

BPHA 二价金属离子配合物的结构 与⁹⁹Tc^m-BPHA 生物分布的关系

刘国正 刘 飞 杨 霆 王翌善 缪增星 方吉东

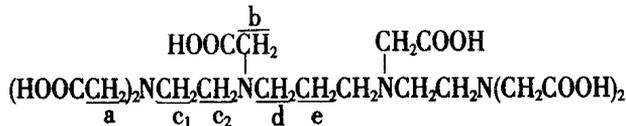
(中国原子能科学研究院同位素研究所, 北京, 102413)

测定了N,N-二胺乙基丙二胺六乙酸(BPHA)的加质子常数和它的二价金属离子配合物的加质子常数,不同pD值下BPHA和Zn²⁺-BPHA的¹H NMR谱,pH=6时,BPHA二价金属离子配合物有一质子离去,并伴有重大的结构变化。pH=7时,⁹⁹Tc^m-BPHA标记物的生物分布与pH=4时⁹⁹Tc^m-BPHA标记物的生物分布不同。pH=7时,⁹⁹Tc^m-BPHA具有优良的肾排泄性质。

关键词 胺羧配位剂 配合物 加质子常数 ¹H NMR谱 锌 生物分布

中图法分类号 O 614.712

二胺乙基丙二胺六乙酸(BPHA: N,N-Bis(2-aminoethyl)-1,3-propanediamine hexaacetic acid)^[1]是新合成的化合物,其结构为:



⁹⁹Tc^m-BPHA 标记物的初步生物分布实验表明,它有快速的肾排泄性质^[1]。由于配位后有较多的剩余羧基,可能在炎症及肿瘤显像方面也有一定意义^[2]。pH=4时,⁹⁹Tc^m-BPHA 的标记反应最易进行,因此文献^[1]的生物分布数据是在pH=4时获得的。虽然肾摄取很高,排泄很快,但肝摄取也很高,不满足肾显像剂的条件。脂溶性化合物通过肝脏排泄,水溶性化合物通过肾脏排泄。水溶性很强的BPHA 配合物却有较高的肝、肺摄取。直接研究⁹⁹Tc^m-BPHA 的结构和性质有一定困难,迄今肾功能显像剂⁹⁹Tc^m-DTPA 的结构还不清楚^[3]。在⁹⁹Tc^m-BPHA 的标记溶液中存在2个重要的宏量组分Sn²⁺和BPHA 配体,亚锡不稳定,配合物Sn²⁺-BPHA 的研究也较难,因此,应首先研究类亚锡离子Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺的BPHA 配合物的性质。

1 实验

BPHA · 4HCl 是2年前自行合成的,酸碱滴定和元素分析表明:BPHA · 4HCl 放置过程

刘国正:男,39岁,放射化学专业,博士后,副研究员

收稿日期:1998-11-28 收到修改稿日期:1999-03-12

中缓慢吸湿并释放 HCl, 现用样品组成变为 $\text{BPBA} \cdot 3.60\text{HCl} \cdot 3.58\text{H}_2\text{O}$ 。所用其他试剂皆为分析纯。 $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器和 DTPA 药盒由中国原子能科学研究院生产。放射性测量采用 γ 井型探头。

1.1 BPBA 和 M^{2+} -BPBA 的加质子常数测定

BPBA 的滴定曲线测定在 (25.0 ± 0.1) 的充氮气恒温杯中进行, pH 用 pH-100 型数字酸度计指示, 所用电极 E201 复合电极。配体浓度控制在 1.00 mmol/L 左右, 滴定用的 NaOH 浓度约为 0.100 mol/L , 支持电解质为 $0.10 \text{ mol/L NaClO}_4$ 。配合物稳定常数测定同样按上述方法进行, 滴定前按摩尔比 1 : 1 稍欠量投入相应金属盐 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 待体系 pH 稳定后再行滴定。

于 (25.0 ± 0.1) 下测定不同浓度 HClO_4 和 NaOH 在 $0.10 \text{ mol/L NaClO}_4$ 介质中的 pH 值, 确定 H^+ 和 OH^- 的活度系数。

1.2 Zn^{2+} -BPBA 的 $^1\text{H NMR}$ 谱测定

$^1\text{H NMR}$ 谱用 Varian 200 核磁共振谱仪测定。981 mg $\text{BPBA} \cdot 3.60\text{HCl} \cdot 3.58\text{H}_2\text{O}$ 溶于 15 mL 重水 (D_2O , > 99.6%) 中, 然后用固体 NaOH 粉末和浓溶液调 pH 值, 在所需 pH 值下取出 0.8~1.0 mL 溶液放入样品管, 每个样品中加入 1 滴 0.1 mol/L DSS (2, 2-二甲基-2-硅代戊烷-5-磺酸)。25.0 下测量化学位移 δ 随 pH 值的变化关系。在 15 mL 上述初始溶液中, 加等摩尔 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 按相同的方法调 pH 值, 在相同条件下测核磁共振谱。

1.3 pH=7 时 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -BPBA 的生物分布

5 mL pH=7.0 的 $\text{BPBA} \cdot 3.60\text{HCl} \cdot 3.58\text{H}_2\text{O}$ (10 mg) 和 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (500 μg) 的溶液, 无菌膜过滤后, 加 37 MBq $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 洗脱液, 5 min 后采用 Whatman No. 1 层析纸, 用丙酮和生理盐水分别展开, 测定标记率。丙酮展开时 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 的 R_f 值为 0.9~1.0, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -BPBA 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 胶体的 R_f 值为 0.0~0.3; 生理盐水展开时 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 胶体的 R_f 值为 0.0~0.3, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -BPBA 和 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4^-$ 的 R_f 值为 0.9~1.0。测得标记率为 95.7%。

每只昆明小鼠注射 0.10 mL 上述溶液, 20 只分为 5 组, 分别在 2、5、10、30、60 min 时断头处死, 取出各脏器(肠道指大肠, 小肠和所包含的食物及粪便), 称重, 测量放射性活度。

2 结果与讨论

2.1 BPBA 和 M^{2+} -BPBA 的加质子常数

BPBA 和配合物各自的滴定曲线示于图 1。每摩尔 $\text{BPBA} \cdot 4\text{HCl}$ (用 H_1L 表示这个十元酸) 加入碱的摩尔数用 a 表示。由于

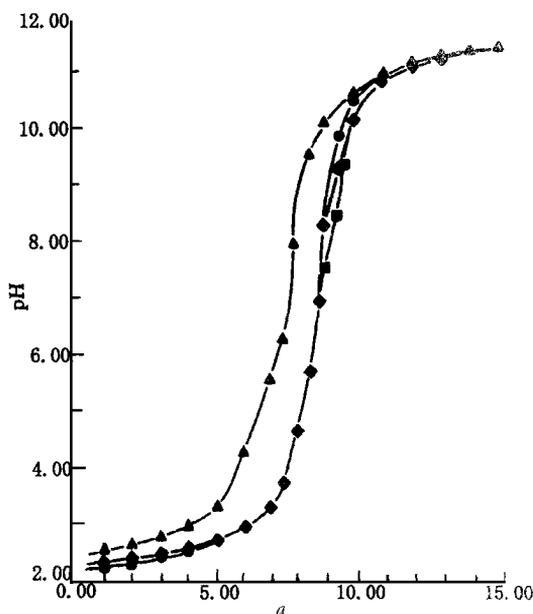


图 1 BPBA 和 M^{2+} -BPBA 的滴定曲线

Fig 1 Titration curves of BPBA and M^{2+} -BPBA
 —BPBA 配体; — $n(\text{Zn}^{2+})$ $n(\text{BPBA})=0.964$ 1;
 — $n(\text{Cu}^{2+})$ $n(\text{BPBA})=0.958$ 1;
 — $n(\text{Co}^{2+})$ $n(\text{BPBA})=0.924$ 1;
 — $n(\text{Ni}^{2+})$ $n(\text{BPBA})=0.961$ 1

每个分子已释放 0.4 个 HCl, 相当于未滴定前 $a = 0.4$, 滴定过程中 $a = 0.4 + c(\text{NaOH}) \cdot V(\text{NaOH})/n(\text{BPHA})$ 。依据加质子平衡:

$$\begin{aligned} \text{HL}^{(6-n)-} + \text{H}^+ &= \text{H}_{n+1}\text{L}^{(6-n-1)-} \\ k_n &= c(\text{H}_{n+1}\text{L}^{(6-n-1)-}) / [c(\text{HL}^{(6-n)-}) \cdot c(\text{H}^+)] \\ n &= 0, 1, 2, \dots \end{aligned}$$

式中 L 表示全解离 BPHA 配体。用非线性最小二乘法计算得到 BPHA 的前六级加质子常数的对数分别为: $\lg k_1 = 11.06$, $\lg k_2 = 9.76$, $\lg k_3 = 6.45$, $\lg k_4 = 4.82$, $\lg k_5 = 3.30$, $\lg k_6 = 2.22$ 。

在获得 BPHA 逐级加质子常数的基础上, 可用非线性最小二乘法进一步计算得到 M^{2+} -BPHA 配合物的稳定常数, 只要初值足够大, 皆可得到收敛的结果, 即得到与实验吻合的计算曲线。然而配合物加质子常数保持不变, 这是因为足够稳定的配合物相当于一种确定的多元酸, 而滴定曲线主要受酸解离性质的影响。配合物的各累积稳定常数与加质子常数有如下关系:

$$\begin{aligned} \text{M}^{2+} + n\text{H}^+ + \text{L}^{6-} &= \text{MHL}^{(4-n)-}, \\ \beta_n &= c(\text{MHL}^{(4-n)-}) / [c(\text{M}^{2+})c^n(\text{H}^+)c(\text{L}^{6-})], n = 0, 1, 2; \\ \text{ML}^{4-} + \text{H}^+ &= \text{MHL}^{3-}, \quad k_1 = \beta_1/\beta_0; \\ \text{MHL}^{3-} + \text{H}^+ &= \text{MHL}^{2-}, \quad k_2 = \beta_2/\beta_1 \end{aligned}$$

计算得到的加质子常数列于表 1。

表 1 ML^{4-} 的加质子常数¹⁾

Table 1 Protonation constants of ML^{4-}

$\lg k_1$				$\lg k_2$			
ZnL ⁴⁻	CuL ⁴⁻	NiL ⁴⁻	CoL ⁴⁻	ZnL ⁴⁻	CuL ⁴⁻	NiL ⁴⁻	CoL ⁴⁻
9.05	8.83	9.09	9.04	5.78	5.91	5.48	5.97

注: 1) L 表示全解离的 BPHA

以 Zn^{2+} -BPHA 为例, 体系在 pH = 9.05 和 5.78 时发生了如下变化:



2.2 BPHA 和 Zn^{2+} -BPHA 的 ¹H NMR 谱

在确定了不同 pH 下配合物的质子化状态后, 可用 ¹H NMR 谱研究配合物的溶液结构。Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺ 皆含开壳层电子, Zn²⁺ 不含开壳层电子, 是抗磁的, 因而可用 ¹H NMR 谱研究配合物的结构。

BPHA 的 ¹H NMR 谱示于图 2。

Zn^{2+} -BPHA 的 2 个典型图谱示于图 3。 Zn^{2+} -BPHA 的 ¹H NMR 谱存在复杂的裂分, 谱峰相互重叠, 谱图随 pD 变化很大。 pD = 2 附近的谱图由一系列包峰组成, 显示不同状态间的缓慢转化。 pD 大于 3.22 后, 皆显示较尖锐的谱峰。 pD 在 5~6 之间, 与 $\lg k_2 = 5.78$ 相对应, 谱形发生了很大变化, 尖锐单峰 I 消失; 在 pD = 9 左右峰形变化也很大, 对应 $\lg k_1 = 9.05$, 出现了另一尖锐单峰。 此时, 配合物 Zn^{2+} -BPHA 分别失去了 1 个质子。 因此, pD > 9 对应 ZnBPHA^{4-} , pD = 6~9 对应 ZnHBPHA^{3-} , pD = 3~5 对应 $\text{ZnH}_2\text{BPHA}^{2-}$ 。

pD = 3~5 峰形变化很小, 尖锐单峰 I 对应 4 个质子, 由于化学位移值最大, 可断定对应羧甲基质子。 pH = 5 时, $\delta_1 = 3.85$, 与胺基质子化的胺三乙酸亚甲基质子的化学位移(3.83)^[4]和

H[Co(H₂DTPA)NO₂]中自由胺二乙酸片段亚甲基质子的化学位移(3.83)^[5]相当,证明存在1个自由的、质子化的胺二乙酸残基—NH⁺(CH₂COO⁻)₂。自由配体在pH=5时也有这样的峰(3.83),在δ=3.70处没有自由配体对应的单峰,说明胺二乙酸残基确实存在于配合物分子中。pD=6,配合物失去1个质子,残基—NH⁺(CH₂COO⁻)₂对应的单峰消失了,说明该胺基已经配位,否则,该单峰只会移向高场。

随着pH升高,溶液中Zn²⁺-BPHA的结构由图4(a)变为图4(b)。

2.3 pH=7时⁹⁹Tc-BPHA的生物分布

Sn(II)-BPHA的结构很可能类似于Zn(II)-BPHA的结构,在pH=4时,应与HDA类配体相似,因而,可能是肝摄取较高的原因之一。虽然,脂溶性能增加肝的摄取,但HDA类配体得配合物在肝中浓集,并不是因为配合物的脂溶性,而是由于胺二乙酸残基与Tc形成的配合物对肝具有特殊的亲合作

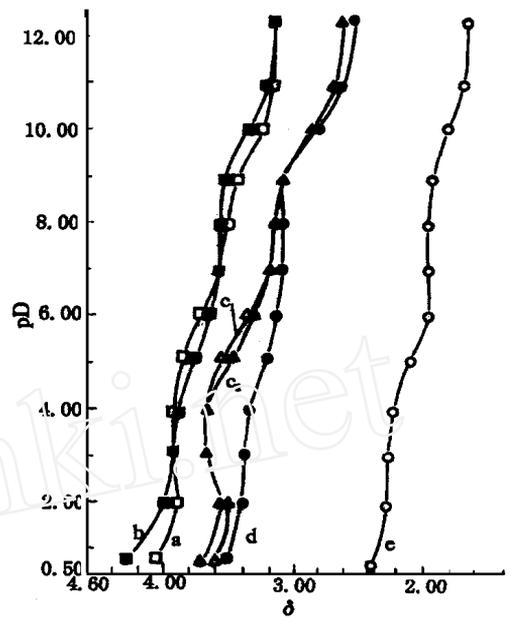


图2 BPHA 化学位移 δ 随 pD 值的变化关系
Fig 2 The chemical shifts of BPHA vs pD values
a, b, c₁, c₂, d, e 表示 BPHA 的不同质子

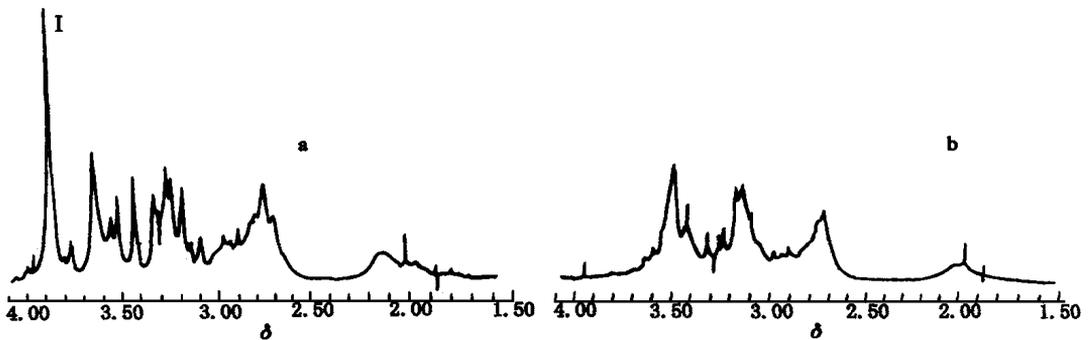
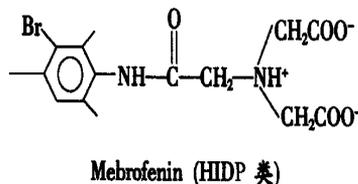
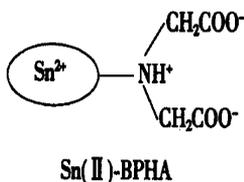


图3 Zn²⁺-BPHA 的2个¹H NMR 谱图
Fig 3 Two ¹H NMR spectra of Zn²⁺-BPHA
a—pD= 5.05; b—pD= 7.97

用^[3,6]。Sn(II)-BPHA 和HDP的结构如下:



pH = 4 时的肝摄取^[1](图 5)可能与 2 个因素有关: 一是亚锡配合物进一步与镅形成的配合物在肝中的摄取; 二是单独 BPHA 的镅配合物本身在肝中的摄取。pH = 7 时, 由于亚锡配合物没有孤立的胺乙酸残基, 不再与镅进一步形成配合物, 应能降低肝、肺摄取。实验证明了这一预测, 且 pH = 7 时形成的镅配合物在肝、肺中的摄取很低(图 6)。

由图 6 可见: pH = 7 时, ⁹⁹Tc^m-BPHA 的肝摄取变得很低。在 2、5、10、30、60 min 时, 肠道放射性摄取分别为 5.44 %、4.22 %、2.68 %、1.73 %、0.80 %。小鼠在此期间几乎未排便, 1、2 粒粪便的放射性活度很低, 因此, 肝、胆排泄很少 (< 1 %)。

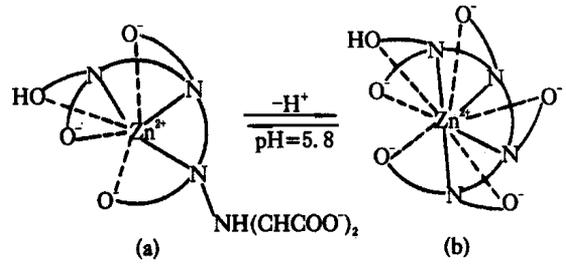


图 4 pD 值升高过程中的 Zn²⁺-BPHA 结构变化

Fig 4 The structural change of Zn²⁺-BPHA with the increasing pH
虚线——可能的结合; 实线——确定的连接

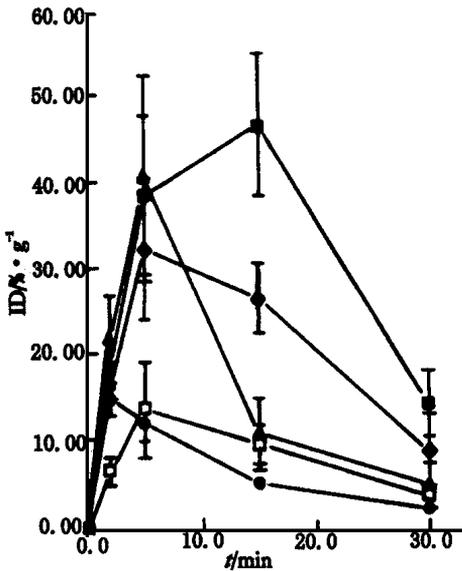


图 5 pH = 4 时⁹⁹Tc^m-BPHA 的生物分布

Fig 5 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m-BPHA formed at pH = 4
——肾; ——肝; ——肺; ——脾;
——血

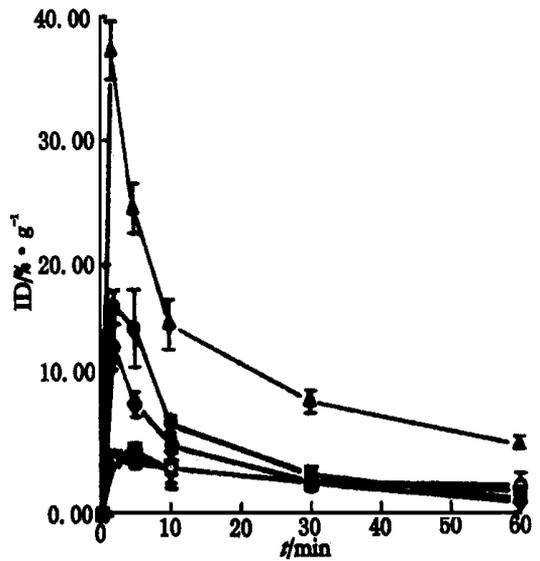


图 6 pH = 7 时⁹⁹Tc^m-BPHA 的生物分布

Fig 6 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m-BPHA formed at pH = 7
——肾; ——血; ——肺; ——肝;
——脾

3 结论

pH 的变化导致二价金属离子 BPHA 配合物的结构发生变化, 带胺乙酸残基的 Sn²⁺ 配合物可能进一步充当⁹⁹Tc^m 的配体, 由此可以解释 pH = 4 时肝有较高摄取, 并指导获得了 pH = 7 时肝的低摄取。这一预测虽被实验证实, 但确定肝摄取的原因尚需进一步进行实验研究确定。pH = 7 时的标记物几乎 100 % 地经肾排泄, 排泄速度快, 满足肾功能显像剂最基本的条件。

与 $^{99}\text{Tc}^m$ -DTPA 类似, ^{99}Tc -BPHA 很可能也是一种肾小球滤过型药物。 $^{99}\text{Tc}^m$ -BPHA 是否经肾小管分泌, 以及蛋白结合率是否低于 $^{99}\text{Tc}^m$ -DTPA 的蛋白结合率有待进一步实验研究确定。 其临床价值亦有待通过大动物显像进一步确证。

感谢北京大学技术物理系王云祥教授在酸常数测定中给予的支持。

参 考 文 献

- 1 Liu GZ, Liu BL. Synthesis of a New Polyaminopolycarboxylic Acid (BPHA) and Its Labeling With ^{99}Tc J Labelled Compd Radiopharm, 1998, 41(2): 97
- 2 赵春雷, 李亚明, 栗维国, 等. $^{99}\text{Tc}^m$ -DTPA 在细菌性脓肿中的浓聚和显像. 同位素, 1997, 10(1): 51
- 3 Jurisson S, Bering D, Wei J, et al Coordination Compounds in Nuclear Medicine Chem Rev, 1992, 93: 1137
- 4 Sandoval AA, Sandoval MW, Lin E, et al Hydrogen Bonding in Some Polyaminocarboxylic Acids J Mag Reson, 1970, 3: 258
- 5 Smith BB, Betts RH. Structure and Stereochemistry of a Cobalt (III)-diethylenetriaminepentaacetic Acid Complex J Am Chem Soc, 1969, 91(27): 7749
- 6 Peters AM, Myers MJ, Mohammadtghi S, et al Bidirectional Transport of Inodiacetic Organic Anion Analogues Between Plasma and Hepatocyte Eur J Nucl Med, 1998, 25(7): 766

STRUCTURES OF M^{2+} -BPHA COMPLEXES AND THE IR RELATIONSHIP TO THE BIODISTRIBUTION OF $^{99}\text{Tc}^m$ -BPHA

Liu Guozheng Liu Fei Yang Ting Wang Yishan Miao Zengxing Fang Jidong

(China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275-103, Beijing, 102413)

ABSTRACT

The protonation constants of BPHA and its complexes of divalent metal ions Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} are determined by potentiometric titration and non-linear regression. The ^1H NMR spectra of Zn^{2+} -BPHA at $\text{pD} = 2 \sim 12$ is obtained on Varian-200. It proves that at $\text{pH} = 6$ the complex $\text{Zn}(\text{II})\text{H}_2\text{BPHA}^{2-}$ loses a proton and a formerly free inodiacetic acid moiety becomes coordinated; at $\text{pH} = 9$ the last proton is dissociated and an inodiacetic acid moiety is released again. The $^{99}\text{Tc}^m$ labelled product obtained at $\text{pH} = 7$ is completely excreted through kidneys, different from the product forming at $\text{pH} = 4$, which is taken up by liver considerably.

Key words Aminocarboxylic acid Coordination compound Protonation constant Proton NMR spectrum Zinc Biodistribution