

含卟啉基团小分子钆配合物的合成与表征

鄢国平,邹头君,邵春桃,李 贞,常秀鹏

(武汉工程大学材料科学与工程学院,湖北 武汉 430074;

武汉工程大学绿色化工过程教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘 要:针对临床上广泛应用的磁共振成像造影剂二乙三胺五乙酸钆(Gd-DTPA)是一种离子型造影剂,由于其成像时间短、渗透压较高,没有组织或器官选择性(靶向性),尤其对早期肿瘤的成像检测效果较差的问题,利用卟啉对肿瘤的特异亲和性,将 5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三吡啶基卟啉与二乙三胺五乙酸双酸酐(DTPAA)进行化学反应,合成了一种小分子配体(DTPA-2APTMPyP),再与金属钆离子 Gd(III)配合,从而制备了小分子磁共振成像造影剂(Gd-DTPA-2APTMPyP),并对所合成的配体及其配合物进行了红外光谱、紫外光谱与核磁共振等结构表征,证明产品为目标产物.同时初步测定了配合物的体外弛豫率与细胞毒性.实验表明,与临床应用的小分子造影剂二乙三胺五乙酸钆(Gd-DTPA)相比,这种小分子造影剂具有较高的弛豫率与略高的体外细胞毒性.

关键词:磁共振成像;造影剂;Gd-DTPA;卟啉

中图分类号:TM 344.1

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2013.02.001

0 引 言

在临床医学诊断中,肿瘤的及时、准确的发现对治疗起着至关重要的作用^[1-2].磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)技术是当前用于肿瘤检测与诊断的先进影像技术之一.磁共振成像造影剂(MRI contrast agent)能缩短体内局部组织中水质子的弛豫时间,提高成像对比度和清晰度^[3],可有效地区分病变组织与正常组织的差异,有利于进行疾病的早期诊断,这样不仅能够及时准确的对症下药,进行早期治疗,而且还能在很大程度上提高治疗效果,提高患者的治愈率和存活率.

二乙三胺五乙酸钆(Gd-DTPA)是目前临床上应用最广泛的 MRI 造影剂,在体内主要循环于组织细胞外液间,没有特定的生理分布,因此 Gd-DTPA 在体内分布没有生物学专一性(靶向性).另外,由于 Gd-DTPA 是以钠盐或葡甲胺盐的形式应用于临床,为离子型造影剂,故有渗透压偏高的问题,这些高浓度的钆类对比剂还不可避免地

产生诸如肾系统纤维化(NSF)等毒性反应^[4-5].因此,在造影剂的基本骨架上引入各种靶向基团进行化学修饰,制备得到非离子型配合物,不仅可赋予造影剂组织或器官的靶向性,而且可降低造影剂的渗透压、毒副作用^[6-8].卟啉及其金属配合物对肿瘤具有特异的亲和性,注射入人体后会在肿瘤组织富集,因此卟啉化合物可用作作为造影剂的肿瘤靶向基团^[9-14].

本研究用 5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三吡啶基卟啉对 DTPA 基本骨架进行化学修饰,合成一种小分子配体二乙三胺三乙酸二酐(5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三吡啶基卟啉)(DTPA-2APTMPyP),再与金属钆离子 Gd(III)配合,从而制备小分子造影剂二乙三胺三乙酸二酐(5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三吡啶基卟啉)钆配合物(Gd-DTPA-2APTMPyP),其具体合成路线如图 1.并对所合成的配体及其配合物进行了 FT-IR、UV、¹H NMR 等结构表征,进一步研究了造影剂的体外弛豫性能与细胞毒性实验.

收稿日期:2012-11-02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51173140);武汉市科技攻关计划项目(2013 年批文待发);武汉工程大学第三届研究生创新基金(CX201139)

作者简介:鄢国平(1970-),男,湖北天门人,教授,博士.研究方向:生物医用材料.

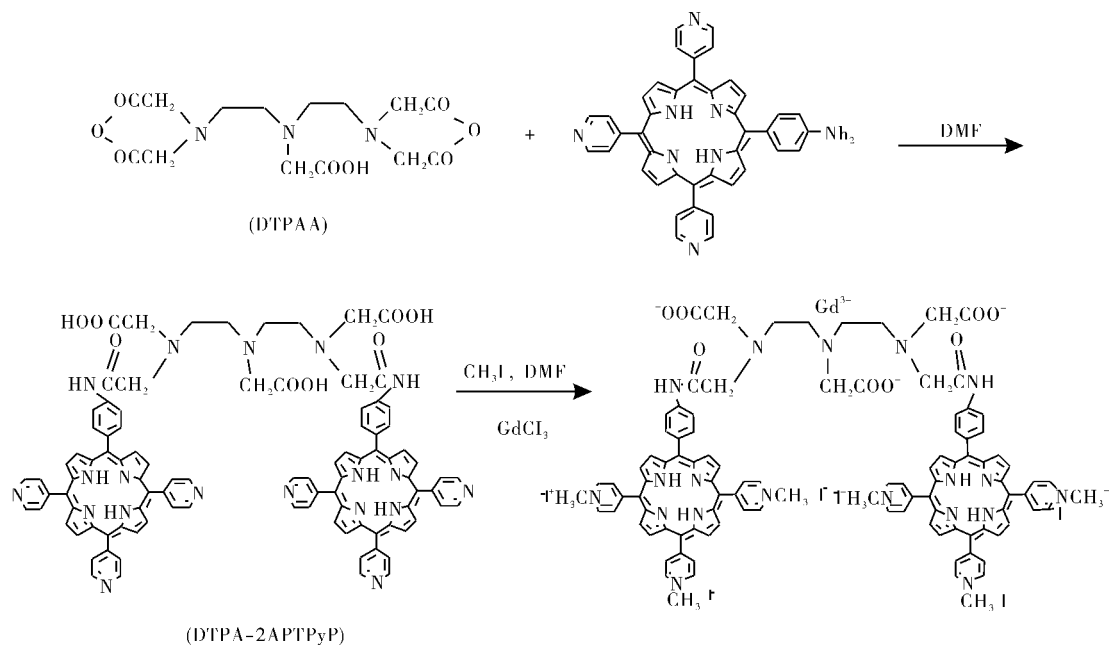


图 1 肿瘤靶向造影剂(Gd-DTPA-2APTMPyP)的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of tumor-targeting MRI contrast agent (Gd-DTPA-2APTMPyP)

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

二乙三胺五乙酸(DTPA)、4-硝基苯甲醛、4-吡啶甲醛、乙酸酐、氧化钆、浓盐酸、碘甲烷、无水乙醇、无水甲醇、无水乙醚、丙酸、三氯甲烷、二氯甲烷均为分析纯试剂;N,N-二甲基甲酰胺(DMF)用CaH₂干燥48 h后蒸馏备用。吡咯、吡啶用前蒸馏。

¹H NMR用Varian Mercury VX-300型核磁共振波谱仪于300 MHz下测定;FT-IR用Nicolet Imapt 420型傅里叶红外分析仪测定,KBr压片;UV用UNIC-2802H UV/Vis Spectrophotometer紫外光谱测定;熔点用北京光电科学仪器厂XT4-100x显微熔点仪(数字显示,温度校正)测定;自旋-晶格弛豫时间(T₁)用Varian Mercury-Vx300 NMR(300 MHz)核磁共振测定。

1.2 配体及配合物的合成

1.2.1 配体 DTPA-2APTMPyP 二乙三胺五乙酸双酸酐(DTPAA)参照文献^[15-16]方法制备,5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三吡啶基卟啉参照文献^[17]方法制备。将0.8 g 5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三吡啶基卟啉(1.28 mmol)加入到盛有20 mL DMF的烧瓶中,在冰浴磁力搅拌的条件下,缓慢加入0.20 g DTPA双酸酐(0.64 mmol),低温反应8 h后,室温下继续反应24 h。用无水乙醚沉淀,过滤干燥,收集固体。再用DMF-无水乙醚重沉淀,真空干燥,即得配体DTPA-2APTMPyP 0.64 g,产

率:81%。

1.2.2 钆配合物 Gd-DTPA-2APTMPyP 的制备

将0.6 g DTPA-2APTMPyP(0.36 mmol)溶于20 mL DMF中,搅拌缓慢加入0.16 g CH₃I(1.08 mL),40℃下反应4 h,加入200 mL无水乙醚,产生红褐色沉淀。过滤,再用DMF-无水乙醚进行重沉淀,真空干燥,即得配体DTPA-2APTMPyP 0.44 g,产率74%。

将0.3 g配体DTPA-2APTMPyP(0.14 mmol)溶于8 mL甲醇中,搅拌缓慢加入0.045 g GdCl₃·6H₂O(0.14 mmol),室温下反应2 h。用甲醇-无水乙醚重沉淀,过滤,乙醚洗涤,干燥,得到深褐色固体,即金属配合物Gd-DTPA-2APTMPyP 0.255 g,产率85%。

1.3 钆配合物弛豫时间的测定

将钆配合物Gd-DTPA-2APTMPyP溶于二次蒸馏水中,配成浓度为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mmol/L的溶液;同样上述方法,配制浓度为0.15 mmol/L的Gd-DTPA溶液。调节至pH 7~8,以返转回复法在Varian Mercury-VX300 NMR(300 MHz)核磁共振仪上测定溶液中质子的自旋-晶格弛豫时间T₁,并计算弛豫率。

1.4 钆配合物体外细胞毒性实验

用培养液调节HeLa细胞浓度为60 000~80 000个/毫升,取96孔培养板加样,每孔100 μL(6 000~8 000个/孔),在37℃,体积分数5%的CO₂培养箱中培养24 h。待HeLa细胞长满孔底之后去掉培养液,加入含不同浓度的小分子钆配

合物(Gd-DTPA-2APTMPyP 或者 Gd-DTPA)的新鲜培养液,对照组则加入不含钆配合物的新鲜培养液.继续培养 48 h.用培养液洗涤一次,加入 100 μL 的培养液、四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液(5.0 mg/mL,20 μL /孔),继续培养 4 h.弃去上清液,以 3%小牛血清-磷酸缓冲盐水洗二次,倾干液体,加入 100 μL 二甲基亚砜(DMSO),摇匀,室温放置 30min.以无细胞空白孔为零点,选取 5 个平行样,测量 OD_{570} 值,计算细胞相对存活率.

2 结果与讨论

2.1 红外表征

配体和配合物的红外光谱图如图 Fig. 1,配体 DTPA-2APTMPyP 在 3 436 cm^{-1} 为 $\nu_{\text{N-H}}$ 和 ν_{OH} 的叠加,1 653 cm^{-1} 和 1 624 cm^{-1} 为酰胺键和羧酸根中的 $\nu_{\text{C=O}}$;配合物 Gd-DTPA-2APTMPyP 在 1 653 cm^{-1} 和 1 624 cm^{-1} 消失,蓝移至 1 593 cm^{-1} ,说明配体在形成配合物后羧酸根和酰胺键中的羰基与金属离子发生了配位作用.

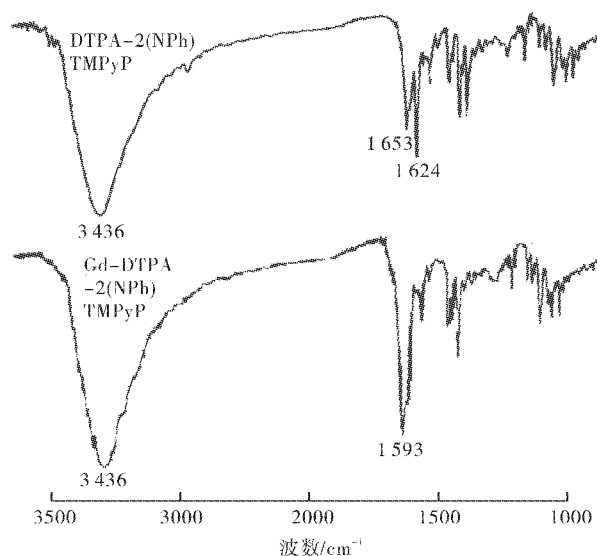


图2 DTPA-2APTMPyP 和 Gd-DTPA-2APTMPyP 的红外光谱图

Fig. 2 FT-IR spectra of DTPA-2APTMPyP and Gd-DTPA-2APTMPyP

2.2 紫外表征

配体和配合物的紫外光谱图如图 3、4. 在紫外可见光谱中,卟啉化合物特殊的化学结构,表现在 Soret 带有一个很强的吸收峰;在可见光区存在 4 个较弱的 Q 吸收带.

由图 3 可知配体 DTPA-2APTMPyP 的紫外吸收峰为 λ_{max} :427,515,558,590,654 nm;由 Fig. 4 可知配合物 Gd-DTPA-2APTMPyP 的紫外吸收峰为 λ_{max} :419,510,549,587,644 nm. 对比可得:

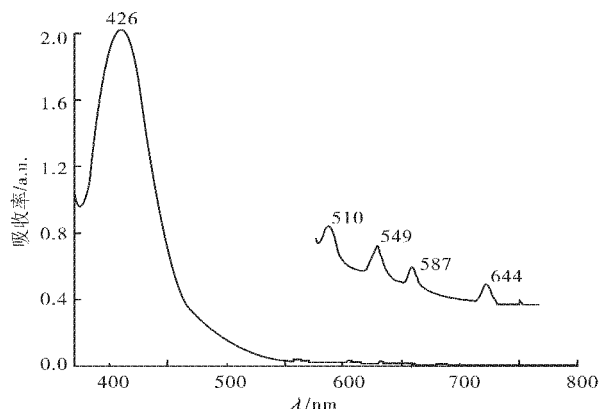


图3 DTPA-2APTMPyP 的紫外图谱

Fig. 3 UV-Vis spectrum of DTPA-2APTMPyP

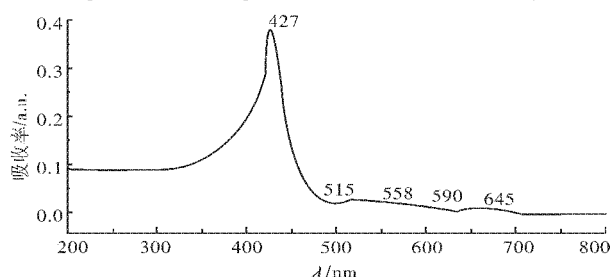


图4 Gd-DTPA-2APTMPyP 的紫外图谱

Fig. 4 UV-Vis spectrum of Gd-DTPA-2APTMPyP

配合物的 Q 带吸收峰存在一定程度的蓝移,这是由于配体与 Gd 配合,溶液的极性增强造成的.

2.3 核磁共振表征

配体 DTPA-2APTpyP 的核磁图谱(图 5)的吸收峰(化学位移)和各自归属为: ^1H NMR(d_6 -DMSO, δ , ppm): 9.49(d, 6H, meta-pyridine), 9.21(d, 2H, β -pyrrole), 9.13(d, 4H, β -pyrrole), 9.00(d, 2H, β -pyrrole), 8.48(s, 1H, amino), 8.43(m, 2H, aminophenyl), 8.15(m, 6H, ortho-phenyl), 4.71(m, 6H, NCH_3), 3.10(s, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{—COOH}$), 2.97(m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{—CO—NH}$), 2.90(t, 4H, $2 \times \text{N—CH}_2$), 2.73(s, 2H, CH_2COOH), 2.67(t, 4H, $2 \times \text{N—CH}_2$).

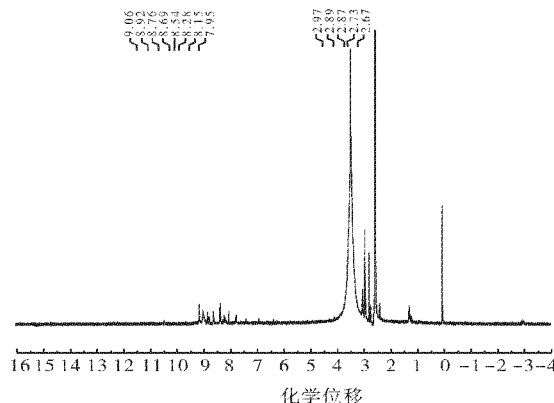


图5 DTPA-2APTpyP 的核磁图谱

Fig. 5 ^1H NMR spectrum of DTPA-2APTpyP

2.4 钆配合物对水质子弛豫性能的影响

顺磁性 MRI 造影剂通过增强水质子的弛豫效率从而提高磁共振成像的效果,本实验表现为增强其对溶剂中水质子的弛豫速率,用自旋-晶格弛豫率 R_1 表示提高磁共振成像的效果,由下式表示:

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

上式中 $(1/T_1)_{\text{obsd}}$ 和 $(1/T_1)_d$ 分别为有顺磁性物质存在时观察到水质子的纵向弛豫速率及作为空白样的纯水中质子的弛豫速率, R_1 溶液中顺磁性物质的弛豫率, $[M]$ 为溶液中顺磁性物质的摩尔浓度. 当 R_1 值越大时表明其弛豫能力越强,即对水质子的弛豫影响更大,活体的成像效果更好.

表 1 为钆配合物 Gd-DTPA-2APTMPyP 在不同浓度 (0.1~1.1 mmol/L) 的水溶液中所测得的溶剂水分子氢核纵向弛豫时间 T_1 , 以及所计算出的相对应的弛豫速率 A , 即 $1/T_1$.

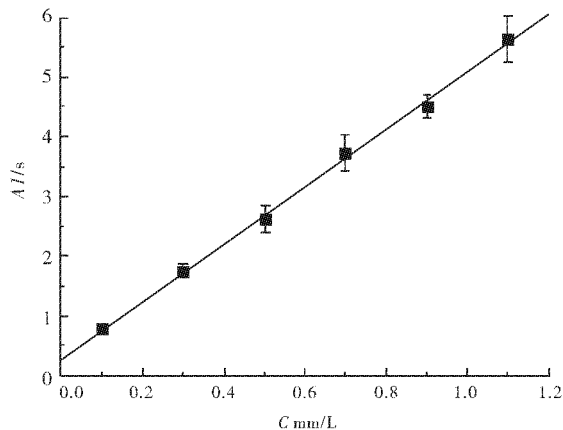


图 6 Gd-DTPA-2APTMPyP 在水溶液中的弛豫性能

Fig. 6 Relaxivity of Gd-DTPA-2APTMPyP in water solution

由 Table 1 的数据作图 (图 6), 从图中可知随着配合物浓度的变化, 溶剂中水分子中质子的弛豫速率 A 呈线性变化. 其中横坐标 X 为水溶液中配合物 Gd-DTPA-2APTMPyP 的摩尔浓度, 纵坐标 Y 为纵向弛豫时间 T_1 的倒数, 即弛豫速率.

表 1 弛豫率数据

Table 1 Experimental data of relaxivity

Gd-DTPA-2APTMPyP	$[M]/(\text{mmol/L})$	$(T_1)/(\text{obsd/s})$	$(1/T_1)/(\text{obsd/s}^{-1})$	$R_1/(\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1})$
1	1.1	0.178 ± 0.012	5.636 ± 0.389	4.809 ± 0.369
2	0.9	0.222 ± 0.007	4.509 ± 0.189	4.626 ± 0.215
3	0.7	0.269 ± 0.022	3.734 ± 0.306	4.839 ± 0.461
4	0.5	0.383 ± 0.024	2.623 ± 0.211	4.552 ± 0.443
5	0.3	0.571 ± 0.029	1.753 ± 0.091	4.689 ± 0.332
6	0.1	1.261 ± 0.081	0.794 ± 0.051	4.476 ± 0.585
Gd-DTPA	0.2	0.924 ± 0.045	1.084 ± 0.054	3.687 ± 0.281

注: T_1 在 19 °C, 300 MHz 下测得; 相同条件下纯水的 $T_{1d} = (2.89 \pm 0.017) \text{ s}$, $1/T_{1d} = (0.346 \pm 0.021) \text{ s}^{-1}$.

根据图 6 的趋势线做线性拟合, 相关系数为 0.999, 得下式

$$(1/T_1)_{\text{obsd}} = 0.296 + 4.798 [\text{Gd-DTPA-2APTMPyP}] \quad (2)$$

对照上式, 可见 Gd-DTPA-2APTMPyP 的弛豫率为 $4.798 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 该值高于 Gd-DTPA 的弛豫率 ($3.687 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$).

实验结果表明, Gd-DTPA-2APTMPyP 对水质子的弛豫速率有较好的加速作用, 弛豫率较高, 有利于获得良好的成像效果.

2.4 钆配合物的细胞毒性实验

从图 7 可知, 当培养液中钆配合物质量浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 时, 用含 Gd-DTPA 培养液培养的 HeLa 细胞的相对存活率为 89%, 而用含 Gd-

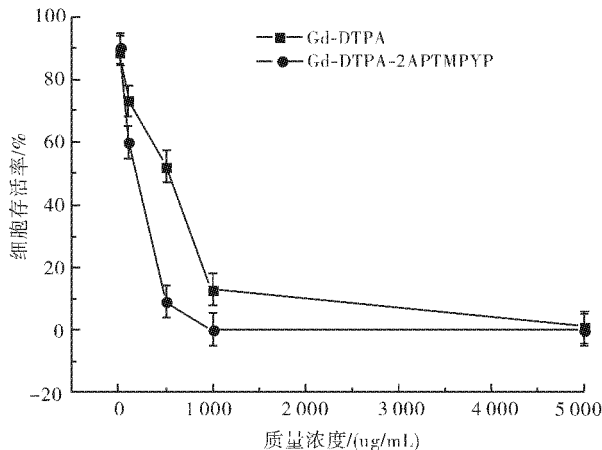


图 7 钆配合物对 HeLa 细胞的体外毒性

Fig. 7 In vitro cytotoxicity assay of the gadolinium complex to HeLa cells

DTPA-2APTMPyP 培养液培养的 HeLa 细胞的相对存活率为 89.8%;当培养液中钆配合物质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,用含 Gd-DTPA 培养液培养的 HeLa 细胞的相对存活率为 73%,而用含 Gd-DTPA-2APTMPyP 培养液培养的 HeLa 细胞的相对存活率为 60.0%。

3 结 语

用二乙酸酐五乙酸(DTPA)脱水制得二乙酸酐五乙酸双酸酐(DTPAA),再与卟啉化合物进行反应,合成小分子配体,然后与金属钆离子进行配合制得水溶性小分子造影剂.对所得的配体和配合物进行结构表征与体外性能研究.实验结果表明,与 Gd-DTPA 相比,这类小分子磁共振成像造影剂具有较高的弛豫率,对 HeLa 细胞具有相似的体外细胞毒性.将进一步研究小分子造影剂的肿瘤靶向性能与体内外磁共振成像性能。

致谢

感谢国家自然科学基金委、武汉市科技攻关计划项目组、武汉工程大学第三届研究生创新基金组的资助。

参考文献:

- [1] 陈小华,潘庆春. PTD-HBcAg 融合蛋白经树突状细胞诱导特性 CTL 抑制 HBV 的体外研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2009,25(4):289-292.
- [2] 汤俊琦,黄嘉敏. 纳米金在肿瘤诊断中的应用[J]. 材料导报,2012,26(9):59-64.
- [3] Fries P, Runge V M, Buecker A, et al. Brain tumor enhancement in magnetic resonance imaging at 3 tesla: intraindividual comparison of two high relaxivity macromolecular contrast media with a standard extracellular Gd-chelate in rat brain tumor model[J]. Invest Radiol,2009,44(4):200-206.
- [4] 黄素英,张婷. 冠脉造影剂肾病水化干预护理探讨[J]. 护士进修杂志,2011,26(8):698-700.
- [5] 王兆星. 造影剂肾病早期诊断的生物标志物[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2011,20(3):275-279.
- [6] Yan G P, Zhuo R X. Liver-targeting macromolecular MRI contrast agents[J]; Science in China; Series B, 2001,44(4):344-352.
- [7] Yan G P, Liu M L. Polyaspartamide Gadolinium Complexes Containing Sulfadiazine Groups as Potential Macromolecular MRI Contrast Agents[J]. Bioconjugate Chem,2005,16(4):967-971.
- [8] Yan G P, Ai C W, Li L, et al. Dendrimers as Carriers for Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging[J]. Chinese Science Bulletin,2010,55(27/28):3237-3243.
- [9] 侯长军,郝燕,霍丹群. 卟啉及其衍生物抗癌活性机理研究进展[J]. 生物医学工程研究,2007,26(1):97-100.
- [10] Shahbazi-Gahrouei D, Williams M, Rizvi S, et al. In Vivo Studies of Gd-DTPA-monoclonal Antibody and Gd-porphyrins: Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Melanoma[J]. J Magn Reson Imaging,2001,14:169-174.
- [11] Young S W, Sidhu M K, Qing F. Preclinical Evaluation of Gadolinium (III) Texaphyrin Complex: a New Paramagnetic Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging[J]. Invest Radiol,1994,29:330-338.
- [12] Hofmann B, Bogdanov A, Marecos E, et al. Mechanism of Gadophrin-2 Accumulation in Tumor Necrosis[J]. J Magn Reson Imaging,1999,9:336-341.
- [13] 石伟民,刘卫敏,陶京朝. 用于光动力治疗的四苯基卟啉衍生物研究进展[J]. 化学研究,2005,16(2):101-105.
- [14] Yan G P, Li Z, Xu W, et al. Porphyrin-containing Polyaspartamide Gadolinium Complexes as Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents[J]. International Journal of Pharmaceutics,2011,407:119-125.
- [15] 张丽民,陈杞. 螯合剂 DTPAA 的合成及应用[J]. 化学世界,1992,33(2):70-72.
- [16] Hnatowich D J, Layne W W. The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin[J]. Int J Appl Radiat Isot,1982,33(5):327-332.
- [17] Dong-Fang S, Richard T W, Daekyu S, et al. Laurence H. Hurley. Quadruplex-Interactive Agents as Telomerase Inhibitors: Synthesis of Porphyrins and Structure-Activity Relationship for the Inhibition of Telomerase[J]. J Med Chem,2001,44(26):4509-4523.

(下转第10页)