

# 放射性同位素<sup>14</sup>C 标记瑞德西韦的合成

余志扬<sup>1</sup>, 杨征敏<sup>2,3,\*</sup>, 李梦雪<sup>2</sup>, 宋明钰<sup>2</sup>, 周 兵<sup>2</sup>, 秦雨馨<sup>2</sup>, 李书琰<sup>2</sup>

1. 浙江大学 原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江爱索拓标记医药科技有限公司, 浙江 嘉兴 314303;  
3. 上海启甄同位素标记合成研究中心, 上海 201403

**摘要:** 为制备瑞德西韦药代动力学研究所必需的放射性示踪剂, 以 *N,N*-二甲基 [<sup>14</sup>C] 甲酰胺为同位素原料, 经亲电取代、分子间环化、碘代、亲核加成、羟基保护等十步放射性反应, 反相高效液相色谱 (HPLC) 纯化和手性 HPLC 拆分获得目标物 (217.7 MBq, 光学纯度 (ee) > 99%), 总放射化收率为 4.3%。经核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H NMR)、质谱 (MS) 和在线放射性高效液相色谱 (HPLC-FSA) 分析确认, 目标物为 [吡咯并三嗪环-4-<sup>14</sup>C] 瑞德西韦。放射性薄层成像分析 (TLC-RIA)、离线放射性高效液相色谱分析 (HPLC-LSC)、在线放射性高效液相色谱-二极管阵列检测器/质谱联用 (HPLC-FSA/PDA/MS)、液体闪烁测量 (LSC) 和 HPLC-MS/MS 分析表明, 所得标记物的放射化纯度和化学纯度均大于 98%, 比活度为 2069.8 MBq/mmol, 放射性/非放射性单一杂质含量均小于 1%, 该标记物可作为示踪剂, 用于瑞德西韦的放射性药代动力学等研究。

**关键词:** 同位素标记合成; 瑞德西韦; <sup>14</sup>C; 放射性示踪剂; 抗病毒剂

中图分类号: TL923; O628.21; R914.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-9950(2025)01-0093-10

doi: 10.7538/hhx.2025.47.01.0093

## Synthesis of Radioisotope <sup>14</sup>C Labelled Remdesivir

YU Zhi-yang<sup>1</sup>, YANG Zheng-min<sup>2,3,\*</sup>, LI Meng-xue<sup>2</sup>, SONG Ming-yu<sup>2</sup>,  
ZHOU Bing<sup>2</sup>, QIN Yu-xin<sup>2</sup>, LI Shu-yan<sup>2</sup>

1. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;  
2. Zhejiang Isotope Labelled Compounds Co., Ltd., Jiaxing 314303, China;  
3. Shanghai Qizhen Radiosynthesis Research Centre, Shanghai 201403, China

**Abstract:** To prepare the radiotracer for the pharmacokinetics study of Remdesivir, the <sup>14</sup>C labelled Remdesivir at 4-C in pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazine moiety was synthesized via ten-step reaction. Firstly, nonradioactive 1H-pyrrole was formylated with *N,N*-dimethyl [<sup>14</sup>C]formamide and phosphorus oxychloride in dichloroethane at 0-15 °C, followed by cyanidation with hydroxylamine in the solution of potassium hydroxide and amination with *O*-(2,4-dinitrophenyl)hydroxylamine in tetrahydrofuran at 0-15 °C. The resulting product 5 was cyclized with formamidine acetate in the presence of tribasic potassium phosphate in EtOH at 78 °C, and then iodinated with *N*-iodosuccinimide to obtain the key intermediate 7-iodo[4-<sup>14</sup>C]pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazin-4-amine(compound 7-1) in DMF at 0 °C. Secondly, the intermediate 7-1 was substituted by the nonradioactive intermediate 7-2 and then cyanided to achieve the intermediate 9 at

收稿日期: 2022-08-30; 修订日期: 2022-10-06

基金项目: 上海张江国家自主创新示范区专项发展资金重点资助项目 (NO. 201905-FX-H25-095)

\* 通信联系人: 杨征敏

-65--60 °C. The protecting benzyls in intermediate 9 were deprotected with boron trichloride in dichloromethane at -65--60 °C, and two secondary hydroxyls of the deprotected product were selectively protected with acetone in the presence of TsOH in 2,2-dimethoxypropane at 25 °C. Thirdly, the resulting product 11-1 was phosphated with the nonradioactive intermediate 11-2 and tert-butylmagnesium chloride in tetrahydrofuran at 0-20 °C, and then deprotected with acetic acid at 100 °C to obtain the carbon-14 labelled product Remdesivir as racemic mixture 13. Finally, the target product  $^{14}\text{C}$  labelled Remdesivir (compound 2b, 2-ethylbutyl *N*-[({(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(4-amino[4- $^{14}\text{C}$ ]pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazin-7-yl)-5-cyano-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furyl)methyl}oxy)(oxo)(phenyloxy)- $\lambda^5$ -phosphanyl]-*L*-alaninate; 217.7 MBq, optical ee > 99%) was obtained in the ten-step chemical/radiochemical yield of 4.3% after the purification by using preparative RP-HPLC and resolution of the racemic mixture by using chiral semi-preparative HPLC. The product 2b was compared with the standard sample of nonradioactive Remdesivir and characterized by  $^1\text{H}$  NMR, ESI-MS, and HPLC-FSA. Its technical data (radiochemical/chemical purity > 98%, specific activity 2 069.8 MBq/mmol, content of radioactive/nonradioactive single impurity < 1%) was determined by TLC-IIA, HPLC-LSC, HPLC-FSA/PDA/MS, LSC, and HPLC-MS/MS. The following tracing study indicates that the target product can be used as radiotracer in the radiopharmacokinetics study of Remdesivir.

**Key words:** isotopically labelled synthesis; Remdesivir;  $^{14}\text{C}$ ; radiotracer; antiviral agent

瑞德西韦 (Remdesivir, GS-5734, 化合物 1, 图 1) 是美国吉利德公司研发的一种 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 抑制剂<sup>[1]</sup>, 可被 RdRp 利用并合成 RNA, 从而阻断病毒 RNA 的合成<sup>[2-3]</sup>, 对埃博拉病毒、冠状病毒、丙肝病毒和 HIV 病毒等多种病原性 RNA 病毒具有优异的抗病毒活性<sup>[4]</sup>。2020 年初, 瑞德西韦成功治愈美国首例新冠肺炎的报道进一步激发了国内外学者将瑞德西韦作

为抗病毒候选药物研究的热情<sup>[5]</sup>。迄今为止, 国内外学者对瑞德西韦的合成工艺、毒理药理、临床药效、安全性等方面进行了深入的研究<sup>[5-8]</sup>。尽管当前国外学者以  $^{14}\text{C}$  标记瑞德西韦 (图 1 中化合物 2a) 为示踪剂对瑞德西韦的药物代谢及动力学 (ADME/PK, 简称药代动力学) 已有初步研究, 但涉及内容十分有限, 仍有很多药代动力学问题亟待深入研究<sup>[9]</sup>。



图 1 瑞德西韦 (化合物 1) 和  $^{14}\text{C}$  标记瑞德西韦 (化合物 2a 和 2b)

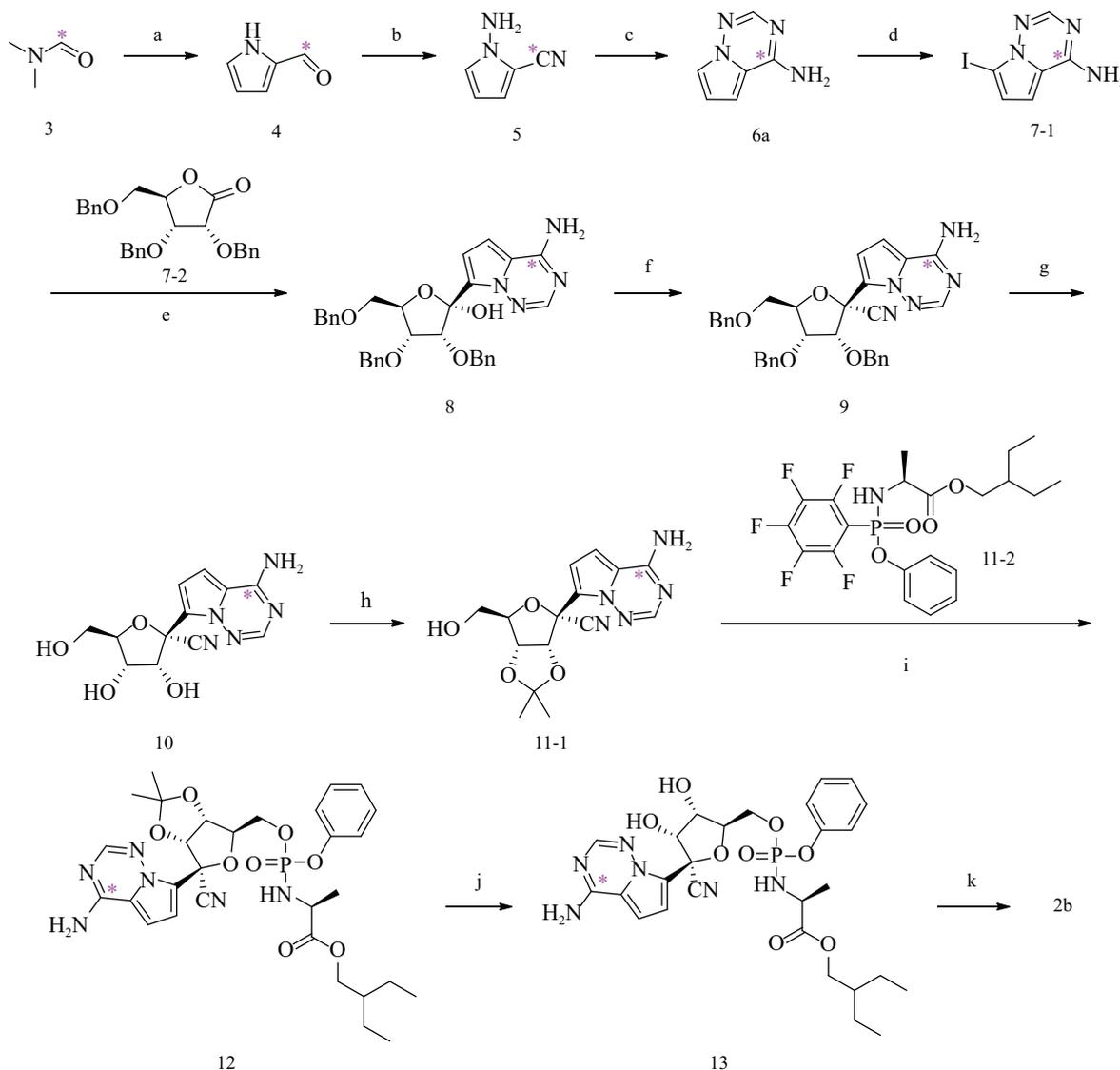
Fig. 1 Remdesivir (compound 1) and two versions of  $^{14}\text{C}$  labelled Remdesivir (compound 2a and 2b)

利用放射性同位素 (小分子药物标记首选  $^{14}\text{C}$ , 其次是氘) 标记物开展新药的临床前及临床药代动力学研究, 具有溯源追踪、痕量精准、直观简便、独特难替等优势, 是国际公认的研究新药的物质平衡、组织分布、代谢物谱分析等药代动力学问题的金标准, 可定量反映代谢物的比例<sup>[10]</sup>。

$^{14}\text{C}$  标记瑞德西韦是利用放射性同位素示踪法开展瑞德西韦药代动力学研究所必需的示踪剂<sup>[11-13]</sup>。综合考虑瑞德西韦分子结构的化学稳定性、代谢稳定性、毒理学重要性和同位素原料供应等因素, 本工作拟以易得的 *N,N*-二甲基  $^{14}\text{C}$  甲酰胺为同位素原料, 选取瑞德西韦分子中具有芳香性的

吡咯并三嗪骨架中4-C为标记位点,制备[吡咯并三嗪环-4-<sup>14</sup>C]瑞德西韦(化合物2b,2-乙基丁基-N-((S)-{[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-氨基[4-<sup>14</sup>C]吡咯并

[2,1-f][1,2,4]三嗪-7-基)-5-氰基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基]甲氧基}(苯氧基)磷酰基)-L-丙氨酸酯;简称<sup>14</sup>C-瑞德西韦),合成路线示于图2。



反应条件: a: 吡咯, POCl<sub>3</sub>, 二氯乙烷(DCE), 0~15 °C, 1 h, 87%; b: (I) 羟胺-O-磺酸, KOH, H<sub>2</sub>O, 0~15 °C, 20 h, 70%; (II) O-(2,4-二硝基苯基)羟胺, NaH, 四氢呋喃(THF), 0~15 °C, 16 h, 74%; c: 乙酸甲脒, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, EtOH, 78 °C, 16 h, 77%; d: 碘代丁二酰亚胺(NIS), N,N-二甲基甲酰胺(DMF), 0 °C, 3 h, 74%; e: (I) TMSCl, THF, 室温; (II) PhMgCl, *i*-Pr-MgCl•LiCl, THF, 0 °C, 1.5 h; (III) 化合物 7-2, -15~20 °C, 3-产率 60%; f: TMSCN, TMSOTf, TfOH, 二氯甲烷(DCM), -65~-60 °C, 2 h, 85%; g: BCl<sub>3</sub>, DCM, -65~-60 °C, 1 h, 87%; h: 2,2-二甲氧基丙烷, TsOH, H<sub>2</sub>O, 丙酮, 25 °C, 2 h, 89%; i: *t*-BuMgCl, THF, 0~20 °C, 20 h, 75%; j: AcOH, 100 °C, 12 h; k: 手性高效液相色谱柱拆分,

第2步产率 64%; \* 手性 HPLC 柱的分辨率标示<sup>14</sup>C 标记位点

图2 <sup>14</sup>C 标记瑞德西韦(化合物2b)的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of <sup>14</sup>C labelled Remdesivir(compound 2b)

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

*N,N*-二甲基 [<sup>14</sup>C] 甲酰胺(比活度 2072.0 MBq/

mmol, 放化纯度 99.9%, 化学纯度 99.8%)、瑞德西韦标样, 自制; 2,5-二苯基噁唑、1,4-双(5-苯基-2-噁唑)苯, 化学纯度 > 99%, 日本 TCI 公司; 液体闪烁测量仪(liquid scintillation counter, LSC)用闪烁

液, 自制<sup>[14]</sup>; 流动液体闪烁分析(flow scintillation analyzer, FSA)用Optiphase HiSafe 3 闪烁液, 美国PE公司; 高效液相色谱(HPLC)和HPLC-质谱(MS)所用的甲醇、乙腈, 色谱级/质谱级, 美国Fisher公司; 其他试剂均为市售分析纯; 溶剂按照文献[15]方法处理。

Alliance e2695 HPLC-2489 UV/Acquity QDa MS液质联用系统、Alliance e2695 HPLC-AIM v. ARC FSA/Waters 2998 PDA/Acquity QDa MS多检测器联用系统<sup>[16]</sup>、Acquity UPLC H-Class/Xevo TQ-XS超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用系统、2545 HPLC-2998 PDA制备型高效液相色谱系统(配备fraction collector III), 除AIM v.ARC FSA外均来自美国Waters公司; AIM v.ARC FSA, 美国Aim Research公司; Agilent 7890B GC-5977B MS气质联用系统, 美国安捷伦公司; Varian 400 MHz核磁共振仪, 美国瓦里安公司; PerkinElmer Tri-Carb 4910TR液体闪烁测量仪, 美国PE公司; AR-2000 TLC(thin layer chromatography)薄层放射性扫描仪, 德国Eckert & Ziegler公司; Milli-Q Reference S. Kit(18.2 MΩ/cm, 25 °C)超纯水仪, 美国密理博公司; Sartorius BSA22 4S-CW(精度为1 mg)、BT25S(精度为0.01 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 <sup>14</sup>C标记瑞德西韦(化合物2b)的制备

### 1.2.1 2-[<sup>14</sup>C]甲酰基吡咯(化合物4)的合成

在氩气保护和室温下, 将三氯氧磷(375.6 mg)的二氯乙烷(DCE)(2.5 mL)溶液缓慢滴入*N,N*-二甲基<sup>[14</sup>C]甲酰胺(184.0 mg, 5 039.5 MBq) DCE(2.5 mL)溶液中, 搅拌15 min; 在0 °C下, 将此混合液缓慢滴入吡咯(166.9 mg) DCE溶液(3 mL)中, 搅拌30 min。采用气相色谱-质谱(GC-MS)和LSC监测反应。放射性原料转化完毕, 将反应液转入饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(20 mL)中, 以二氯甲烷(DCM, 30 mL×6次)萃取, 萃取液经饱和食盐水(60 mL)洗涤、干燥浓缩和快速柱层析(*V*(PE) : *V*(EA)=50 : 1~1 : 1; 石油醚缩写为PE, 乙酸乙酯缩写为EA)得白色固体4(207.0 mg, 4 384.6 MBq, 87%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12.09 (brs, 1H), 9.47 (d, *J*=0.9 Hz, 1H), 7.21~7.22 (m, 1H), 6.99 (dd, *J*=3.7、1.4 Hz, 1H), 6.27 (dd, *J*=3.7、2.4 Hz, 1H)。ESI-MS *m/z*: 98[M+2+H]<sup>+</sup>。

### 1.2.2 *N*-氨基-2-[<sup>14</sup>C]氰基吡咯(化合物5)的合成

在氩气保护和室温下, 将白色固体化合物4(203.7 mg, 4 314.9 MBq)、羟胺磷酸(830.4 mg)和水(8 mL)混合, 搅拌1 h; 体系冷却至0 °C, 向其中缓慢滴加KOH(2.349 g)水溶液(5 mL), 在冰-水浴冷却下搅拌18 h。反应完毕, 向反应混合物中加水(12 mL), 经EA(30 mL×6次)萃取、饱和食盐水(60 mL)洗涤、干燥浓缩和快速柱层析(*V*(PE) : *V*(EA)=20 : 1~1 : 1)得棕色油状物2-[<sup>14</sup>C]氰基吡咯(138.2 mg, 3 024.1 MBq, 70%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12.29(s, 1H), 7.14(s, 1H), 6.90(d, *J*=3.4 Hz, 1H), 6.21(t, *J*=2.9 Hz, 1H)。GC-MS(EI) *m/z*: 94 [M+2]<sup>+</sup>。在氩气保护下, 将氢氧化钠(70.1 mg, *w*=60%)加入冷却至0 °C的2-[<sup>14</sup>C]氰基吡咯(135.5 mg, 2 965.1 MBq)四氢呋喃(THF, 10 mL)溶液, 体系升至室温, 搅拌1 h; 在0 °C下向体系加入2,4-二硝基苯基羟胺(383.3 mg), 升至室温, 搅拌16 h, 采用放射性高效液相色谱-二极管阵列检测器/质谱联用(HPLC-FSA/PDA/MS, 简称HFPM)在线监测反应。反应完毕, 在0 °C下加水(30 mL)淬灭反应, 所得混合液经EA(25 mL×6次)萃取、饱和食盐水(50 mL)洗涤、干燥浓缩和制备型HPLC纯化得白色固体5盐酸盐(155.3 mg, 2 194.2 MBq, 74%)。制备色谱条件: Welch Xtimate C18柱(150 mm×8 mm, 5 μm), 流速3.00 mL/min, 波长254 nm, 进样量150 μL; 柱温30 °C; 梯度洗脱(min/%B)控制: 0/1, 1/1, 20/25, 30/40; A为φ=0.3% HCl溶液, B为乙腈。收集保留时间为11.518~12.865 min的组分。*N*-氨基-2-[<sup>14</sup>C]氰基吡咯(化合物5): <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.03~7.04(m, 1H), 6.74(dd, *J*=4.3、1.7 Hz, 1H), 6.32(s, 2H), 6.05(dd, *J*=4.3、1.7 Hz, 1H)。ESI-MS *m/z*: 110[M+2+H]<sup>+</sup>。

### 1.2.3 4-氨基[4-<sup>14</sup>C]吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪(化合物6a)的合成

在氩气保护和室温下, 将醋酸甲脒(545.5 mg)和磷酸钾(1 110 mg)加入中间体化合物5盐酸盐(152.6 mg, 2 156.0 MBq)乙醇(10 mL)溶液中, 加热回流。HFPM监测显示16 h后反应完毕。将反应液倒入冰-水(20 mL)中, 离心后去除上清液得灰褐色固体, 用冰-水洗涤后同法离心处理。所得固体经干燥和快速柱层析(*V*(DCM) : *V*(甲醇)=100 : 1~1 : 1)得浅灰色固体6a(109.7 mg, 1 660.2 MBq, 77%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.78(s, 1H), 7.69(brs, 2H), 7.59(dd, *J*=2.5、1.6 Hz,

1H), 6.85(dd,  $J=4.3, 1.6$  Hz, 1H), 6.59(dd,  $J=4.3, 2.6$  Hz, 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 137[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.4** 4-氨基-7-碘 [4-<sup>14</sup>C] 吡咯并 [2,1-*f*] [1,2,4] 三嗪 (化合物 7-1) 的合成 在氩气保护下, 将碘代丁二酰亚胺 (NIS, 179.2 mg) 加入冷却至 0 °C 化合物 6a (107.0 mg, 1 616.7 MBq) *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 5 mL) 溶液中, 在 0 °C 下搅拌。HFPM 监测显示 3 h 后反应完毕。将反应液转入 1 mol/L NaOH 溶液 (20 mL), 于 15~20 °C 搅拌 1.5 h, 经离心、水洗、干燥和制备型 HPLC 纯化得到白色固体 7-1 (152.4 mg, 1 196.3 MBq, 74%)。制备色谱条件: Waters Xbridge BEH C18 柱 (150 mm×10 mm, 5 μm), 流速 3.50 mL/min, 波长 254 nm, 进样量 200 μL; 柱温 30 °C; 梯度洗脱 (min/%B) 控制: 0/10, 1/10, 25/45, 30/50; A 为 10 mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液, B 为乙腈。收集保留时间为 15.586~16.649 min 的组分。4-氨基-7-碘 [4-<sup>14</sup>C] 吡咯并 [2,1-*f*] [1,2,4] 三嗪 (化合物 7-1): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.91(s, 1H), 7.79(brs, 2H), 6.99(d,  $J=4.4$  Hz, 1H), 6.83(d,  $J=4.4$  Hz, 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 263[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.5** <sup>14</sup>C 标记中间体 (化合物 8) 的合成 在氩气保护下, 将三甲基氯硅烷 (TMSCl, 123.6 mg) 加入中间体化合物 7-1 (148.8 mg, 1 168.0 MBq) THF (10 mL) 溶液, 搅拌 10 min。体系降温至 0 °C, 向其中缓慢滴加 PhMgCl (1 mol/L, 1 135 μL) THF 溶液, 搅拌 20 min; 然后在 0 °C 下加入 *i*-PrMgCl·LiCl (0.65 mol/L, 875 μL) THF 溶液, 搅拌 15 min。体系降温至 -20 °C, 缓慢滴加中间体 7-2 (238.1 mg) 无水 THF 溶液 (5 mL)。HFPM 监测显示继续搅拌 1 h 反应完毕。以甲醇 (10 mL) 于 0 °C 淬灭反应, 然后向体系加入乙酸/水 (15 mL, 等体积比), 搅拌下降至室温, 减压浓缩。将浓缩物分散于 EA-1 mol/L HCl 混合液 (20 mL, 等体积比), 分层后水相以饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (20 mL) 碱化, 再以 EA (20 mL×6 次) 萃取, 萃取液经饱和食盐水 (30 mL) 洗涤、干燥浓缩和制备型 HPLC 纯化得黄色固体 8 (189.0 mg, 702.6 MBq, 60%)。制备色谱条件: 梯度洗脱 (min/%B) 控制: 0/35, 1/35, 25/65, 30/80; 其余条件同 1.2.2 节。收集保留时间为 14.549~15.727 min 的组分。中间体 (化合物 8): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 8.07 (brs, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.26~7.33 (m, 11H), 7.13~7.17 (m, 3H), 6.99~7.01 (m, 2H), 6.95 (d,  $J=4.8$  Hz, 1H), 5.38 (d,

$J=5.9$  Hz, 1H), 5.06 (d,  $J=5.2$  Hz, 1H), 4.54~4.56 (m, 2H), 4.45~4.50 (m, 4H), 4.00~4.04 (m, 1H), 3.92~3.94 (m, 1H), 3.69 (dd,  $J=10.0, 3.4$  Hz, 1H), 3.47 (dd,  $J=10.0, 6.5$  Hz, 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 555[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.6** <sup>14</sup>C 标记中间体 (化合物 9) 的合成 在氩气保护下, 将三氟甲磺酸 (TfOH, 101.2 mg) 加入冷至 -65~-60 °C 的中间体化合物 8 (186.6 mg, 697.3 MBq) DCM 溶液 (5 mL), 搅拌 10 min; 加入三氟甲磺酸三甲基硅酯 (TMSOTf, 157.7 mg), 维持此温度搅拌 0.5 h; 最后加入三甲基硅氰 (TMSCN, 134.9 mg)。HFPM 监测显示在该温度下继续搅拌 2 h 反应完毕。将体系升至室温, 向体系加入三乙胺 (TEA, 3 mL) 和饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (25 mL), 搅拌 10 min, 用 DCM (15 mL×5 次) 萃取。萃取液经饱和食盐水 (25 mL) 洗涤、干燥浓缩、快速柱层析 ( $V(\text{PE}) : V(\text{EA}) = 1 : 1 \sim 2 : 1$ ) 和制备型 HPLC 纯化得白色固体 9 (162.3 mg, 596.5 MBq, 85%)。制备色谱条件: 梯度洗脱 (min/%B) 控制: 0/40, 1/40, 25/60, 30/80; 其它条件同 1.2.4 节。收集保留时间为 13.628~14.709 min 的组分。中间体 (化合物 9): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.88 (s, 3H), 7.25~7.35 (m, 15H), 6.87 (d,  $J=4.5$  Hz, 1H), 6.75 (d,  $J=4.5$  Hz, 1H), 4.90 (d,  $J=5.0$  Hz, 1H), 4.85 (d,  $J=11.6$  Hz, 1H), 4.77 (d,  $J=11.6$  Hz, 1H), 4.46~4.58 (m, 4H), 4.39 (dd,  $J=9.5, 4.4$  Hz, 1H), 4.12 (t,  $J=5.4$  Hz, 1H), 3.69 (dd,  $J=11.2, 3.6$  Hz, 1H), 3.59 (dd,  $J=11.2, 3.6$  Hz, 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 564[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.7** <sup>14</sup>C 标记中间体 (化合物 10) 的合成 在氩气保护和 -65~-60 °C 下, 将中间体化合物 9 (161.2 mg, 592.5 MBq)、BCl<sub>3</sub> (1.00 mol/L, 1.75 mL) 和 DCM (10 mL) 混合。HFPM 监测显示在该温度下搅拌 1 h 反应完毕。以甲醇 (10 mL) 淬灭反应, 将混合液减压浓缩, 所得固体以 DCM/MeOH 混合液 (10 mL, 体积比为 20/1) 洗涤得到白色固体 10 (72.4 mg, 512.1 MBq, 87%)。中间体 (化合物 10): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.86~7.92 (m, 3H), 6.89 (dd,  $J=10.0, 4.4$  Hz, 2H), 6.10 (d,  $J=6.3$  Hz, 1H), 5.20 (d,  $J=5.3$  Hz, 1H), 4.93 (t,  $J=5.8$  Hz, 1H), 4.63~4.65 (m, 1H), 4.04~4.07 (m, 1H), 3.95 (q,  $J=5.2$  Hz, 1H), 3.64 (ddd,  $J=12.1, 5.1, 3.5$  Hz, 1H), 3.48~3.54 (m, 1H)。ESI-MS  $m/z$ : 294[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.8** <sup>14</sup>C 标记中间体 (化合物 11-1) 的合成 在氩

气保护下,将2,2-二甲氧基丙烷(128.3 mg)、TsOH·H<sub>2</sub>O(51.3 mg)依次加入中间体化合物10(71.6 mg, 506.5 MBq)干燥丙酮(5 mL)溶液。HFPM监测显示在室温下搅拌2 h反应完毕。向反应液中加入饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(20 mL),搅拌10 min,经EA(15 mL×5次)萃取、饱和食盐水(25 mL)洗涤、干燥浓缩和制备型HPLC纯化得白色固体11-1(72.0 mg, 447.5 MBq, 89%)。制备色谱条件:梯度洗脱(min/%B)控制:0/8, 1/8, 25/50, 30/80;其它条件同1.2.4节。收集保留时间为15.276~16.317 min的组分。中间体(化合物11-1):<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>CN-*d*<sub>3</sub>) δ: 7.88(s, 1H), 6.93(d, *J*=4.6 Hz, 1H), 6.78(d, *J*=4.6 Hz, 1H), 6.41(s, 2H), 5.35(d, *J*=6.6 Hz, 1H), 5.04(dd, *J*=6.4, 2.6 Hz, 1H), 4.48~4.50(m, 1H), 3.82~3.85(m, 1H), 3.66~3.77(m, 2H), 1.70(s, 3H), 1.37(s, 3H)。ESI-MS *m/z*: 334[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.9** <sup>14</sup>C标记中间体(化合物12)的合成 在氩气保护下,将*t*-BuMgCl(375 μL, 溶剂为0.85 mol/L THF)溶液加入冷至0 °C的中间体化合物11-1(69.9 mg, 434.4 MBq) THF(3 mL)溶液,维持此温度搅拌30 min;向反应液中加入中间体化合物11-2(151.2 mg),体系升至室温。HFPM监测显示在室温下搅拌16 h反应完毕。以饱和氯化铵溶液(30 mL)淬灭反应,经EA(20 mL×5次)萃取、饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(20 mL)和饱和食盐水(30 mL)洗涤、干燥浓缩和快速柱层析(*V*(PE):*V*(EA)=1:1~5:1)得白色固体12(100.8 mg, 342.3 MBq, 75%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.86(s, 1H), 7.25~7.29(m, 2H), 7.15(d, *J*=7.3 Hz, 3H), 6.89~6.90(m, 2H), 5.34(d, *J*=6.3 Hz, 1H), 4.98~4.99(m, 1H), 4.56(d, *J*=2.5 Hz, 1H), 4.25~4.34(m, 2H), 4.00~4.04(m, 1H), 3.90~3.94(m, 1H), 3.80~3.87(m, 1H), 1.71(s, 3H), 1.45~1.48(m, 1H), 1.40(s, 3H), 1.26~1.36(m, 8H), 0.86(t, *J*=7.2 Hz, 6H)。<sup>31</sup>P NMR(162 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ: 3.23(s)。ESI-MS *m/z*: 645[M+2+H]<sup>+</sup>。

**1.2.10** 目标物<sup>14</sup>C-瑞德西韦(化合物2b)的合成 在氩气保护下,将中间体化合物12(99.9 mg, 339.2 MBq)与φ=80% AcOH(5 mL)的混合液加热至100 °C搅拌。HFPM监测显示在室温下搅拌12 h反应完毕。将反应混合物经浓缩,所得粗品溶于饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(25 mL),以EA(15 mL×5次)萃取;

萃取液经饱和食盐水(25 mL)洗涤、干燥浓缩和快速柱层析(*V*(DCM):*V*(甲醇)=20:1~100:1)得外消旋产物13。外消旋产物13以手性半制备柱拆分后获得白色固体2b(63.6 mg, 光学纯度(ee)>99%, 218.0 MBq, 两步收率64%)。手性拆分条件:Daicel CHIRALPAK® AD-H柱(250 mm×10 mm, 5 μm),流速3.00 mL/min,波长254 nm,进样量100 μL;柱温25 °C;流动相:*V*(正己烷)/*V*(乙醇)=75/25。收集保留时间为16.915~18.126 min的组分。<sup>14</sup>C-瑞德西韦(化合物2b):<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ: 7.87(s, 1H), 7.28~7.32(m, 2H), 7.14~7.20(m, 3H), 6.92(d, *J*=4.8 Hz, 1H), 6.88(d, *J*=4.8 Hz, 1H), 4.79(d, *J*=5.4 Hz, 1H), 4.37~4.42(m, 2H), 4.25~4.31(m, 1H), 4.17(t, *J*=5.6 Hz, 1H), 4.00~4.04(m, 1H), 3.85~3.95(m, 2H), 1.45(dq, *J*=12.2, 5.9 Hz, 1H), 1.28~1.35(m, 7H), 0.85(t, *J*=7.4 Hz, 6H)。<sup>31</sup>P NMR(162 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>) δ: 3.51(s)。ESI-MS *m/z*: 605[M+2+H]<sup>+</sup>。

### 1.3 <sup>14</sup>C标记瑞德西韦(化合物2b)的质量指标分析

用于放射性药代动力学研究的<sup>14</sup>C标记医药的质量指标主要包括放化纯度、化学纯度、比活度、总活度和单一杂质含量等。所得白色固体2b的质量指标分别采用TLC-IIA(isotope imaging analysis, IIA)、HPLC-LSC、HPLC-FSA(面积归一法)、HPLC-PDA(Photo-Diode Array, PDA, 面积归一法)、HPLC-MS/MS法测量,具体方法参考文献[17-20]。具体实验条件如下: HPLC条件: Waters XBridge C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流速1.00 mL/min;波长254 nm;柱温30 °C;进样量10 μL;梯度洗脱(min/%B)控制:0/30, 1/30, 25/90, 30/90;A为0.5%甲酸水溶液,B为乙腈。手性HPLC条件:Daicel CHIRALPAK® AD-H柱(100 mm×4.6 mm, 5 μm),流速1.00 mL/min,波长254 nm,进样量10 μL,柱温25 °C,流动相*V*(正己烷)/*V*(乙醇)=70/30。FSA条件:闪烁液流速为6.00 mL/min;检测池温25 °C。

## 2 结果与讨论

基于放射性药代动力学实验对<sup>14</sup>C标记药物的要求,本研究以瑞德西韦分子中具有芳香性的吡咯并三嗪环骨架中4-C为标记位点,首先按照放射性合成过程中电离辐射防护要求在常量冷

反应条件下筛选适合各步标记合成的方法,优化各步筛中方法的微量反应工艺,然后通过低比活度热反应检验所得目标物的质量指标(尤其是单一杂质含量、晶型、比活度、放化收率和放化纯度等)是否符合要求,最后基于低比活度热反应验证的工艺条件,以高比活度 *N,N*-二甲基 [<sup>14</sup>C] 甲酰胺为同位素原料,经亲电取代、分子间环化、碘代、亲核加成、羟基保护等十步放射性反应、反相 HPLC 纯化和手性 HPLC 拆分获得目标物 <sup>14</sup>C-瑞德西韦(化合物 2b, 217.7 MBq, ee > 99%), 总放化收率/化学收率为 4.3%。

瑞德西韦前期冷反应研究结果和目标物(化合物 2b)的 <sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR、ESI-MS 和在线放射性高效液相色谱(HPLC-FSA)综合分析表明,白色固体 2b 为 <sup>14</sup>C-瑞德西韦。定量分析显示目标物 <sup>14</sup>C-瑞德西韦质量指标如下:比活度为 2069.8 MBq/mmol(称重-LSC法);放化纯度 > 98%(TLC-HIA、HPLC-LSC、HPLC-FSA 三法测定);化学纯度 > 98%(HPLC-PDA 面积归一法);非放射性单一杂质含量 < 1%(HPLC-PDA 面积归一法与 HPLC-MS/MS 法结合);放射性单一杂质含量 < 1%(HPLC-FSA 与 HPLC-MS/MS 法结合)。根据目标物质量(63.6 mg)和比活度计算可知,目标物的总活度为 217.7 MBq;结合所用同位素原料 *N,N*-二甲基 [<sup>14</sup>C] 甲酰胺总活度(5039.5 MBq) 计算可知,目标物的总放化收率为 4.3%。后续示踪实验证实,目标化合物 2b 可作为放射性示踪剂,满足放射性药代动力学研究对 <sup>14</sup>C 标记物的要求<sup>[11-13]</sup>。

在药物 <sup>14</sup>C 标记合成中,首先要考虑的问题是药物分子中标记位点的选择<sup>[21]</sup>。在选择标记位点时,需综合考虑药物分子结构的化学稳定性和代谢稳定性、药代动力学实验的目的和内容及其对标记物的要求、<sup>14</sup>C 标记原料来源、标记合成难度(成本)和目标物的时效性等多种因素。然而,药代动力学研究是一个需要不断探索、逐步深入的复杂过程;在前期探索性药代动力学实验中,获取 <sup>14</sup>C 标记药物的时效性往往是初始阶段药代动力学实验中优先考虑的因素。为快速获得瑞德西韦的 <sup>14</sup>C 标记物,国外学者以剧毒的三甲基硅 [<sup>14</sup>C] 氰为同位素原料、经五步放射性反应制备了氰基 <sup>14</sup>C 标记瑞德西韦(化合物 2a)<sup>[4]</sup>;本项目组曾以瑞德西韦分子中的羰基碳作为标记位点,从 [1-<sup>14</sup>C] 丙酸开始,经溴代、胺化、酯化、磷酸化等放射性反应制备了羰基 <sup>14</sup>C 标记瑞德西韦(化合物 2c, 图 3)。尽管这两种标记物合成路线短,总放化收率高,产生放射性废物较少,但是这两种标记物(化合物 2a、2c)均以分子环骨架之外的氰基碳或羰基碳为标记位点,标记碳原子在药代动力学实验过程中有可能从分子环骨架脱落而引起瑞德西韦的主代谢片段难以追踪,进而引起放射性药代动力学实验结果与瑞德西韦的实际代谢情况出现较大偏离<sup>[22]</sup>。因此,这两种标记物(化合物 2a、2c)主要适用于前期探索性药代动力学实验,但其中标记位点难以完全满足后期正式药代动力学实验对 <sup>14</sup>C 标记物的要求<sup>[11-13]</sup>。

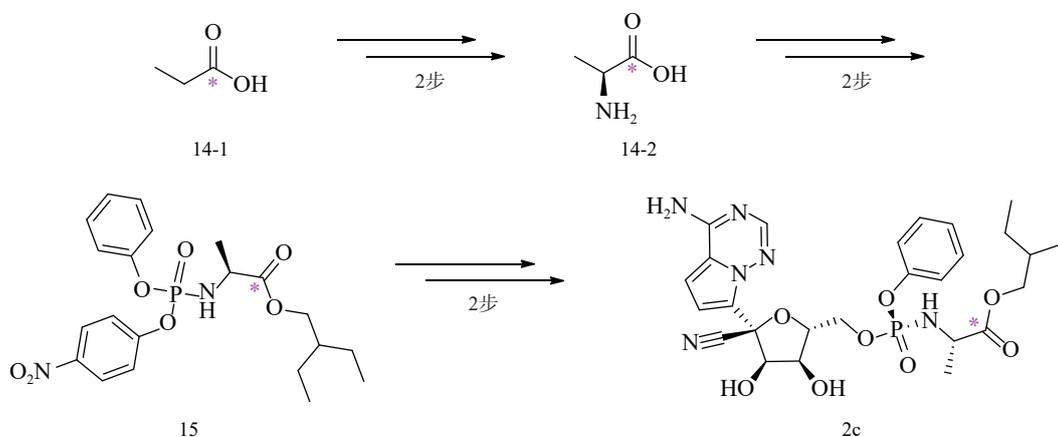


图 3 羰基<sup>14</sup>C 标记瑞德西韦(化合物 2c)的合成路线

Fig. 3 Synthetic route of <sup>14</sup>C labelled Remdesivir(compound 2c) in carbonyl carbon

从放射性药代动力学实验目的与内容、瑞德

西韦分子结构的化学稳定性和代谢稳定性等角

度考虑,瑞德西韦分子中具有芳香性的吡咯并三嗪环骨架为较理想的标记单元,该标记单元可由 *N*-氨基-2-氰基吡咯和甲脒环化而成。换言之,以 *N*-氨基-2-[ $^{14}\text{C}$ ] 氰基吡咯(化合物 5)或 [ $^{14}\text{C}$ ] 甲脒(化合物 16)为同位素原料,可制备吡咯并三嗪标记单元中标记位点不同的两种标记物 6a 和 6b(图 4)。在标记合成时,选择该标记单元中任意一个碳原子作为标记位点均可满足药代动力学实验的要求。多次冷反应结果表明,在满足电离辐射防护的操作条件下,甲脒在操作过程中易水解变质,导致其与 *N*-氨基-2-氰基吡咯的环化产率较低,因而吡咯并三嗪标记单元中 2-C 并非理想的标记位点。相比于 [ $^{14}\text{C}$ ] 甲脒(化合物 16),*N*-氨基-2-[ $^{14}\text{C}$ ] 氰基吡咯(化合物 5)更易制备和保存,因而本研究选取吡咯并三嗪标记单元的 4-C 作为瑞德西韦的标记位点。所得目标化合物 2b 中  $^{14}\text{C}$  标记牢固而不易脱落。

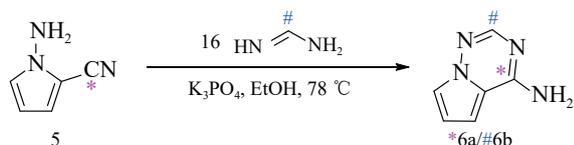


图 4 羰基 $^{14}\text{C}$  标记瑞德西韦(化合物 6a 和 6b)的合成路线

Fig. 4 Synthetic route of  $^{14}\text{C}$  labelled Remdesivir (compound 6a and 6b) in carbonyl carbon

文献[23]报道了两种中间体 2-[ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰基吡咯(化合物 4)的制备方法:(1)先以 [ $^{14}\text{C}$ ] 二氧化碳为原料经两步反应制备 [ $^{14}\text{C}$ ] 甲酸(化合物 18),接着与二丁胺反应制得 *N,N*-二丁基 [ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰胺(化合物 19),最后中间体 19 与吡咯反应制得 2-[ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰基吡咯(化合物 4,图 5),该法包括四步放射性反应,其中涉及放射性气体和多种低沸点易挥发的放射性液体物质,这对操作人员造成内照射的潜在风险高;(2)[ $^{14}\text{C}$ ] 氰化锌与 2-溴吡咯反应制备 2-[ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰基吡咯(化合物 4,图 5)[24],其中 [ $^{14}\text{C}$ ] 氰化锌的制备须使用剧毒的 [ $^{14}\text{C}$ ] 氰化钾/[ $^{14}\text{C}$ ] 氰化钠,安全风险大。此外,这两种方法的总放化收率均较低,产生放射性废物量大,不符合电离辐射防护三原则的要求,均不是制备 2-[ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰基吡咯的理想方法[25]。因此,本研究采用易得的 *N,N*-二甲基 [ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰胺(化合物 3)作为  $^{14}\text{C}$  标记同位素原料,化合物 3 与吡咯发生亲核取代而生成 2-[ $^{14}\text{C}$ ] 甲酰基吡咯(化合物 4),然后将

甲酰基转化为氰基,接着胺化制得 *N*-氨基-2-[ $^{14}\text{C}$ ] 氰基吡咯(化合物 5),最后化合物 5 与甲脒乙酸盐环化得到芳香环骨架标记的关键中间体 4-氨基[4- $^{14}\text{C}$ ] 吡咯并 [2,1-*f*][1,2,4] 三嗪(化合物 6a)[26]。通过合成工艺优化,该化合物 6a 的各步反应的放化收率均不低于 70%,经四步放射性反应和制备型 HPLC 纯化后的总放化收率为 35%。

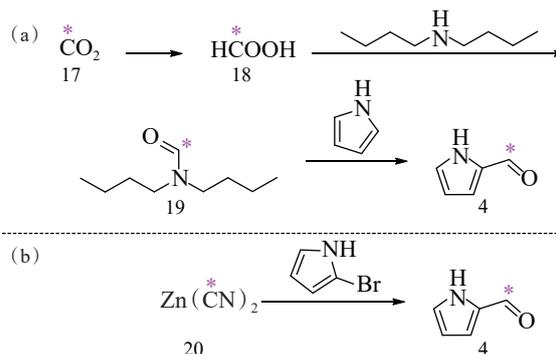


图 5  $^{14}\text{C}$  标记化合物 4 的两种合成路线

Fig. 5 Two synthetic routes of  $^{14}\text{C}$  labelled compound 4

后续的热反应路线是基于对美国吉利德公司等报道[27-30]的诸多冷反应方法进行筛选和微量化改造发展而来。首先化合物 6a 与碘代丁二酰亚胺反应制备化合物 4-氨基-7-碘[4- $^{14}\text{C}$ ] 吡咯并 [2,1-*f*][1,2,4] 三嗪(化合物 7-1),然后以两个三甲基硅基保护化合物 7-1 中氨基,接着以 LiCl 加速碘-镁交换,在低温下与中间体化合物 7-2 发生亲核加成,最后以酸水淬灭反应并脱去硅保护基而得到手性中间体化合物 8。化合物 7-1 和 7-2 皆含有大位阻基团,化合物 7-1 选择由位阻小的一侧进攻化合物 7-2 中羰基,因而控制反应位点手性为 *S* 型,不需要手性试剂参与反应。在化合物 8 中羟基转变为氰基时,羟基通过活化后断键生成碳正离子,只有选择合适位阻的氰基试剂(如 TM-SCN)才能保持中间体化合物 9 手性不变。氰基试剂位阻太小则其亲核进攻不具选择性,而氰基试剂位阻太大则其亲核能力降低而导致反应效果差。中间体化合物 9 以三氯化硼脱苄基而获得中间体化合物 10,该法脱保护基效果较好,而以 Pd/C 加氢法脱苄基则因氰基部分被还原而效果变差。随后,化合物 10 中邻位双羟基以保护选择性高、位阻小、易脱除的 2,2-二甲氧基丙烷进行保护,再与活性磷酸酯发生亲核取代,经脱保护后得到外消旋产物 13,最后以手性柱拆分得到最

终产品(化合物 2b)。最终产品(化合物 2b)的<sup>1</sup>H NMR 和<sup>31</sup>P NMR 分析结果与文献 [27] 报道瑞德西韦的分析结果一致;其相对分子质量比瑞德西韦大 2。综合考虑最终产品的合成技术路线、波谱分析、在线放射性色谱分析和瑞德西韦标样色谱比对结果,确认最终产品为<sup>14</sup>C-瑞德西韦(化合物 2b)。

需要指出的是,<sup>14</sup>C 标记药物中的杂质控制与药物中的杂质控制同等重要,它是决定放射性药代动力学实验成败的关键质量属性之一,尤其是对临床人体药代动力学实验<sup>[31]</sup>。目标化合物 2b 的热反应路线是基于瑞德西韦的冷反应小试/中试工艺改造而来,所采用的原辅料等与小试/中试生产差异巨大,因而所得产物 2b 中杂质的种类、化学结构及其含量均与待申报批准的中试产品中固定杂质(因生产工艺和原料中引入或在贮存过程中产生)必定有所差异。为此,本研究在冷反应阶段将 HPLC-PDA 面积归一法与 HPLC-MS/MS 法结合对所制备瑞德西韦中的杂质进行逐一分析,要求筛选和优化后的合成工艺中所得目标物中单一杂质含量均小于 1%<sup>[32]</sup>;在热反应阶段,本研究在非放射性杂质分析的基础上将 HPLC-FSA 面积归一法与 HPLC-MS/MS 法结合逐一分析目标物中放射性杂质含量,控制每种非放射性/放射性杂质的含量低于 1%,以减小杂质对放射性药代动力学实验的干扰。

### 3 结 论

以 *N,N*-二甲基 [<sup>14</sup>C] 甲酰胺为放射性同位素原料,经十步放射性反应、反相 HPLC 制备和手性 HPLC 拆分获得 [吡咯并三嗪环-4-<sup>14</sup>C] 瑞德西韦(化合物 2b, 217.7 MBq, ee > 99%),总放化收率为 4.3%。目标物<sup>14</sup>C-瑞德西韦的放化纯度/化学纯度均大于 98%,比活度为 2069.8 MBq/mmol,放射性/非放射性单一杂质含量均小于 1%。该标记物可作为放射性示踪剂,用于瑞德西韦的放射性药代动力学等研究。

#### 参考文献:

[1] Williamson B N, Feldmann F, Schwarz B, et al. Clinical benefit of Remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020, 585: 273-276.  
[2] Thornton P J, Kadri H, Miccoli A, et al. Nucleoside phosphate and phosphonate prodrug clinical candidates[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(23): 10400-10410.

[3] Cho A, Zhang L, Xu J, et al. Discovery of the first C-nucleoside HCV polymerase inhibitor(GS-6620) with demonstrated antiviral response in HCV infected patients[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(5): 1812-1825.  
[4] Warren T K, Jordan R, Lo M K, et al. Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys[J]. *Nature*, 2016, 531(7594): 381-385.  
[5] Holshue M L, DeBolt C, Lindquist S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(10): 929-936.  
[6] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus(2019-nCoV) *in vitro*[J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 269-271.  
[7] Oh J M, Venters C C, Di C, et al. U1 snRNP regulates cancer cell migration and invasion *in vitro*[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1.  
[8] De Wit E, Feldmann F, Cronin J, et al. Prophylactic and therapeutic Remdesivir(GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(12): 6771-6776.  
[9] Deb S, Reeves A A, Hopefl R, et al. ADME and pharmacokinetic properties of Remdesivir: its drug interaction potential[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(7): 655.  
[10] Roberts D, Lockley W. Radiochemistry, a vital role supporting drug development[J]. *Drug Discov World*, 2004, Fall issue: 59-64.  
[11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物非临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2014-05-13.  
[12] Food and Drug Administration. Guidance for industry: safety testing of drug metabolites[S/OL]. 2020-03 08-20.  
[13] European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions[S/OL]. 2012-06-21.  
[14] Yang Z M, Ye Q F, Lu L. Synthesis of herbicidal ZJ0273 labeled with tritium and carbon-14[J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2008, 51(4): 182-186.  
[15] Armarego W L F, Chai C L L. Purification of laboratory chemicals[M]. 7th ed. Oxford: Elsevier/Butterworth-Heinemann, 2013.  
[16] 杨征敏,见才广,周兵,等.两种放射性同位素碳-14 标记毒氟磷的合成与分析[J].*有机化学*,2018,38(5):1177-1184.  
[17] 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.  
[18] Yang Z M, Xu Y J, Zhang G H, et al. Synthesis of carbon-14 labeled ZJ0712, a novel strobilurin fungicide[J]. *J Label Compd Radiopharm*, 2018, 61(11): 812-819.  
[19] 杨征敏,宋明钰,陈沪飞,等.放射性同位素碳-14 标记氯虫苯甲酰胺的合成与分析[J].*农药学报*,2020,22(1):19-26.

- [20] 杨征敏,张贵华,许亚军,等.高比活度碳-14 标记吡虫啉的合成与分析[J].*核化学与放射化学*,2018,40(3):196-202.
- [21] 钟大放.创新药物代谢和药动学研究[M].北京:科学出版社,2021.
- [22] 钟大放,李桦.药物设计和开发中的药物代谢:基本原理和实践[M].北京:人民军医出版社,2011:201.
- [23] Ho J, Elmore C, Wallace M, et al. Use of dibutyl[ $^{14}\text{C}$ ]formamide as a formylating reagent in the *Vilsmeier-Haack* reaction and synthesis of a  $^{14}\text{C}$ -labeled novel phosphodiesterase-4 (PDE-4) inhibitor[J]. *Helv Chim Acta*, 2005, 88(5): 1040-1047.
- [24] Saemian N, Shirvani G. A convenient method for  $^{14}\text{C}$ -labeling of *N*-(2-oxo-5-phenyl-2, 3-dihydro-1H-benzo[e][1, 4]diazepin-3-yl)-1H-pyrrole-2-carboxamide-[carboxy- $^{14}\text{C}$ ] as CCK-A antagonist[J]. *J Radioanal Nucl Chem*, 2012, 292(1): 119-122.
- [25] 国家质量监督检验检疫总局.GB 18871—2002 电离辐射防护与辐射源安全基本标准[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [26] Bi L, Fang S, Zhang R, et al. Regioselective mono-bromination of pyrrolo[2, 1-*f*][1, 2, 4]triazin-4-amine[J]. *Asian J Chem*, 2014, 26(20): 7083-7084.
- [27] Siegel D, Hui H C, Doerffler E, et al. Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo[2, 1-*f*][triazin-4-amino]adenine C-nucleoside(GS-5734) for the treatment of Ebola and emerging viruses[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(5): 1648-1661.
- [28] Roy S, Yadaw A, Roy S, et al. Facile and scalable methodology for the pyrrolo[2, 1-*f*][1, 2, 4]triazine of Remdesivir[J]. *Org Process Res Dev*, 2022, 26(1): 82-90.
- [29] Gannedi V, Villuri B K, Reddy S N, et al. Practical Remdesivir synthesis through one-pot organocatalyzed asymmetric (*S*)-P-phosphoramidation[J]. *J Org Chem*, 2021, 86(7): 4977-4985.
- [30] Palli K K, Ghosh P, Avula S K, et al. Total synthesis of Remdesivir[J]. *Tetrahedron Lett*, 2022, 88: 153590.
- [31] 国家药典委员会.中华人民共和国药典-四部:2020年版[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [32] Smith R J, Webb M L. Analysis of drug impurities[M]. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2007.