收率 92%。m.p.: 184~187 °C。M_w=536.33。元素分析实验值 (% , C₁₆H₂₅N₂Cl₄ORu(III) 计算值): C 36.08(35.83), H 4.67(4.70), N 4.95(5.22)。UV/Vis(25 °C, H₂O), λ_{max}/nm [ε/(L·mol⁻¹·cm⁻¹): 394(3 920), 457(520)。ν_{max}/cm⁻¹: 3 061, 2 970, 1 636(s), 1 618(s), 1 503(s), 1 425(s), 1 086(vs), 1 026(vs), 432。¹H NMR(DMSO-d₆) δ: 8.83 (4-EtPyH⁺ H₂ and H₆); 7.99 (4-EtPyH⁺ H₃ and H₅); 2.94(4-EtPyH⁺ CH₂); 1.29(4-EtPyH⁺ CH₃); -0.94(Ru-4-EtPy' CH₃); -2.14(Ru-4-EtPy' CH₂); -12.50(DMSO CH₃')。



Scheme 1 化合物 *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)]Na·2DMSO(左)和 *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)][(4-EtPy)H](右)的化学结构

Scheme 1 Chemical structures of *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)]Na·2DMSO (left) and *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)][(4-EtPy)H] (right)

1.3 化合物 1、2 水解反应机理研究

分别测定不同时间下化合物 1、2 在磷酸缓冲液(pH 7.40)及生理盐水溶液(pH 5~6)中的紫外吸收光谱。与 NAMI-A 水解机理相近^[5,32], 两化合物在 pH

7.40 缓冲液中发生分步脱氯水解反应(图 2), 在生理盐水中发生脱 DMSO 水解反应(图 5)。

1.4 化合物 1、2 的水解动力学研究

按文献方法^[28,33]测定两个化合物及其水解产物在不同浓度下的吸光度, 建立吸光度-浓度曲线方程($n=3, r>0.999$)。

将化合物溶于缓冲或非缓冲液, 在其最大吸收波长测定吸光度, 得到吸光度-时间曲线。对零级反应将吸光度值用吸光度-浓度曲线方程转化成浓度-时间曲线后按零级反应方程 $C=B+k_{\text{obs}}t$ 拟合(C 为反应浓度; B 为拟合常数; k_{obs} 为表观速率常数; t 为反应时间); 将吸光度转化成百分吸光度后按一级反应方程 $A_t=C_0+C_1\exp(-k_{\text{obs}}t)$ 进行非线性拟合(A_t 为百分吸光度; C_0, C_1 为拟合常数; k_{obs} 为表观速率常数; t 为反应时间)。拟合范围约为反应的 10~90%, $r>0.99$ 。动力学反应测定为至少重复 2 次后取均值。

1.5 电化学研究

电化学测定使用 LK98BII 微机电化学分析系统。碳电极(Φ 3)为工作电极, 铂电极为辅助电极, 饱和甘汞电极为参比电极。以氯化钠为支持电解质, 扫描速度 0.1 V·s⁻¹。结果如图 8。

2 结果与讨论

2.1 化合物的结构参数

化合物 1、化合物 2 及 NAMI-A(包括各水解产物)的紫外、红外光谱数据列于表 1、表 2。表 1 中两个化合物的紫外、红外光谱数据与 NAMI-A 差别不大。表 2 中化合物 1、2 的脱 I 氯、II 氯水解产物的吸收与 NAMI-A 的相应水解产物相近, 表明化合物 1、2 与 NAMI-A 的脱氯水解反应机理可能相近^[11,28,34](见 Scheme 2)。

2.2 化合物在 pH 7.40 的缓冲液中的水解机理及动力学研究

化合物 1 和化合物 2 在磷酸缓冲液中的水解

表 1 化合物 1、化合物 2 和 NAMI-A 的紫外吸收光谱及红外光谱

Table 1 Infrared and UV spectra of compounds 1, 2 and NAMI-A

Compound	IR / cm ⁻¹			λ _{max} / nm (ε / (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)) (25 °C, H ₂ O)		
	ν(CH in heterocycle)	ν(S=O)	ν(Ru-S)	1	2	3
1	3 127	1 107	440	280 (Unclear)	395 (4 950)	459 (500)
2	3 061	1 086	432	280 (Unclear)	394 (3 920)	457 (520)
NAMI-Aa	3 152	1 097	428	287 (1 390)	389 (3 890)	450 (530)

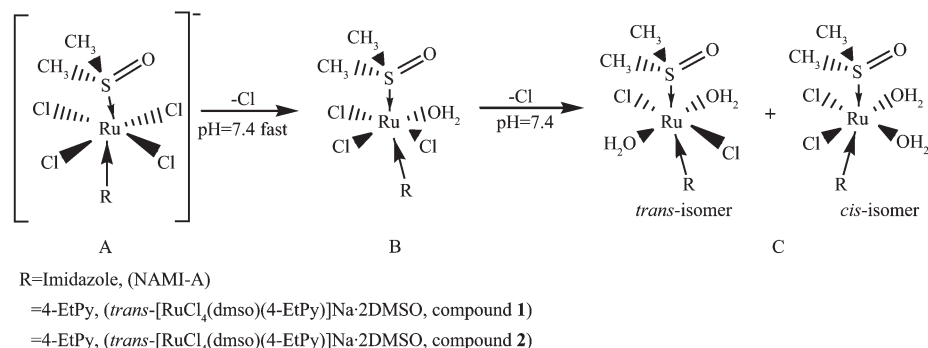
Note: ^a Data are from Ref.^[34].

表 2 化合物 1、化合物 2、NAMI-A 及其在中性缓冲液(pH 7.40, 0.15 mol·L⁻¹ NaCl, 37 °C) 中水解产物的紫外吸收光谱

Table 2 UV absorptions (λ_{max}) of compounds 1, 2 and NAMI-A together with their degradation products (pH 7.40, 0.15 mol·L⁻¹ NaCl, 37 °C)

Compound	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	
Compound 1	393	459
RuCl ₃ (DMSO)(4-EtPy)(H ₂ O)	345	
[RuCl ₂ (DMSO)(4-EtPy)(H ₂ O) ₂] ⁺	282	
Compound 2	393	457
RuCl ₃ (DMSO)(4-EtPy)(H ₂ O)	346	
[RuCl ₂ (DMSO)(4-EtPy)(H ₂ O) ₂] ⁺	282	
NAMI-A ^a	287	389
RuCl ₃ (DMSO)(HIm)(H ₂ O) ^a	340	451
[RuCl ₂ (DMSO)(HIm)(H ₂ O) ₂] ⁺ ^a	300	

Note: ^a Data are from Ref.^[34].



Scheme 2 化合物 1、化合物 2 及 NAMI-A 在磷酸盐缓冲液(pH 7.40)中可能的水解反应

Scheme 2 Proposed degradation of compounds 1, 2 and NAMI-A in phosphate buffer saline (pH 7.40)

反应光谱见图 1。

与 NAMI-A 的脱氯水解相似^[11,28],图 1 中化合物 1 在 393 nm 处的吸收下降,345 nm 处的吸收上升,约 10.8 min 后 345 nm 处的吸收达到最高,这是脱 I 氯水解产物[RuCl₃(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)]的最高吸收峰。等吸收点 367 nm 表明原配合物与脱 I 氯水解产物间的化学平衡。脱 I 氯水解结束后发生[RuCl₃(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)]水解为[RuCl₂(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)₂]⁺的脱 II 氯水解反应。表现为 345 nm 处吸收下降,282 nm 处吸收上升,约 18 min 后[RuCl₂(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)₂]⁺的吸收达到最高。等吸收点分别为 276 nm、333 nm、385 nm 及 425 nm,此时 I 氯水解产物与 II 氯水解产物之间达到化学平衡。化合物 2 的水解反应与化合物 1 类似,首先 394 nm 吸收峰下降,346 nm 吸收峰上升,约 11.2 min 后 346 nm 吸收达到最高。等吸收点 368 nm 表明化合物 2 与脱 I 氯水解产物间的化学平衡过程。脱 I 氯水解反应结束后 346 nm 吸收峰由升转降,282 nm

吸收峰上升,约 24 min 后达到最高,等吸收点分别为 270 nm、335 nm、395 nm 及 435 nm。显然,两个化合物的脱氯水解反应机理基本相同,同为明显的分步水解反应^[11]。化合物的脱氯水解反应拟合数据见图 2。

化合物 1 的 I 氯水解反应 (测定波长 393 nm),即由 *trans*-[RuCl₄(DMSO)(4-EtPy)][(4-EtPy)H]Na·2DMSO 水解为[RuCl₃(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)](图 2b)。以零级反应模型线性拟合得方程 1:

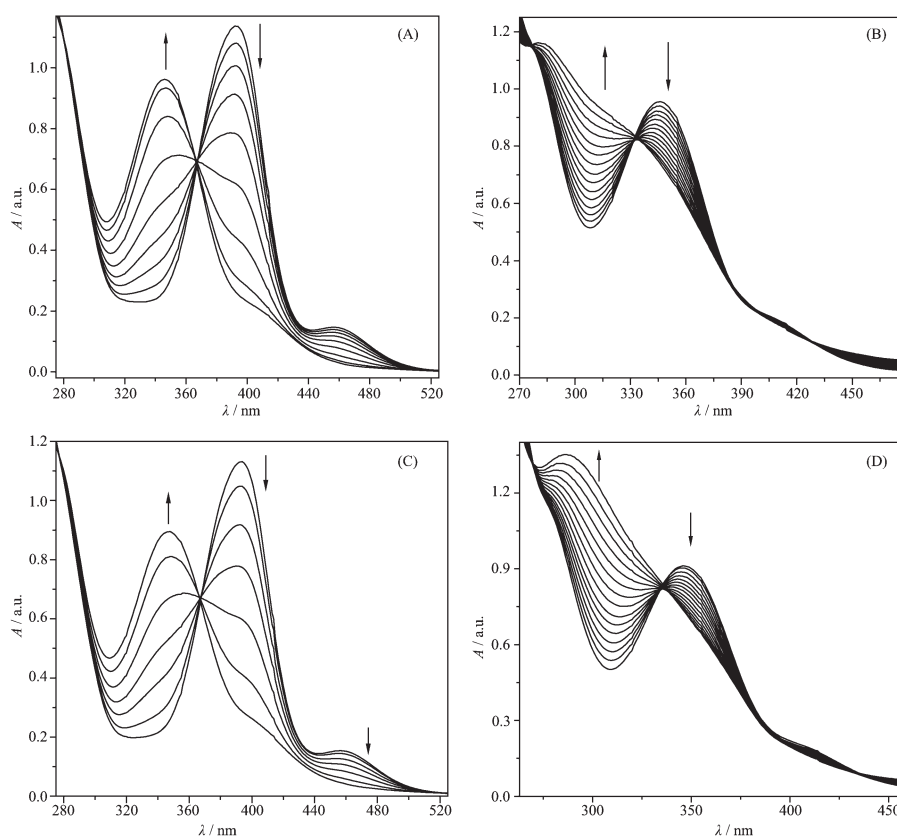
$$C=3.295 \times 10^{-4}-3.162 \times 10^{-5}t, r=-0.9911 (n=2) \quad (1)$$

由方程 1 得:

$$k_{\text{obs } 1}=3.162 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}, t_{1/2 \text{ I}}=C_0/(2k_{\text{obs } 1})=4.744 \text{ min}$$

化合物 1 的脱 II 氯水解反应 (测定波长 345 nm),即由[RuCl₃(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)]水解为[RuCl₂(DMSO)(4-EtPy)(H₂O)₂]⁺(图 2d)。以零级反应模型进行线性拟合得方程 2:

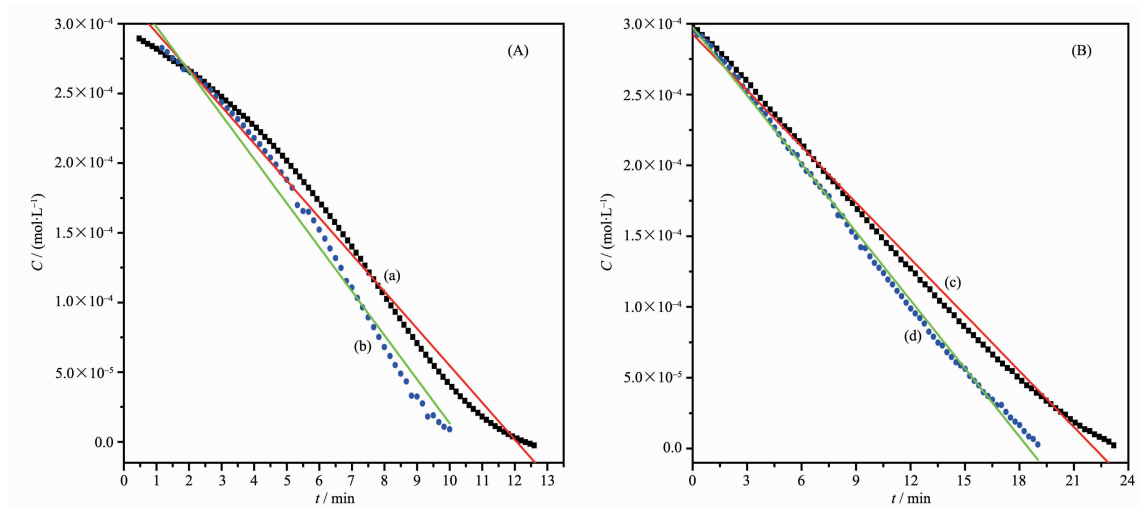
$$C=2.966 \times 10^{-4}-1.596 \times 10^{-5}t, r=-0.9986 (n=2) \quad (2)$$



(A) 1st chloride hydrolysis of compound **1**, (B) 2nd chloride hydrolysis of compound **1**, (C) 1st chloride hydrolysis of compound **2**, (D) 2nd chloride hydrolysis of compound **2**

图 1 化合物 **1** 与化合物 **2** ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在磷酸盐缓冲液 (pH 7.40, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 37°C) 中的水解反应 (测定的时间间隔分别为 1.2 min (化合物 **1**) 和 1.6 min)

Fig.1 Hydrolysis of compounds **1** and **2** ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in phosphate buffer saline (pH 7.40, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 37°C) recorded every 1.2 min (compound **1**) and 1.6 min



(A) 1st chloro-hydrolysis of compounds **1** (b) and **2** (a) and fitted lines; (B) 2nd chloro-hydrolysis of compounds **1** (d) and **2** (c) and fitted lines

图 2 化合物 **1** 与化合物 **2** ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 pH 7.40 磷酸盐缓冲液 (pH 7.40, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 37°C) 中的脱 I 氯 (左) 及脱 II 氯 (右) 水解反应及拟合曲线

Fig.2 1st (left) and the 2nd (right) chloro-hydrolysis of compounds **1** and **2** ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in phosphate buffer saline (pH 7.40, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 37°C) monitored by plotting C vs t

由方程 2 得:

$$k_{\text{obs II}} = 1.596 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}, t_{1/2 \text{ II}} = 9.398 \text{ min}$$

以相同方法测定化合物 2 的脱 I 氯水解反应表观速率常数 $k_{\text{obs I}} = 2.633 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $r = -0.9926$ ($n=2$), $t_{1/2 \text{ I}} = 5.697 \text{ min}$; 脱 II 氯水解反应 $k_{\text{obs II}} = 1.321 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $r = -0.9968$ ($n=2$), $t_{1/2 \text{ II}} = 11.36 \text{ min}$ 。

Scheme 2 表示化合物 1、化合物 2 及 NAMI-A 在 pH 7.40 缓冲液中的水解反应过程及水解产物, 其中 B、C 为主要药效分子, 在抗肿瘤转移机理中起重要作用^[10, 13]。

2.3 化合物 1 和化合物 2 在 pH 5.00 缓冲液中的水解动力学研究

化合物 1、2 在醋酸缓冲液(pH 5.00)中都表现为 Abs(393 nm)下降, Abs(300 nm)上升, 此反应可归结为脱 DMSO 反应^[5, 28](图 3)。化合物 1 和化合物 2 水解反应曲线拟合情况见图 4。

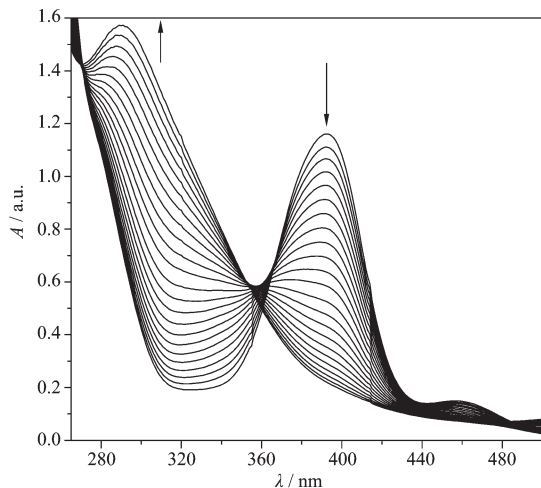


图 3 化合物 2 ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在醋酸缓冲液(pH 5.00, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中的水解反应(测定时间间隔为 10 min)

Fig.3 Hydrolysis of compound 2 ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in acetic buffer solution (pH 5.00, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$) recorded every 10 min

图 4 中线 a 为化合物 1 脱 DMSO 水解反应。拟合得直线方程(3):

$$C = 3.032 \times 10^{-4} - 1.603 \times 10^{-6} t, r = -0.9967 (n=2) \quad (3)$$

由方程 3 得:

$$k_{\text{obs}} = 1.603 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}, t_{1/2} = 93.57 \text{ min}$$

同法测得化合物 2 的脱 DMSO 水解反应 (图 4b) $k_{\text{obs}} = 1.560 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $r = -0.9981$ ($n=2$), $t_{1/2} = 96.15 \text{ min}$ 。

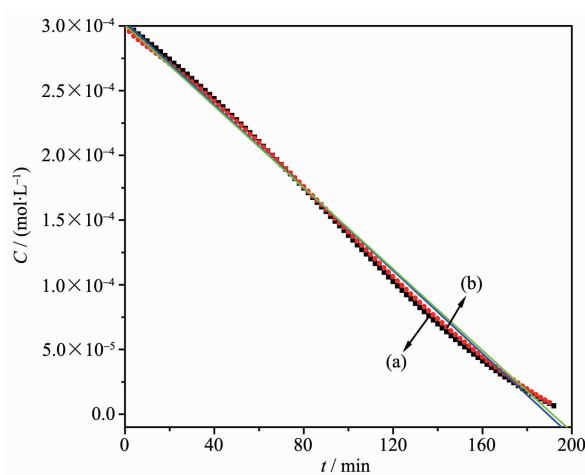


图 4 化合物 1(a)与化合物 2(b) ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在醋酸缓冲液(pH 5.00, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中的脱 DMSO 水解反应及拟合曲线

Fig.4 DMSO hydrolysis of compounds 1 (a) and 2 (b) ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in acetic buffer solution (pH 5.00, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and fitted lines

2.4 化合物的稳定性

图 5 为化合物 1 和化合物 2 在生理盐水溶液中的水解反应(测定波长 393 nm, 测定时间间隔分别为 0.5 和 1 min)。根据核磁测定结果(图 6), 此反应主要为脱 DMSO 水解反应^[5, 28]。

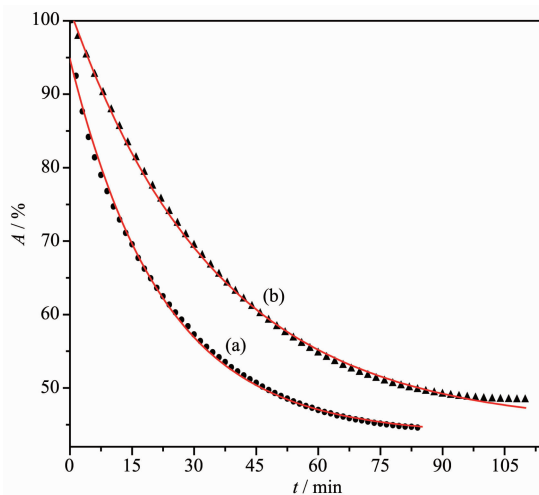
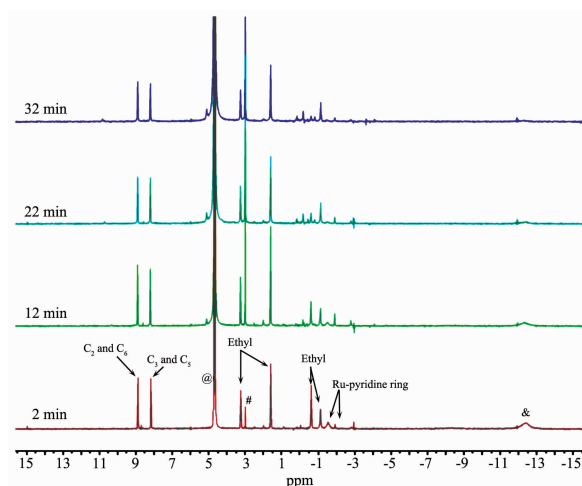


图 5 化合物 1(a)与化合物 2(b) ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在生理盐水溶液(pH 5~6, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中的稳定性及拟合曲线

Fig.5 Stabilities of compounds 1 (a) and 2 (b) ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in physiological saline (pH 5~6, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) and fitted lines

对化合物 1 的水解反应, 以指数衰减一级反应动力学模型拟合得曲线方程:



&: Coordinated-DMSO, #: Free-DMSO and @: internal standard material D₂O

图 6 0~32 min 内化合物 **2** 在生理盐水溶液的氢谱图, 测定温度 50 °C

Fig.6 Part of stack plot of the ¹H NMR spectra of compound **2** in 0.15 mol·L⁻¹ NaCl recorded in 0~32 min interval at 50 °C

$$A_t = 43.61 + 51.20 \exp(-0.044 \ 98t), r = -0.998 \ 6 \quad (n=2) \quad (4)$$

由方程 4 得:

$$k_{\text{obs}} = 0.044 \ 98 \text{ min}^{-1}, t_{1/2} = 15.41 \text{ min}$$

同法测定了化合物 **2**(图 5b)在生理盐水中的稳定性, 以一级反应动力学模型经非线性拟合($r = 0.999 \ 6$)得到的表观速率常数及半衰期列于表 3。

测定的两个化合物的表观速率常数及半衰期列于表 3。

本文首次测定了含有相同含氮配体的 NAMI、NAMI-A 衍生物的各级水解反应速率。结果表明含氮配体相同时 NAMI 比相应 NAMI-A 衍生物的水解速率稍快, 特别是 NAMI-A 衍生物的溶液稳定性

表 3 化合物 1、化合物 2 与 NAMI-A($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)在中性及酸性缓冲液(pH 5.00/7.40, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 37 °C)或生理盐水溶液(pH 5~6, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 50 °C)中的表观速率常数及半衰期的比较

Table 3 Comparison on observed rate constant and half-life time of compounds 1, 2 and NAMI-A ($3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in buffer solution (pH 5.00/7.40, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 37 °C) or physiological saline (pH 5~6, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 50 °C)

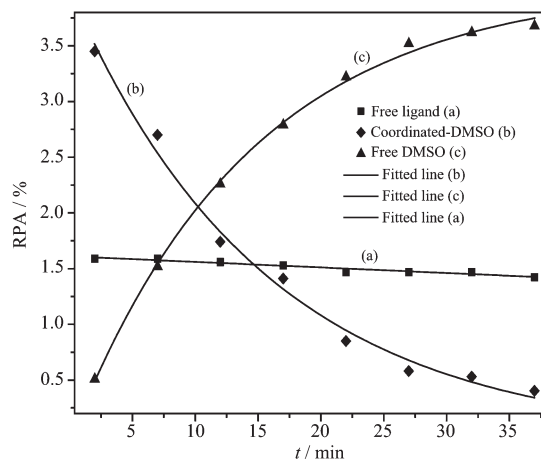
Compound	pH 7.40				pH 5.00		In water (pH 5~6)	
	1st chloro-hydrolysis		2nd chloro-hydrolysis		DMSO-hydrolysis			
	$k_{\text{obs}} / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$t_{1/2} / \text{min}$	$k_{\text{obs}} / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$t_{1/2} / \text{min}$	$k_{\text{obs}} / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$t_{1/2} / \text{min}$	$k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{min}$
1	3.162×10 ⁻⁵	4.744	1.596×10 ⁻⁵	9.398	1.603×10 ⁻⁶	93.57	0.044 98	15.41
2	2.633×10 ⁻⁵	5.697	1.321×10 ⁻⁵	11.36	1.560×10 ⁻⁶	96.15	0.028 23	24.55
(NAMI-A) ^a	2.166×10 ⁻⁵	6.925	1.638×10 ⁻⁵	9.158	1.279×10 ⁻⁶	117.3	0.028 06	23.64

Note: ^a Data of hydrolysis for NAMI-A in buffer solution (pH 7.40/5.00) and in water ($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$) are from Ref.^[33,34].

明显比 NAMI 衍生物好。NAMI-A 衍生物的溶液稳定性强可能与其带质子配体的酸性有关。目前未见有同时定量测定 NAMI 或 NAMI-A 衍生物脱 II 氯水解的报道, Nazzareno、计亮年^[26, 32]等曾用化学计算的方法预测 NAMI-A 衍生物的脱 II 氯水解应该比较难, 表 3 中虽然 3 个化合物的脱 II 氯水解反应速率比脱 I 氯水解反应慢, 但 2 步脱氯水解反应速率的差别并不是很大(Table 3)。

2.5 ¹H NMR 法测定化合物水解机理

为得到化合物脱 DMSO 水解反应的直接证据, 用核磁法测定了化合物 **2** 的水解机理, 结果见图 6。以 D₂O 的峰面积作为参照得到目标峰的相对峰面积百分比, 结果见图 7。图 7 中配位结合的 DMSO 相对峰面积(化学位移为 -12.50 ppm)逐渐减小, 游



(a) Free-ligand 4-EtPyH⁺-H₂ and H₆ (8.88 ppm, ■); (b) coordinated-DMSO (-12.50 ppm, ◆); (c) free-DMSO (2.99 ppm, ▲)

图 7 化合物 **2**($5.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 50 °C)的氢谱信号的相对峰面积(RPA)-水解时间(t)曲线

Fig.7 Plots of HNMR signals (relative peak areas) (Rpa) of related ligands of compound **2** ($5.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 50 °C) against hydrolysis time (t)

离 DMSO 的相对峰面积(2.99 ppm)逐渐增大;且配位结合的 DMSO 相对峰面积减少的比例与游离 DMSO 增加比例相近。但游离 4-EtPy H⁺ 浓度基本不变(以化学位移 8.88 ppm 计)。表明溶液中主要发生 DMSO 水解,配体 4-EtPyH⁺ 基本不水解,与 NAMI-A 及其衍生物在相同条件下的 NMR 测定结果基本相符^[5,28]。

Reedijk 曾用核磁法测定了 NAMI-A 脱 DMSO 水解反应,但由于测定误差较大,游离、配位 DMSO 浓度变化无规律,无法进行曲线拟合^[5]。本核磁法测定的 NAMI-A 衍生物 DMSO 水解,游离、配位 DMSO 浓度变化明显且更加合理。甚至可以用曲线拟合得到定量水解反应数据。此结果表明在适当实验条件下,用核磁法也可以测定化合物的水解动力学。

以 Coordinated-DMSO 的相对峰面积对时间作图,并进行非线性拟合,得方程:

$$\text{RPA}_{(\text{Co-DMSO})} = -0.2892 + 4.035 \exp(-0.06447t),$$

$$r = -0.9942 \quad (5)$$

由方程 5 得:

$$k_{\text{obs}(\text{Co-DMSO})} = 0.06447 \text{ min}^{-1}, t_{1/2} = 10.75 \text{ min}$$

以 Free-DMSO 的相对峰面积对时间作图并进行非线性拟合,得方程:

$$\text{RPA}_{(\text{Free-DMSO})} = 4.0504 - 101 \exp(-0.07045t),$$

$$r = 0.9981 \quad (6)$$

由方程 6 得:

$$k_{\text{obs}(\text{Free-DMSO})} = 0.07045 \text{ min}^{-1}, t_{1/2} = 9.839 \text{ min}$$

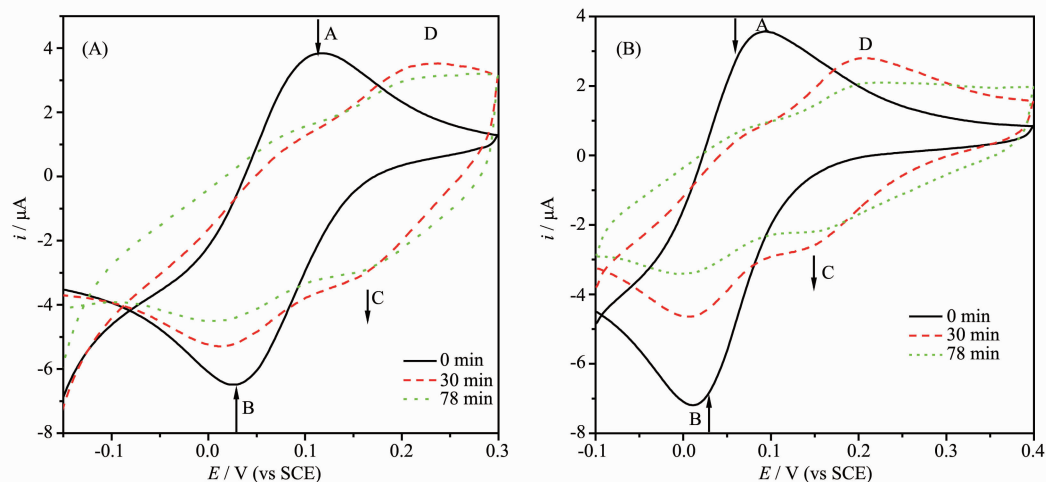
虽然核磁法定量测定动力学反应一般误差较大,但本测定以 Co-DMSO 和 Free-DMSO 的相对峰面积对时间作图经拟合得到的水解反应 $t_{1/2}$ 分别为 10.75 min 和 9.839 min,测定误差较小(曲线拟合的 $R > 0.99$)。用此方法测定了其它 NAMI-A 衍生物也得到理想结果。即只要实验条件适当,用核磁法可以定量测定 NAMI-A 衍生物的水解机理-动力学。

核磁测定结果还表明,化合物 2 ($5.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 50 °C) 的脱 DMSO 水解反应的 $t_{1/2} = 10.75 \text{ min}$,即当化合物浓度增加,其在生理溶液中的水解反应速度适当加快。与相同条件下测定的其它 NAMI-A 衍生物的结果相同。

2.6 电化学研究

化合物 1 与化合物 2 在生理盐水中水解过程的循环伏安曲线变化见图 8,测得的化合物及其水解产物的氧化还原电位见表 4。

两个化合物的氧化还原电位相差不大,即具有基本相同的氧化还原能力。如图 8(A),化合物 1 的水溶液中 30 min 后,氧化电位由 0.019 V 右移至 0.15 V,且还原峰 B 逐渐减小并生成新的还原峰 C;同时氧化电位 0.096 V 右移至 0.21 V,氧化峰 A 逐渐消失并生成新氧化峰 D。反应最终氧化还原峰几乎消失。可能由于生成了氧化聚合产物,溶液颜色变深,并有少量的沉淀生成。由紫外、核磁谱可知,此反应可归结为脱 DMSO 水解反应。化合物 2 及其水解产物的氧化还原电位及氧化还原峰的变化与化合物 1 相似,但略较化合物 1 稳定,如图 8(B)。



(A) Compound 1 in water ($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 50 °C) scanned after 0 min (—), 30 min (---) and 78 min (···); (B) Compound 2 in water ($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 50 °C) scanned after 0 min (—), 30 min (---) and 78 min (···)

图 8 化合物 1 与化合物 2 ($5.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的循环伏安图

Fig.8 Cyclic voltammograms of compound 1 and compound 2 ($5.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

表 4 化合物 1、化合物 2 及 NAMI-A($5.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在生理盐水溶液($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 50°C) 中的氧化、还原及标准电极电位

Table 4 Oxidation, reduction and formal electrode potential of Compd. 1, Compd. 2 and NAMI-A ($5.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in water ($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, 50°C)

0.15 mol·L ⁻¹ NaCl solution, 50 °C			
	Red potential / V	Ox potential / V	E ^{0'} / V (vs SCE)
Compd. 1	0.019 (B)	0.096 (A)	0.058
Hydrolytic reductive product of compd. 1 after 30 min	0.15 (C)	0.21 (D)	0.18
Compd. 2	0.012 (B)	0.093 (A)	0.053
Hydrolytic reductive product of compd. 2 after 30 min	0.16 (C)	0.21 (D)	0.19
NAMI-A*	—	—	0.021
NAMI-A	-0.021	0.062	0.021

Note: * Data of NAMI-A are from Ref.^[35].

3 结 论

NAMI-A 的水解产物为抗肿瘤转移的活性成分^[11,14]。与 NAMI-A 相似, 化合物 1 和化合物 2 在 pH 7.40 缓冲液中发生脱 I 氯、脱 II 氯水解(图 2); 在 pH 5.00 缓冲液及生理盐水溶液中发生脱 DMSO 水解(图 4,5)。即含氮配体相同时, NAMI 衍生物与 NAMI-A 衍生物水解机理相似。总体看, NAMI-A 与化合物 1、2 的各级水解速率差别不是很大(表 3)。NAMI-A 的各级水解速率比化合物 1 和 2 略慢, 即用 4-EtPy 取代 NAMI-A 的咪唑基, 可稍稍加快其水解速率。化合物 1(NAMI 衍生物)的各级水解速率比化合物 2(NAMI-A 衍生物)稍快, 表明外界阳离子 4-EtPyH⁺不但降低了水溶性, 也可以提高溶液稳定性。化合物 1、2 在酸性溶液中的稳定性明显高于其中性溶液的稳定性。

此结论对研究 NAMI、NAMI-A 衍生物的水解机理-动力学及其与药效、毒性的关系有重要意义。

参考文献:

- [1] Sava G, Clerici K, Capozzi I, et al. *Anticancer Drugs*, **1999**, **10**(1):129-138
- [2] Sava G, Gagliardi R, Bergamo A, et al. *Anticancer Res.*, **1999**, **19**(2A):969-972
- [3] Bergamo A, Gava B, Alessio E, et al. *Int. J. Oncol.*, **2002**, **21**(6):1331-1338
- [4] Sava G, Bergamo A, Zorzet S, et al. *Eur. J. Cancer.*, **2002**, **38**(3):427-435
- [5] Bacac M, Hotze A C, van der Schilden K, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, **98**(2):402-412
- [6] Khalaila I, Bergamo A, Bussy F, et al. *Int. J. Oncol.*, **2006**,

29(1):261-268

- [7] Rademaker-Lakhai J M, van den Bongard D, Pluim D, et al. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, **10**(11):3717-3727
- [8] Casini A, Mastrobuoni G, Terenghi M, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, **12**(8):1107-1117
- [9] Groessl M, Tsybin Y O, Hartinger C G, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, **15**(4):677-688
- [10] LIANG Yao-Hua (梁曜华), LIANG Guo-Gang (梁国刚). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2008**, **24**(12):1983-1988
- [11] Frausin F, Scarcia V, Cocchietto M, et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2005**, **313**(1):227-233
- [12] Alessio E, Mestroni G, Bergamo A, et al. *Curr. Top Med. Chem.*, **2004**, **4**(15):1525-1535
- [13] Chen J, Chen L, Liao S, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, **111**(27):7862-7869
- [14] Bouma M, Nuijen B, Jansen M T, et al. *Int. J. Pharm.*, **2002**, **248**(1-2):239-246
- [15] Bouma M, Nuijen B, Jansen M T, et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, **30**(4):1287-1296
- [16] Sava G, Pacor S, Bergamo A, et al. *Chem. Biol. Interact.*, **1995**, **95**(1-2):109-126
- [17] Geremia S, Alessio E, Todone F. *Inorg. Chim. Acta*, **1996**, **253**:87-90
- [18] Webb M I, Chard R A, Al-Jobory Y M, et al. *Dalton Trans.*, **2011**, **40**(6):1322-1331
- [19] Hostetter A A, Miranda M L, Derosé V J, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2011**, **16**(8):1177-1185
- [20] Vargiu A V, Robertazzi A, Magistrato A, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, **112**(14):4401-4409
- [21] Brindell M, Stawoska I, Supel J, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2008**, **13**(6):909-918
- [22] Liu M, Lim Z J, Gwee Y Y, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2010**, **49**(9):1661-1664

- [23]ZHANG Xiao-Nian(张小年), LIU Ya-Nan(刘亚楠), YANG Xiao-Xin(杨晓新), et al. *Prog. Chem. (Huaxue Jinzhan)*, **2011**,**23**(5):943-990
- [24]Webb M I, Chard R A, Al-Jobory Y M, et al. *Inorg. Chem.*, **2012**,**51**(2):954-966
- [25]Bergamo A, Gaiddon C, Schellens J H, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**,**106**(1):90-99
- [26]Chen J, Chen L, Liao S, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2007**,**111**(27):7862-7869
- [27]CHEN Yu(陈禹), DU Ke-Jie(杜可杰), CHAO Hui(巢晖), et al. *Prog. Chem. (Huaxue Jinzhan)*, **2009**,**21**(5):836-844
- [28]LIANG Yao-Hua(梁曜华), BI Wei(毕葳), YANG Bin(杨滨), et al. *Chem. J. Chinese Universities (Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao)*, 2011, 32(2):210-217
- [29]Alessio E, Balducci G, Calligaris M, et al. *Inorg. Chem.*, **1991**,**30**(4):609-618
- [30]Mestroni G, Alessio E, Sava G. *United States Patent*, 6, 221, 905 B1, 2001-04-24.
- [31]Alessio E, Mestroni G, Pocar S, et al. *United States Patent*, 5409893, 1995-04-25.
- [32]Besker N, Coletti C, Marrone A, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2008**,**112**(13):3871-3875
- [33]LIANG Yao-Hua(梁曜华), BI Wei(毕葳), LIANG Guo-Gang(梁国刚). *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2011**,**27**(4):505-603
- [34]LIANG Yao-Hua(梁曜华), LIANG Guo-Gang(梁国刚). *J. Macau Univ. Sci. Technol. (Aomen Keji Daxue Xuebao)*, **2008**,**2**(1):36-42
- [35]Ravera M, Baracco S, Cassino C, et al. *Dalton. Trans.*, **2004**(15):2347-2351