



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96197752.3

[43]公开日 1998年11月25日

[11] 公开号 CN 1200179A

[22]申请日 96.9.6

[30]优先权

[32]95.9.8 [33]GB[31]9518442.0

[32]95.10.20[33]US[31]08 / 546,146

[32]96.6.20 [33]GB[31]9612931.7

[86]国际申请 PCT / GB96 / 02198 96.9.6

[87]国际公布 WO97 / 09633 英 97.3.13

[85]进入国家阶段日期 98.4.20

[71]申请人 耐克麦德英梅金公司

地址 挪威奥斯陆

[72]发明人 简·H·阿登科贾尔-拉森

伊布·莱恩巴赫

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 黄益芬

权利要求书 4 页 说明书 48 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 一种测定样品中氧气浓度的方法

[57]摘要

一种用电子自旋共振增强的磁共振成像测定样品中氧浓度的方法。

权 利 要 求 书

1. 一种测定样品中氧浓度的方法,该方法包括下列步骤:把一种有效量的、生理上可接受的、esr过渡态的线幅小于400mG的自由基引入所说的样品中;用选定振幅和频率的射线辐照所说的样品以激发所说的自由基的电子自旋共振过渡态;至少在第一个、第二个和第三个条件下检测所说样品的电子自旋共振增强的磁共振信号,从而在所说的第一个和第二个条件下,所说的射线具有第一个频率,在所说的第三个条件下,所说的射线具有与第一个频率不同的第二个频率,在所说的第一个、第二个和第三个条件下,所说的射线具有第一个、第二个和第三个振幅,所说的第一个振幅和第二个振幅至少是彼此不相同的;和处理所检测到的信号,从而测出样品中的氧浓度。

2. 权利要求1中所说的方法,其中处理所检测到的信号的步骤包括产生一组图象数据。

3. 权利要求1或2中的任意一项所说的方法,包括:

(a) 在VHF功率 P_A 、辐照时间 T_{VHF1} 和共振($\Delta H=0$)条件下,产生所说样品的第一个OMRI图象,

(b) 在VHF功率 P_B 、辐照时间 T_{VHF1} 和共振($\Delta H=0$)条件下,产生所说样品的第二个OMRI图象,

(c) 在VHF功率 P_C 、辐照时间 T_{VHF1} 和非共振($\Delta H \neq 0$)条件下,产生所说样品的第三个OMRI图象,

(d) 用体外测定的参数处理在步骤(a)-(c)中得到的图象并进行校正,得到所说样品的氧图象。

4. 权利要求3中所说的方法,其中另外在VHF功率 P_A 和辐照时间 T_{VHF2} 时产生第四个图象,在没有VHF辐照时产生第五个MR图象。

5. 前述的任意一项权利要求的方法,还包括一个产生样品的原始MR图象的步骤。

6. 权利要求1中所说的方法,其中处理所说的检测信号的步骤包括把所测的esr过渡态的饱和度拟合到一个沃伊特函数。

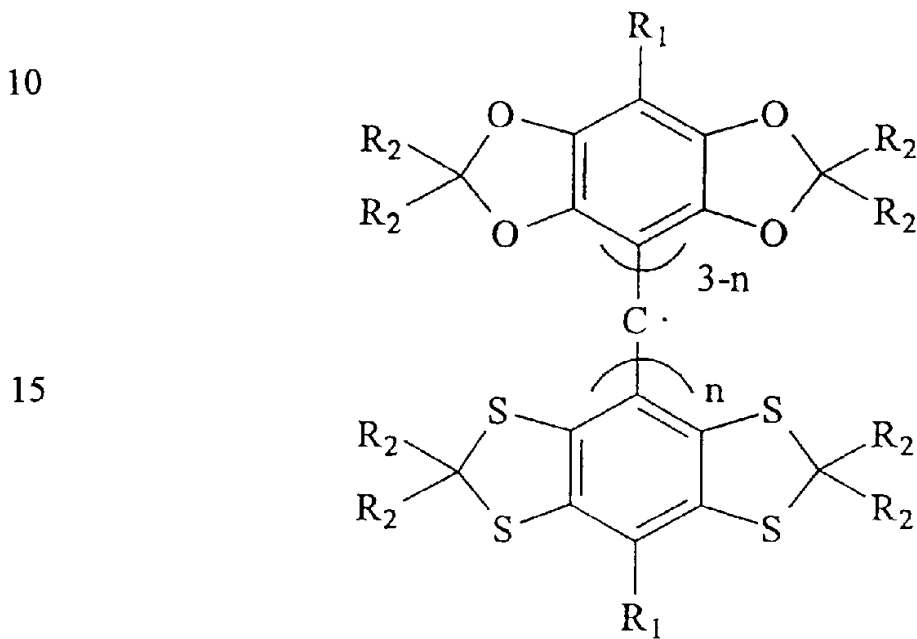
7. 前述的任意一项权利要求的方法,其中所说的生理上可接受的自由基是一种能扩散进入细胞外液的自由基。

8. 前述的任意一项权利要求的方法,其中所说的生理上可接受的自由基,其 esr 过渡态的线幅小于 150mG。

9. 权利要求 8 中所说的方法,其中所说的自由基的 esr 过渡态的线幅小于 60mG。

5 10. 前述的任意一项权利要求的方法,其中所说的生理上可接受的自由基是三苯基甲基自由基。

11. 权利要求 10 中所说的方法,其中所说的三苯基甲基自由基是下式的自由基及其盐、前体和氘代的类似物:



20 其中:

n 为 0,1,2 或 3;

R_1 为羧基或其衍生物;

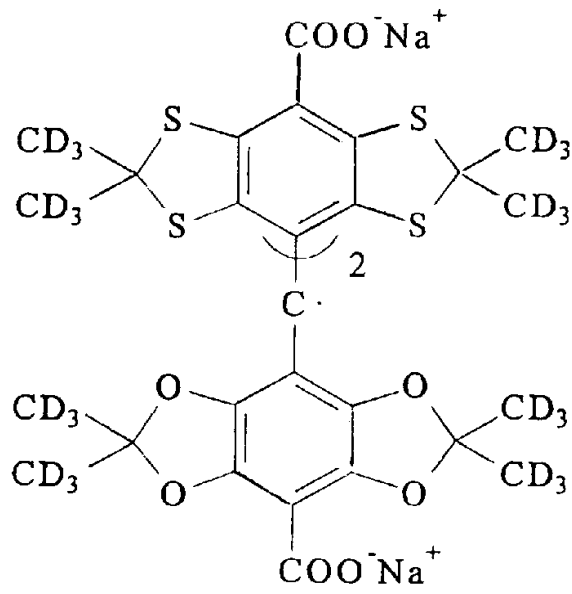
R_2 为氢或者是可以被羟基化或烷氧基化的 C_{1-6} 烷基,其中的烷氧基本身可以被羟基化。

25 12. 权利要求 10 中所说的方法,其中所说的三苯基甲基自由基是下式的自由基:

30

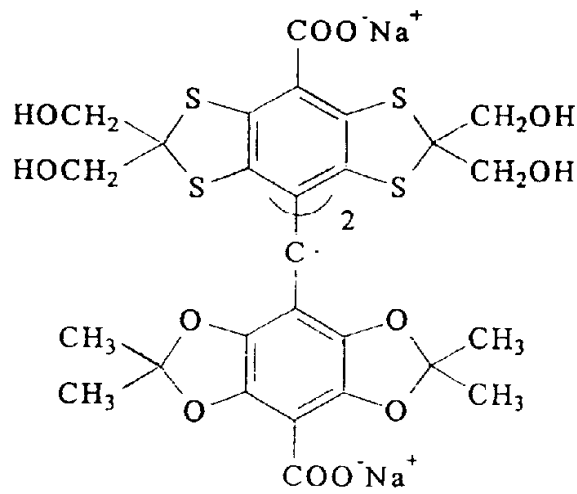
1950

5



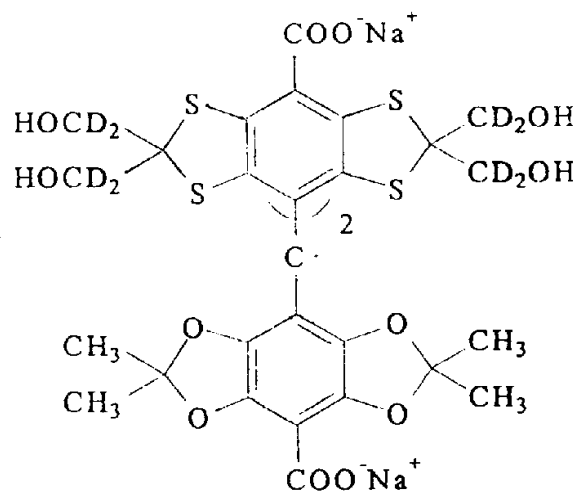
10

15



20

25



30

说明书

一种测定样品中氧气 浓度的方法

5

本发明涉及一种测定样品(例如人体或动物体)中氧浓度的方法,更具体地说涉及用样品的电子自旋共振增强的磁共振成像(OMRI)来测定其中的氧浓度,特别涉及利用 OMRI 来产生显示样品中溶解的氧浓度的图像。

10 氧在生物体系的代谢过程中起着关键性的作用,许多种生理条件都与身体中不正常的氧浓度有关。为了更好地理解这种代谢作用并帮助临床诊断,显然需要改进测定肌体组织中氧水平的方法。

常规的测定氧浓度的方法不能令人满意。其中一种技术涉及把一个克拉克(Clark)电极直接插入血管中来测定局部的氧浓度,很显然由于这种技术的侵入性及只能局部使用而具有局限性。

15 非侵入性的测定技术的发展一直很缓慢,而且一般不适于研究处于样品表面下深处的组织。

发展最完善、最准确的体外用测定方法是“自旋标记测氧法”。在这种方法中,监测因氧的存在而引起的自由基电子自旋共振(esr)线宽的变化。这种技术一般使用固相固定化的顺磁性物质作为自旋标记物,因而不适合体内测量。

20 电子自旋共振增强的 MRI(在这里指 OMRI(核极化效应 MRI),但在早期的出版物中也指 ESREMRI 或 PEDRI)是一种完善形式的 MRI,其中产生图像的磁共振信号的增强是通过动态核极化(核极化效应)而达到的,这种极化发生在本研究主题的顺磁性材料中的 esr 过渡态(一般是一个稳定的自由基)对 VHF 的激励时。磁共振信号可能增强到几百倍以上,这样就保证 OMRI 图像可迅速产生,而且只需要较低的主磁场强度。

30 已经有几位作者描述过 OMRI 技术,主要的有 Leunbach, Lurie, Ettinger, Grucker, Ehnholm 和 Sepponen, 例如在 EP - A - 296833, EP - A - 361551, WO - A - 90/13047, 磁共振杂志(J.Mag.Reson.)76: 366 - 370(1988), EP - A - 302742, SMRM 9: 619(1990), SMRM 6:

24(1987), SMRM 7: 1094(1988), SMRM 8: 329(1989), US - A - 4719425, SMRM 8: 816(1989), 磁共振医学(Mag.Reson.Med.)14: 140 - 147(1990), SMRM 9: 617(1990), SMRM 9: 612(1990), SMRM 9: 121(1990), GB - A - 2227095, DE - A - 4042212 和 GB - A - 2220269 中作了描述。

- 5 在基本的 OMRI 技术中, 成像程序包括先用选定频率的射线(通常为 VHF 射线)辐照置于均匀磁场(主磁场 B_0)中的受试体, 在一种顺磁性增强剂中激发一种窄线幅的 esr 过渡态, 这种增强剂在受试体中或已投药给受试体。动态核极化导致了成像核(即那些引起磁共振信号的核, 一般为质子)的核自旋激发态和基态数量之间的差增大。由于 MR 信号强度与这种数量差成正比, 10 每种成像程序的后续步骤(基本上按常规 MRI 技术进行)都导致检测到了更大幅度的 MR 信号。

- 在室温下进行的任何 OMRI 试验中, 顺磁性的氧对所在的自旋体系都有一定的影响。一般来讲, 与自由基的电子自旋体和核自旋体系之间的一级相互作用相比, 这种二级效应可以不考虑。尽管如此, 还是有人提出可以利用 15 这种效应来测定样品中的氧浓度。而这样的研究特别集中在利用氮氧化物自旋标记物上。这样的自由基其本身的缺点是具有宽的 esr 共振线幅, 因而对氧效应的灵敏度低。因此, 到目前为止, 对氧效应的认识仅仅处于定性的水平, 任何关于定量地认识氧效应重要性的尝试都失败了。

- 例如, Grucker 等人(MRM,34:219-225(1995))报道了一种通过测定氮氧 20 自由基的核极化效应并且把氧气对核极化效应因子的非线性效应与它的浓度相关联而计算氧气浓度的方法, 这需要拍两张照片, 一张是在共振条件下而另一张是在非共振条件下拍摄的, 然后用一级近似来推出氧气浓度。但是, Grucker 发现, 真空的氧浓度与计算出来的氧浓度之间的相关性很差, 因此这种方法本身就不准确。这归因于计算中涉及的大量参数。

- 25 Ehnholm(US - A - 5289125)提出了一种 OMRI 技术, 其中至少在两套不同的操作参数下检测一种顺磁材料的信号, 从而产生各种物理、化学或生物参数条件下的图象。虽然氧压是这样几个参数中的一个, 但是 Ehnholm 并没有证明使用这样的技术能定量测定溶解的氧。

- 30 本发明涉及一种非侵入性的测定样品中氧气浓度的方法, 这涉及对核极化效应的控制, 其中当一种给药的长寿命自由基的电子自旋共振过渡态饱和时, 极化被动态地转移到质子上。更具体地说, 本方法基于对在氧存在下由

于一种自由基的饱和特征的变化而引起的各种质子信号增强的观察和控制。

因此，从一个方面来看，本发明提供了一种测定样品(例如人体或非人体，优选哺乳动物，受试体)中氧气浓度的方法，所说的方法包括下列步骤：
5 向所说的样品中导入一种有效量的生理上可接受的自由基(一般为长效的自由基)，该自由基的 esr 过渡态的线幅(于 37 °C 下水中测量)小于 400mG，优选小于 150mG；用选定振幅(即功率)和频率的射线(一般这里指 VHF 射线)辐照所说的样品来激发所说的自由基的电子自旋共振过渡态；在至少第一、第二和第三个条件下检测所说样品的电子自旋共振增强的磁共振信号，从而在所说的第一和第二个条件下，所说的射线具有第一个频率，在所说的第三个条件下，所说的射线具有不同于第一个频率的第二个频率，在所说的第一、
10 第二和第三个条件下，所说的射线具有第一、第二和第三个振幅，所说的第一和第二个振幅至少应是彼此不相同的；处理所说的检测到的信号进而测出所说样品中的氧浓度。

在一个优选的实施方案中，本发明的方法包括：

15 (a)以胃肠外进药方式(例如通过向身体组织或脉管系统注射)引入自由基；

(b)在 VHF 功率 P_A ，辐射时间 T_{VHF1} 和共振($\Delta H = 0$)(即把其中射线的频率选定为 esr 过渡态的共振频率)条件下产生所说样品的第一个 OMRI 图像；

20 (c)在第二个 VHF 功率 P_B ，辐照时间 T_{VHF1} 和共振($\Delta H = 0$)条件下产生所说样品的第二个 OMRI 图像；

(d)在 VHF 功率 P_C (例如等于 P_A 或 P_B)，辐照时间 T_{VHF1} 和非共振($\Delta H \neq 0$ ，例如 100 - 200mG)下，产生所说样品的第三个 OMRI 图像；

25 (e)处理步骤(b) - (d)中所得到的图像，并用体外测定的参数来校正，得到所说样品的氧图像。

在一个特别优选的实施方案中，在该成像程序中还产生第四个和第五个 OMRI 图像，第四个图像的成像条件除 VHF 辐照时间 T_{VHF2} 不同(例如两倍长的时间，即 $T_{VHF2} = 2T_{VHF1}$)外，其它条件与第一个图像的相同，而第五个图像是在没有 VHF 辐照的条件下得到的，例如通过重复时间为 $T_R = T_{VHF}$ 的常
30 规 MRI 技术产生强度为 I_0 的自然图像。

在另一个实施方案中，可以产生样品(例如人体)的自然图像(即用常规的

MRI 技术得到的图像), 从而提供附加了氧图像的结构(例如解剖)信息。以这种方法有可能精确地确定例如缺氧的肿瘤的位置。

5 精确地测量身体组织中氧的水平对临床医生是一个无价的帮助, 因而本发明的方法有多种最终用途。例如可以利用血液中溶解氧浓度的知识(从已知的速率常数)来计算与红血球有关的氧的浓度。这个有用的参数目前是用不太受欢迎侵入性技术或是 BOLD MR 成像技术进行测定的, 该成像技术涉及用高场成像来测定氧对顺磁性铁的影响, 但是这种技术的缺点是; 要测定血液氧的浓度需要知道受测的血液的体积。

10 本发明方法的其它用途对于技术人员来说将是显而易见的, 这包括例如心脏、动脉和恶性肿瘤的氧成像(例如映像), 例如在大脑、乳腺、肺、淋巴组织和肝脏的表面区域中恶性肿瘤的氧成像。对于肿瘤的氧成像来说, 通过放射疗法成功地治疗恶性肿瘤可以从组织中氧的水平反映出来(典型地, 小于 0.01mM 的氧浓度表明该组织已坏死, 因而这种治疗可能是无效的)。

15 本发明的方法也显然可用于心脏病学、外科和强度护理中估测氧, 几乎是任何组织中的氧水平, 甚至在灌注法中都可通过非侵入性的方法估测。

20 处理用本发明方法检测到的 MR 信号一般都要产生一组表明自由基浓度的图像数据(即可以从中产生一个图像的一组数据)和一组或多组表明自由基电子驰豫时间(一般是 T_{1e} , T_{2e} 或 $T_{1e} \cdot T_{2e}$)的图像数据以及对这些数据组的处理和用体外校正数据校正而得到一组表明氧浓度的图像数据。这种氧浓度图像数据组可以转换为氧浓度图像或者经上下限滤光片过滤以鉴别出是高氧浓度区或是低氧浓度区, 如果需要的话, 可以再显示图像。

25 广义地说, 增强质子 MR 信号的核极化效应依赖于本发明的方法中使用的自由基的 esr 过渡态驰豫时间 T_{1e} 和 T_{2e} 。这些驰豫时间本身依赖于体液中自由基和溶解的氧浓度以及体液的温度和化学性质。然而, 虽然核极化增强可以很容易地被用于测定体外氧浓度(对于体外已知自由基浓度的小体积分离出来的样品的氧浓度), 但是测定体内氧浓度却是复杂的, 这是因为对于一个大的不是分离的样品(例如活体)来说, 核极化增强还强烈地依赖于样品结构, 尤其是当射线穿透到大体积样品时呈现非均一性。

30 因此, 虽然本发明方法要求校正数据, 但是在预设的温度下测得的对应于体液(该体液中的氧需要测定)的流体样品(例如血液)中的一系列自由基和氧浓度数据, 还需要作进一步处理, 以便从检测到的样品的 OMRI 信号中求

出体内氧浓度。

校正数据是通过在选定的温度和氧(优选也是自由基)浓度范围内,测定在选定体液中自由基的核极化效应增强值而产生的。在同样的条件下,用带有温度控制器的常规的 esr 光谱仪、用 Ravin 等的方法(J.Appl.Physiol.18: 784 - 790(1964), 一种已知的能产生准确的和重复性结果的方法)测定氧浓度的情况下,可以测得自由基的固有的 esr 驰豫时间。

总之,应当对于自由基浓度达到 0.2mM, 优选达到 1.0mM, 特别优选达到 1.5mM, 而氧浓度达到 0.1mM, 优选达到 0.5mM 时产生的校正数据进行研究。

10 这里所说的优选的自由基是指全氘代的羟基三苯甲基自由基,对 37 °C F 的血样进行这样的校正表明,最大的核极化增强(即在不限定的 VHF 功率和不限定的自由基浓度下)值为 192, 而 T_1 即质子驰豫为 $0.44\text{mM}^{-1}\text{S}^{-1}$ 。发现 T_{1e} 和 T_{2e} 对自由基和氧浓度的依赖性符合下列线性函数:

$$2(\sqrt{3}Y_e T_{2e})^{-1} = 20 + 21.5C_{\text{rad}} + 428C_{O_2} \quad (1)$$

15 $3(\sqrt{3}Y_e T_{1e})^{-1} = 10 + 3.6C_{\text{rad}} + 330C_{O_2} \quad (2)$

$$(Y_e \sqrt{T_{1e} T_{2e}})^{-1} = 15 + 6.9C_{\text{rad}} + 319C_{O_2} \quad (3)$$

其中 Y_e 为电子的旋磁比, C_{rad} 为以 mM 为单位的自由基浓度, C_{O_2} 为以 mM 为单位的氧浓度, 而 T_{1e} 和 T_{2e} 为以秒为单位的电子驰豫时间, 系数是以测量的线幅单位的 mG 为单位。

20 对本发明方法中所用的任何自由基都可以从试验中得到相似的方程。

如果用这种校正数据可以计算一个样品的 OMRI 图像中象素的 T_{1e} , T_{2e} 或 $T_{1e} \cdot T_{2e}$ 的话, 那么用方程(1), (2)或(3)可以很容易地确定那个象素的氧浓度。通过处理用本发明的方法检测到的 MR 信号, 可以测定自由基的浓度, 从而得到一组自由基图像数据。

25 然而, 必须从在成像过程中检测到的 OMRI 信号中求出象素的 T_{1e} , T_{2e} 或 $T_{1e} \cdot T_{2e}$ 的值。本发明方法中所用的 OMRI 成像程序可以是任何一种常规的成像程序, 图 1 中示意了这样的一种可用程序的例子, 该程序涉及一个与水中质子的 T_1 大致相同数量级的 VHF 辐射时间(T_{VHF})和一个远比 T_2 小的单回声时间 TE, 则象素强度(I)由方程(4)给出:

30 $I \propto (1 - \exp(-T_{\text{VHF}}/T_1)) \quad (4)$

在 VHF 辐照期间发生动态质子极化 $\langle I_z \rangle$, 稳定态受核极化方程(5)约束:

$$\frac{\langle I_z \rangle}{I_0} = 1 - \frac{[S_0 k. f. S_0 - \langle S_z \rangle]}{I_0 S_0} \quad (5)$$

其中对于电子：质子动态核极化， $S_0/I_0=658$ (I_0 在此处代表平衡磁化强度)，

5 K 为偶合因子 (在低场处等于 $1/2$)，

f 为漏泄因子，而

$(S_0 - \langle S_z \rangle)/S_0$ 为电子自旋过渡态的饱和度 (SAT)。

漏泄因子 f 由方程 (6) 给出：

$$10 \quad f = \frac{rC_{rad}T_{10}}{1 + rC_{rad}T_{10}} \approx rC_{rad}T_{10} \quad (6)$$

(其中 r 为自由基的驰豫系数； C_{rad} 为自由基浓度，而 T_{10} 为在没有自由基存在
15 时质子的驰豫时间 T_1)。

最终图像的像素强度由方程 (7) 给出

$$I \propto (1 - \exp(-T_{VHF}/T_1))(1 - 329rC_{rad}T_1SAT)I_0 \quad (7)$$

(其中 I_0 为原始图像像素的强度)。

从方程 (7) 中的指数函数的泰勒展开式可以看到，假如 T_{VHF} 远小于 T_{10} ，
20 则 T_1 减少到一级。SAT 随激发的 VHF 场强度 B_{1e} 而变化并遵守基本的 Bloch 方程，esr 过渡态为单洛仑兹型时，这是指 SAT 由方程 (8) 给出：

$$25 \quad SAT = \frac{\alpha PY_e^2 T_{1e} T_{2e}}{1 + \alpha PY_e^2 T_{1e} T_{2e} + (\Delta \omega T_{2e})^2} \quad (8)$$

(其中 α 为转换因子； P 为 VHF 功率；而 $\Delta \omega$ 为共振的 VHF 激发频率与非共振的 VHF 激发频率之差 (当使用共振频率时， $\Delta \omega$ 当然为 0))。

在体内大样品图像中，转换因子 α 随空间变化很大，因此仅仅知道 P 、
30 SAT、 Y_e 和 $\Delta \omega$ 本身还不足以确定氧浓度。

而且，在大多数情况下，由于自由基分子间存在磁偶合，esr 过渡态并不是单洛仑兹型的。其中对于窄 esr 线幅的自由基 (例如这里提到的三苯甲基自由基) 来说，偶合常数远小于线幅，共振线型将变为沃伊特函数，SAT 将是由方程 (9) 中的高斯型强度函数加权的所有非共振值的积分：

$$SAT = 1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{\Delta H_{PP}^G} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-2H'^2 / \Delta H_{PP}^{G^2}) \frac{1 + \frac{4}{3}(\Delta H - H')^2 / \Delta H_{PP}^{L^2}}{1 + \frac{4}{3}(\Delta H - H')^2 / \Delta H_{PP}^{L^2} + \frac{2}{\sqrt{3}} \alpha P \gamma_e T_{1e} / \Delta H_{PP}^L} dH' \quad (9)$$

5

(其中 ΔH_{PP}^G 和 ΔH_{PP}^L 为高斯型函数和洛仑兹函数的峰对线宽的一级导数, 磁场单元 ΔH 是非共振磁场)。

方程(8)和(9)分别适用于均匀变宽的和非均匀变宽的单个 esr 峰。对具有大的偶合常数、分得较开的谱峰来说, 饱和度以对应于远离共振分数的因子减小(氮氧化物由于氮偶合其因子为 1/3, 三苯甲基由于多重 ^{13}C 偶合其因子为 0.8)。

在本发明的方法中, 数据处理大体上是把以象素/象素为基础而测得的 SAT 拟合到方程(8)或(9)之一中, 求出 T_{1e} , T_{2e} 或 $T_{1e} \cdot T_{2e}$, 再以象素/象素为基础这样就从方程(1)、(2)或(3)(或者是适合本方法中所用的自由基的等价方程)中计算出允许的象素氧浓度。

15

在本发明方法的一个优选的实施例中, 以非均匀变宽方程(9)为基础进行数据处理来计算 esr 线幅。

本方法最基本地需要产生 3 个 OMRI 图像, 然而还可以并且优选地附加一些在非共振条件下记录的图像, 而且优选附加在不同辐射时间下记录的图像和原始图像。

20

在本方法中, 图像 A、B 和 C 按下列的基本方式记录:

A: VHF 功率 P_A , $\Delta \omega = 0$ (即共振)

$\Delta H = 0$, 辐照时间 $T_{\text{VHF}} = T_{\text{VHF}1}$

B: VHF 功率 $P_B (\neq P_A)$, $\Delta \omega = 0$, 辐照时间 $T_{\text{VHF}} = T_{\text{VHF}1}$

25 C: VHF 功率 P_C (例如 = P_A 或 = P_B), $\Delta \omega \neq 0$ (即非共振)

$\Delta H \neq 0$ (例如 10 - 20 μT (100 - 200 mG)), 辐照时间 $T_{\text{VHF}} = T_{\text{VHF}1}$ 。

在这些条件下, 象素强度可以书写为:

$$I = A \left\{ 1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{\Delta H_{PP}^G} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-2H'^2 / \Delta H_{PP}^{G^2}) \frac{1 + \frac{4}{3}(\Delta H - H')^2 / \Delta H_{PP}^{L^2}}{1 + \frac{4}{3}(\Delta H - H')^2 / \Delta H_{PP}^{L^2} + \frac{2}{\sqrt{3}} \alpha P \gamma_e T_{1e} / \Delta H_{PP}^L} dH' \right\} - B \quad (10)$$

30

(其中 $A = \text{增益} \times \text{质子密度} \times rC_{\text{rad}}T_1 \times (1 - \exp(-T_{\text{VHF}}/T_1))$ ，对 $rC_{\text{rad}}T_1 \ll 1$ (增益是指体系增益因子，而质子密度是指象素的质子密度)；而

$B = \text{增益} \times \text{质子密度} \times (1 - \exp(-T_{\text{VHF}}/T_1))$ 。

5 方程(10)有 5 个未知数： T_1 质子密度、 C_{rad} 、 $\Delta H_{\text{PP}}^L = 2/\sqrt{3}Y_e \cdot T_{2e}$ 和 αT_{1e} 。

在大的增强值(例如大约 10)、相对于 T_1 较小的 $T_{\text{VHF}1}$ 、和在分布有自由基的流体介质中质子密度基本上均匀的情况下， B 可以省去，可以在象素/象素的基础上，用分别从图像 A、B 和 C 得到的 3 个 I 值解出 3 个未知数 C_{rad} 、 ΔH_{PP}^L 和 αT_{1e} 。然后通过用增益和 r 计算 A 得到一个自由基浓度
10 图像来确定自由基浓度(C_{rad})，再用确定的 ΔH_{PP}^L 值和自由基浓度图像，可以从方程(1)计算出氧浓度图像。

如果再产生两个图像(一个是在功率 P_A 和辐照时间 $T_{\text{VHF}} = T_{\text{VHF}2}$ (其中 $T_{\text{VHF}2} \neq T_{\text{VHF}1}$ ，例如 $T_{\text{VHF}2} = 2 \times T_{\text{VHF}1}$)的共振条件下得到的图像 D，另一个是用常规的 MR 技术、重复时间 $T_R = T_{\text{VHF}1}$ 、不需要 VHF 激发的条件下
15 得到的图像 E)，则用这种方法可以更加准确地测定氧浓度。图像 E 给出象素的初始强度 I。

从象素的 5 个强度值可以计算出所有 5 个未知数，还得到一个浓度图像和用方程(1)可以确定氧浓度图像的 ΔH_{PP}^L 。

按照这种方法，如果把含有体液和自由基的参考样品进行样品表面(例如
20 含有已知浓度的自由基的血管)处理，甚至可以把氧浓度图像调整到能更准确地表达浓度的程度。

本发明方法的另一个优选的实施例利用了方程(3)(即 $T_{1e} \cdot T_{2e}$ 乘积的方程)对氧浓度的更大的敏感性。但是这种方法需要确定 α 值，该 α 值给出象素的 VHF 磁场。

25 在这另一方法中，氧浓度和自由基浓度图像是从 3 个或更多个上述的图像中计算出来的。 $1/T_{1e}$ 图像是从这些图像计算出来的，而 α 图像则是通过把已经确定的 $1/T_{1e}$ 图像与 αT_{1e} 图像相乘而计算得到。然后用例如一种多项式函数使 α 图像平滑。优选在上述所讨论的研究条件下处理参考样，如果这样做了的话，那么就可以利用在参考样点处有固定值的平滑函数使 α 图像平滑。
30 这样减小了图像的统计误差并且使图像正规化，由于 α 对空间变化很迟钝，对固定的参考点将产生准确的 α 图像。

利用这种 α - 图像, 可以计算出 ΔH_{PP}^L 与 $1/T_{1e}$ 的乘积, 从这个值(该值依赖于 $1/T_{1e} \cdot T_{2e}$)和自由基浓度图像, 可以计算出更精确的氧图像。

如果不使用参考样品管, 那么还是可以计算出平滑的 α - 图像, 但是在
5 这种情况下, 所确定的 α - 值被优选地用于从检测到的 OMRI 图像计算 3 个
(或 5 个)变量, 从所得的 $1/T_{1e}$ 计算进一步平滑的 α - 图像, 重复该程序直至
连续产生的 α 图像基本上不变化为止(即程序收敛于最佳配合)。

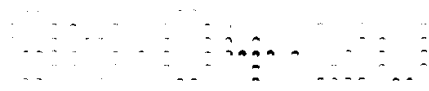
用于按照本发明的方法采集的数据的各种计算方法代表了在准确地测定
10 样品中氧浓度方面一个重要的进步。虽然对具有大的 esr 线幅的自由基(典
型地为氮氧自由基)来说, 洛仑兹模型是线形的一个准确的近似值, 但对于窄
esr 线幅的自由基来说, 需要更加精确的线形分析, 使之对氧浓度的更加准确
的测定。

这样, 本发明的方法可导致真实的氧浓度和计算出的氧浓度之间的一致
15 性因子典型地小于或等于大约 5 % (对于一个 $3 \times 3 \times 10\text{mm}$ 体积单元、100
秒的采集时间、0 - 0.1mM 的氧浓度和 0.1 - 0.2mmol/kg 体重、样品典型地
为人体大小来说)。

为了能够计算 VHF 磁场的空间变化, 用上述的另一方法得到纵向驰豫
20 时间(或纵向驰豫时间与横向驰豫时间的乘积)的一个绝对数值。纵向驰豫时
间(甚至更是纵向驰豫速率和横向驰豫速率的乘积)对氧更加敏感, 因而总体
上讲这种方法是比较敏感的技术。

虽然上述方法着重于利用沃伊特函数来计算各种未知的参数, 但是本发
25 明方法同样可以用洛仑兹型函数, 其中这些函数是 esr 线形的一个精确模型,
而这样的一种方法构成了本发明的又一个实施方案。例如在大线幅的自由基
(典型地为氮氧自由基)中, 非均一性效应可以忽略, 该线形基本上是洛仑兹
型。因此, 在这个优选的实施方案中, 数据处理步骤的主要目的在于把 SAT(例
如在象素/象素基础上确定的)拟合到方程(8), 在象素/象素基础上求出 T_{1e} , T_{2e}
和 $T_{1e} \cdot T_{2e}$, 从而能够从经验关系(例如方程(1), (2)和(3))确定氧浓度。

在实践中, 可能有必要对本发明方法中的流动效应进行补偿, 所采取的
30 合适步骤对本领域技术人员来说都是已知的。其它参数例如样品粘度、pH
值、温度、自由基自动变宽等, 一般只是二级效应, 因而与本发明方法中的
顺磁性氧的一级效应相比可以忽略。但是在方程 1 - 3 中对自由基自动变宽
作了校正。



一般地讲，本发明方法可以使用任何常规的、在生理条件下稳定的长寿命自由基，该长寿命自由基具有足够长的半衰期(至少一分钟，优选至少一小时)，具有长的电子驰豫时间和良好的驰豫性。根据对发明方法的讨论，很显然对于具有窄线幅 esr 过渡态的自由基(例如最高达 500mG，优选小于 150mG，特别优选小于 60mG)来说，氧测定的敏感性将得到提高。通过举例说明，对于用 500mG/mMO₂ 的谱线变宽表示的一种典型的氧敏感性来说，具有与 T_{2e} 相关的 500mG 线幅的自由基(例如 Lurie 等人在 J.Mag.Reson.76: 366 - 370(1988)上所提出的那种氮氧自由基)在氧浓度增大 0.1mM 时，其线宽只增加 10%，而对于一个 50mG 线幅的自由基来说，氧浓度增大同样数量时，其线幅都增大 100%。

优选地，选择用于本发明方法的自由基应当基本上扩散到细胞外液中(例如应当是一种 ECF 试剂)，这是因为在细胞外液中可以避免受顺磁性铁(例如在红细胞中的铁)的影响。

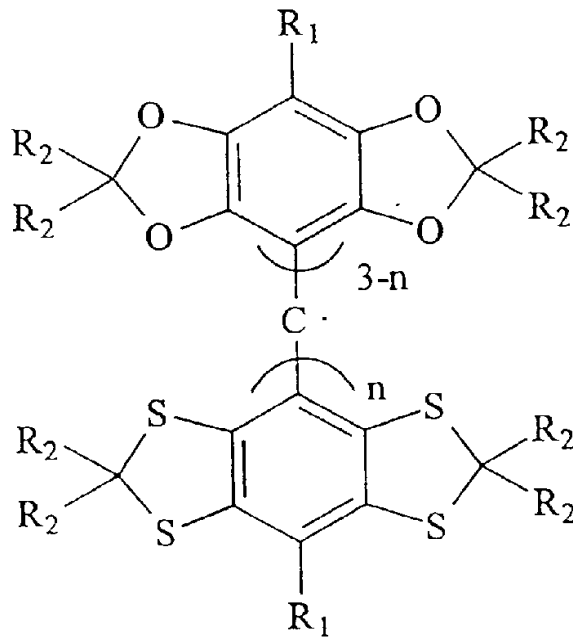
用于本发明方法的自由基的又一个优选的特征是它们应当有低的自变宽效应，优选使每 mM 的自由基其自变宽效应小于 100mG，特别优选使其自变宽效应处于 0 与 50mG 之间。

一类特别优选的特别适用于本发明方法的具有很小的 esr 线宽和自变宽效应的化合物是在 WO - A - 91/12024，US - A - 5530140 和美国专利申请号 08/467,273(Nycomed Innovation AB) 和国际专利申请号 PCT/GB95/02151 中所讨论的三苯基甲基自由基(以后称为“三苯基甲基自由基”)以及它们的氙代类似物。

特别优选的用于本发明方法的三苯基甲基自由基是下式的自由基及其盐、前体和氙代类似物：

25

30



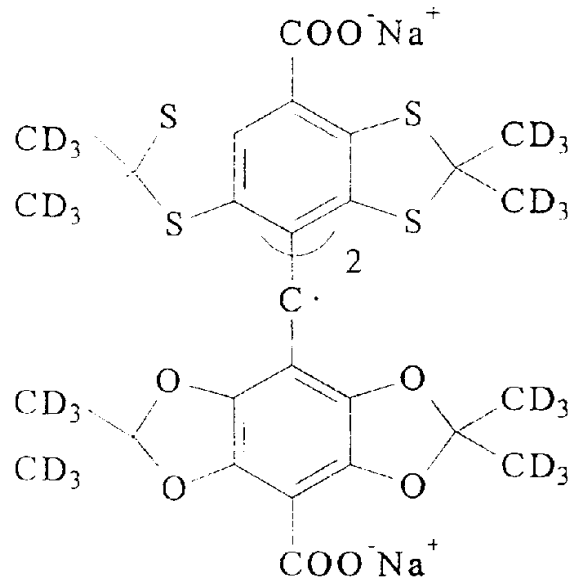
其中:

n 为 0,1,2 或 3;

R_1 为羧基或其衍生物;

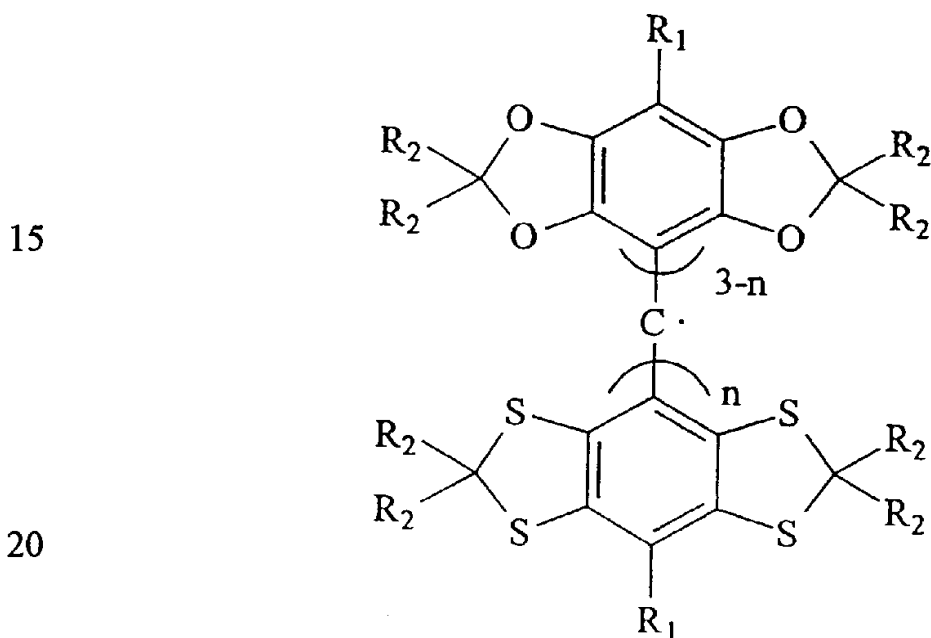
15 R_2 为氢或可以被羟基化或烷氧基化的 C_{1-6} 的烷基,其中烷氧基本身可以被羟基化,优选为 C^mH_3 、 C^mH_2OH 或 $C^mH_2(OR_3)$ 基(其中 m 为 1 或 2,即 2H 为氘,而其中的 R_3 为可以被羟基化的 C_{1-6} 的烷基,优选为可以被羟基化的乙基)。

很自然地,这种定义是为了把能够在给药前或甚至在给药时发生一个产生自由基的步骤而产生自由基的自由基前体覆盖进去。自由基前体和产生自由
20 基的步骤已为本领域的技术人员所熟知。特别优选的三苯基甲基自由基是下式的自由基(此处分别指全氘代的三苯基甲基自由基、没有氘代的羟基三苯基甲基自由基、氘代的羟基三苯基甲基自由基和对称的三苯基甲基自由基):



适用于本发明方法的自由基的制备在很多情况下都是熟知的合成方法,而在另外的情况下例如在 WO-A-91/12024,US-A-5530140 和美国专利申请号 08/467,273(Nycomed Innovation AB)中讨论过。全氘代的三苯基甲基自由基可以用下面的实施例 15-20 中所述的制备其没有氘代的羟基三苯基甲基自由基的方法来制备,但是在开始的缩酮化步骤(如 WO-A-91/12024 的实施例 2 所述)中要用六氘代的丙酮代替丙酮。氘代的羟基三苯基甲基自由基一般是通过连续的稠环形成和氘代的还原步骤,然后是类似于在下面的实施例 23-27 中所述的制备其没有氘代的类似物的方法中所述的步骤而制备的,也可以按照实施例 33-37 来制备。

10 形成本发明的另一个方面的化合物是下式的化合物:



其中:

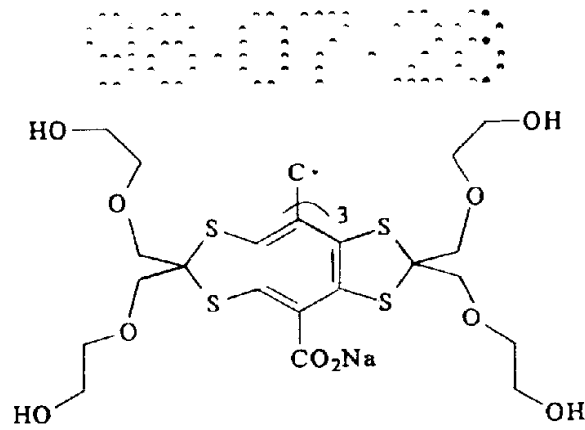
n 为 0,1,2 或 3;

25 R₁ 为羧基或其衍生物;

R₂ 为氢或可以被羟基化或烷氧基化的 C₁₋₆ 的烷基,其中烷氧基本身可以被羟基化,优选为 C^mH₃、C^mH₂OH 或 C^mH₂(OR₃)基(其中 m 为 1 或 2,即 ²H 为氘,而其中的 R₃ 为可以被羟基化的 C₁₋₆ 的烷基,优选为可以被羟基化的乙基)。

30 条件是:假如 n 为 0,2 或 3,则至少有一个 R₂ 是烷氧基化的 C₁₋₆ 的烷基,其中烷氧基本身可以被羟基化;

及其盐、前体、氘代的类似物,特别是下式的化合物及其氘代的类似物。



5

另一类特别用于本发明方法的自由基化合物是氙代的氮氧自由基,特别是具有很窄线宽的全氙代的 2,5-二叔丁基-3,4-二甲氧基羰基-吡咯氧基。这些化合物可以通过使 2,5-二叔丁基-3,4-二甲氧基羰基-吡咯氧基的甲基酯部分进行氙代来制备,该氙代是用四氙代的甲醇和/或叔丁基经过一个以六氙代的丙酮开始的多步程序发生酯基转移作用而实现的。

用于体内成像的自由基化合物当然应当是一种生理上可接受的自由基或以生理上可接受的剂型(例如以溶液、胶囊,或前体形式)存在的自由基。自由基可以方便地与常规的药物载体或赋形剂一起配制成造影介质。

15 本发明所用的造影介质除含有惰性自由基(或者是刚好在给药前形成自由基的非自由基前体)外,还含有制剂用的辅剂例如常规用于医疗和兽医中作为治疗和诊断组合物的辅剂。这样的介质的例子可以包括助溶剂、乳化剂、增粘剂、缓冲剂等。该介质可以是适于胃肠外给药(例如静脉注射)或胃肠给药(例如口服)的剂型,例如直接用于具有外空腔(例如消化道、膀胱和子宫)的体腔,或用于注射或灌注到心血管系统、肌肉或其它组织的剂型。然而,一般

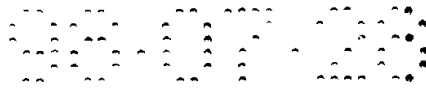
20 优选用生理上可接受的介质制成的溶液、悬浮液和分散液。

用于体内诊断成像的介质(优选基本上是等渗的),可以方便地以足以在成像区使自由基的浓度达到 $1\mu\text{M}$ - 10mM 、优选达到 0.05 - 1mM 、特别优选达到 0.1 - 0.3mM 的浓度给药。然而,精确的浓度和剂量当然依赖于多种因素例如

25 毒性、器官对造影剂的定位能力和给药方式,最佳的自由基浓度是综合各种因素的结果。总之,在大多数情况下最佳浓度处于 0.1 - 100mM ,优选处于 0.2 - 10mM ,更优选处于 0.5 - 5mM 的范围。用于静脉给药的组合物将优选含有 1 - 1000mM 、特别优选含有 5 - 500mM 浓度的自由基。对于离子性材料,特别优选的浓度范围为 5 - 200mM 、最优选 10 - 150mM ,而对于非离子性材料,特别优

30 选的浓度范围为 20 - 400mM 、最优选 30 - 300mM 。

因此,从另一方面来看,本发明提供了把长寿命自由基、优选具有小的 esr



固有线宽的自由基、特别优选三苯基甲基自由基，用于测定体内氧浓度的方法。

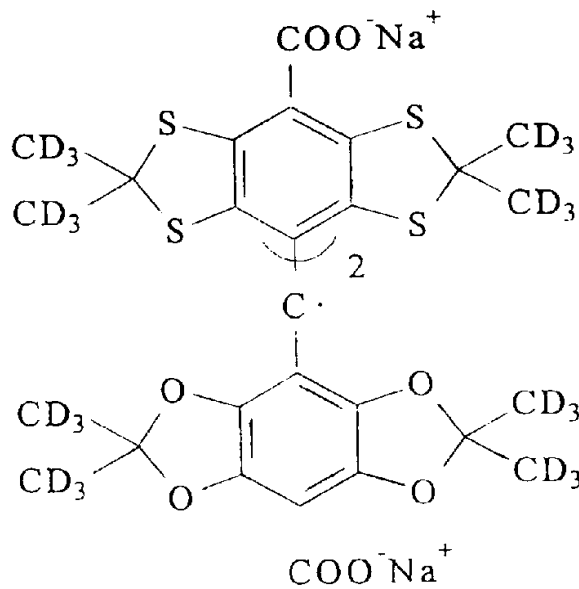
下面的实施例是为了以一种非限定性的方式阐述本发明。

实施例

5 用 NMRD、动态核极化(DNP)和 ESR(实施例 1-4)研究了下面四个水溶性的、单一 ESR 谱线的三苯基甲基自由基。

(1) 双-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-(三氘代甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-(三氘代甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲基。

10 这里是指下列的全氘代的三苯基甲基自由基(MW=1080)。



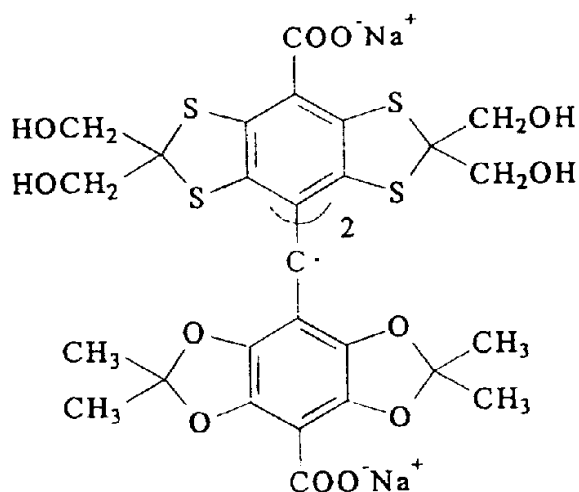
2) 双-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-羟甲基-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-羟甲基-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲基。

这里是指下列的非氘代的羟基三苯基甲基自由基(MW=1129)。

25

30

5

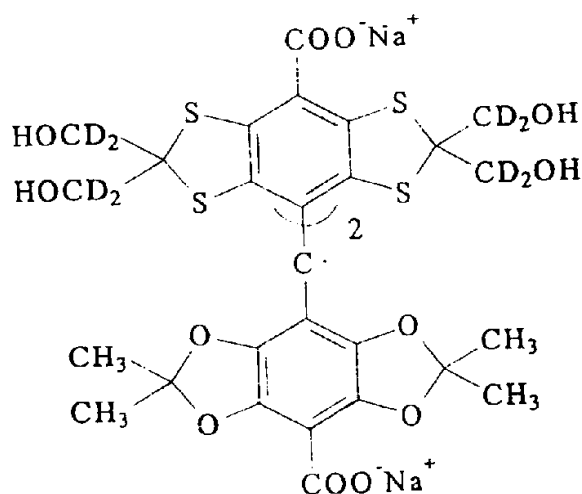


10

(3) 双-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-(羟基二氘代甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-甲基-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲基。

这里是指下列的氘代的羟基三苯基甲基自由基(MW=1145)。

15



20

25

(4) 三-(8-甲酸钠基-2,2,6,6-四-(三氘代甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊二烯)甲基。

这里是指下列对称的三苯基甲基自由基(MW=1151)。

30

列于表 3 中:

表 3

以 mG/mM 峰间值表示的三种自由基在等渗盐水中以及其中氘代羟基三苯基甲基自由基在 37 °C 血浆和血液中浓度依赖性的驰豫速率。

5

		全氘代的三苯基甲基自由基	氘代的羟基三苯基甲基自由基	对称的三苯基甲基自由基
水	23 °C	24.3 ± 0.8	11.1 ± 0.5	35.4 ± 0.6
	$2(\sqrt{3}Y_e T_{2e})^{-1}$ 37 °C	28.2 ± 1.2	8.0 ± 0.2	33.1 ± 0.3
水	23 °C	10.6 ± 0.8	2.6 ± 0.1	13.2 ± 0.5
	$2(\sqrt{3}Y_e T_{1e})^{-1}$ 37 °C	12.9 ± 0.3	2.8 ± 0.2	17.7 ± 0.8
		全氘代的三苯基甲基自由基	氘代的羟基三苯基甲基自由基	对称的三苯基甲基自由基
血浆	$2(\sqrt{3}Y_e T_{2e})^{-1}$		9.8 ± 0.5	
37 °C	$2(\sqrt{3}Y_e T_{1e})^{-1}$		2.7 ± 0.5	
血液	$2(\sqrt{3}Y_e T_{2e})^{-1}$		21.5 ± 0.5	
37 °C	$2(\sqrt{3}Y_e T_{1e})^{-1}$		3.6 ± 0.5	

实施例 3

10 在水和血浆中于 37 °C 下, 用 ESR 在 9GHz 的 X-波段对全氘代的三苯基甲基自由基和非氘代的羟基三苯基甲基自由基进行测氧计校准。试验在配有温度控制器的 Varian 光谱仪的 X-波段上进行。在微波阱附近放置一个热电偶以便准确地测定温度。把样品置于薄壁聚四氟乙烯毛细管中, 使其与一种流动的气体混合物快速达到平衡。用一种医学传感器氧分析仪 OM-11 测定该流动气体中氧的百分含量。用于控制温度的气体压力和氧压力维持在 20psi。测量电子自旋共振的线宽和饱和度。选择弗莱米斯盐作为 B_1 校准标准, 得到 $38.6 \pm 0.2 \text{mG}/\sqrt{\text{mW}}$ 的转换因子。

15 图 2 和图 3 示出了线宽随氧浓度变化的结果。在 37 °C 下血浆中全氘代的三苯基甲基自由基的氧变宽系数为 $583 \text{mG}/\text{mM}_{\text{O}_2}$ 。

实施例 4

分别在 23 °C 和 37 °C 下用 ESR 和 DNP 于水中和血液中以 260Hz 检测氘代的羟基三苯基甲基自由基对氧的敏感性。所需的氧分压通过一个简易的摇

动式张力计达到。把 1-2ml 体积的样品与一种缓缓流过样品的水饱和的气体混合物一起振荡 5 分钟,样品和气体置于恒温水浴中,气体混合物是高纯度的并且经过化学分析。结果示于图 4-7 和表 4 中。在 37 °C 和 23 °C 下在水中的洛仑兹型线变宽系数分别为 511 和 369 mG/mM_{O₂},而在 23 °C 在血液中的洛仑兹型线变宽系数为 329 mG/mM_{O₂}。

表 4

在 23 °C 和 37 °C 下,水中和血液中氘代的羟基三苯基甲基自由基的驰豫速率 mG/mM 峰/峰值和 DNP 倒数曲线(mG/mM)斜率的平方根随氧浓度的变化

	$(Y_e \sqrt{T_{1e} T_{2e}})^{-1}$	$2(\sqrt{3} Y_e T_{2e})^{-1}$	$2(\sqrt{3} Y_e T_{1e})^{-1}$
水, 37 °C	359C _{O₂} + 14.2	511	398
水, 23 °C	282C _{O₂} + 13.4	369	301
血液, 37 °C	319C _{O₂} + 15.0	428	330
血液, 37 °C	249C _{O₂} + 12.9	329	250

10 实施例 5

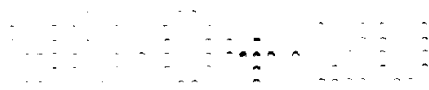
下列试验是用羟基三苯基甲基自由基(如上述所定义的)在 Picker Nordstar MEGA 4 250-300 MR 仪器上进行的,通过把主磁场强度从 0.1 减小到 0.01T,并且配置能发射具有 200-300MHz 范围频率和 0-100W 范围功率的 VHF 射线的 VHF 发射器而使该仪器适用于 OMRI。

15 (a)具有不同自由基浓度和氧压力的血液样品

计算三种不同的自由基剂量 2.0 mM,4.0 mM 和 6.0 mM 的血液样品中的自由基浓度和氧图象,结果示于图 8 中。

参数:

	扫描时间	4:36 分钟
20	TR/TE	270ms/20ms
	狭缝	4mm
	象素大小	0.5 × 0.5mm ²
	平均值	2
	T-vhf	200ms
25	采样时间	24ms
	样品频率	21kHz



样品基板 512 × 256(在阅读方向过量采样)
 记录仪基板 256 × 256

(b)OMRI 测氧法

5 在体重为 120g 的大鼠吸入不同氧含量的气体后,得到了显示体内氧浓度
 的三个图象。向尾静脉中注入 1.5ml 浓度为 1.5mmol/kg 的自由基药剂,注射时
 间为 10s(在得到第一个图象前 10s), 结果示于图 9 中。

参数:

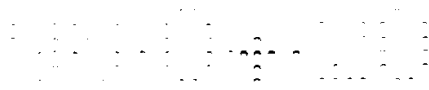
	扫描时间	3:28 分钟
	TR/TE	270ms/20ms
10	狭缝	5mm
	象素大小	0.75 × 0.75mm ²
	平均值	2
	T-vhf	200ms
	采样时间	24ms
15	样品频率	21kHz
	样品基板	512 × 192(在阅读方向过量采样)
	记录仪基板	192 × 192

(c) OMRI 测氧法

20 在体重为 125g 的大鼠吸入不同氧含量的气体后,得到了显示体内度的五
 个图象。向尾静脉中注入 1.5ml 浓度为 1.5mmol/kg 的自由基药剂,注射时间为
 15s(在得到第一个图象前 15s), 结果示于图 10 中。

参数:

	扫描时间	3:28 分钟
	TR/TE	270ms/20ms
25	狭缝	5mm
	象素大小	0.75 × 0.75mm ²
	平均值	2
	T-vhf	200ms
	采样时间	24ms
30	样品频率	21kHz
	样品基板	512 × 192(在阅读方向过量采样)



记录仪基板 192 × 192

(d) OMRI 测氧法

对于肺中所测得的氧压与吸入的气体中的氧含量之间相关性进行了试验研究。向体重 150g 的大鼠尾静脉中注入 0.5ml 浓度为 1.0mmol/kg 的自由基药剂, 5 注射时间为 10s(在得到第一个图象前 10s), 结果示于图 11 中。

参数:

	扫描时间	1:44 分钟
	TR/TE	270ms/18ms
	狭缝	5mm
10	象素大小	1.0 × 2.0mm ²
	平均值	2
	T-vhf	200ms
	采样时间	24ms
	样品频率	21kHz
15	样品基板	512 × 96(在阅读方向过量采样)
	记录仪基板	192 × 96

(e)OMRI 测氧方法

在定位后,得到一张高功率图象和一张计算出来的氧图象。向体重 132g 的大鼠尾静脉中注入 1.0ml 浓度为 2.0mmol/kg 的自由基药剂,注射时间为 20 60s(在得到第一个图象前 15 分钟), 在定位后 8 分钟开始成像,结果示于图 1 2 中。

参数:

	扫描时间	3:28 分钟
	TR/TE	270ms/20ms
25	狭缝	8mm
	象素大小	1.0 × 1.0mm ²
	平均值	2
	T-vhf	200ms
	采样时间	24ms
30	样品频率	21kHz
	样品基板	512 × 192(在阅读方向过量采样)

实施例 6

也研究了可用于本发明方法的一系列部分氘代的和全氘代的氮氧自由基(化合物 3b-d),这些自由基从 2,5-二叔丁基-3,4-二甲氧基羰基-吡咯氧基(化合物 3a)衍生而来,把它们与 TEMPONE(4-氧杂-2,2,6,6-四甲基-哌啶-1-氧基,1)和 CTPO(3-氨基甲酰基-2,2,5,5-四甲基-吡咯啉-1-基氧基,2a)(这些是典型的常用于成像目的的氮氧化物的例子)一起研究。

材料. 4-氧杂-2,2,6,6-四甲基-哌啶-1-氧基,1(Jansen,95%),4-氧杂-2,2,6,6-四甲基-哌啶-十六氘代-1-氧基,1-16 氘代(MSD 同位素,98%的原子被氘代)和 2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-十三氘代-氧基-3-羧酸,2b-十三氘代(MSD 同位素,97.5%的原子被氘代)用原装的。 2,2,5,5-四甲基-3-吡咯啉-1-氧基-3-羧酸,2b, 从早期的工作中得到。 甲基-4,4-二甲基-3-氧杂-戊酸盐(Aldrich,99%)(5a), 三甲基甲硅烷碘化物(TMSI,Jansen,97%),六氘代丙酮(Glaser AG,氘代率 >99.5%)和四氘代甲醇(CIL,氘代率>99.8%)用原装的。十二氘代的 3,3 - 二甲 - 2 - 丁酮(频哪酮)从 Organic Synthesis Coll.,1,459-462 的非氘代化合物部分所述的六氘代的丙酮得到。 乙醚(含水<0.01%)在使用前用中性氧化铝过滤。 氯化钠(Aidrich,80%的矿物油悬浮液)和过氧化镍(Aidrich)用原装的。所有其它的化学试剂都是原装的、商业上可得到的最高级别的试剂。

仪器

ESR 光谱用 Bruker ER-200D SRC 仪器的精装型 ESP 3200-200SH 在 22°下测定。自由基浓度范围为 0.1-0.2mM,调制幅度 10mG,微波功率远远低于饱和功率。 NMR 光谱在 Varian XL-300 光谱仪上记录。质谱用装配有 ESPC 电子喷雾器的 VG Quattor II 仪器记录。 GLC 分析在配有熔融石英柱(30m,0.25 μ m,HP-1701)的 HP 5830 II 型仪器上进行。 TLC 分析和柱色谱分离用硅胶-60,以庚烷/乙醚作洗脱液。

5c 的制备

按照 J. Am. Chem. Soc., 72,1356(1950)所述的制备非氘代的化合物的方法,使 NaH(22.9g,0.77mol)和碳酸二甲酯(64.1,0.77mol)与十二氘代的 3, 3 - 二甲 - 2 - 丁酮(32.4g,0.29mol)作用,得到 5c(28.1g,0.17mol,59%),沸点 98-100 °C /6mm。 ^1H NMR(CD_3OD): δ 3.72(s,3H)。 ^{13}C NMR (CD_3OD): δ : 209.0(-CO-),168.8(-COO-),51.2(-CH₃),43.7-42.0(m,-CD₂),25.0-23.5(m,-CD₃)。

5b 和 5d 的制备: 把未氘代的甲酯(5a,5c)溶解于 CD₃OD 中,与 2%mol 的 NaOCD₃ 作用。蒸发后,重复该程序。当用 NMR 鉴别不出甲基上有质子时,认为酯交换反应已经完成。蒸发该混合物,加入乙醚,再蒸发,不再需要进一步纯化就可用于下一步反应中。

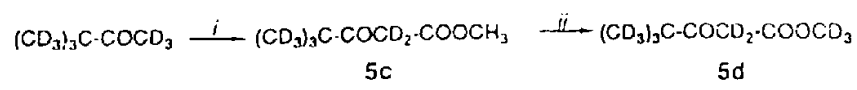
5 6d 的制备: 在氩气气氛和搅拌下,在 2 小时内,向 Na(1.22g,53mmol)的 15ml 乙醚悬浮液加入 5d(8.5g,49mmol)的 30ml 乙醚溶液。搅拌 4 小时后,以 1 小时的时间加入 I₂(6.35g,25mmol)的 50ml 乙醚溶液。混合物放置过夜,把所得的白色悬浮液倒入乙醚/饱和氯化钠溶液。水层用乙醚萃取两次,合并的有机层通过 MgSO₄ 干燥、蒸馏和色谱分离,收集到 4.8g(14mmol,56%)无色的油状物 6d,
10 该油状物由一个非对映体混合物组成,在其中的两个不对称的(及酸的)碳原子发生了不完全的氘代。 ¹³C NMR(CD₃OD): 209.0+208.1(-CO-),168.5+168.2(-COO-),53.7-53.0(m,-CD₂-+-CHD+ -CH₂-),51.7-50.7(m, 酯 -CD₃),25.0-23.5(m,-CD₃)。质谱(ESP⁺), m/z:379 (M+39), 363(M+23)。类似地,6a-6c 可以从 5a-5c 制得,产率 40-60%。

15 7d 的制备: 把 NaOCOCH₃(1.78g,13.0mmol),NH₂OHxHCl(0.80g,11.5mmol)溶于 13ml 水而成的溶液与 6d(2.80g,8.2mmol)溶于 35ml CH₃COOH 而成的溶液混合,在 65 °C 搅拌 72 小时。冷却混合物并蒸去大部分溶剂,把残留物倒入乙醚/NaHCO₃ 水溶液,水层用乙醚萃取。合并的乙醚层通过 Na₂SO₄ 干燥,所得的油状物经色谱分离得到 1.6g 回收的原料。然后与脞(0.025g,0.07mmol,2.0%)
20 和 7d(0.065g, 0.19mmol, 5.4%)作用,得到白色结晶,熔点 156-158 °C。 ¹H NMR(CD₃CN):δ9.82(s,1H)。 ¹³C NMR (CD₃CN): 68.3,136.5,109.3,52.2-50.9(m, 酯-CD₃),33.5,30.2-28.1(m,t-CD₃)。质谱(ESP⁻),m/z:334(M-1)。同样得到了: 7a ¹H NMR ((CD₃)₂CO): δ9.80(s,1H), 3.67(s, 6H),1.40(s,18H)。质谱 (ESP⁻),m/z:310(M-1)。 7b ¹H NMR ((CD₃)₂CO): δ9.80(s,1H), 1.40(s,18H)。 ¹³C
25 NMR((CD₃)₂CO):δ167.1,135.3,108.7,45.8-44.7(m,CD₃), 33.4, 29.3。质谱(ESP⁻), m/z:316(M-1)。 7c ¹H NMR ((CD₃)₂CO): δ9.87(s,1H), 3.63(s, 6H)。 ¹³C NMR((CD₃)₂CO):δ167.1,135.3,108.7,50.9,32.3,29.7-28.2(m,CD₃)。质谱(ESP⁻), m/z:328(M-1)。

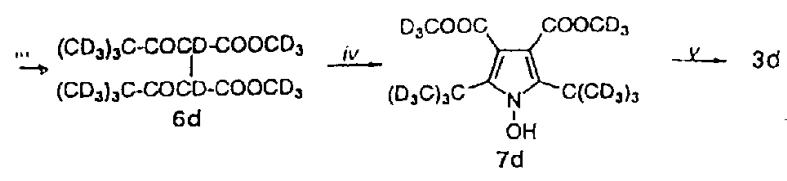
3a-3d 的制备: 3a 是按照前面所说的、 Bull. Soc. Chim. France,72,4330(1970)中制备乙酯的方法,从甲基酯 5a 制得,相似地,3b 是通过 5a 的酯交换反应而制得的。 3a,6a,和 7a 的甲基酯部分很难发生酯交换和常规

的水解,这意味着在制备 3b 时,在二聚步骤之前进行酯交换步骤。制备 3c 和 3d 时,先进行六氘代丙酮的频哪醇化反应,然后进行频哪醇重排和羧基化反应,得到 5c,酯交换反应、二聚合及与羟基胺的闭环反应如下列的反应简式所示。可以从反应混合物中分离出中间体 6c(产率与闭环产物相近),而这些中间体在其它的同等条件下将单独转变为羟基胺,或者简单地转入下一轮合成中。使 7a 与 TMSI 在 $CdCl_3$ 中水解,以中等产率得到二羧酸 4。

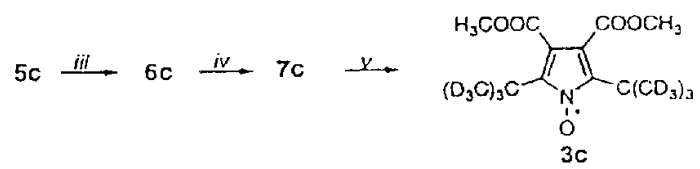
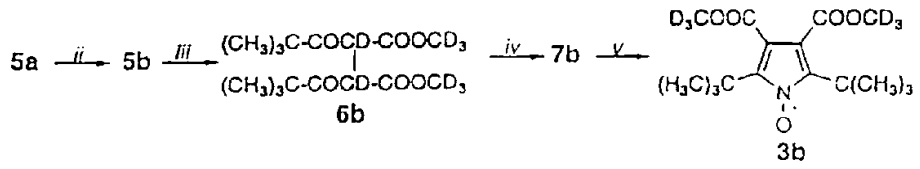
5



10



15



20

- i. NaH , $(CH_3)_2OCO$ ii. CD_3OD , 催化量 $NaOCD_3$
- iii. a) Na /乙醚 b) I_2 iv. NH_2OH , CH_3COOH
- v. $NiOOH$

反应简式 1

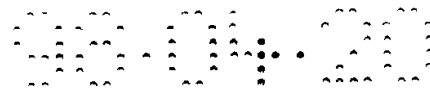
25

吡咯氧基自由基的制备: 向经过脱气的 2mg 羟基胺 7a-7d 溶于 2ml 苯而成的溶液中加入大约 10 mg $NiOOH$, 5 分钟后, 过滤悬浮液, 用脱气的苯稀释淡兰绿色的溶液以制得一种适于 ESR 测定的溶液。

2,5-二叔丁基-N-羟基-吡咯-3,4-二羧酸(4)的制备:

30

当按照上述的酯交换反应条件处理 7a 时, 在加猪肝酯酶或在标准的碱水解条件下作用时, 没有观察到反应。把 7a(0.09g, 0.29mmol) 溶于 10ml 干燥的 $CDCl_3$, 并加入 TMSI(0.240g, 1.20 mmol)。加热到 55 °C 过夜后, 混合物用 40ml CH_2Cl_2 稀释, 用饱和 $NaCl$ 水溶液洗涤, 用几滴溶于饱和 $NaCl$ 水溶液的



Na₂S₂O₄ 溶液洗涤,最后用饱和 NaCl 水溶液洗涤。经过 Na₂SO₄ 干燥和蒸发后,把残余的固体溶于 9:1 的庚烷-乙醚中,蒸发并用庚烷研制,得到无色结晶的二羧酸 4(0.040g,0.14mmol,49%)。 ¹H NMR ((CD₃)₂CO): δ1.50(s)。 ¹³C NMR((CD₃)₂CO): δ159.5, 141.0,108.2,33.7, 29.2。 质谱(ESP⁺), m/z:264(M-19)。

5 按上述方法与 NiOOH 作用后,记录到几乎与 3b 相同线宽的 ESR 信号。

ESR 测量: 表 5 中所概括的是上述的氮氧自由基的 ESR 线宽。所有的光谱都是在 22 °C 下用仔细脱气的苯高度稀释后记录下来的。全氘代导致 1 的线宽降低 2.2 倍,2b 的线宽降低 2.5 倍。对于 3a-d 的氮氧化物,酯部分的烷基氘代引起线宽降低 1.9 倍(3c:3d),而只有叔丁基氘代时,对线宽几乎没有影响(3a:3c)。发现,在迄今为止所记录下的氮氧化物中,全氘代的氮氧化物 3d 具有最窄的线宽 113mG,氮偶合常数 4.4G(在苯中)。在表 6 中,就自旋密度分布、氮偶合常数和固有线宽,把 3d 与其它的氮氧化物作了比较。

表 5

在 23 °C 下,未氘代的和全氘代的氮氧化物在苯中的 ESR 线宽

化合物号	线宽/mG
1	602
1 - d ₁₆	266
2b	1032
2b-d ₁₃	407
3a	228
3b	172
3c	219
3d	113

15

表 6

一些氮氧化物的自旋密度分布、氮偶合常数和固有线宽

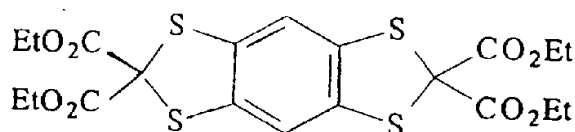
	1	弗基米斯盐 (C ₆ H ₅) ₂ NO	3d
a _N	15	12	9.7
p _N + p _O	1.0	1.0a	0.78
Δ H ₁ (mG)	300	210	160
(Δ H ₂) ^{1/2}	17	14.5	12.6

a 对 p_O + p_N ≤ 1

实施例 7

2,2,6,6-四(乙氧基羰基)苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯

5

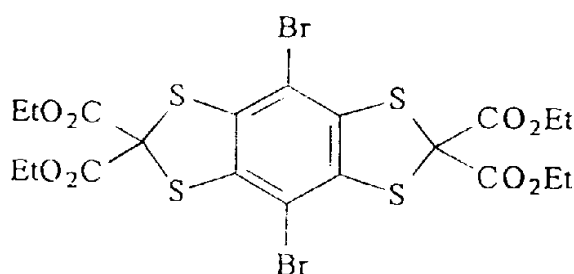


反应在氩气气氛下,用脱氧的溶剂进行。把 1,2,4,5-苯并四硫醇 (1.50g,7.3mmol)和 K_2CO_3 (4g)与干燥的 DMF(70ml)混合,加入二溴代丙二酸二乙酯(4.26g,14.6mmol)的 DMF(15ml)溶液。把混合物加热到 60 °C 并搅拌 65 小时。冷却到室温后,把反应混合物倒入冰水中,然后用 CH_2Cl_2 (2x100ml)萃取,合并有机相,用水(4x50ml)洗涤,干燥(Na_2SO_4)并蒸发。产率: 3.32g(88%)。 1H NMR($CDCl_3$): 6.97(s, 2H), 4.29(q, J=7.2Hz,8H),1.28(t, J=7.2Hz,12H).

实施例 8

2,2,6,6-四(乙氧基羰基)-4,8-二溴代苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯

15



20

把 2,2,6,6-四(乙氧基羰基)苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯 (10.7g,20.6mmol)溶于冰醋酸中,加入溴(16.5g,0.103mol)。溶液在 65 °C 下搅拌 17 小时,加入 $Na_2S_2O_4$ 水溶液。水溶性浆液用 CH_2Cl_2 (3x100ml)萃取,合并有机相,用水(3x50ml)洗涤,干燥($MgSO_4$)并蒸发。残留物用 CH_3CN 研制,干燥。产率: 10.1g (72%)。

25

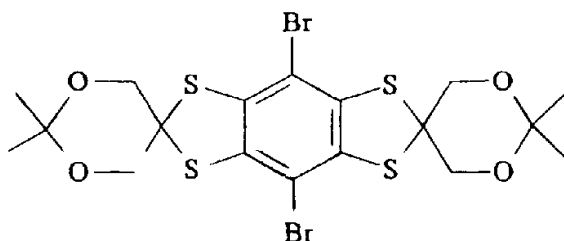
$^1HNMR(DMSO-d_6)$: 4.28(q, J=7.2Hz,8H),1.21(t, J=7.2Hz,12H).

实施例 9

4,8-二溴代苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷)

30

5



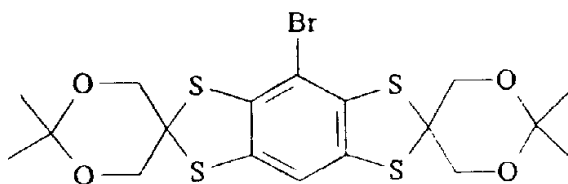
把 2,2,6,6-四(甲氧基羰基)-4,8-二溴代苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯(6.76g,10.0mmol)溶于干燥的 THF 中,溶液冷却到 0 ℃,滴加 DIBAL 的甲苯(17.8ml,100mmol)溶液。将溶液加热回流 3 小时,然后冷却到室温。滴加甲醇(20ml),然后加水(60ml),用 6MHCl 把 pH 值调节到 2。蒸发除去除水之外的溶剂,过滤收集沉淀。产物用水、乙腈洗涤,干燥,然后悬浮于干燥的丙酮(600ml)中。加入 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2.52ml,20mmol),溶液搅拌 20 分钟,加入固体 K_2CO_3 (6.0g),再继续搅拌 5 分钟。通过一个短的碱性氧化铝填料柱过滤后,蒸发除去溶剂,残留物用 CH_2Cl_2 研制,干燥。产率: 1.12g(19%)。

15 ^1H NMR(DMSO- D_6): 4.15(s, 8H),1.37(s, 12H)。

实施例 10

4-溴代苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷)

20

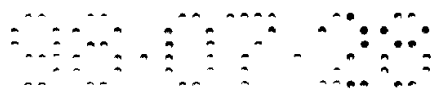


在氩气气氛下,把 4,8-二溴代苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷)(1.14g,1.94mmol)溶于干燥的 THF 中。溶液冷却到-45 ℃后,滴加正丁基锂的环己烷溶液(2.5M,2.02mmol)。搅拌 5 分钟后,加入甲醇(3ml),让溶液恢复到室温,蒸发除去溶剂。产物用硅胶柱色谱纯化(以 CH_2Cl_2 和甲醇的混合物(99.5:0.5)作洗脱液)。产率: 0.70g(71%)。

^1H NMR(CDCl_3): 6.80(s, 1H),4.15(s,8H),1.37(s, 12H)。

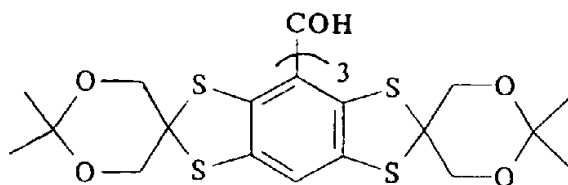
30 实施例 11

三(苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-4-基-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷)



噁烷))甲醇

5



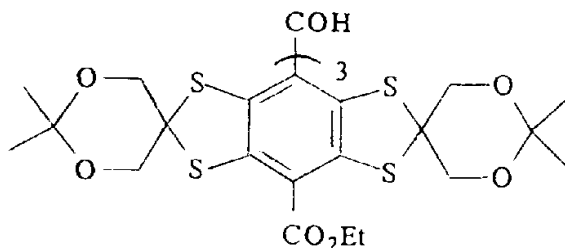
在氩气气氛下,把 4-溴代苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷)(0.99g,1.94mmol)悬浮于干燥的乙醚(28ml)中,滴加正丁基锂的环己烷溶液(2.5M,1.94mmol)。5 分钟后,缓慢加入碳酸二乙酯(0.078ml,0.64mmol)的乙醚(3ml)溶液。搅拌 18 小时后,加入乙醇(5ml),蒸发除去溶剂。产物用硅胶柱色谱纯化(以 CHCl_3 和乙酸乙酯的混合物(20:1)作洗脱液)。产率:0.65g(71%)。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7.16(s, 1H),6.01(s,1H),3.86-4.22(m,24H),1.43,1.41,1.37,1.32 (4s, 36H)。

实施例 12

15 三(8-乙氧基羰基苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊二烯-4-基-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷))甲醇

20



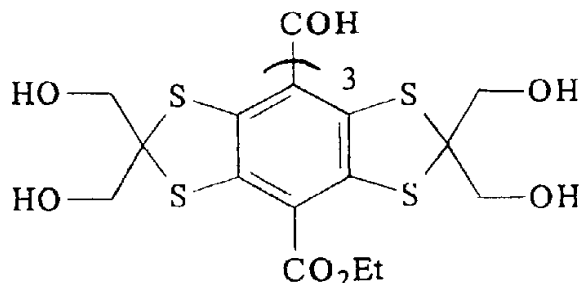
在氩气气氛下,把三(苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-4-基-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷))甲醇(0.205g,0.156mmol)溶于含有 N,N,N',N' -四甲基乙二胺(0.33ml,2.18mmol)的干燥的苯中,滴加正丁基锂的戊烷溶液(1.5M,2.18mmol)并持续搅拌 40 分钟。然后把溶液转移到另一个在 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温并含有焦碳酸二乙酯(1.3ml,8.82mmol)和苯(6ml)的烧瓶中。搅拌 45 分钟后,加入 NaH_2PO_4 的水缓冲液,分离出有机相,用水洗涤并蒸发。产物用制备性的 HPLC 纯化。产率:55mg(23%)。

30 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 6.68(s, 1H),4.41-4.52(m,6H),3.86-4.21(m,24H),1.22-1.60(m, 45H)。

实施例 13

三(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四羟基甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲醇

5



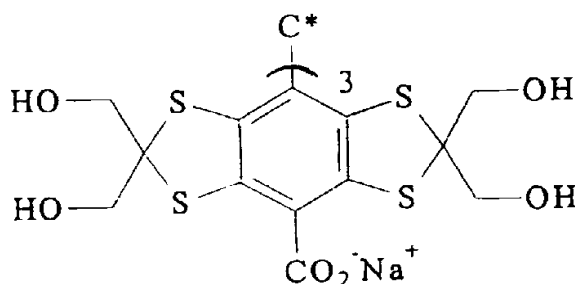
10 在氩气气氛下,把三(8-乙氧基羰基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基-2,6-二螺环-(4,4-二甲基-3,5-二噁烷))甲醇(55mg,0.0359mmol)溶于冰醋酸(20ml)和水(5ml)的混合物中,溶液在室温下搅拌 42 小时。蒸发除去溶剂,痕量的酸通过加入苯后蒸发的办法除去。 HPLC 分析表明产物纯度大于 98%。 产率: 42.4mg(91%)。

15 MS(ESP⁻,m/e): 1293(M⁺,68%),1291([M-2],100%)。

实施例 14

三(8-羧基-2,2,6,6-四羟基甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊二烯-4-基)甲基钠盐

20



25 把三(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四羟基甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲醇(3.4mg,0.0026mmol)溶于乙腈(2ml)中,溶液冷却到 0 °C。加入三氟甲磺酸(0.017ml)。 15 分钟后,加入 SnCl₂(0.4g)的乙腈(1ml)。再过 15 分钟,加入 NaH₂PO₄ 的水缓冲液,蒸发除去溶剂,把残留物悬浮于水中,用 1M 的 NaOH 水溶液把 pH 值调节到 12。搅拌 1 小时后,用 1M 的 HCl 水溶液中和溶液,蒸发除去溶剂。 产物用制备性的 HPLC 纯化。 产率: 2.0mg(60%)。

30

ESR(在水中的浓度为 1.5mM,100G): 单重峰,线宽 100mG。

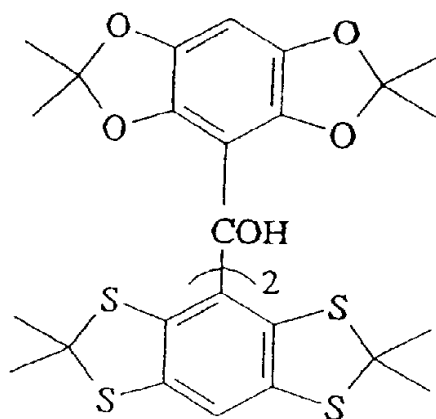
$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz}) \delta: 6.44(\text{s}, 1\text{H}), 3.85(\text{s}, 3\text{H}), 1.65(\text{s}, 12\text{H}).$

$^{13}\text{C NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz}) \delta: 163.4, 140.8, 140.6, 119.0, 99.9, 99.4, 51.8, 25.6 .$

实施例 17

5 双-(2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-4-基)-单-(2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲醇

10



15 把 2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯(2.86g, 10mmol; 按照 WO-91/12024 的方法制备)溶于干燥的 THF 中(75ml)中并冷却到 $-70\text{ }^\circ\text{C}$, 加入加正丁基锂(4.4ml, 2.5M 的己烷溶液)。反应混合物恢复到室温后,加入固体的 4-甲氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯(1.5g, 5mmol)。1 小时后,用饱和的 NaH_2PO_4 水溶液淬灭混合物的反应。倒去水层,蒸发有机层,将残留物溶解于二氯甲烷中,用水洗涤并干燥(Na_2SO_4)。产物

20 用柱色谱纯化(二氯甲烷:庚烷=1:1), 得到 1.8g(44%)纯的产物。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz}) \delta: 7.10(\text{宽的单峰}, 2\text{H}, \text{ArH}), 6.39(\text{s}, 1\text{H}, \text{ArH}), 4.79(\text{s}, 1\text{H}, \text{OH}), 1.82-1.56(\text{m}, 24\text{H}, \text{CH}_3), 1.53(\text{s}, 6\text{H}, \text{CH}_3), 1.46(\text{s}, 6\text{H}, \text{CH}_3).$

实施例 18

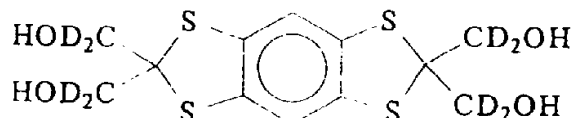
25 双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲醇

30

(4x100ml)洗涤,干燥(Na_2SO_4)并蒸发。把粗产物洗涤到不需要纯化就足以能用于下一步的纯度。产率: 3.05g(80%)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})\delta: 6.91(\text{s}, 2\text{H}), 4.29(\text{q}, J=7.2\text{Hz}, 8\text{H}), 1.38(\text{t}, J= 7.2 \text{ Hz}, 12\text{H})$ 。

实施例 22

5 2,2,6,6-四(羟基二氘代甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯



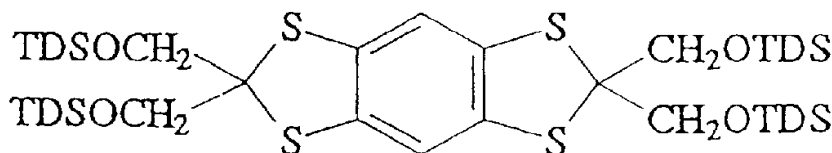
10 把苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-2,2,6,6-四羧酸四乙酯(5.0g,9.65mmol)加入到索氏提取器的上部,把氧化铝锂(1.62g,38.6mmol)和乙醚(300ml)的混合物加入到提取器的下部的圆底烧瓶中。把乙醚加热回流 20 小时,然后使混合物冷却借助于水(50ml)来滴加甲醇(150ml),用浓盐酸(20ml)酸化混合物,通过真空蒸发把溶剂减少到 50ml,过滤出白色固体,用水(2x25ml)洗涤并干燥。

产率: 3.15g(91%)。

$^1\text{HNMR}(300\text{Mhz}, \text{DMSO-d}_6): 7.06(2,2\text{H}), 5.45(\text{宽的单峰}, 4\text{H})$ 。

实施例 23

20 2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯



25 反应在氩气气氛下进行。

把 2,2,6,6-四(羟甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯(0.8g,2.2mmol)溶解于 DMF(20ml)中。加入咪唑(1.1g,15.8mmol),将溶液冷却到 0 °C,滴加(大约 2 分钟)二甲基三甲丙基氯化硅(2.8g,15.8mmol),溶液在室温下搅拌 48 小时。将反应混合物倒入冰/水中,加入 CH_2Cl_2 (100ml),把两相分离。

30 有机相用 1M HCl 和水(3x100ml)洗涤,干燥(Na_2SO_4)并蒸发溶液。产物通过以二氯甲烷-庚烷(1:9)作洗脱剂的柱色谱纯化。

产率: 1.1g(52%).

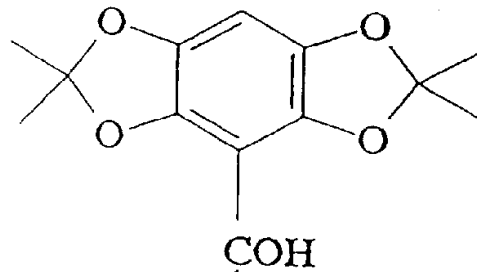
^1H NMR(CDCl_3 ,300MHz) δ : 6.84(s,2H,ArH),3.94(s,8H, CH_2),1.62(七重峰,4H, $J=6.8\text{Hz}$, CH), 0.88(d,24H, $J=6.8\text{Hz}$, CH_3),0.08(s,24H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C NMR(CDCl_3 ,75MHz) δ : 134.3,115.8,74.2,65.0,34.2,25.1,20.3,18.6,-3.6.

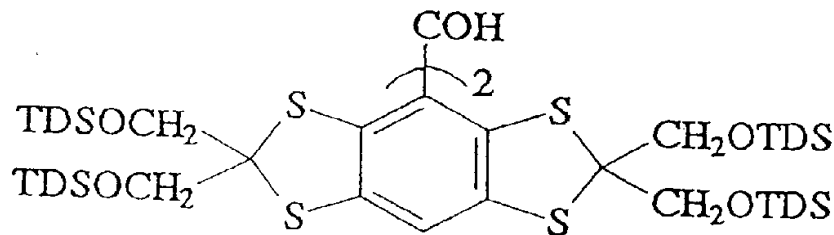
5 实施例 24

双-(2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基) 甲醇

10



15



反应在氩气气氛下进行。把 2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧甲基)-苯并
20 [1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯(7.0g,7.6mmol)溶解于干燥的 DMF(50ml)
中,将溶液冷却到-70 $^{\circ}\text{C}$,加入正丁基锂(5.0ml,1.6M 的己烷溶液),使温度恢复到
室温,再搅拌 1 小时。在室温下真空蒸发除溶剂,加入乙醚(20ml),然后一次性加
入 4-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯
(0.8g,2.9mmol),反应混合物在室温下搅拌 12 小时。将混合物倒入 NaH_2PO_4 溶
25 液中。把两相分离,水相用乙醚萃取(2x100ml),把有机相干燥(Na_2SO_4)并蒸发,
残留物用制备性的 HPLC 纯化。

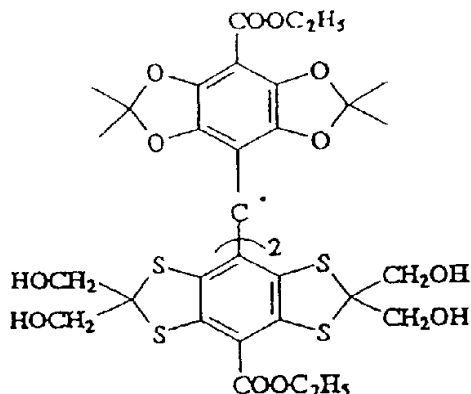
产率: 1.7g(62%).

^1H NMR(CDCl_3 ,300MHz) δ : 6.80(s,2H,ArH),6.26(s,1H,ArH),4.95(s,1H, OH),
3.80(宽的多重峰, 16H, CH_2), 1.5(宽的多重峰,20H, CH_3 + CH), 0.9(d,48H, CH_3),
30 0.7 (s,48H, CH_3),0.2(2s,48H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C NMR(CDCl_3 ,75MHz) δ : 141.5,140.3,139.8,139.6,131.7, 118.6,117.1,108.1,

4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲基

5



10

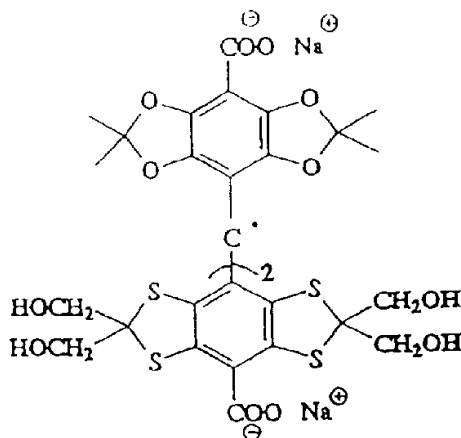
在氩气气氛下,把双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟甲基)苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲醇(294mg,0.25mmol)溶解于乙腈(70ml)中。将溶液冷却到 0 °C 后,加入三氟甲磺酸(190μL,2.2mmol),搅拌 3 分钟后,加入溶解在乙腈(7ml)中的氯化锡(II)(48mg,0.25mmol)。1 分钟后,加入饱和的 NaH₂PO₄ 溶液(50ml),水相用乙腈(2x50ml)洗涤。将合并的有机相干燥(Na₂SO₄)并蒸发,经制备性的 HPLC 纯化,得到 176mg(61%)纯的产物。

20 ESR(H₂O,200G): 单峰,线宽 433mG。

实施例 27

双-(8-羧基-2,2,6,6-四(羟甲基)苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-羧基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲基钠盐

25



30

把双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟甲基)苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲基(316mg,0.275mmol)溶解于 1M NaOH 水溶液(3ml)、水(1.5ml)和乙醇(3ml)中。溶液在室温下搅拌 15 分钟,蒸去乙醇,残留物在室温下再搅拌 2 小时。接近蒸干时,依次通过制备性的 HPLC 和冷冻干燥分离出纯粹的酸(240mg,82%)。通过加入水(50ml),然后用 1M NaOH 水溶液把 pH 调节到 7 并进行冷冻干燥的办法,把酸转变为相应的钠盐。

ESR(3.4mM 的水溶液,200G): 单峰,线宽 120mG。

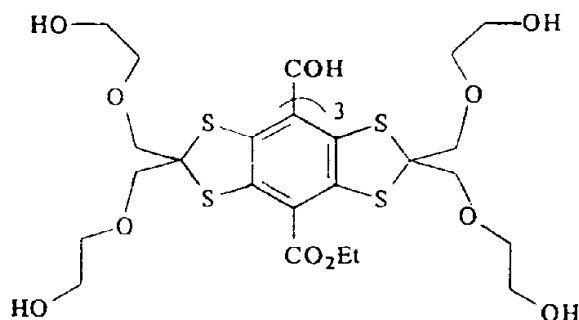
核极化效应增强值(上述的水溶液): 164(在 5W 的微波功率下)

10 稳定性测量值: 在没有排除空气的水中的半衰期为 120 小时。

实施例 28

三-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟乙基)甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-甲醇

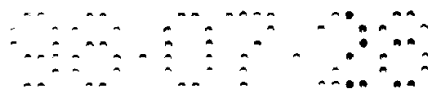
15



20

把三-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四羟甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲醇(实施例 13)(169mg,0.13mmol)与氢化钠(280 mg,80%的矿物油溶液)和 2-(2-溴代乙氧基)四氢吡喃(2.16g,10.3mmol)一起溶解于 N,N-二甲基乙酰胺(18ml)中。反应混合物在 55 °C 搅拌 3.5 小时,使其冷却,然后将其倒入磷酸钠缓冲水溶液(100 ml,pH7)中。用二氯甲烷萃取后,把有机相干燥,蒸去溶剂,将残留物溶解于甲醇(30ml)和水(4ml)的混合物中,然后用 2M 的 HCl 水溶液把 pH 值调节到 0.8,溶液再在室温下搅拌 15 分钟。溶液用 NaHCO₃ 水溶液中和,蒸去溶剂,产物用制备性的 HPLC(RP-18,甲醇-水:40-60)纯化。

30



产率: 142mg(60%).

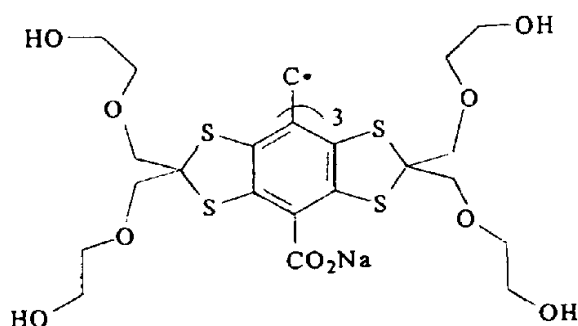
$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CD_3OD) δ : 4.42(6H, q, $J=7\text{Hz}$), 3.48-4.16(84H, m), 1.43(9H, t, $J=7\text{Hz}$).

MS(ESP, m/e): 1822(73%), 1821(78%), 1820(96%), 1819(100%).

5 实施例 29

三-(8-羧基-2,2,6,6-四(羟乙基)甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-甲基钠盐

10



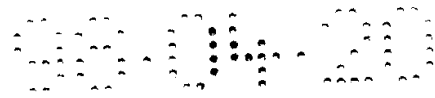
15

把三-(8-乙氧基羧基-2,2,6,6-四(羟乙基)甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲醇(40mg, 0.022mmol)溶解于乙酸酐(5ml)和吡啶(10ml)的混合物中,溶液在室温下搅拌 2 小时。蒸去有机溶剂,将残留物溶解于二氯甲烷,并用水洗涤。蒸去溶剂后,将残留物溶解于二氯甲烷(8 ml),然后在 0 °C 下加入三氟甲磺酸的二氯甲烷溶液(0.58mmol 溶于 4ml)。搅拌 2 分钟后,加入 SnCl_2 的乙腈溶液(2mg 溶于 2ml),再将溶液搅拌 1 分钟。把反应混合物倒入 pH=7 的磷酸钠缓冲水溶液中,分离出有机相,水相用二氯甲烷(25ml)萃取。把合并的有机相干燥(Na_2SO_4)并蒸去溶剂。残留物用乙醇(10ml)溶解,加入 1M 氢氧化钠水溶液(3 ml)。在室温下搅拌 1 小时后,用 1M HCl 水溶液把 pH 调节到 2,然后用制备性的 HPLC 纯化溶液 (RP-18, $\text{CH}_3\text{CN-HCl}(\text{pH}_2)$:20:80)。将含有纯粹的产物的组分合并,蒸去乙腈,把残留的水溶液冷冻干燥,将残留物溶解于水,溶液用 1M 的 NaOH 水溶液中中和,再将溶液冷冻干燥。

产率: 24mg(62%).

30 ESR(1mM 的水溶液, 100G): 单峰, 线宽 116mG。

实施例 30



下列实施例是用羟基三苯甲基自由基在 Picker Nordstar MEGA4 250-300Hz 仪器上进行的,通过把主磁场强度从 0.1T 减小到 0.01T,并且配置一个 VHF 发射器发射频率为 200-300MHz、功率为 0-100W 的 VHF 射线来使该仪器适用于 OMRI。

5 (a)大鼠心脏、大脑、肝脏和腺体组织的形态学矢量 OMRI 扫描血管造影

对重 125g 的大鼠成像。把剂量为 1.5mmol/kg 的自由基以 1.5ml 的体积、10 秒的注射时间(在成像前 15 分钟进行)注入尾静脉中。结果如图 13 所示。

参数:

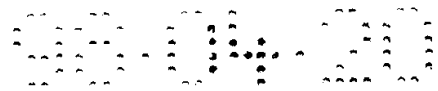
	扫描时间	4:36 分钟
10	TR/TE	270ms/20ms
	狭缝	4mm
	象素大小	$0.5 \times 0.5\text{mm}^2$
	平均值	4
	T-vhf	200ms
15	采样时间	24ms
	样品频率	21kHz
	样品基板	512×192 (在阅读方向过量采样)
	记录仪基板	192×192
	后处理	再取样到 348×348 基板

20 (b)心肌梗死

对重 110g 的大鼠成像。把剂量为 2.0m mol/kg 的自由基以 1.8ml 的体积 5 秒注射时间(在成像前 20 分钟进行)注入尾静脉中。结果如图 13 所示。

参数:

	扫描时间	3:15 分钟
25	TR/TE	190ms/20ms
	狭缝	4mm
	象素大小	$0.5 \times 0.5\text{mm}^2$
	平均值	4
	T-vhf	125ms
30	采样时间	24ms
	样品频率	21kHz



样品基板	512 × 256(在阅读方向过量采样)
记录仪基板	256 × 256
后处理	Y - 校正
注释	注射后 8 分钟杀死

5

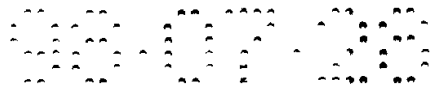
10

15

20

25

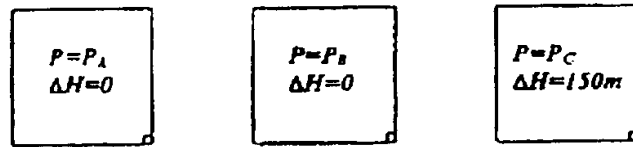
30



实施例 31

使用全氘代的羟基三苯甲基自由基的代表本发明“基本方法”的简式。
 自变宽和氧变宽由方程 1 给出,非均匀变宽为 $\Delta H_{pp}^G = 60mG$, 弛豫为 $0.4mM^{-1}s^{-1}$ 。

5 图象 A,B 和 C:



10
$$I_A = \left\{ 0.4mM^{-1}s^{-1}c_{rad} \left[1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{90mG} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{-2H'^2/(60mG)^2\} \frac{1 + \frac{4}{3}H'^2/\Delta H_{pp}^L}{1 + \frac{4}{3}H'^2/\Delta H_{pp}^L + \frac{2}{\sqrt{3}}\alpha P_A \gamma_e T_{1c} / \Delta H_{pp}^L} dH' \right] - 1 \right\}$$

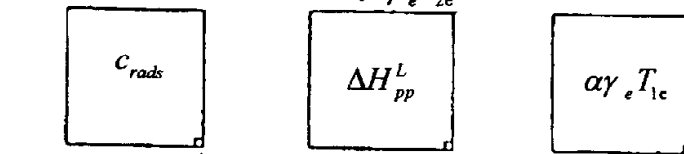
10
$$I_B = \left\{ 0.4mM^{-1}s^{-1}c_{rad} \left[1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{90mG} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{-2H'^2/(60mG)^2\} \frac{1 + \frac{4}{3}H'^2/\Delta H_{pp}^L}{1 + \frac{4}{3}H'^2/\Delta H_{pp}^L + \frac{2}{\sqrt{3}}\alpha P_B \gamma_e T_{1c} / \Delta H_{pp}^L} dH' \right] - 1 \right\}$$

15

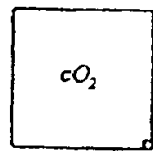
$$I_C = A_X \left\{ 0.4mM^{-1}s^{-1}c_{rad} \left[1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{90mG} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{-2H'^2/(60mG)^2\} \frac{1 + \frac{4}{3}(\Delta H - H')^2 / \Delta H_{pp}^L}{1 + \frac{4}{3}(\Delta H - H')^2 / \Delta H_{pp}^L + \frac{2}{\sqrt{3}}\alpha P_C \gamma_e T_{1c} / \Delta H_{pp}^L} dH' \right] - 1 \right\}$$

解出三个未知数 c_{rad} , $\Delta H_{pp}^L = \frac{2}{\sqrt{3}\gamma_e T_{1c}}$ 和 $\alpha \gamma_e T_{1c}$

20



25



方程 1

$$cO_2 = (\Delta H_{pp}^L - 215c_{rad} - 20) / 428$$

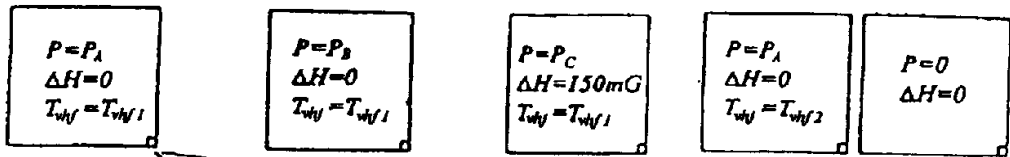
30



实施例 32

使用全氘代的羟基三苯甲基自由基的、代表本发明的优选方法的简式。
自变宽和氧变宽由方程 1 给出,非均匀变宽为 $\Delta H_{pp}^G=60mG$,驰豫为 $0.4mM^{-1}s^{-1}$ 。

5 图象 A,B,C,D 和 E:



10 在象素/象素基础上

从方程4计算 T_1 ,
并用 T_1 对所有的
强度进行校正

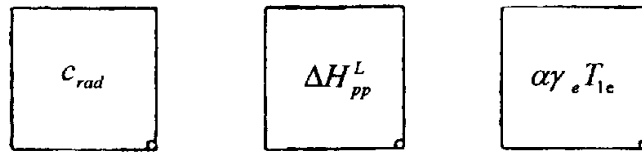
$$\frac{I_A}{I_E} = A \left\{ 0.4mM^{-1}s^{-1}c_{rad} \left[1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{90mG} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{-2H'^2/(60mG)^2\} \frac{1 + \frac{4}{3} H'^2/\Delta H_{pp}^L}{1 + \frac{4}{3} H'^2/\Delta H_{pp}^L + \frac{2}{\sqrt{3}} \alpha P_A \gamma_e T_{1e} / \Delta H_{pp}^L} dH' \right] - 1 \right\}$$

$$15 \quad \frac{I_B}{I_E} = A \left\{ 0.4mM^{-1}s^{-1}c_{rad} \left[1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{90mG} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{-2H'^2/(60mG)^2\} \frac{1 + \frac{4}{3} H'^2/\Delta H_{pp}^L}{1 + \frac{4}{3} H'^2/\Delta H_{pp}^L + \frac{2}{\sqrt{3}} \alpha P_B \gamma_e T_{1e} / \Delta H_{pp}^L} dH' \right] - 1 \right\}$$

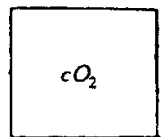
$$\frac{I_C}{I_E} = A_X$$

$$20 \quad \left\{ 0.4mM^{-1}s^{-1}c_{rad} \left[1 - \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{90mG} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\{-2H'^2/(60mG)^2\} \frac{1 + \frac{4}{3} (\Delta H - H')^2 / \Delta H_{pp}^L}{1 + \frac{4}{3} (\Delta H - H')^2 / \Delta H_{pp}^L + \frac{2}{\sqrt{3}} \alpha P_C \gamma_e T_{1e} / \Delta H_{pp}^L} dH' \right] - 1 \right\}$$

解出三个未知数 c_{rad} , $\Delta H_{pp}^L = \frac{2}{\sqrt{3}\gamma_e T_{1e}}$ 和 $\alpha \gamma_e T_{1e}$



25



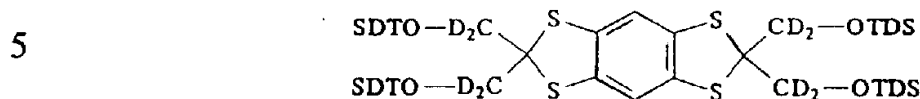
方程 1

$$c_{O_2} = (\Delta H_{pp}^L - 215c_{rad} - 20) / 428$$

30

实施例 33

2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧基(²H₂ - 甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊二烯



反应在氩气气氛下进行。

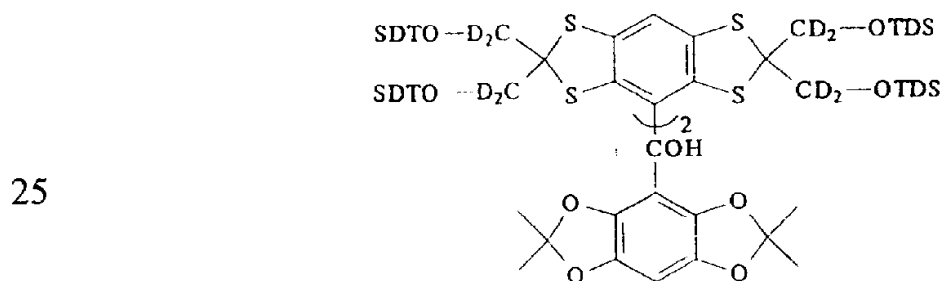
10 把 2,2,6,6-四(羟基(²H₂ - 甲基)-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯 (29.1g,81mmol)溶解于 DMF(176ml)中,加入咪唑(44.3g,650mmol),将溶液冷却到 0 ℃,滴加二甲基三甲丙基氯化硅(87.2g,96mmol),溶液在室温下搅拌 48 小时。反应混合物用庚烷萃取(4x200ml),然后蒸发合并的庚烷相。残留物通过用二氯甲烷-庚烷(1:9)作洗脱剂的柱色谱纯化。

产率: 37.6g(55%)。

15 ¹HNMR(CDCl₃,300MHz) δ: 6.84(s,2H,ArH),1.62(七重峰,4H,J=6.8Hz, C H),0.88 (d,24H, J=6.8Hz,CH₃),0.84(s,24H, CH₃),0.08(s,24H, Si(CH₃)₂)。

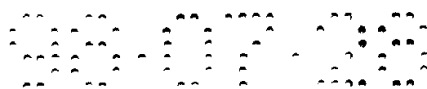
实施例 34

20 双-(2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧基(²H₂ - 甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基-单-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲醇



反应在氩气气氛下进行。

30 把 2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧基(²H₂ - 甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯(80.9g,88mmol)溶解于干燥的 DMF(300ml)中,将溶液冷却



到-70 °C,加入正丁基锂(70ml,2.5M 的己烷溶液),使温度恢复到室温,再搅拌 1 小时。在室温下真空蒸发除去溶剂,加入乙醚(200ml),然后一次性加入 4-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯(11.7g,42mmol),反应混合物在室温下搅拌 16 小时。将混合物倒入饱和的 NaH₂PO₄ 溶液(200ml) 5 和水(200ml)的混合物中。把两相分离,水相用乙醚萃取(2x200ml),把有机相干燥(Na₂SO₄)并蒸发,残留物用制备性的 HPLC 纯化。

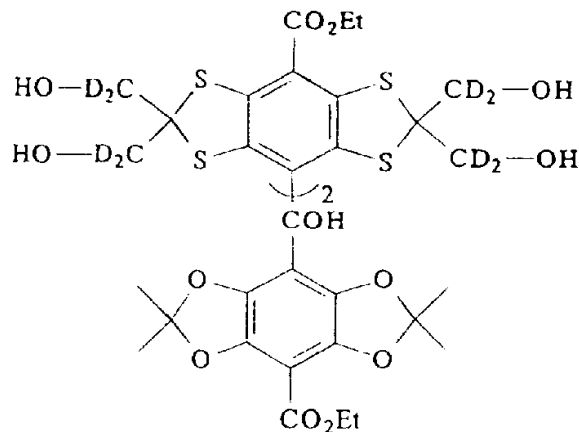
产率: 51.5g(56%)。

¹H NMR(CDCl₃,300MHz) δ: 6.80(s,2H,ArH),6.33(s,1H,ArH),4.95(s,1H,OH), 1.5(宽的多重峰,20H,CH₃+CH),0.9(d,48H,CH₃), 0.7 (s,48H,CH₃),0.2(2s, 48H, Si 10 (CH₃)₂)。

实施例 35

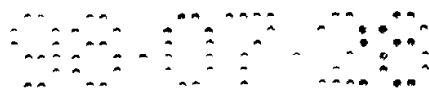
双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟基(²H₂ - 甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲醇

15



20

25 在氩气气氛下,把双-(2,2,6,6-四(二甲基三甲丙基硅氧基(²H₂ - 甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲醇(54g,26mmol)与 TMEDA(54ml)一起溶解于庚烷(216ml)和干燥的苯(178ml)中,将溶液冷却到-22 °C,加入叔丁基锂(54ml,2.5M 的戊烷溶液)。在-22 °C 搅拌 1 小时后,把反应混合物转移到在-40 30 °C 恒温的焦碳酸二乙酯(216ml,1.47mol)的庚烷(640ml)溶液中,然后使反应混合物恢复到室温,再搅拌 1 小时,加入饱和的 NaH₂PO₄ 溶液(40ml)。把混合物搅

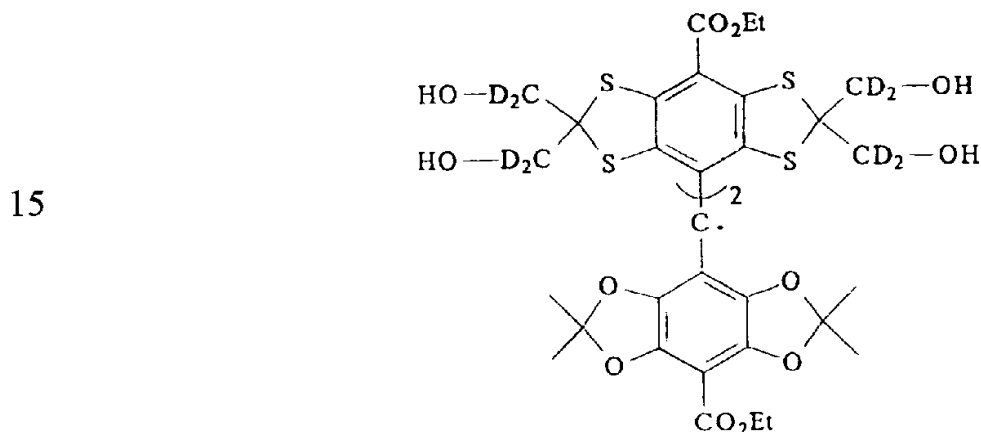


拌 1 小时,分离出有机相,用水(2x100ml)和乙腈(2x100ml)洗涤。蒸发庚烷/苯相,然后溶解于 THF(380ml)中,加入 Bu_4NF 的 THF(300ml,300mmol)溶液,混合物搅拌过夜。蒸去溶剂后,残留物用制备性的 HPLC 纯化,得到 11.4mg(39%)纯的产物。

5 ^1H NMR(CDCl_3 ,300MHz) δ : 5.77-5.92(m,6H),5.11-5.51(m,8H),2.98-3.24(m,12H), 2.90(t, 6H, $J=7.0\text{Hz}$), 2.84(t,3H, $J=6.9\text{Hz}$).

实施例 36

10 双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟基 $^2\text{H}_2$ -甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲醇



20

在氩气气氛下,把双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟基($^2\text{H}_2$ -甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二氧杂环戊烯-4-基)甲醇(5.07g,4.30mmol)溶解于乙腈(650ml)中。将溶液冷却到 0°C 后,加入三氟甲磺酸(2.2ml),搅拌 3 分钟后,加入溶解在乙腈(90ml)中的氯化锡(II)(447mg,2.36mmol)。1 分钟后,加入饱和的 NaH_2PO_4 溶液(200ml),水相用乙腈(2x50ml)洗涤。将合并的有机相干燥(Na_2SO_4)并蒸发,经制备性的 HPLC 纯化,得到 2.66mg(53%)纯的产物。

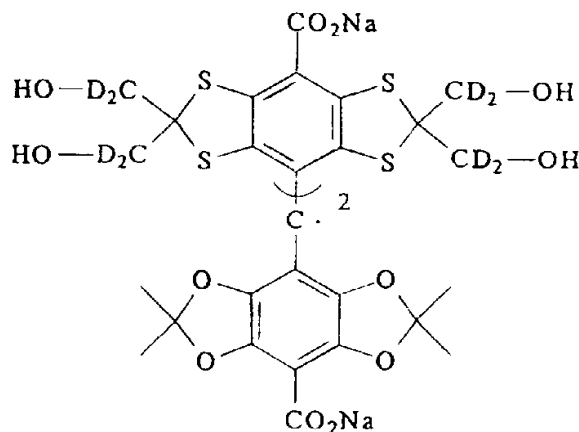
25 ESR(H_2O ,200G):单峰,线宽 268mG。

30 实施例 37

双-(8-羧基-2,2,6,6-四(羟基($^2\text{H}_2$ -甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环

戊烯-4-基)-单-(8-羧基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲基钠盐

5



10

把双-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四(羟基(²H₂ 甲基))-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)-单-(8-乙氧基羰基-2,2,6,6-四甲基苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)二氧杂环戊烯-4-基)甲基(7.48g,6.4mmol)溶解于 1MNaOH 水溶液(80ml)和乙醇(80ml)的混合物中,溶液在室温下搅拌 15 分钟,蒸去乙醇,残留物在室温下再搅拌 1 小时。接近蒸干时,依次通过制备性的 HPLC 和冷冻干燥分离出纯粹的酸。通过加入水(50ml),然后用 1M NaOH 水溶液把 pH 调节到 7 并进行冷冻干燥的办法,把酸转变为相应的钠盐。产率: 3.96g(55 %)

20 ESR(1mM 的水溶液,200G): 单峰,线宽 60mG。

说明书附图

图 1

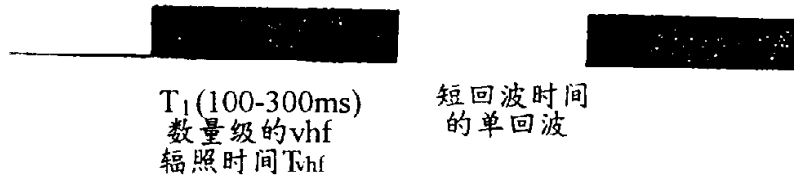
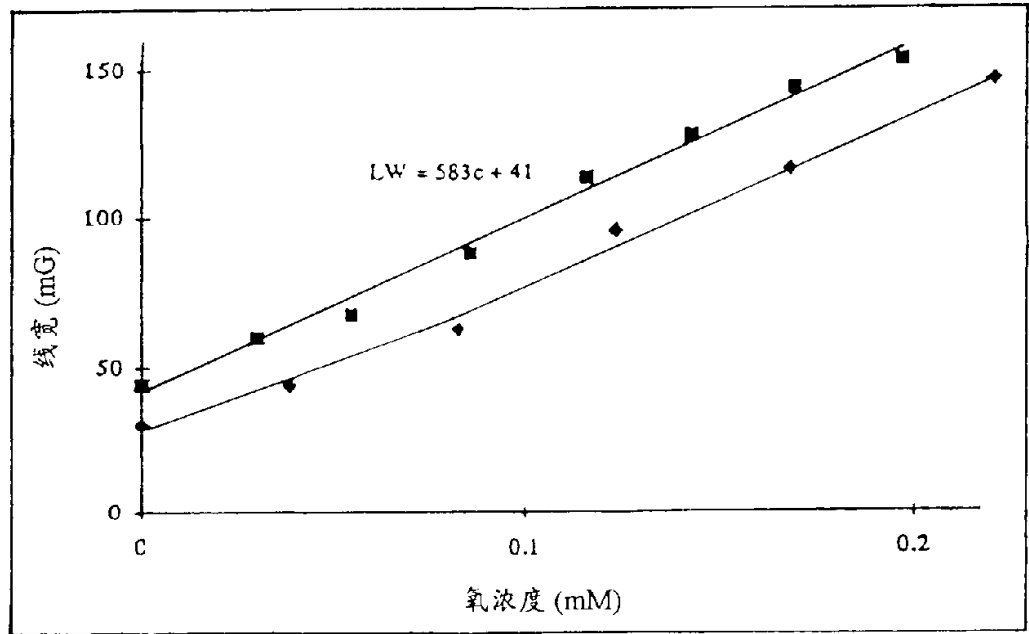
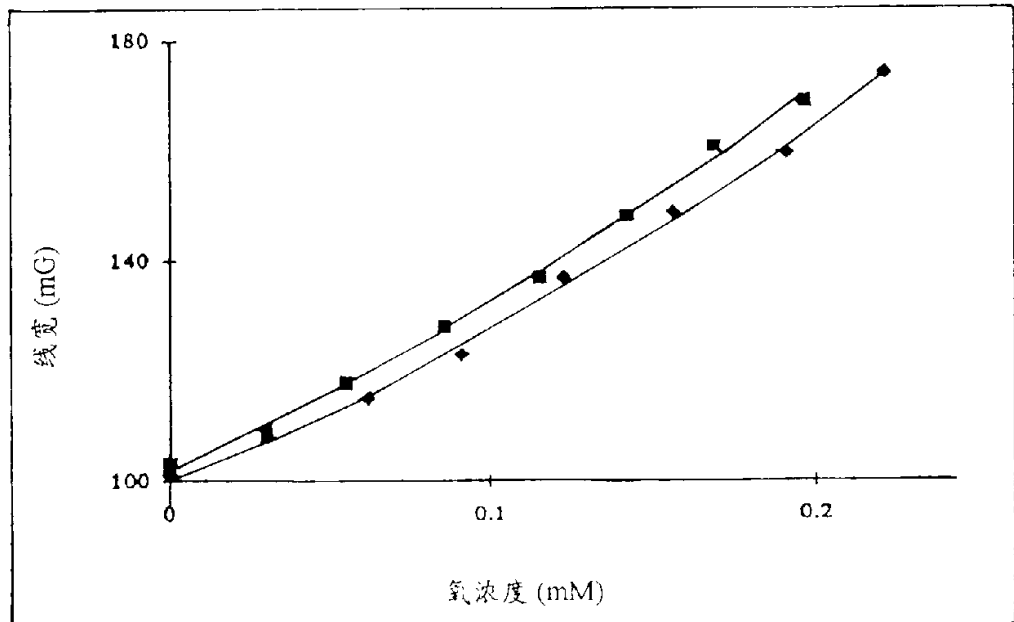


图 2



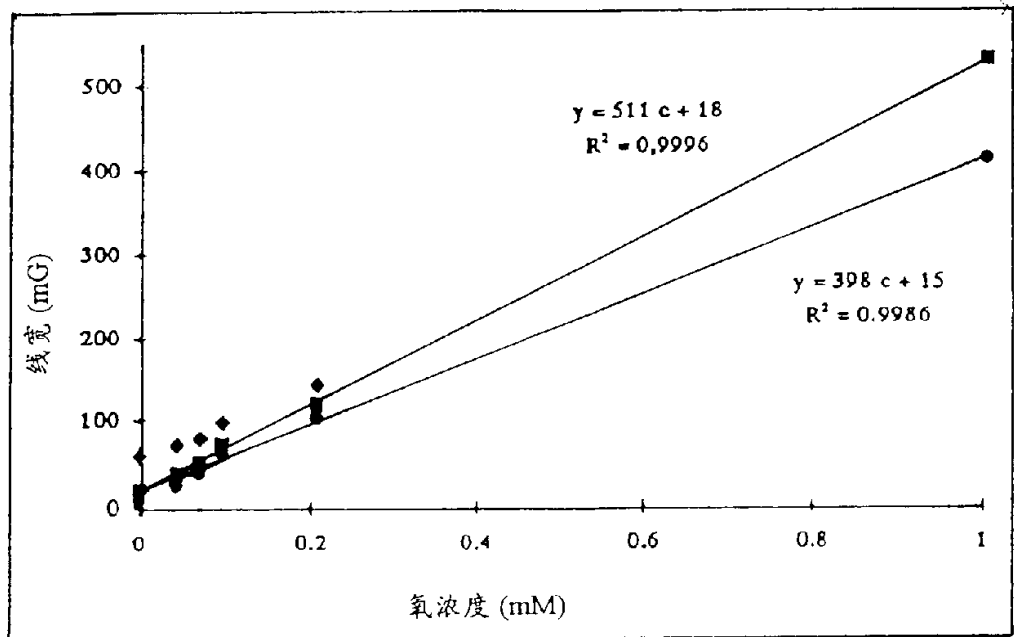
在37℃下, ◆ 水和 ■ 血浆中的
全氟代的三苯基甲基自由基,
在X-波段测得的线宽随氧浓度的变化。

图 3



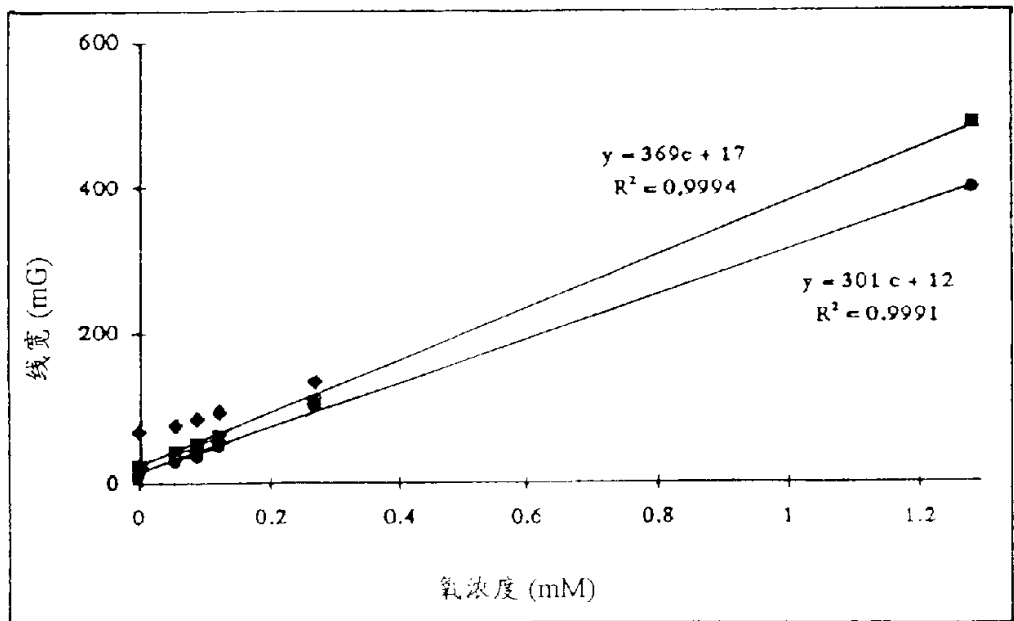
在37℃下, ◆ 水和 ■ 血浆中的未氟代的羟基三苯基甲基自由基,
在X-波段测得的线宽随氧浓度的变化。

图 4



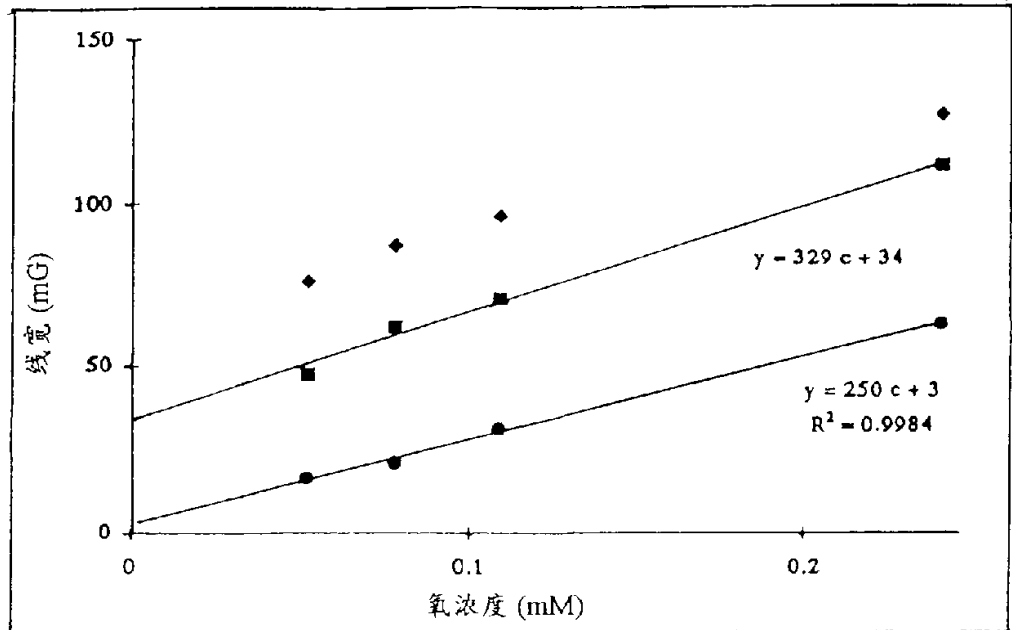
在37°C下,测得的氘代的羟基三苯基甲基自由基,
◆包络和■洛仑兹型线宽和● $2(\sqrt{3}\gamma_e T_{1c})^{-1}$

图 5



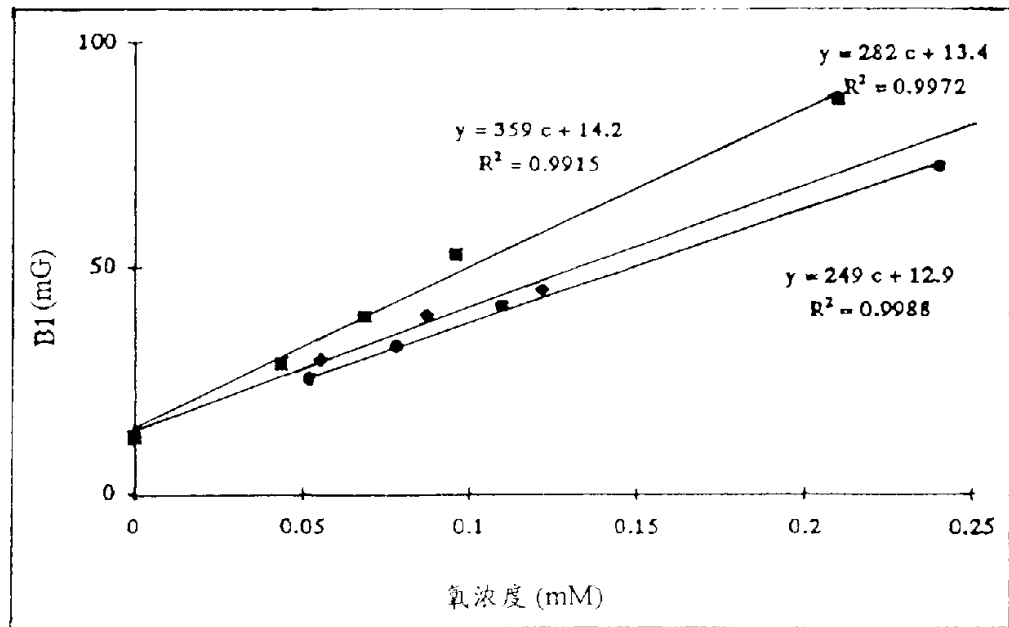
在23°C下水中的氘代的羟基三苯基甲基自由基,
◆包络和■洛仑兹型线宽和● $2(\sqrt{3}\gamma_e T_{1c})^{-1}$

图 6



在23℃下, 血液中的氙代的羟基三苯基甲基自由基
 ◆ 包络 ■ 洛仑兹型线宽和 $2(\sqrt{3}\gamma_e T_{1e})^{-1}$

图 7



$(\gamma_e \sqrt{T_{1e} T_{2e}})^{-1}$ 或 DNP 最大增强值一半时的 B_1 (mG),
 在37℃ ■ 水中和 ● 血液中及23℃ ◆ 水中的氙代的羟基三苯基甲基自由基

图 8

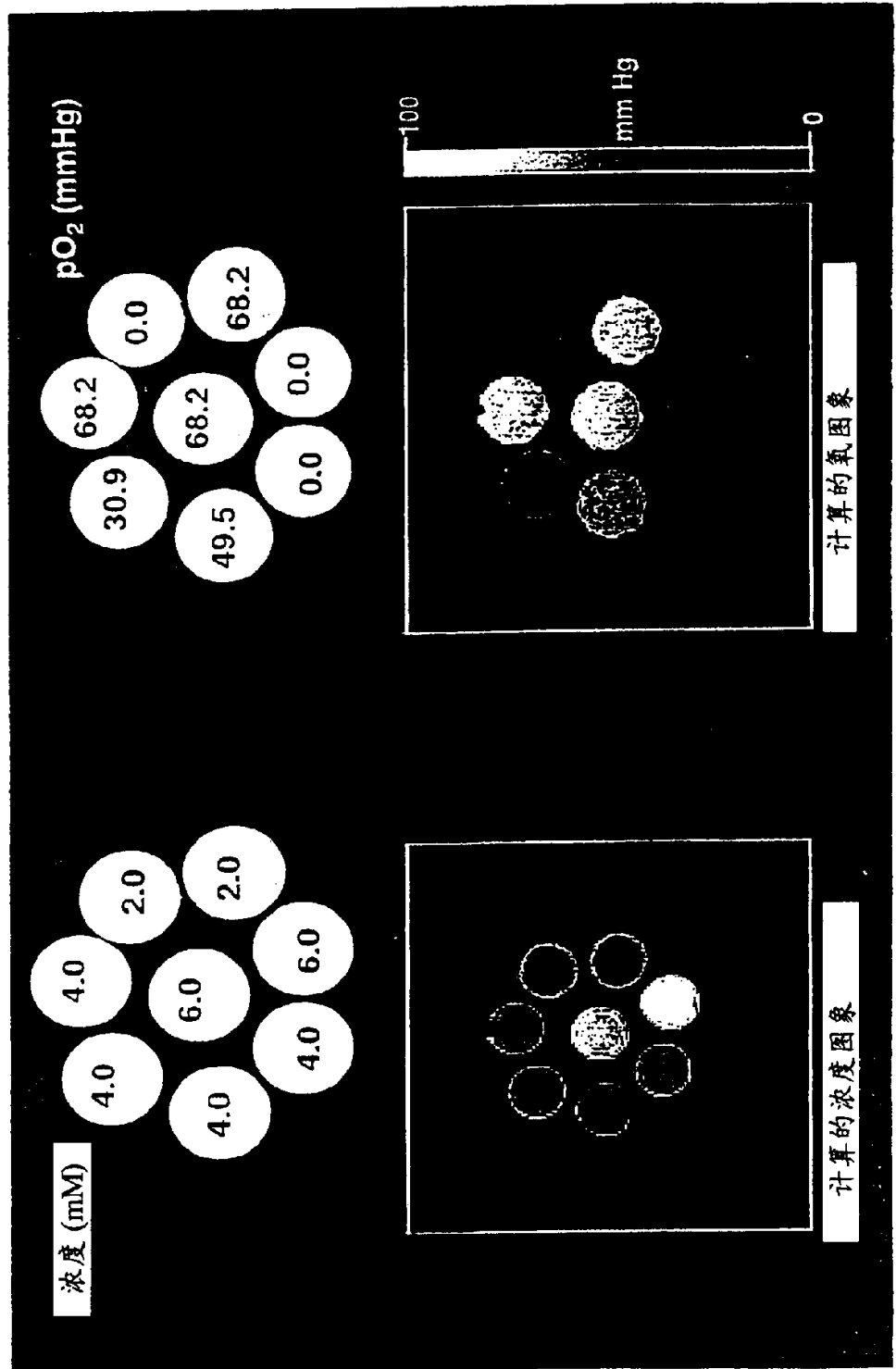


图 9

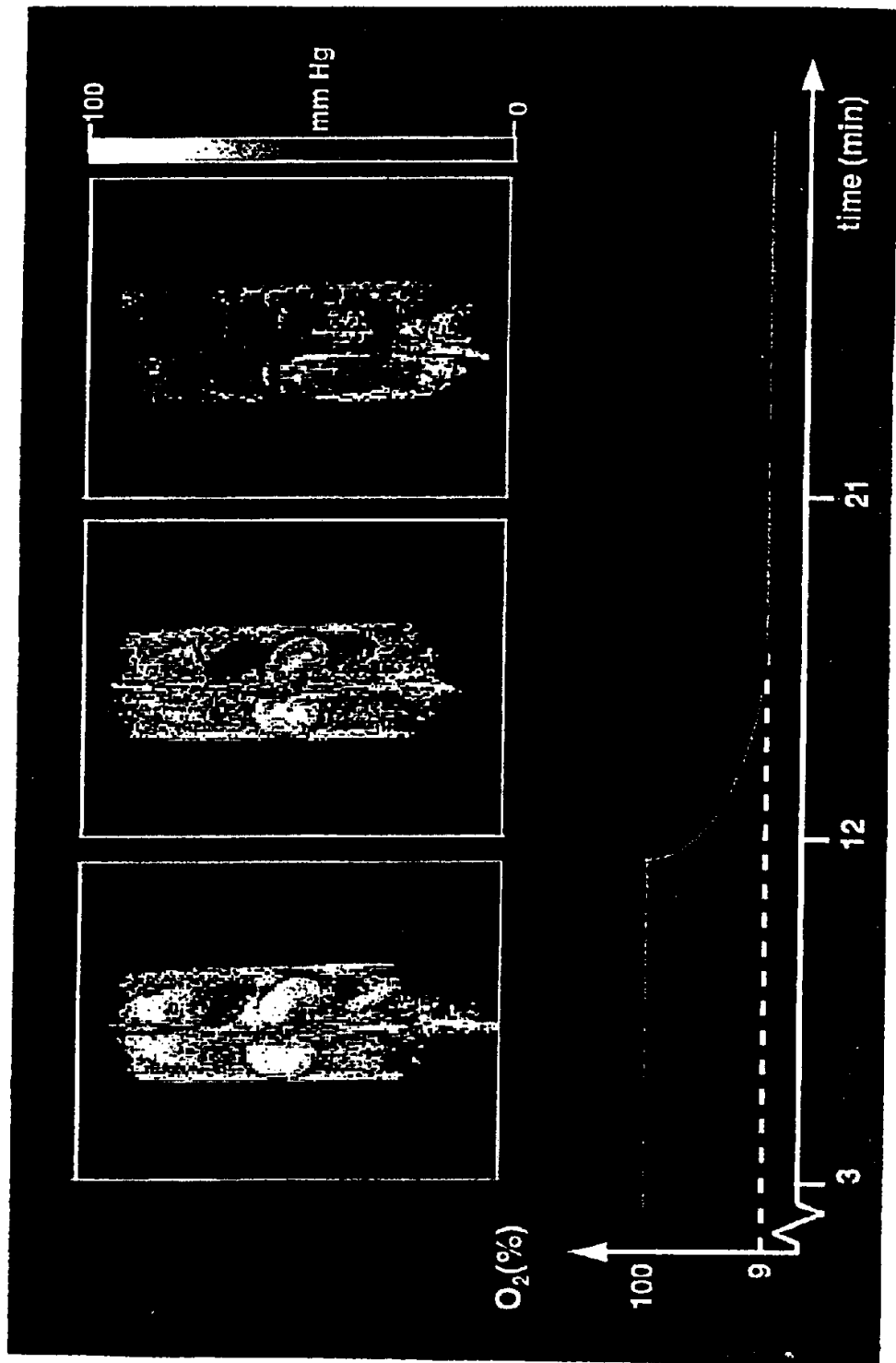


图 10

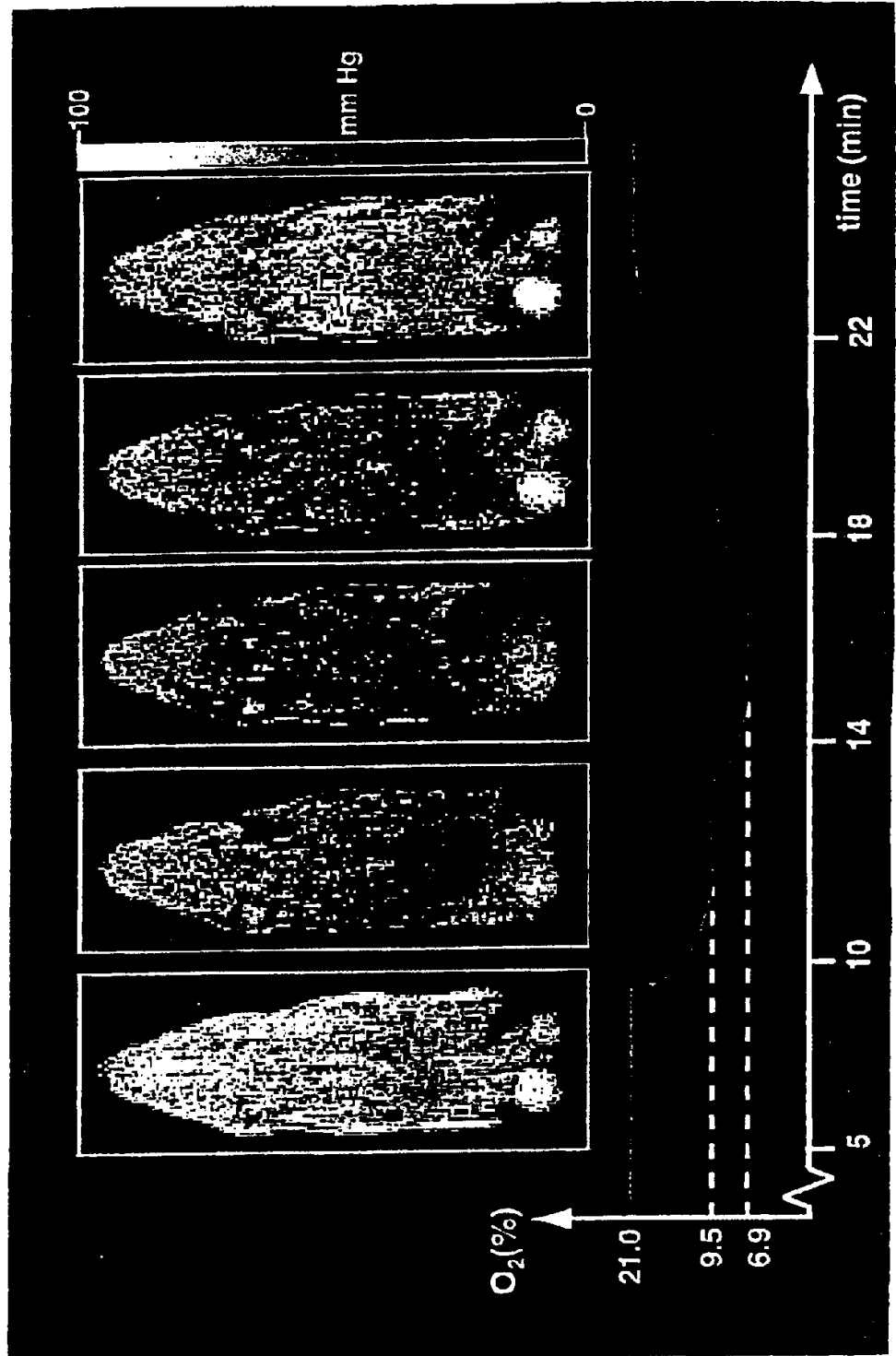


图 11

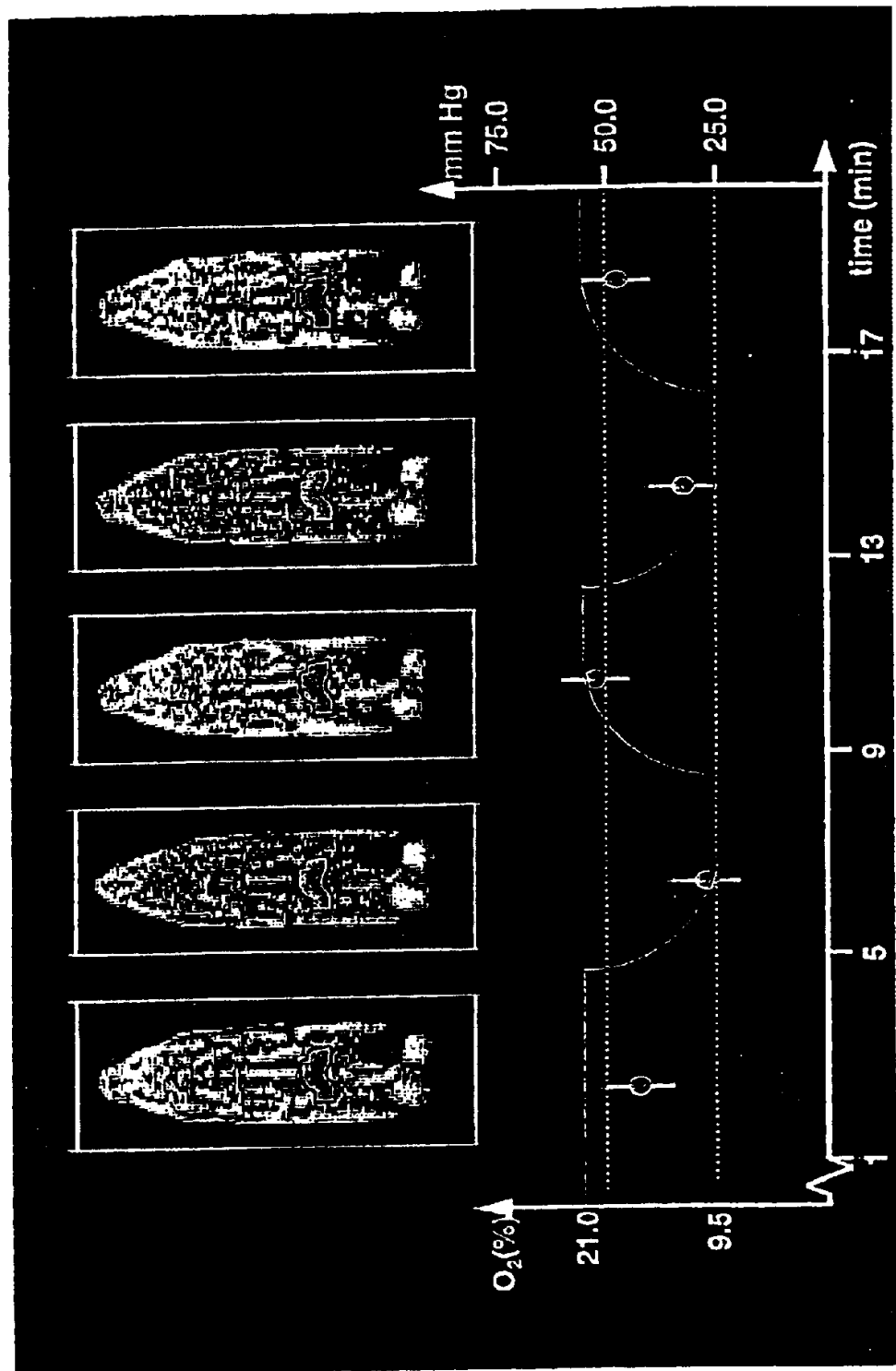


图 12

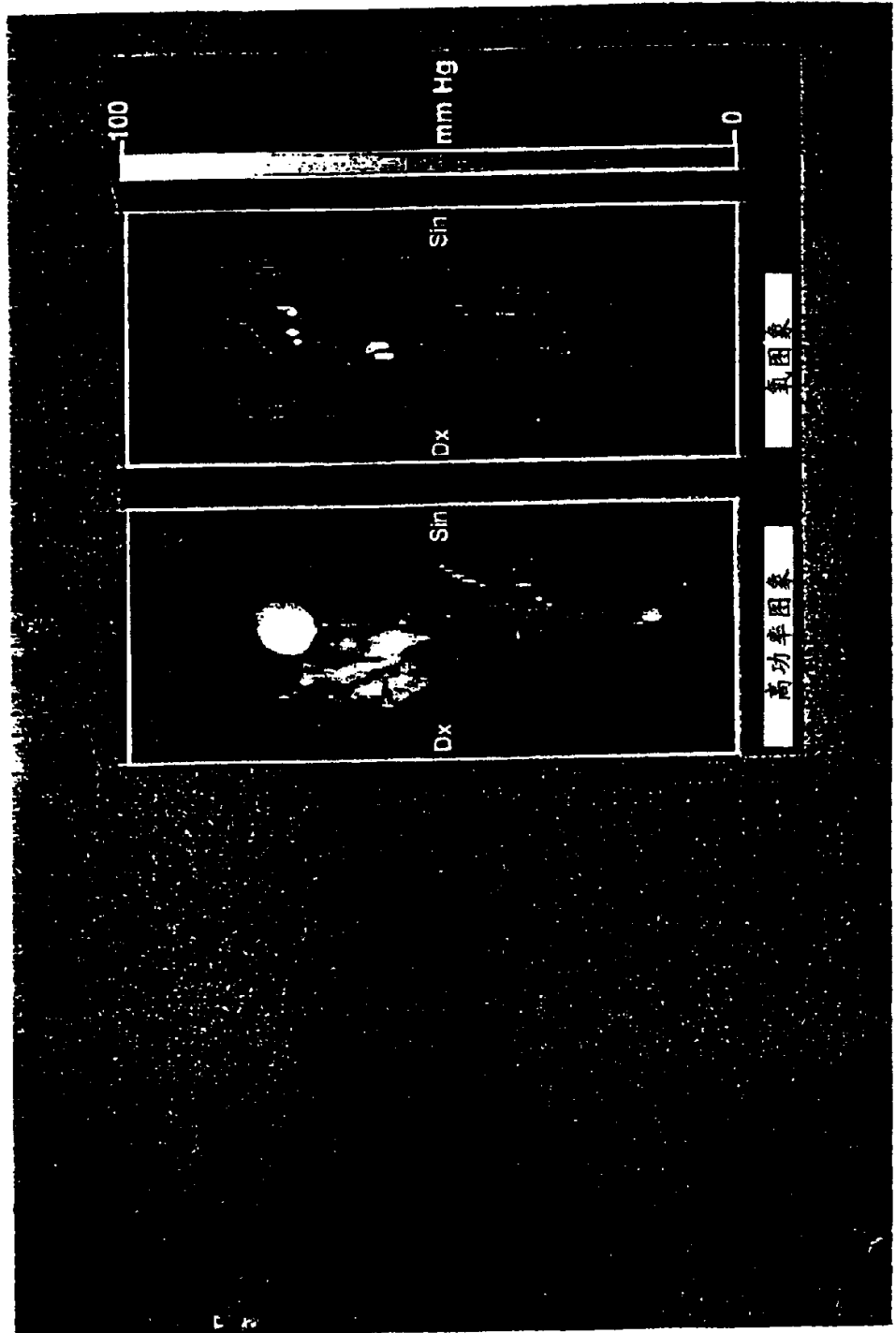


图 13

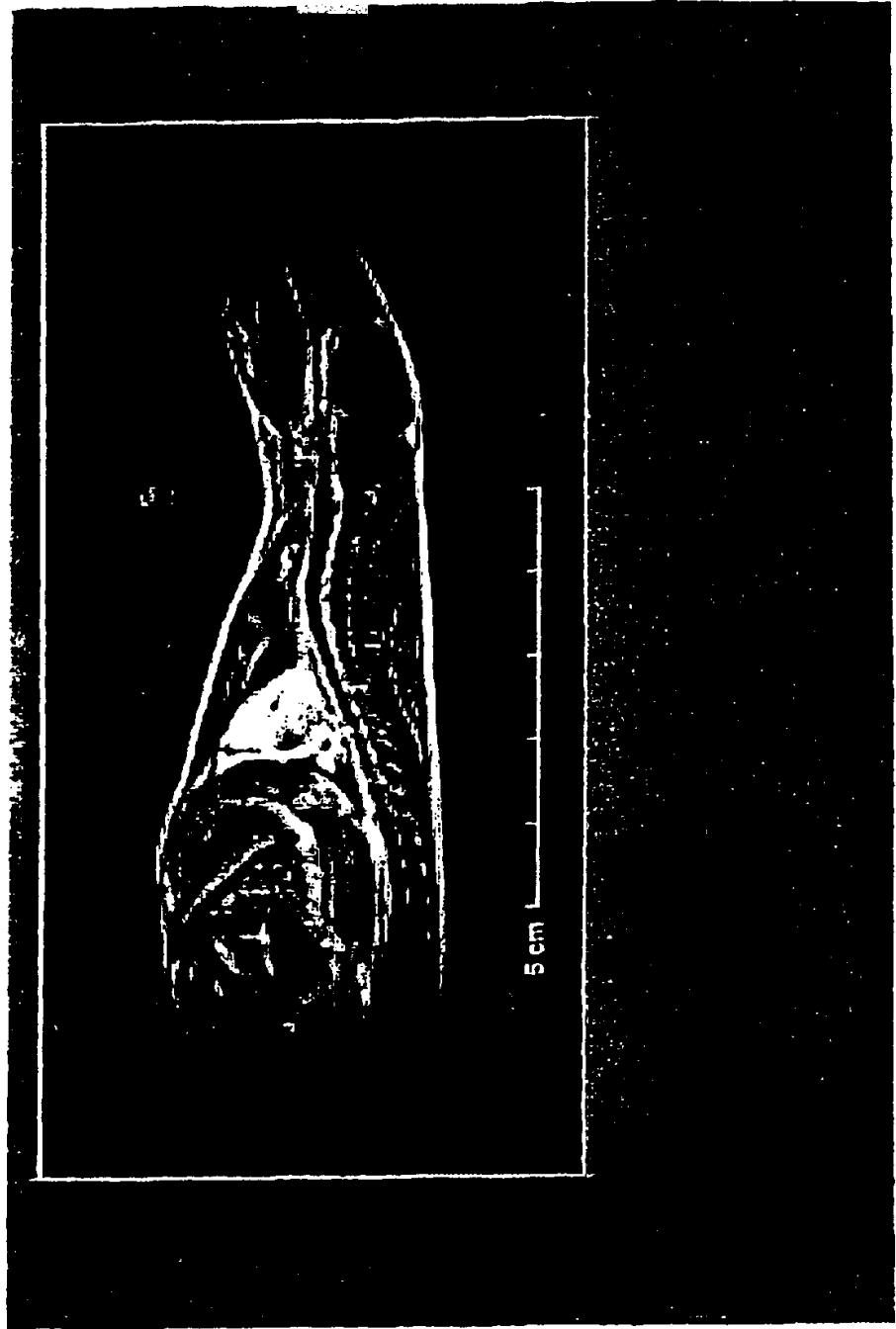


图 14

