

# 高比活度碳-14 标记吡虫啉的合成与分析

杨征敏<sup>1,\*</sup>, 张贵华<sup>1</sup>, 许亚军<sup>1</sup>, 见才广<sup>1</sup>, 李霄<sup>1</sup>, 叶庆富<sup>2,\*</sup>

1. 上海启甄环境科技有限公司 同位素标记合成研究中心, 上海 201403;  
2. 浙江大学 原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029

**摘要:**以<sup>[14C]</sup>碳酸钡为原料, 通过格氏、还原、溴化和亲核取代等五步反应制备了碳-14 标记吡虫啉的粗品, 经制备型 HPLC 纯化获得了目标物<sup>14</sup>C-吡虫啉(1-(6-氯-3-吡啶<sup>[14C]</sup>甲基)-N-硝基咪唑-2-亚胺, 1 354. 2 MBq) 纯品, 反应总放化收率为 51%。目标物化学结构经质谱(ESI-MS)和核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)确认, 其放化纯度和化学纯度分别以放射性薄层层析-同位素成像分析法(TLC-IIA)、离线放射性高效液相色谱法(HPLC-LSC)、在线放射性高效液相色谱法(HPLC-FSA)和多波长高效液相色谱法(HPLC-PDA)测定。结果表明, 目标物<sup>14</sup>C-吡虫啉的放化纯度和化学纯度均大于 98%, 比活度为 1 871. 46 GBq/mol。目标物<sup>14</sup>C-吡虫啉可作为放射性示踪剂, 用于吡虫啉在不同植物中的定向积累与代谢特征研究。

**关键词:**同位素标记合成; 吡虫啉; 碳-14; 杀虫剂; 放射性示踪剂

**中图分类号:** TL923; O628. 4; S482. 3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2018)03-0196-07  
**doi:** 10. 7538/hhx. 2018. YX. 2017055

## Synthesis and Analysis of Carbon-14 Labelled Imidacloprid With High Specific Activity

YANG Zheng-min<sup>1,\*</sup>, ZHANG Gui-hua<sup>1</sup>, XU Ya-jun<sup>1</sup>,  
JIAN Cai-guang<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, YE Qing-fu<sup>2,\*</sup>

1. Radiosynthesis Research Center, Shanghai Qizhen Isotech Co., Ltd., Shanghai 201403, China;  
2. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

**Abstract:** A version of carbon-14 labelled imidacloprid, (*E*)-*N*-(1-((6-chloropyridin-3-yl)<sup>[14C]</sup>methyl)imidazolidin-2-ylidene)nitramide (1 354. 2 MBq), was synthesized from barium <sup>[14C]</sup>carbonate via Grignard reaction, reduction, bromination, nucleophilic substitution reaction and purified by preparative HPLC with the overall yield of 51%. The labelled product was identified by using ESI-MS and <sup>1</sup>H NMR. Its radiochemical and chemical purity are more than 98%, determined by TLC-IIA, HPLC-LSC, HPLC-FSA, and HPLC-PDA, respectively. The specific activity of the product is 1 871. 46 GBq/mol. This product can be

收稿日期: 2017-09-08; 修订日期: 2017-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11675142); 上海张江国家自主创新示范区专项发展资金重点项目(201609-FX-A2008-002)

\* 通信联系人: 杨征敏(1974—), 男, 陕西周至人, 博士, 技术总监, 从事有机物放射性同位素标记合成与示踪研究, E-mail: zmyang@qzisotech.com

叶庆富(1963—), 男, 浙江开化人, 博士, 教授, 主要从事核技术农业应用、农药作用机理与环境行为研究, E-mail: qfye@zju.edu.cn

网络出版时间: 2018-03-16; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2045.TL.20180316.0858.010.html>

used as radiotracer in the study of the directional accumulation and metabolism of imidacloprid in plants.

**Key words:** isotopically labelled synthesis; imidacloprid; carbon-14; insecticide; radiotracer

吡虫啉(imidacloprid)是第一个商品化的高效烟碱类内吸性杀虫剂,作用于害虫的烟酸乙酰胆碱酯酶受体,具有高效、广谱、低毒、安全和高选择性的特点,对人、畜、植物和天敌等安全。因而该药自1991年由德国拜耳公司投入市场,迅速成为全球杀虫剂市场的主流品种。但随着世界范围内吡虫啉的频繁使用,该杀虫剂造成的生态环境问题日益凸显。2007年,Cox-Foster等<sup>[1]</sup>报导吡虫啉会引发“蜂群崩溃综合症”。2012年,国外学者<sup>[2-3]</sup>相继发现吡虫啉会减弱蜜蜂觅食能力和降低蜂群增长速率及蜂王的繁殖能力。国外研究还表明,吡虫啉在水域环境中广泛分布<sup>[4-5]</sup>,且对水生及陆生无脊椎动物(如底栖动物、蜉蝣稚虫、甲壳虫和苍蝇等)具有致死作用<sup>[5-7]</sup>。Hallmann等<sup>[8]</sup>通过连续7年研究发现吡虫啉可能通过营养级联效应进而引发自然生态系统灾害,如在吡虫啉严重污染的水环境区域,无脊椎昆虫大量死亡,并在营养级联效应的作用下,食虫鸟类种群和数量也急剧下降。当水体吡虫啉质量浓度达到20 ng/L时,鸟类数量每年趋于下降3.5%。上述研究揭示,尽管新烟碱类杀虫剂吡虫啉通过120多个国家数百种作物登记相关试验要求<sup>[6]</sup>并已应用于农业生产25年,但人们对吡虫啉在植物中的定向积累(尤其是与蜜蜂等非靶标生物营养级联有关的植物器官的残留情况)与代谢特征等的认识仍不够客观全面。

放射性同位素示踪技术具有痕量精准、溯源追踪等独特优势,因此,在国际上农药等有机污染物在复杂环境介质中的吸收分配、代谢降解、迁移转化、生物效应等方面的研究多采用放射性同位素示踪技术<sup>[9-13]</sup>。为了研究吡虫啉在不同植物中的定向积累与代谢特征,需要借助于放射性同位素示踪技术,而放射性同位素碳-14标记的吡虫啉是示踪研究所必需的示踪剂。吡虫啉属于超高效杀虫剂,田间用量小,故需要高比活度( $a \geq 1\ 850\ \text{GBq/mol}$ ,  $1\ \text{mCi} = 3.70 \times 10^7\ \text{Bq}$ )的吡虫啉才能满足下游示踪研究的要求。国际上对吡虫啉的碳-14标记合成工作主要由德国拜耳公司完成,主要标记位点为吡虫啉分子中亚甲基、亚乙基和咪唑啉环2位碳原子,但其标

记合成工艺均尚未公开报道<sup>[14-15]</sup>。综合考虑下游示踪试验要求和碳-14原料市场供应等因素,本研究拟以亚甲基作为标记位点,该标记方式最具可行性,拟研究高比活度[亚甲基-<sup>14</sup>C]吡虫啉的合成与质量指标分析。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

放射性[<sup>14</sup>C]碳酸钡,比活度2 146 GBq/mol,放化纯度99.9%,美国ARC公司;2,5-二苯基噁唑(PPO),高效液相色谱(HPLC)纯度大于99.0%,日本TCI公司;1,4-双(5-苯基-2-噁唑)苯(POPOP),HPLC纯度大于98.0%,日本TCI公司;Optiphase HiSafe 3闪烁液,美国PE公司;HPLC和高效液相色谱-质谱联用分析(HPLC-MS)用甲醇分别为色谱级和质谱级,美国Fisher Scientific公司;其它试剂均为市售分析纯。溶剂按照文献<sup>[16]</sup>方法纯化。

Varian 400 MHz核磁共振仪(以TMS为内标),美国瓦里安公司;Agilent 7890B-5977B气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司;Waters Alliance e2695-2489/Acquity QDa高效液相色谱-紫外光谱/质谱联用系统,Waters 2545-2998 PDA制备液相色谱仪,Waters Alliance e2695- $\nu$ . ARC FSA/2998 PDA/Acquity QDa MS高效液相色谱-流动液体闪烁测量/二极管阵列检测器/质谱联用系统(FSA与PDA并联,MS串联于PDA后),其中色谱、质谱设备来自美国Waters公司,FSA来自美国Aim Research公司;Tri-Carb 4910TR液体闪烁测量仪,美国PE公司;Typhoon FLA9500 IP多功能激光成像仪,美国GE公司;Milli-Q Reference S. Kit (18.2 M $\Omega$ /cm,25  $^{\circ}\text{C}$ )超纯水制备系统,默克化工技术(上海)有限公司;BT25S(精度0.01 mg)和BSA22 4S-CW(精度1 mg)电子天平,德国赛多利斯公司。以上与定量分析相关仪器均通过3Q认证和上海市计量测试技术研究院校准。

### 1.2 同位素标记化合物的合成

放射性同位素碳-14标记吡虫啉(1)的合成路线示于图1。

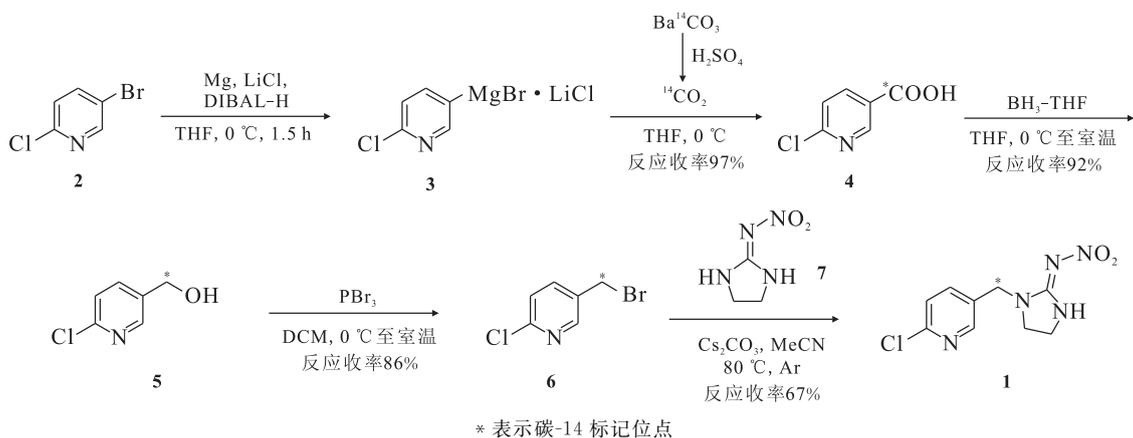


图1 放射性同位素碳-14 标记吡虫啉的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of radioisotope carbon-14 labelled imidacloprid

**1.2.1 Konchel 型格氏试剂(3)** 在氩气保护下,向干燥三口反应瓶中加入无水氯化锂(424 mg, 10.00 mmol);热风枪(设置 250 °C)加热,重复抽真空-充氩气操作 5 次以彻底干燥氯化锂。加入表面光亮的镁条(491 mg, 20.20 mmol),再用氩气置换反应瓶内气体 5 次;加入无水四氢呋喃(THF, 10 mL),搅拌至氯化锂完全溶解;再加入二异丁基铝(1 mol/L, 160  $\mu$ L, 0.15 mmol),室温搅拌 5 min。降温至 0 °C,缓慢滴加 2-氯-5-溴吡啶(1.540 g, 8.00 mmol)无水 THF 溶液(10 mL),继续搅拌至 **2** 彻底消耗(1.5 h),反应溶液由无色变为茶色悬浊液。静置后析出白色固体,上部为茶黄色透明溶液,此溶液即 Konchel 型格氏试剂(**3**,浓度约为 0.4 mol/L)<sup>[17]</sup>。放射性薄层层析(TLC):EtOAc/石油醚(PE)体积比为 1/20,  $R_f$ (**2**)=0.72。以 4-苯基苯甲醛无水四氢呋喃溶液检验其反应性能,结果表明制备的中间产物格氏试剂(**3**)反应性能满足实验要求。

**1.2.2 6-氯-吡啶-3-[<sup>14</sup>C]甲酸(4)** 在氩气保护下,将自行设计制作的微型放射性二氧化碳反应系统中各部件(包括二氧化碳发生器、二氧化碳反应器、微型气体循环泵、气体压力缓冲器、微型干燥器、玻璃旋塞和连接管件等)趁热连接组装。各部件组装完毕,用热风枪(设置 250 °C)加热系统,重复抽真空-充氩气操作 5 次以彻底干燥系统,最后关闭系统所有旋塞。在氩气保护下,打开二氧化碳反应器的瓶塞,迅速加入 [<sup>14</sup>C]碳酸钡(307 mg, 2 851.22 MBq,比活度已调至 1 868.5 GBq/mol),塞上瓶塞,重复抽真空-充氩气操作 5 次以彻底排除系统中空气。将各乳胶塞密封牢固,油泵抽真空至系统压力(0.07 Pa)稳定,关闭与油泵相连的

旋塞,保持系统处于高真空状态,打开二氧化碳反应器和二氧化碳发生器之间的旋塞。将格氏试剂(**3**, 4.60 mL, 1.84 mmol)转入二氧化碳反应器,补加无水四氢呋喃(3 mL),用冰-盐浴分别将二氧化碳发生器和二氧化碳反应器冷至 0~5 °C,然后向二氧化碳发生器中缓慢滴入已充分脱除二氧化碳的浓硫酸(7 mL),产生的 [<sup>14</sup>C]二氧化碳经微型干燥器进入二氧化碳反应器与格氏试剂(**3**)反应。待二氧化碳反应器液面无明显气泡溢出时,打开二氧化碳反应器和二氧化碳发生器之间气体回路上的旋塞,向系统补充适量氩气,启动微型气体循环泵,利用氩气运送系统残余 [<sup>14</sup>C]二氧化碳与格氏试剂反应。氩气循环 1 h 后反应结束。TLC:乙酸乙酯(EA)/PE 体积比为 1/1,  $R_f$ (**4**)=0.42。以 NaOH 溶液(0.5 mol/L)淬灭反应,调溶液 pH 至 13,减压蒸除反应液中 THF,余液加水至 100 mL,用乙基叔丁基醚萃取(50 mL  $\times$  2)除杂。水相 pH 用盐酸(1 mol/L)调至 6,乙基叔丁基醚萃取(80 mL  $\times$  6),合并有机相,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩得淡黄色固体(**4**, 235 mg, 反应收率 97%)。

**1.2.3 6-氯-吡啶-3-[<sup>14</sup>C]甲醇(5)** 在氩气保护下,将 6-氯-吡啶-3-[<sup>14</sup>C]甲酸(**4**, 233 mg, 1.46 mmol)加入干燥 Shlenk 反应管;热风枪加热,用氩气置换反应管内气体 5 次,冷至室温;用注射器加入无水 THF(5 mL),用冰-盐浴冷却至 0~5 °C,缓慢逐滴加入硼烷-四氢呋喃溶液(1 mol/L, 3.7 mL, 3.70 mmol)。滴毕,继续搅拌 1.5 h;自然升至室温,搅拌 1.5 h 后反应结束。TLC:EA/PE 体积比 1/3,  $R_f$ (**5**)=0.45。向反应体系中缓慢滴加水直至无气泡生成以淬灭反应。减压浓缩除去 THF,所

得混合液用二氯甲烷萃取(70 mL×6),合并有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得浅黄色液体(5,192 mg,反应收率 92%)。

**1.2.4 2-氯-5-(溴<sup>14</sup>C)甲基)吡啶(6)** 在氩气保护下,将 6-氯-3-吡啶<sup>14</sup>C]甲醇(5,189 mg,1.30 mmol)加入干燥 Schlenk 反应管,热风枪加热,用氩气置换反应管内气体 5 次;用注射器加入无水二氯甲烷(8 mL)搅拌溶解,用冰-盐浴冷至 0~5 °C,逐滴加入 PBr<sub>3</sub>(246 mg,910 μmol)。滴加完毕,保持此温度搅拌 1 h;自然升至室温,搅拌 1 h 后反应结束。TLC:PE/EA 体积比 5/1;R<sub>f</sub>(6)=0.50。向反应体系缓慢滴加 ω=5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液直至无 CO<sub>2</sub> 气泡生成以淬灭反应,用二氯甲烷萃取(80 mL×5)。合并有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,抽滤,减压浓缩得浅黄色液体(6,231 mg,反应收率 86%)。

**1.2.5 1-(6-氯-3-吡啶<sup>14</sup>C)甲基)-N-硝基咪唑-2-亚胺(1,<sup>14</sup>C-吡虫啉)** 在氩气保护下,将 2-氯-5-(溴<sup>14</sup>C)甲基)吡啶(6,227 mg,1.09 mmol)、N-硝基亚氨基咪唑烷(7,149 mg,1.14 mmol)和无水 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(391 mg,1.20 mmol)加入干燥 Schlenk 反应管;用氩气置换 5 次,注入干燥乙腈(8 mL),内温升至 80 °C,剧烈搅拌 50 min 后反应结束。将反应液冷却至室温,用硅藻土层滤除残余 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,滤液减压浓缩得淡黄色固体粗产品。TLC:DCM/丙酮体积比 10/1;R<sub>f</sub>(1)=0.45。将粗产品溶于甲醇,利用制备型高效液相色谱纯化,收集保留时间 11.08~14.68 min 洗脱组分,减压浓缩得白色固体(1,186 mg,1 354.2 MBq,反应收率 67%)。色谱条件:xBridge Prep C18 柱(10 μm,150 mm×φ19 mm;Waters Co.,MA,USA),梯度洗脱(min/%A)控制:0/15,5/15,10/30,25/30,30/15,35/15;A 为乙腈,B 为水。流速 12 mL/min,进样量 600 μL,波长 270 nm。

### 1.3 同位素标记化合物的质量指标分析

**1.3.1 放射化学纯度的测定** 准确称取 5.03 mg 标记物(1),用甲醇溶解并在 50.00 mL 容量瓶中配成质量浓度为 100.6 mg/L 溶液,分别稀释至 10.00、0.01 mg/L 保存备用。另配置质量浓度为 20.00 mg/L 吡虫啉标样二氯甲烷溶液。

1) 放射性薄层层析-同位素成像分析法(TLC-HIA)

将标记物(1)甲醇溶液(2.00 mL,10.00 mg/L)转至浓缩管,转入氮吹仪浓缩至干,浓缩物用

1.00 mL 二氯甲烷溶解作为试样。将试样二氯甲烷溶液和吡虫啉标样溶液在硅胶薄板(5 cm×20 cm)底端约 1 cm 高度处的 4 个位置依次均匀点样(试样溶液、标样溶液、试样溶液、标样溶液),保持斑点直径不超过 3 mm。将载样硅胶板在层析缸中展开(DCM/丙酮体积比 9/1)。层析结束,挥发晾干溶剂,将硅胶板用多功能激光成像仪进行同位素成像分析(HIA, isotope imaging analysis),据此计算标记物(1)的放化纯度<sup>[18]</sup>。

#### 2) 离线放射性高效液相色谱法(HPLC-LSC)

取标记物(1)溶液(10 μL,0.01 mg/L)进行多波长高效液相色谱(HPLC-PDA)分析,自动收集器收集 14.70~15.62 min 洗脱组分于闪烁瓶,向其中加入 10 mL 闪烁液(配制方法:PPO(7 g)和 POPOP(0.5 g)溶于二甲苯(650 mL)和乙二醇单甲醚(350 mL)中,溶解后避光保存 24 h 后使用),混匀,避光 12 h 后液体闪烁测量仪(LSC, liquid scintillation counter)测量其放射性活度(A<sub>e</sub>)。重复 HPLC-PDA 分析 6 次。取标记物(1)溶液(10 μL,0.01 mg/L)加入闪烁瓶,同法加入 10 mL 闪烁液后测定其放射性活度(A<sub>0</sub>)。重复 6 次<sup>[18]</sup>。色谱条件:Waters SunFire C18 柱,φ4.6 mm×250 mm(美国 Waters 公司),梯度洗脱(min/%A)控制:0/10,5/10,20/100,25/100,28/10,30/10。A 为乙腈,B 为水。流速 0.80 mL/min,波长 270 nm,标记物(1)保留时间为 14.858 min。

#### 3) 在线放射性高效液相色谱法(HPLC-FSA)

取标记物(1)溶液(20 μL,0.01 mg/L)进行 HPLC 分析,柱后洗脱液分别进入 PDA 检测器和流动液体闪烁测量仪(FSA, flow scintillation analyzer),分流比为 1/1;进入 FSA 中洗脱液与 Optiphase HiSafe 3 闪烁液的流速比为 1/8。根据 HPLC-FSA 色谱图以面积归一法计算标记物(1)的放化纯度。色谱条件同 1.3.1 节分析 2)。

**1.3.2 化学纯度的测定** 根据 1.3.1 节分析 3) 中所得 HPLC-UV 色谱图,以面积归一法计算标记物(1)的化学纯度。

**1.3.3 比活度的测定** 利用微量注射器取目标物(1)溶液(20 μL,0.01 mg/L)转入闪烁瓶,加入 10 mL 闪烁液(配方同 1.3.1 节分析 2)),混匀;重复 6 次。将加闪烁液的 6 个样品避光保存 12 h 后用 LSC 测定其放射性活度,据此计算样品的比活度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 放射性同位素标记化合物的合成

从 $^{14}\text{C}$ 碳酸钡出发,通过格氏、还原、溴化和亲核取代等五步反应和制备型 HPLC 纯化获得了高比活度最终产物,反应总放化收率为 51%。各步反应产物表征数据如下:

6-氯-吡啶-3- $^{14}\text{C}$ 甲酸(4): $^1\text{H}$  NMR(400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ :13.58(s, 1H), 8.85(d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 8.25(dd,  $J=8.3, 2.4$  Hz, 1H), 7.63(d,  $J=8.3$  Hz, 1H), 3.28(s, 1H), 2.52~2.42(m, 3H); ESI-MS  $m/z$ :160[M+H] $^+$ , 162[M+2+H] $^+$ 。

6-氯-吡啶-3- $^{14}\text{C}$ 甲醇(5): $^1\text{H}$  NMR(400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ :8.31(d,  $J=1.7$  Hz, 1H), 7.75(dd,  $J=8.2, 2.5$  Hz, 1H), 7.43(d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 5.37(t,  $J=5.6$  Hz, 1H), 4.50(d,  $J=5.2$  Hz, 2H); ESI-MS  $m/z$ :146[M+H] $^+$ , 148[M+2+H] $^+$ 。

2-氯-5-(溴 $^{14}\text{C}$ 甲基)吡啶(6): $^1\text{H}$  NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ :8.37(d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 7.67(dd,  $J=8.2, 2.5$  Hz, 1H), 7.30(d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 4.41(s, 2H); ESI-MS  $m/z$ :208[M+H] $^+$ , 210[M+2+H] $^+$ 。

1-(6-氯-3-吡啶 $^{14}\text{C}$ 甲基)-*N*-硝基咪唑-2-亚胺(1,  $^{14}\text{C}$ -吡虫啉): $^1\text{H}$  NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ :8.32(s, 1H), 8.17(s, 1H), 7.71(d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.35(d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 4.53(s, 2H), 3.79(t,  $J=9.0$  Hz, 2H), 3.51(t,  $J=9.0$  Hz, 2H); ESI-MS  $m/z$ :258[M+H] $^+$ , 260[M+2+H] $^+$ 。标记物 1 的 $^1\text{H}$  NMR 分析数据与非标吡虫啉一致;其 ESI-MS 分析数据中清楚地显示出 $^{14}\text{C}$ 特征,这与目标物(1-(6-氯-3-吡啶 $^{14}\text{C}$ 甲基)-*N*-硝基咪唑-2-亚胺)结构相符;其 HPLC 保留时间与吡虫啉标样保留时间一致<sup>[19]</sup>。这表明所获得最终产物即目标物 $^{14}\text{C}$ -吡虫啉(1-(6-氯-3-吡啶 $^{14}\text{C}$ 甲基)-*N*-硝基咪唑-2-亚胺, 1)。

在国际上,放射性同位素碳-14 和氚标记农药是新农药的代谢过程、作用机制、环境行为与归趋等研究中使用最广泛的示踪剂。前期研究表明,氚原子在同位素示踪过程中易与研究对象介质中的氢原子发生一定程度的交换而引起其从标记分子的骨架上脱落,造成研究对象介质发生一定程度的氚污染,导致代谢物追踪溯源和放射性活度测定困难。通常选择农药活性成分分子中化学性质稳定、且具有代谢稳定性的分子碳骨架或者支链中的碳原子进行标记,标记碳原子不易从

标记物分子中脱落。加之,碳-14 半衰期长,因而碳-14 是农药标记时优先考虑的标记原子<sup>[9-10, 13, 18, 20-22]</sup>。文献[14-15, 23-24]中同位素标记吡虫啉多以分子中亚甲基、亚乙基和咪唑啉环 2 位碳原子作为标记位点。本研究选取亚甲基为标记位点进行碳-14 标记。这种标记方案的合成技术路线短,放射性原料易得,可行性高。

从源头来讲,放射性同位素碳-14 标记合成原料是 $^{14}\text{C}$ 碳酸钡,因而碳-14 标记合成所采用的技术路线往往有别于普通的有机合成,且合成多为微量合成。吡虫啉有多种合成法,本研究从中选择最成熟的技术路线:以 2-氯-5-甲基吡啶为起始原料,经过氯化获得 2-氯-5-氯甲基吡啶;以氯化铯为催化剂,乙腈为溶剂,碳酸钾为缚酸剂,2-氯-5-氯甲基吡啶与 *N*-硝基亚氨基咪唑啉反应制得吡虫啉<sup>[25-27]</sup>。基于该方法和放射合成的特点,本工作设计了 $^{14}\text{C}$ -吡虫啉的标记合成技术路线(图 1),并在冷反应条件下对其进行了优化<sup>[17]</sup>。

制备高纯度的格氏试剂是标记合成的关键之一。冷反应证实,2,5-二氯吡啶与 Mg 反应缓慢,反应不充分,原因在于吡啶环上 5 位氯的活性较低。用 2-氯-5-溴吡啶(2)制备格氏试剂时反应速率提高了,但反应依然不充分;为使 2 充分反应,以无水 LiCl 为促进剂,高效地制备了高纯度 Konchel 型格氏试剂,直接用于下一步反应<sup>[17]</sup>。为了获得高比活度标记物,本研究中 $^{14}\text{C}$ 碳酸钡用量仅为 1.54 mmol,它与酸反应释放出 $^{14}\text{C}$ 二氧化碳体积小,且必须在隔绝空气的条件下充分干燥,以避免产物(4)收率和比活度的降低。 $^{14}\text{C}$ 二氧化碳与过量的 Konchel 型格氏试剂在自行设计制作的微型放射性二氧化碳反应系统中反应,放射性原料反应彻底,最终以 97% 收率获得了 6-氯-吡啶-3- $^{14}\text{C}$ 甲酸(4)。

在 *N*-硝基亚氨基咪唑啉(7)与 2-氯-5-溴甲基吡啶的反应中, $\text{Cs}^+$  和  $\text{CO}_3^{2-}$  对取代反应至关重要<sup>[19]</sup>。通过反复优化反应条件,以乙腈为溶剂、碳酸铯为缚酸剂进行标记合成。该法反应时间短,后处理简单,产品收率高。

### 2.2 放射性同位素标记化合物的质量指标分析

TLC-IIA 分析表明,放射性薄层硅胶板上目标物(1)展开后仅显示一个放射性斑点,该斑点与硅胶板在 UV 灯下相同位置显示类似斑点,且放射性斑点的比移值与同一块硅胶板上吡虫啉标样的比移值均为 0.56,目标物(1)和吡虫啉标样对

应斑点的形状和轮廓均一致。这表明目标物(1)中仅有的一个放射性斑点对应的组分即 $^{14}\text{C}$ -吡虫啉(1),初步认为其放化纯度为100%。HPLC-LSC分析结果表明,目标物(1)的放射性活度 $A_e$ 平均值为 $(43\ 237 \pm 293)\ \text{min}^{-1}$  ( $n=6$ ), $A_0$ 平均值为 $(43\ 751 \pm 341)\ \text{min}^{-1}$  ( $n=6$ )。由此计算得到目标物(1)放化纯度( $A_e/A_0$ )为98.9%。图2为目标产物(1)的HPLC-FSA图。由图2可知, $^{14}\text{C}$ -吡虫啉对应的色谱峰积分面积占所有色谱峰积分总面积99.8%,即目标物(1)放化纯度为99.8%。图3为目标产物(1)的HPLC-UV图(270 nm)。由图3可知, $^{14}\text{C}$ -吡虫啉对应的峰面积占所有色谱峰面积的98.6%,即目标物(1)的化学纯度为98.6%。LSC测量表明,目标产物(1)的比活度为1 871.46 GBq/mol。

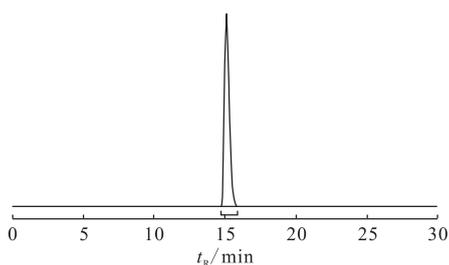


图2 目标物(1)的HPLC-FSA图

Fig. 2 HPLC-FSA chromatogram of desired compound (1)

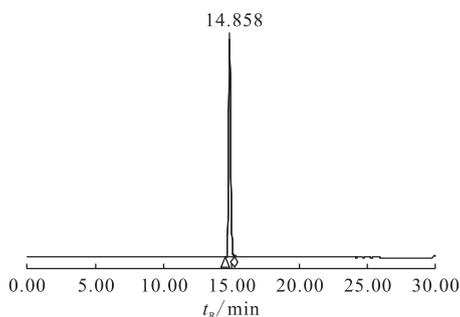


图3 目标物(1)的HPLC-UV图(270 nm)

Fig. 3 HPLC-UV chromatogram of desired compound (1, 270 nm)

放射性同位素碳-14 标记物的放化纯度测定常用TLC-HIA、HPLC-LSC和HPLC-FSA法<sup>[10,13,18,20]</sup>。这三种方法各有优劣,可以相互补充印证。在目标物(1)放化纯度分析中,TLC-HIA法能有效地防止非挥发性弱极性组分漏检,但TLC对样品分离能力有限。HPLC-LSC分析操作繁琐,耗时较

长,但测量结果最为精准。HPLC-FSA法检测速度快,所得放射性色谱图(t-CPM图)直观、细节信息丰富,但不足之处在于FSA测定的是衰变次数的表观值( $\text{min}^{-1}$ ),受猝灭等因素的影响,因而在放化纯度分析时主组分的色谱峰高应大于 $2\ 000\ \text{min}^{-1}$ 。

高比活度的放射性同位素碳-14 标记吡虫啉的量较少,因而其化学纯度通常采用HPLC-UV面积归一法确定,以尽可能减少放射性物质的损耗。在当前新医药开发实践中,用于非临床和临床试验的高比活度碳-14 标记药物( $a \geq 1\ 850\ \text{GBq/mol}$ ),其化学纯度通常也根据HPLC-UV色谱图的面积归一法确定。对于示踪试验中使用的低比活度( $a \leq 370\ \text{GBq/mol}$ )放射性物质,其化学纯度可考虑采用外标法测定。

### 3 结论

以 $[^{14}\text{C}]$ 碳酸钡为起始原料,通过格氏、还原、溴化和亲核取代等5步反应制备了 $^{14}\text{C}$ -吡虫啉(1-(6-氯-3-吡啶 $[^{14}\text{C}]$ 甲基)-N-硝基咪唑-2-亚胺,1 354.2 MBq),反应总放化收率为51%。目标物 $^{14}\text{C}$ -吡虫啉的化学纯度和放化纯度均大于98%,比活度为1 871.46 GBq/mol。

### 参考文献:

- [1] Cox-Foster D L, Conlan S, Holmes E C, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder[J]. *Science*, 2007, 318(5848): 283-287.
- [2] Henry M, Beguin M, Requier F, et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees[J]. *Science*, 2012, 336(6079): 348-350.
- [3] Whitehorn P R, O'Connor S, Wackers F L, et al. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production[J]. *Science*, 2012, 336(6079): 351-352.
- [4] Hladik M L, Kolpin D W. First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA[J]. *Environ Chem*, 2016, 13(1): 12-20.
- [5] Morrissey C A, Mineau P, Devries J H, et al. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review[J]. *Environ Int*, 2015, 74: 291-303.
- [6] van Dijk T C, van Staalduin M A, van der Sluijs J

- P. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid[J]. *PloS One*, 2013, 8(5): e62374.
- [7] Roessink I, Merga L B, Zweers H J, et al. The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2013, 32(5): 1096-1100.
- [8] Hallmann C A, Foppen R P, van Turnhout C A, et al. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations[J]. *Nature*, 2014, 511(7509): 334-341.
- [9] Yang Z M, Wang W, Han A L, et al. Determination of herbicide ZJ0273 residue in rapeseed by radioisotopic tracing method[J]. *Food Chem*, 2009, 114(1): 300-305.
- [10] Yang Z M, Ji Z Q, Ye Q F, et al. Synthesis of 6 $\beta$ -([1-<sup>14</sup>C]propoxy)celangulin V[J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2008, 51(2): 109-112.
- [11] Han A L, Ye Q F, Wang H Y, et al. Absorption, translocation, and residue of <sup>14</sup>C-ZJ0273 in oilseed rape[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(10): 4398-4402.
- [12] Wang H, Yang Z, Liu R, et al. Stereoselective uptake and distribution of the chiral neonicotinoid insecticide, Paichongding, in Chinese pak choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 262: 862-869.
- [13] 许亚军, 张贵华, 杨征敏, 等. 高比活度碳-14 标记毒氟磷的合成与分析[J]. *农药学学报*, 2017, 19(6): 672-678.
- [14] Nishiwaki H, Sato K, Nakagawa Y, et al. Metabolism of imidacloprid in houseflies[J]. *J Pestic Sci*, 2004, 29(2): 110-116.
- [15] Suchail S, Sousa G D, Rahmani R, et al. *In vivo* distribution and metabolism of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L[J]. *Pest Manag Sci*, 2004, 60(11): 1056-1062.
- [16] Armarego W L F, Chai C L L. Purification of laboratory chemicals[M]. 7th Ed. Boston: Butterworth-Heinemann, 2013.
- [17] Piller F M, Appukkuttan P, Gavryushin A, et al. Convenient preparation of polyfunctional aryl magnesium reagents by a direct magnesium insertion in the presence of LiCl[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 47(36): 6802-6806.
- [18] 杨征敏, 叶庆富, 唐庆红, 等. 新型除草剂丙酯草醚 A 环<sup>14</sup>C均标记合成和鉴定[J]. *化学学报*, 2005, 63(21): 1999-2003.
- [19] Wen Jianping, Wang Changlin. Technological optimization of the preparation of imidacloprid[J]. *Chinese J Chem Eng*, 2003, 11(5): 604-607.
- [20] Yang Z M, Ye Q F, Lu L. Synthesis of herbicide ZJ0273 labeled with tritium and carbon-14[J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2008, 51(4): 182-186.
- [21] Wang H Y, Yu Z Y, Yue L, et al. Transformation of <sup>14</sup>C-pyrimidinyloxybenzoic herbicide ZJ0273 in aerobic soils[J]. *Sci Total Environ*, 2010, 408(10): 2239-2244.
- [22] Wang H Y, Ye Q F, Yue L, et al. Fate characterization of a novel herbicide ZJ0273 in aerobic soils using multi-position <sup>14</sup>C labeling[J]. *Sci Total Environ*, 2009, 407(13): 4134-4139.
- [23] Latli B, Casida J E. [<sup>3</sup>H]imidacloprid: synthesis of a candidate radioligand for the nicotinic acetylcholine receptor[J]. *J Label Compd Radiopharm*, 1992, 31(8): 609-613.
- [24] Latli B, Than C, Morimoto H, et al. [6-chloro-3-pyridylmethyl-<sup>3</sup>H] neonicotinoids as high-affinity radioligands for the nicotinic acetylcholine receptor: preparation using NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> and LiB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> [J]. *J Label Compd Radiopharm*, 1996, 38(11): 971-978.
- [25] 宣日成, 郑巍, 刘维屏, 等. 吡虫啉的合成方法[J]. *农药*, 1998, 37(10): 13-16.
- [26] Novák L, Hornyánszky G, Király I, et al. Preparation of new imidacloprid analogues[J]. *Heterocycles*, 2001, 55(1): 45-48.
- [27] Gangadasu B, Raju B C, Rao V J. Synthesis of imidacloprid analogues from novel chloronicotinaldehydes[J]. *J Heterocycl Chem*, 2009, 46(6): 1213-1217.