

文章编号:0253-9950(2011)04-0252-05

阿片受体显像剂 ^{11}C -Carfentanil的前体合成及放射性标记

张锦明¹, 桂媛², 徐志红², 张晓军¹, 向晓辉³, 田嘉禾¹

1. 中国人民解放军总医院 核医学科, 北京 100853;

2. 江苏常熟华益化工有限公司, 江苏 常熟 215522; 3. 北京大学神经科学研究所, 北京 100191

摘要:为合成 μ -阿片受体显像剂:1-(2-苯乙基)-4-(*N*-苯基丙酰胺基)哌啶-4-羧酸 ^{11}C 甲酯(^{11}C)-methyl 1-phenethyl-4-(*N*-phenylpropanamido)piperidine-4-carboxylate, ^{11}C -CFN), 合成了标记前体:1-苯乙基-4-(*N*-苯基丙酰胺基)哌啶-4-羧酸, 并用 ^{11}C 标记。标记前体和各步合成中间体均经核磁和质谱确证。采用 ^{11}C -Triflate- CH_3 标记, Sep-Pak 柱层纯化, 标记率为 $(67.3 \pm 2.3)\%$ ($n=3$), 产物放化纯度大于98%, 比活度为 1.67×10^{14} Bq/g (66.6 PBq/mol), 基本满足临床研究的需求。

关键词: ^{11}C ; 阿片受体; ^{11}C -Carfentanil; PET

中图分类号: TL923 **文献标志码:** A

Organic Synthesis of Precursor and Radiolabelling of ^{11}C -Carfentanil as Opiate Receptor Imaging Agent

ZHANG Jin-ming¹, GUI Yuan², XU Zhi-hong², ZHANG Xiao-jun¹, XIANG Xiao-hui³, TIAN Jia-he¹

1. Department of Nuclear Medicine, The PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Huayi Chemicals Co. Ltd., Changshu 215522, China;

3. Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: The ^{11}C -methyl 1-phenethyl-4-(*N*-phenylpropanamido)piperidine-4-carboxylate (^{11}C -Carfentanil) as μ opiate receptor imaging agent and its precursor have been synthesized. The precursor has been confirmed by ^1H NMR and MS. ^{11}C -Carfentanil was prepared without using HPLC purification. Labeling yields, radiochemistry purity and specific activity are $(67.3 \pm 2.3)\%$ ($n=3$), 98% and 1.67×10^{14} Bq/g (66.6 PBq/mol) respectively.

Key words: ^{11}C ; opiate receptor; ^{11}C -Carfentanil; PET

^{11}C 标记的卡芬太尼(^{11}C -Carfentanil, ^{11}C -CFN)是一个选择性很强的 μ -阿片受体显像剂, 可用于人中枢神经 μ -阿片受体的显像, 以研究阿片受体的药理机制、针灸止痛的机理^[1-2]。同时 ^{11}C -CFN可用于研究癫痫、肺腺癌和烟酒等滥用的监测^[3]。Dannals

等^[4]最先报道了合成 ^{11}C -CFN, 采用 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ 与去甲基的钠盐前体加热反应, 经HPLC纯化, 合成时间为30 min。Jewett^[5]选用活性更高的 ^{11}C - CH_3 -Triflate与前体在四丁基胺碱性条件下反应, 采用固相萃取法, 结合阴离子交换膜除放射性杂质, 合成时间减小

收稿日期: 2010-07-08; 修订日期: 2010-12-13

基金项目: 国家重点研究发展计划(973)支持项目(2007CB512500)

作者简介: 张锦明(1965—), 男, 江苏南通人, 博士, 研究员, 核医学专业

到 10 min。Shao 等^[6]采用商业化模块自动化合成了¹¹C-CFN,但合成效率只有 40%,需进一步研究合成并提高其产率。国内最早合成了用于医疗的 CFN,但采用 CFN 直接脱甲基合成 CFN 前体的效率低。本研究参照朱国政及 Wadsak 的合成方法^[7-8],拟自行合成 CFN 的前体和标准品,采用¹¹C-CH₃-Triflate 碱性条件下标记¹¹C-CFN,改良的柱层法纯化标记药物,以期达到较高的合成效率。

1 试剂和仪器

N-(2-苯乙基)-4-哌啶酮、氰化钾、苯胺、浓硫酸、氢氧化钾、碘甲烷、丙酸酐、六次甲基磷酸三酰胺、Pd/C 等购自上海阿拉丁试剂有限公司;冰醋酸购自国药试剂公司。所有试剂均为分析纯,购买后没有纯化直接使用。低本底 1 mol/L 氯化锂铝/THF,德国 ABX 公司;DMSO,美国 Alfa Aesar 公司;57% 的氢碘酸、1 mol/L 四丁基胺甲醇溶液,美国 Sigma-Aldrich 公司;无水乙醇,美国 Millennium 公司;氨水,北京化工厂;Sep-Pak C-2 柱,美国 Alltech 公司产品;Grace Alltima C-18

分析柱,5 μm,10 mm×250 mm,美国 Grace 公司。

Agilent 6120 型质谱仪,美国安捷伦公司;Bruker 300M 核磁共振仪,美国布鲁克公司;SGWX-4 熔点仪,上海精密仪器厂;Sumitomo HM-20S 回旋加速器,日本驻友公司;C-11 碘代甲烷合成器,北京派特生物技术有限公司;高效 HPLC 分析仪,美国 Waters 公司,配 515 泵、2487 紫外检测器、BioScan 流动放射性检测器。API2000 型 LC/MS/MS,美国 API 公司。

2 实验方法

2.1 去甲基 CFN 和 CFN 标准品的合成

去甲基 CFN 和 CFN 标准品合成路线^[7-8]示于图 1。

2.1.1 4-哌啶乙腈,4-苯胺-1-(2-苯乙基)(1)的合成 将 *N*-(2-苯乙基)-4-哌啶酮 6.7 g 和苯胺 3.7 g 溶于 24.5 g 冰醋酸中,室温搅拌下加入 2.3 g KCN 与 2.5 g 水的溶液,反应 48 h 后将反应混合物倒入水中,加氨水使其呈碱性,滤出所得固体,用异丙醇重结晶得固体 5.7 g(产率 55%),

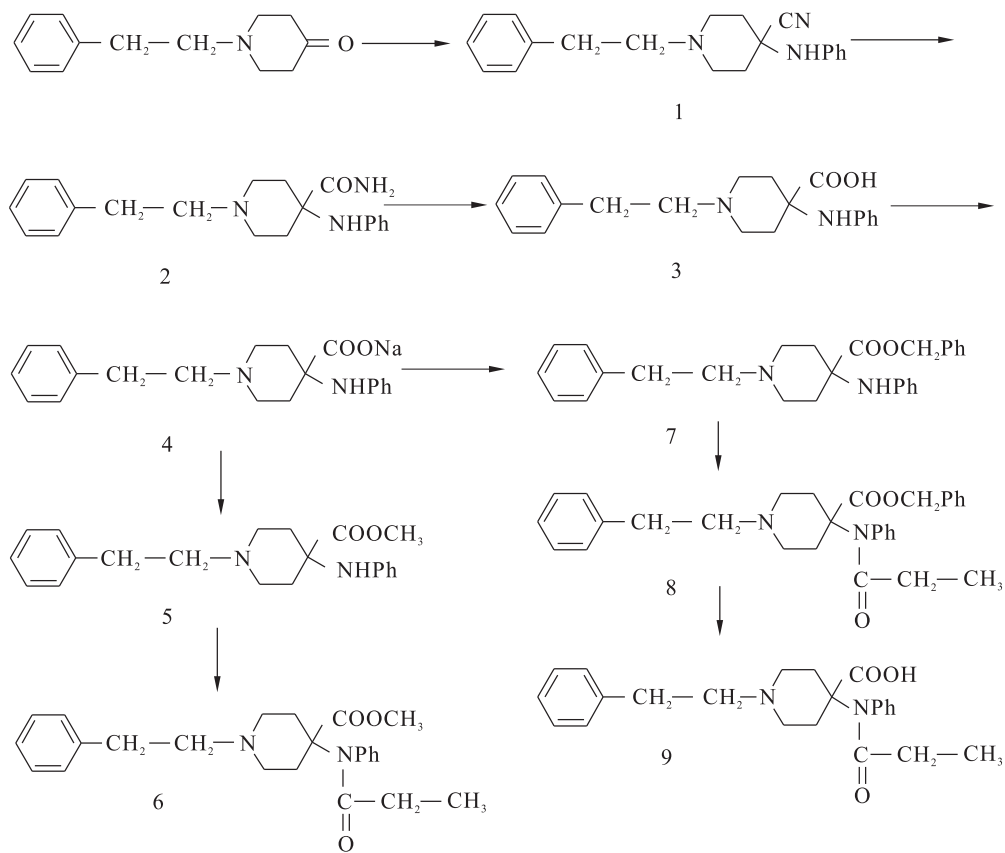


图 1 ¹¹C-CFN 前体和 CFN 标准品合成路线

Fig. 1 Reaction scheme for precursor of ¹¹C-CFN and CFN reference standards

熔点 118~123 °C。

2.1.2 4-哌啶甲酰胺, 4-苯胺-1-(2-苯乙基)(2)的合成 将上述 5.7 g 产物 1 慢慢加入到 20 mL 浓硫酸中, 搅拌反应 24 h 后将反应混合物倾到碎冰和氨水中, 氯仿萃取, 提取液干燥浓缩得固体, 用异丙醇洗涤得产品 3.8 g。

2.1.3 4-哌啶甲酸钠, 4-苯胺-1-(2-苯乙基)(4)的合成 将 2.1 g 产品 2、1.2 g 氢氧化钾溶于 10 mL 的乙二醇中, 加热回流 20 h, 冷却将反应物倒入水中过滤, 滤液用盐酸酸化开始有沉淀生成, 再加盐酸后沉淀溶解, 加盐酸直到沉淀完全溶解。用浓的氢氧化钠碱化, 该反应为放热反应, 趁热过滤除不溶物, 滤液冷却后, 产物(4)结晶出来, 过滤出固体再用水重结晶, 得到产物 0.92 g(产率 41%)。

2.1.4 4-哌啶甲酸甲酯, 4-苯胺-1-(2-苯乙基)(5)的合成 将 0.46 g 钠盐溶于 5 mL 六次甲基磷酸三酰胺(HMPA)中, 加热至 70 °C 搅拌, 然后冷却至 10 °C 加入碘甲烷 0.22 g, 反应物于室温下继续搅拌反应 21 h。反应结束后加入 5 mL 甲苯, 有机层用水洗涤, 洗出的水相再用甲苯萃取, 合并有机层, 依次用 $\omega=10\%$ 的 NaOH 和饱和食盐水洗涤, 干燥过滤浓缩得粗产品, 柱分离得产品 0.17 g(产率 38%), 熔点 95~99 °C。

2.1.5 4-哌啶甲酸甲酯, 4-[(1-丙酰基)苯胺]-1-(2-苯乙基)(6)的合成 将上述 0.17 g 产品 5 与丙酸酐 1 mL 混合, 搅拌下回流 6 h, 冷却至室温后倾入水中, 加入氨水至碱性。氯仿提取, 提取液用水洗涤后干燥, 过滤浓缩得油状物, 将其溶于少量异丙醇中加入草酸形成草酸盐, 过滤得白色固体 0.17 g。经碱化、提取、干燥, 然后减压浓缩得到油状物 0.11 g, 即为 CFN 标准品(产率 56%)。

2.1.6 4-哌啶甲酸苯甲醇酯, 4-苯胺-1-(2-苯乙基)(7)的合成 将 0.46 g 钠盐溶于 5 mL 六次甲基磷酸三酰胺(HMPA)中, 加热至 110 °C 搅拌然后冷却至 20 °C 加入氯化苄 0.15 g, 反应物于室温下继续搅拌反应 18 h。反应结束后将混合物倒入水中, 用甲苯萃取, 合并有机层, 用饱和食盐水洗涤, 干燥过滤浓缩得粗产品, 柱分离得产品 0.18 g(产率 32%), 熔点 75~78 °C。

2.1.7 4-哌啶甲酸苯甲醇酯, 1-(2-苯乙基)-4-(N-苯基丙酰胺基)(8)的合成 将上述 0.18 g 产品 7 与丙酸酐 5 mL 混合, 搅拌下回流 6 h, 冷却至室温后倾入水中, 加入氨水至碱性。氯仿提取, 提取液用水洗涤后干燥, 过滤浓缩得油状物, 将其溶

于少量异丙醇中加入草酸形成草酸盐, 过滤得白色固体 0.13 g。经碱化、提取、干燥, 然后减压浓缩得到固体 0.1 g(产率 45%)。

2.1.8 4-哌啶甲酸, 1-(2-苯乙基)-4-(N-苯基丙酰胺基)(9)的合成 将 90 mg 产品 8 溶于 10 mL 无水乙醇中, 加入 10% Pd/C 20 mg, $(2\sim3)\times 10^5$ Pa 下室温通入氢气脱去苄基, 搅拌约 16 h, 过滤除去催化剂, 滤饼用乙醇洗涤, 将滤液浓缩得到固体物质, 将其柱分离后得到最终白色固体产物 14.5 mg(产率 20%)。

2.2 ^{11}C 碘代甲烷的生产及 $^{11}\text{C}-\text{CH}_3\text{-Triflate}$ 的合成

用 Sumitomo HM-20S 回旋加速器 40 μA 20 MeV 质子轰击含 $\varphi=1\%$ 氧的天然氮气靶, 通过 $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ 核反应生成 $^{11}\text{C}-\text{CO}_2$ 。 $[^{11}\text{C}]-\text{CH}_3\text{I}$ 由单管、液相法由 ^{11}C 碘代甲烷仪自动化合成^[9], 即生成的 $^{11}\text{C}-\text{CO}_2$ 由液氮捕获后, 由氮气以 30 mL/min 速率载带入 0.2 mL 1 mol/L 氢化锂铝/THF 中, 然后加热除 THF, 加入 0.2 mL $\omega=57\%$ 的氢碘酸, 生成的 $^{11}\text{C}-\text{CH}_3\text{I}$ 由氮气载带, 进入 Triflate 转化炉; $^{11}\text{C}-\text{CH}_3\text{I}$ 经在线转化成 $^{11}\text{C}-\text{CH}_3\text{-Triflate}$ ^[10]。

2.3 ^{11}C -CFN 的标记及纯化

1.0 mg 的去甲基 CFN 酸前体, 用 0.2 mL DMSO 溶解, 加入 2.6 μL 1 mol/L 四丁基胺甲醇溶液。将上述制备的 $^{11}\text{CH}_3\text{-Triflate}$ 通入该溶液。该溶液用 10 mL $\varphi=10\%$ 氨水稀释, 混合液过 C-2 柱, 用 10 mL 水清洗该柱, 最后用 1.0 mL 无水乙醇将产品从 C-2 柱上洗脱, 加入 9 mL 水即可。

2.4 ^{11}C -CFN 质量控制

采用 HPLC 分析产品的放化纯度, 分析柱为 C-18 柱, 流动相为 30% MeCN/水(1 L 水加 2 mL 冰乙酸), 流速为 1 mL/min。 ^{11}C -CFN 的保留时间为 5.3 min。采用 LC/MS/MS 测量 ^{11}C -CFN 的比活度^[11]。首先需配制不同浓度的 CFN 标准品, 由 LC/MS/MS 测得不同浓度下 CFN 标准品的质量数峰值为 395.2, 根据浓度和峰面积作图为线性($r^2=0.9999$), 依据 ^{11}C -CFN 在相同质量数下的峰面积, 计算 CFN 的浓度, 根据其放射化学浓度, 计算 ^{11}C -CFN 的比活度。

3 结果和讨论

3.1 CFN 标准品和 CFN 标记前体的合成与表征

本研究合成从较易得到的原料出发, 最终合成了 CFN 的标准品(6)和 CFN 的标记前体(9), 从 N-(2-苯乙基)-4-哌啶酮开始计算, 总体产率为 0.22%。

其中化合物 2: MS(m/e): 324. 2; ^1H NMR (300 MHz, DMSO, δ): 7. 13~7. 30(m, 6H), 6. 95~7. 09(m, 3H), 6. 52~6. 63(m, 3H), 2. 57~2. 75(m, 4H), 2. 42~2. 50(M, 2H), 2. 20~2. 33(m, 2H), 1. 90~2. 04(m, 2H), 1. 78~1. 89(m, 2H)。

化合物 3: ^1H NMR(300 MHz, DMSO, δ): 7. 12~7. 30(m, 5H), 6. 87~6. 95(m, 2H), 6. 60~6. 68(m, 2H), 6. 32~6. 41(m, 1H), 2. 65~2. 75(m, 4H), 2. 40~2. 50(m, 2H), 2. 26~2. 40(m, 2H), 1. 92~2. 05(m, 2H), 1. 72~1. 84(m, 2H)。

化合物 5: MS(m/e): 339. 2; ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3 , δ): 7. 25~7. 32(m, 2H), 7. 11~7. 22(m, 5H), 6. 72~6. 79(m, 1H), 6. 55~6. 62(m, 2H), 3. 85(br, 1H), 3. 68(s, 3H), 2. 75~2. 85(m, 2H), 2. 57~2. 75(m, 4H), 2. 43~2. 56(m, 2H), 2. 20~2. 35(m, 2H), 2. 00~2. 13(m, 2H)。

化合物 6: MS(m/e): 395. 2; ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3 , δ): 7. 38~7. 46(m, 3H), 7. 30~7. 35(m, 2H), 7. 21~7. 29(m, 2H), 7. 11~7. 20(m, 3H), 3. 80(s, 3H), 2. 67~2. 80(m, 4H), 2. 39~2. 62(m, 4H), 2. 26~2. 38(m, 2H), 1. 88(q, 2H, $J=7.5$ Hz), 1. 60~1. 74(m, 2H), 0. 96(t, 3H, $J=7.5$ Hz)。

化合物 8: MS(m/e): 471. 2; ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3 , δ): 7. 21~7. 44(m, 12H), 7. 09~7. 20(m, 3H), 5. 25(s, 2H), 2. 63~2. 75(m, 4H), 2. 41~2. 57(m, 4H), 2. 28~2. 39(m, 2H), 1. 85(q, 2H, $J=7.5$ Hz), 1. 60~1. 74(m, 2H), 0. 94(t, 3H, $J=7.5$ Hz)。

化合物 9: MS(m/e): 381. 2; ^1H NMR(300 MHz, DMSO, δ): 12. 30(1H), 7. 41~7. 51(m, 3H), 7. 35~7. 40(m, 2H), 7. 21~7. 26(m, 2H), 7. 14~7. 18(m, 3H), 2. 55~2. 70(m, 4H), 2. 38~2. 50(m, 4H), 2. 08~2. 15(m, 2H), 1. 78(q, 2H, $J=7.5$ Hz), 1. 50~1. 60(m, 2H), 0. 82(t, 3H, $J=7.5$ Hz)。

与朱国政等^[7]的合成方法相比,本研究在从物质 3 合成 5、7 的时候,增加了成盐这一步,由于成盐后溶液的 pH 为中性,甲基化及苄基化时无需再加碱,甲基化时不受碱量的影响,因此产率增加,显著提高了合成产率。

3. 2 ^{11}C -CFN 的标记及纯化结果

在常温、碱性条件下,前体易与 ^{11}C - CH_3 -Triflate 反应,从 ^{11}C - CH_3I 的放射性活度计算, ^{11}C -CFN 的标

记率为 $(67.3\pm2.3)\%$ ($n=3$)。经 HPLC 分析,产品的放化纯度大于 98%,有二个杂质峰(图 2),一个是与溶剂相对应的 $t_{\text{R}}=2.36$ min 的峰,该峰为水溶性的 ^{11}C - CH_3 -Triflate 峰,另一是未知副产品的 $t_{\text{R}}=4.29$ min 杂质峰。图 2 中紫外吸收峰为共进样 CFN 标准品的吸收峰(死体积已校正),该峰与放射性峰一致,说明放射性主峰 $t_{\text{R}}=5.31$ min 即为 CFN。由于采用 ABX 公司低本底 1 mol/L 氢化锂铝/THF,标记物的 $t_{\text{R}}=5.31$ min 处的紫外吸收峰很小(未列),紫外测量受干扰,经 LC/MS/MS 测量, ^{11}C -CFN 的比活度为 1.67×10^{14} Bq/g (66.6 PBq/mol)。患者注射剂量为每人 370 MBq,则单个患者接受注射的 CFN 量为 2.2 μg 。CFN 的安全剂量为 10 μg ,因此,本法合成的 ^{11}C -CFN 放射化学纯度和比活度基本满足临床研究的需求。

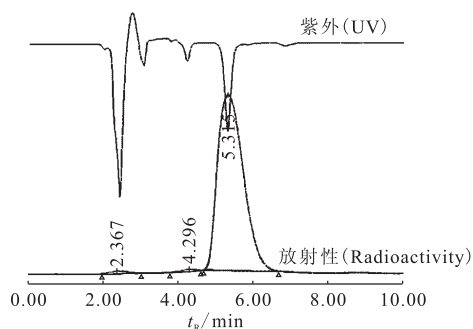


图 2 ^{11}C -CFN 的 HPLC 分析放射性和标准品的 UV
Fig. 2 Profiles of analytical of formulation ^{11}C -CFN and UV of CFN reference standards

本方法的标记率明显高于文献[6]上的 40%。采用 ^{11}C - CH_3 -Triflate 甲基化的优点除其活性大外, ^{11}C - CH_3 -Triflate 本身是水溶性,而 ^{11}C - CH_3I 为脂溶性^[10],在制备中枢神经受体药物时,可容易将产品吸附在固相柱上,未反应的 ^{11}C - CH_3 -Triflate 通过水清洗固相柱达到纯化的目的;而脂溶性的 ^{11}C - CH_3I 常与产品混在一起,用固相柱不易分开。

本研究的纯化方法与文献[5-6]相比有一定区别:本方法未采用正丁醇,同时也没有采用阴离子柱;而直接采用 C-2 柱吸附、清洗和洗脱,采用 C-2 柱可最大限度去除标记前体,少量的去甲基 CFN 酸前体价态为负一价,在血液中无法进入大脑血脑屏障(BBB);动物实验证实,尽管 CFN 的毒性很大,但其前体去甲基 CFN 酸则毒性很低,注射 50 $\mu\text{g/g}$ 前体于小鼠,未观察到小鼠中毒症

状。采用阴离子柱的目的是提高产品的放化纯度,从图 2 可见,虽然没有采用阴离子柱纯化,但本产品放化纯度仍达到 98%。

3.3 ^{11}C -CFN 的副反应

为提高 ^{11}C -CFN 的甲基化产率,在前体溶液中通入 $^{11}\text{CH}_3$ -Triflate 后,反应液加热至 80 °C 反应 5 min,同样方法纯化,发现产品放化纯度下降,同时出现了 2 个脂溶性放射性峰(图 3),且 t_R 发生了变化。经共进 CFN 标准品发现, $t_R=6.1$ min 的为产品, $t_R=4.2$ min 的为放化杂质,结构未知。

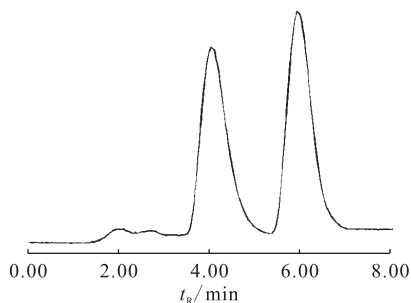


图 3 ^{11}C -CFN 的副反应的 HPLC 峰

Fig. 3 Analytical HPLC of by-production of ^{11}C -CFN

在标记前体 1-苄基-4-(*N*-苯基丙酰胺基)哌啶-4-羧酸上,可甲基化的位置共有 3 个:第一是产品的羧基位;第二是哌啶环上的氮原子,甲基化后生成季铵盐,但本实验采用阳离子交换柱 Sep-Pak CM 未能分离到该产品,可能是受溶液中其它离子干扰的缘故;第三是苯胺上的氮原子,但该原子受邻位羰基和苯环空间位阻的影响,亲核力很小。因此最有可能的副反应是第二种。本工作尝试用质谱分析副产物,发现其分子量与产品一致,说明仍是前体甲基化产品,仅是标在了其它位置,经生物学验证,该副产品不能进入 BBB (另文报道)。

早期的文献采用加热的方法没有发现这类副反应,可能是他们均采用了活性较小的碘代甲烷作甲基化试剂。因此采用高活性的 ^{11}C - CH_3 -Triflate 作甲基化试剂,无需加热,常温下即可发生反应;加热后副反应会增加,需经 HPLC 纯化。

4 结 论

本研究从较易得的试剂 1-苄基-4-哌啶酮为原料合成了 ^{11}C -CFN 的前体:1-苄基-4-(*N*-苯基丙酰胺基)哌啶-4-羧酸和标准品,标准品对分析副反

应有很大帮助。采用 ^{11}C - CH_3 -Triflate 可在常温下与前体反应,直接采用 C-2 柱吸附、清洗和洗脱,标记率为 $(67.3 \pm 2.3)\%$ ($n=3$),产品的放化纯度大于 98%,比活度为 1.67×10^{14} Bq/g (66.6 PBq/mol)。

参考文献:

- [1] Harris R E, Zubieta J K, Scott D J, et al. Traditional Chinese Acupuncture and Placebo (Sham) Acupuncture are Differentiated by Their Effects on M-Opioid Receptors (MORs) [J]. *Neuroimage*, 2009, 47; 1 077-1 085.
- [2] Liberzon I, Taylor S F, Phan K L, et al. Altered Central Mu-Opioid Receptor Binding After Psychological Trauma [J]. *Biol Psychiatry*, 2007, 61; 1 030-1 038.
- [3] Heinz A, Reimold M, Wrase J, et al. Correlation of Stable Elevations in Striatal Mu-Opioid Receptor Availability in Detoxified Alcoholic Patients With Alcohol Craving: A Positron Emissiontomography Study Using Carbon 11-Labeled Carfentanil [J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2005, 62; 57-64.
- [4] Dannals R F, Ravert H T, Frost J J, et al. Radio-synthesis of an Opiate Receptor Binding Radiotracer: [^{11}C]Carfentanil [J]. *Int J Appl Radiat Isot*, 1985, 36; 303-306.
- [5] Jewett D M. A Simple Synthesis of [^{11}C]Carfentanil Using an Extraction Disk Instead of HPLC [J]. *Nucl Med Biol*, 2001, 28; 733-734.
- [6] Shao X, Kilbourn M R. A Simple Modification of GE Tracerlab FX C Pro for Rapid Sequential Preparation of ^{11}C -Carfentanil and ^{11}C -Raclopride [J]. *Appl Radiat Isot*, 2009, 67; 602-605.
- [7] 朱国政,戴敦华. 强效镇痛药卡芬太尼的合成 [J]. *医药工业*, 1988, 19; 9-11.
- [8] Wadsak W. Preparation and Radiosynthesis of [^{18}F]FE-CFN (2-[^{18}F]Fluoroethyl 4-[*N*-(1-Oxo-propyl)-*N*-Phenylamino]-1-(2-Phenylethyl)-4-Piperidinecarboxylate): A Potential M-Opioid Receptor Imaging Agent [J]. *Radiochim Acta*, 2007, 95; 33-38.
- [9] 张锦明,田嘉禾,王武尚,等. 单管法自动化合成 ^{11}C -碘代甲烷 [J]. *中华核医学杂志*, 2004, 24; 243-244.
- [10] 张锦明,田嘉禾,王武尚,等. 在线制备 ^{11}C -Triflate- CH_3 [J]. *同位素*, 2006, 19; 124-128.
- [11] Zhang X J, Zhang J M. Quality Control of ^{11}C -Carfentanil [C] // 8th China-Japan Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, Beijing: Beijing Normal University, 2010; 73.