

• 研究论文 •

新型除草剂丙酯草醚 A 环 ^{14}C 均标记合成和鉴定

杨征敏^{a,c} 叶庆富^b 唐庆红^c 吕 龙^{*,c} 陈子元^b

(^a西北农林科技大学生命科学学院 咸阳 712100)

(^b浙江大学原子核农业科学研究所 杭州 310029)

(^c中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

摘要 以 U- ^{14}C -对氨基苯甲酸为前体, 通过酯化、缩合、还原和取代四步反应获得了 A 环 ^{14}C 均标记的丙酯草醚, 用 PHPLC 对其进行纯化. 采用 HPLC-MS(ESI), MS(EI) 和 ^1H NMR 验证了其结构, 通过 HPLC(外标法) 确定其化学纯度大于 98%; HPLC-LSC 和 TLC-HIA 两种方法分析表明, 其放射化学纯度大于 98%, 其比活度为 1.089 ± 0.011 mCi/mmol. 合成的化学收率和放化收率均为 53%.

关键词 丙酯草醚(A-环-U- ^{14}C); 放射性标记合成; 鉴定; 除草剂

Radiolabeled Synthesis and Identification of a Novel Herbicide, Propyl 4-[2-(4,6-Dimethoxy-2-pyrimidinyl)benzylamino]benzoate with All Six Benzoic Ring Carbons Labeled by ^{14}C

YANG, Zheng-Min^{a,c} YE, Qing-Fu^b TANG, Qing-Hong^c

LU, Long^{*,c} CHEN, Zi-Yuan^b

(^a College of Life Science, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Xianyang 712100)

(^b Institute of Nuclear-Agricultural Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

(^c Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract A radiochemical, propyl 4-[2-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)benzylamino]benzoate with all six benzoic ring carbons labeled by ^{14}C was made from 4-aminobenzoic acid with all six benzoic ring carbons labeled by ^{14}C through esterification, condensation, reduction and substitution, and purified by preparative HPLC. Its structure was identified by LC-MS and ^1H NMR. HPLC test showed its chemical purity exceeded 98%. HPLC-LSC and TLC-HIA demonstrated that its radiochemical purity exceeded 98% and specific activity was 1.089 ± 0.011 mCi/mmol. The total chemical yield and radiochemical yield were all 53%.

Keywords propyl 4-[2-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)benzylamino]benzoate with all six benzoic ring carbons labeled by ^{14}C (A-ring-U- ^{14}C); radiolabelled synthesis; identification; herbicide

2-嘧啶氧基-N-芳基苄胺类衍生物(图 1)是吕龙等发现的一类具有新颖结构和高效除草活性的农药先导化合物. 丙酯草醚(图 2)是源于该类先导化合物的一种新型高效除草剂品种, 能有效防除油菜田中主要的单、双子叶杂草, 对当季油菜和后茬作物水稻等安全^[1~3]. 在

2003 和 2004 年, 丙酯草醚原药及其 10% 的乳油制剂和 10% 悬浮剂先后获得了农药登记证和农药生产批准证书, 使之成为我国为数不多的、具有自主知识产权的农药新品种. 吴军等^[4]曾通过重结晶获得了丙酯草醚单晶, 并解析了丙酯草醚的单晶体结构, 但有关丙酯草醚的放

* E-mail: lulong@mail.sioc.ac.cn

Received May 20, 2005; revised and accepted July 18, 2005.

973 课题“绿色化学农药先导结构及作用靶标的发现与研究”(No. 2003CB114406)资助项目.

射性同位素标记合成的研究, 国内外迄今未见报道。

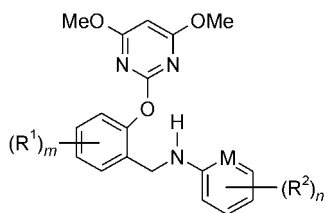


图1 2-嘧啶氧基-N-芳基苄胺类衍生物

Figure 1 Molecule structure of 2-pyrimidinyloxy-N-arylbenzylamine derivatives

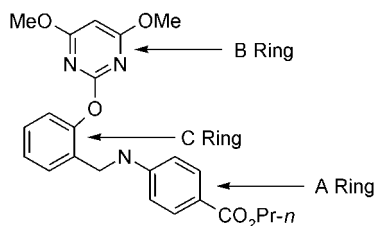


图2 4-[2-(4,6-二氧基嘧啶-2-氧基)苄氨基]苯甲酸正丙酯

Figure 2 Molecule structure of propyl 4-[2-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyloxy)benzylamino]benzoate

放射性同位素示踪技术具有灵敏度高($10^{-18} \sim 10^{-20}$ g)、结果准确、直观和简便等特点, 因此, 在除草剂的代谢途径、作用机理、环境行为与归宿等研究中, 国内外大多采用放射性同位素标记物作为示踪剂^[5-8]。放射性同位素标记合成通常是微量和半微量的, 要求标记位置结构稳定, 合成步骤少, 放化产率高, 产品的放射化学纯度高, 与常规的有机合成有所不同^[9]。因此,

笔者采用以下路线(图式 1)对丙酯草醚的 A 环进行了放射性同位素 ^{14}C 标记合成, 为开展后续研究提供物质基础。

1 放射性标记化合物的合成

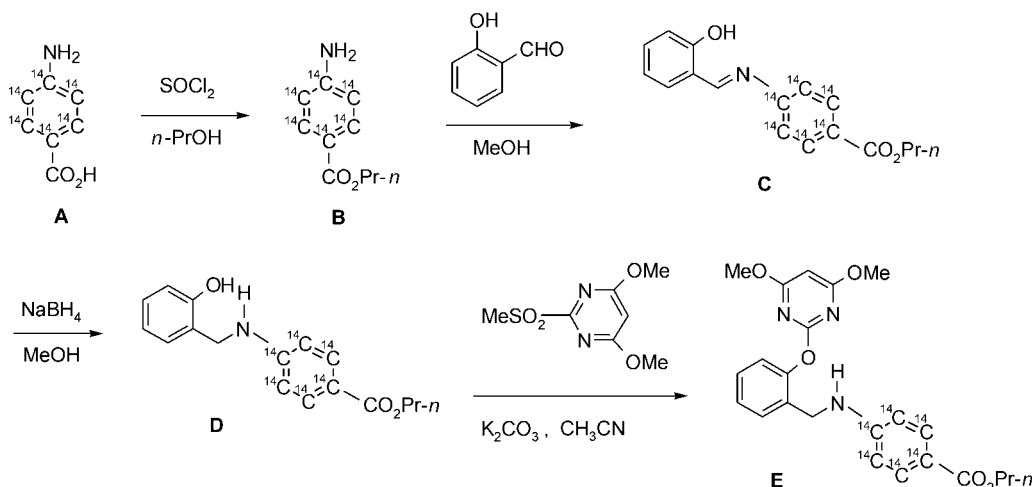
1.1 试剂与仪器

$\text{U-}^{14}\text{C}$ -对氨基苯甲酸的乙醇溶液, 比活度为 2.500 mCi/mmol, 购自美国放射化学品公司。HPLC 采用色谱纯甲醇和乙腈, 水为新蒸二次重蒸水。2,5-二苯基噁唑 (POP), 1,4-双-[5-苯基噁唑基-2]苯 (POPOP) 为闪烁纯(进口分装), 液体闪烁测量(LSC)所用的闪烁液自行配制(5 g PPO+0.5 g POPOP+650 mL 二甲苯+350 mL 乙二醇乙醚)。丙酯草醚标样为中国科学院上海有机化学研究所提供, 纯度大于 98%。其它试剂均为分析纯。所用溶剂按照文献方法纯化^[10]。

X-4 型数字显示显微熔点测定仪, Bruker AM-300 型核磁共振仪, Agilent 5973 型低分辨质谱仪, MARRINER API-TOF 型液相-质谱联用仪。Waters 600E 液相色谱仪系统, Waters 996 Photodiode Array Detector, 色谱工作站为 Millennium³² (V4.00)。FUJIFILM BAS1800-II 同位素成像分析仪。Wallac WinSpectral-1414 液体闪烁测量仪。

1.2 合成方法

称取 205.7 mg 对氨基苯甲酸于 10 mL 蛋形瓶中, 加入 1 mL 无水乙醇, 室温搅拌 10 min, 然后将 2.500 mCi $\text{U-}^{14}\text{C}$ -对氨基苯甲酸的乙醇溶液(2.500 mCi/mmol, 2.5 mL)转入蛋形瓶中, 浓缩除去乙醇, 用 P_2O_5 真空干燥 3 d, 得到粘稠的块状物 A 342.8 mg。



图式 1 A-环- $\text{U-}^{14}\text{C}$ -丙酯草醚标记合成路线

Scheme 1 Synthetic route of propyl 4-[2-(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyloxy)benzylamino]benzoate (A-ring- $\text{U-}^{14}\text{C}$)

在氩气保护下, 称取 342.8 mg **A** 于干燥的反应管里, 然后将上述蛋形瓶依次用 0.5 mL 干燥正丙醇洗涤 8 次, 洗涤液转入反应管, 搅拌至全溶. 在冰-盐浴冷却下, 用干燥注射器在 5 min 内将 446.2 mg 新蒸的二氯亚砷沿反应管内壁滴加到反应体系中, 然后回流 6 h 后冷至室温^[11]. 向反应混合物中缓慢加入 5.0 mL 的饱和碳酸氢钠溶液, 用 5 mL 乙酸乙酯重复萃取 3 次; 再向萃取余液中加入 0.5 mL 异丙醇^[12], 再用 3 mL 乙酸乙酯萃取 3 次; 合并乙酸乙酯萃取液, 用 10 mL 饱和氯化钠溶液洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 用 P_2O_5 真空干燥 3 d, 得标记化合物 **B** 429.3 mg, 收率为 96%.

在 15~20 °C 下, 将 429.3 mg **B** 用 4 mL 无水甲醇溶于 10 mL 蛋形瓶中, 加入 351.2 mg 水杨醛, 搅拌 1 h 后析出黄色固体. 将黄色固体转移出, 用带孔三角漏斗抽滤(滤纸直径为 1.2 cm, 经预处理), 依次用 1.5, 1.0, 1.0 mL 冷冻过的无水甲醇洗涤, 黄色固体用油泵抽干溶剂, 得标记化合物 **C** 588.1 mg, 产率为 82%.

在冰-水浴冷却下, 将 588.1 mg **C** 与 3 mL 无水甲醇在 10 mL 蛋形瓶中混合, 分批加入 200.1 mg 硼氢化钠, 使反应缓和进行. 反应完毕, 在反应体系中加入 3 mL 水, 搅拌 1 h, 浓缩除去甲醇, 补加 3 mL 水, 用乙酸乙酯萃取 4 次. 向萃取余液中加入 0.5 mL 异丙醇, 再用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并乙酸乙酯萃取液. 用 10 mL 饱和氯化钠溶液洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 浓缩除去溶剂, 真空干燥 3 d, 得标记化合物 **D** 569.0 mg, 收率为 97%.

在 55 °C 下, 将 569.0 mg **D** 和 436.5 mg 2-甲砷基-4,6-甲氧基嘧啶溶于 5 mL 乙腈, 加入 826.8 mg 无水碳酸钾, 搅拌(碳酸钾悬浮)48 h. 抽滤除去碳酸钾, 浓缩除去乙腈, 得标记化合物 **E** 粗品 720.1 mg, 收率为 85%.

将标记化合物 **E** 粗品溶于 10.0 mL 乙腈, 用针头式过滤器过滤, 滤液用 PHPLC 纯化. PHPLC 分离条件为: 色谱柱为 Hypersil C_{18} 柱, 8.0 mm×300 mm(大连依利特有限公司). 流速 2.0 mL/min. 流动相: 甲醇/水=75/25 (V/V), 进样量为 200 μL , 检测波长为 254 nm. 分离结果如图 3 所示. 收集 27.317~38.425 min 的洗脱组分, 浓缩至干, 用 P_2O_5 真空干燥 3 d, 得纯化的标记化合物 **E** 561.7 mg. HPLC 制备收率为 78%. m.p. 96~97 °C.

2 放射性标记化合物的鉴定和质量指标分析

2.1 放射性标记化合物的鉴定

HPLC-MS(ESI): HPLC 条件: 检测波长为 254 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量 20 μL . Diamonsil C_{18} , 4.6 mm×250 mm, C_{18} 柱(迪马科技有限公司), 洗脱溶剂 A/B=70/30 (V/V), A 溶液为乙腈+0.1%冰醋酸, B 溶液为水+

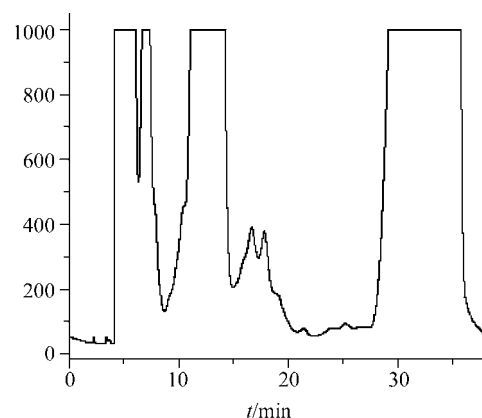


图 3 放射性标记物 **E** 的 PHPLC 图

Figure 3 Preparative HPLC chromatography of radiochemical **E**

0.1%冰醋酸. 丙酯草醚标样保留时间为 13.856 min, 产品保留时间为 13.849 min, 其质谱碎片均为(m/z): 424.3 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 425.3 ($\text{M}^+ + \text{H} + 1$), 446.2 ($\text{M}^+ + \text{Na}$).

MS (70 eV) m/z (%): 245 (100), 423 (M^+ , 62).

^1H NMR (TMS 作内标, CD_3Cl 为溶剂): 1.00 (t, $J=7.20$ Hz, 3H, CH_3), 1.74~1.75 (m, 2H, CH_2), 3.79 (s, 6H, OCH_3), 4.20 (t, $J=6.40$ Hz, 2H, OCH_2), 4.38 (d, $J=5.60$ Hz, 2H, OCH_2), 5.77 (s, 1H, CH), 6.49 (d, $J=8.80$ Hz, 2H, ArH), 7.15~7.40 (m, 4H, ArH), 7.80 (d, $J=8.80$ Hz, 2H, ArH). 以上实验数据与文献报道的丙酯草醚结构一致^[4].

取 1 mL PHPLC 收集液, 加入 10 mL 闪烁液, 混匀后用 LSC 法测定该物质, 结果表明其具有 ^{14}C 放射性的特征. 由此可见, 标记化合物 **E** 就是 A-环- ^{14}C -丙酯草醚.

2.2 放射性标记化合物的质量指标分析

2.2.1 放射性标记化合物的化学纯度测定

准确称取 10.0 mg 丙酯草醚标样, 用乙腈溶解并定容至 100.00 mL, 然后配成 10, 8, 6, 4 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液, 按照下述两种色谱条件分别建立丙酯草醚浓度与峰积分面积的校正关系曲线. 另准确称取 A-环- ^{14}C -丙酯草醚 10.0 mg, 在 50 mL 的容量瓶中配成浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 分别稀释至 8, 6, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 分别按照下述两种色谱条件测定其浓度, 每个样品重复 3 次. 根据浓度计算样品的化学纯度. 两种 HPLC 分析条件: 检测波长为 301.7 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量 20 μL . (1) Intersil ODS-3 C_{18} 柱, 4.6 mm×250 mm (GL Science Co., 日本), 梯度洗脱(min/%A)控制: 0/55, 10/68, 20/81, 30/94. A 溶液为乙腈+0.1%冰醋酸, B 溶液为水+0.1%冰醋酸. 标样保留时间为 21.873 min. (2) SepaxGP- C_{18}

柱, 4.6 mm×150 mm (Sepax. Tech. Inc, 美国), 洗脱梯度(min/%A)控制: 0/10, 15/64, 25/100, 30/100. A 溶液为乙腈+0.1% TFA, B 溶液为水+0.1% TFA. 标样保留时间为 24.529 min. 在色谱条件(1)下, 所得丙酯草醚浓度与积分面积校正关系曲线如图 4 所示. 结果表明, 在两种色谱条件下测得丙酯草醚的化学纯度均大于 98%.

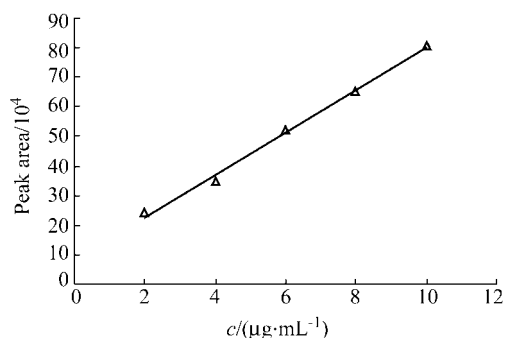


图 4 丙酯草醚浓度与积分面积的校正曲线

Figure 4 Curve of concentration vs. peak area of compound E

2.2.2 放射化学纯度的测定

(1) TLC-IIA 法测定

以硅胶为固定相, 用 2 种展开剂(C 和 D)层析. C 为丙酮/石油醚(1/2, V/V), D 为乙酸乙酯/石油醚(1/2, V/V), 分别吸取 10 μL ^{14}C -丙酯草醚溶液(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)点样, 同时点丙酯草醚标样溶液, 分别展开, 重复 6 次. 取出层析板(5 cm×20 cm), 蒸掉溶剂, 在紫外灯下用直尺量 ^{14}C -丙酯草醚和丙酯草醚标样的移动距离, 分别计算其 R_f 值. 用塑料薄膜将硅胶板包好, 避光条件下与激光磷屏接触 12 h, 然后将激光磷屏进行 IIA (Isotope Imaging Analysis)法分析, 得到 ^{14}C -标记丙酯草醚所成的图像(图 5, 左边 2 个斑点为样品在 C 中展开结果, 右边 3 个斑点为样品在 D 中展开结果). R_f 值分别为 0.78 和 0.55. 图 5 显示 ^{14}C -标记丙酯草醚在两种 TLC 条件下均只显示出一个具有放射性的斑点, 这表明产品中仅有一种放射性

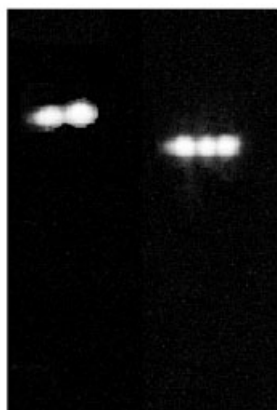


图 5 放射性丙酯草醚薄板层析成像

Figure 5 Radiography of compound E on TLC

物质, 初步认为放射化学纯度约为 100%.

(2) HPLC-LSC 法测定

准确吸取 20 μL A-环- ^{14}C -丙酯草醚溶液(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 按 2.2.1 节进行 HPLC 分离, 用闪烁瓶分别收集 21.012~22.734 min 之间的洗脱组分, 加入 10 mL 闪烁液, 混匀后用 LSC 法测定其放射性活度(A_e), 重复 6 次. 另取 6 个闪烁瓶, 用微量进样器分别向其中加入 20 μL A-环- ^{14}C -丙酯草醚溶液(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 10 mL 闪烁液, 混匀后测定其放射性活度(A_0), 重复 6 次. A_e 测定值为 46660 ± 474 dpm, A_0 测定值为 47193 ± 499 dpm. 计算得到产品的放射化学纯度(A_e/A_0)为 98.87%, 这与 TLC-IIA 法得到结果一致.

3 讨论

标记化合物 E 与丙酯草醚标准品在两种 HPLC 条件下的保留时间均相同, HPLC-MS (ESI), MS (ED), ^1H NMR 表明标记化合物 E 为丙酯草醚; HPLC-LSC 分析显示标记化合物 E 就是 A-环- ^{14}C -丙酯草醚. HPLC-LSC 和 TLC-IIA 两种方法分析均表明标记化合物 E 的放射化学纯度大于 98%, 通过计算可知产品的比活度为 1.089 ± 0.011 mCi/mmol, 与理论计算值(1.000 mCi/mmol)吻合. 两种条件下 HPLC 定量分析均显示, 标记化合物 E 化学纯度大于 98%, 优于丙酯草醚标准品. 通过计算可知合成过程的总化学收率和总放射收率均为 53%. 因此, 采用本文的合成方法是可行的, 所获得 ^{14}C -丙酯草醚能够满足同位素示踪试验的要求^[9].

在化合物放射性同位素标记合成中, 通常采用分子中稳定的芳香环骨架进行标记^[9,13-16]. 在丙酯草醚的标记合成中, 选择 A 环的碳骨架进行 ^{14}C 标记, 标记比较牢固, 它能很好地反映丙酯草醚分子中 A 环部分在植物体内的运转、代谢及其在环境中的迁移和归宿等变化过程. 从合成的难易程度考虑, 笔者选择市场上可购得的 ^{14}C -对氨基苯甲酸为原料, 对丙酯草醚分子骨架中 A 环位置进行 ^{14}C 标记合成.

在同位素标记化合物合成过程中, 由于放射性标记化合物的原料(^{14}C -对氨基苯甲酸)是超微量的, 且价格非常昂贵(4200 US\$/mCi), 首先要处理的问题就是如何减少放射性标记化合物在操作过程中因吸附而引起的损失. 笔者在实验中采取如下措施: (1)选取收率高, 后处理简单的反应, 并经优化后进行标记合成工作. 例如在合成 B 时, 采用本文中的方法进行合成, 反应后处理简单, 产品的收率比传统的浓硫酸催化法提高约 10%. (2)在实验中减少放射性物质的转移操作, 反应和后处理过程中尽可能采用内壁光滑, 体积小的厚壁玻璃

瓶. (3)玻璃仪器内壁, 特别是反应器在使用前需预先用浓度为 1% 的载体溶液充分浸泡, 让其充分吸附载体, 然后用丙酮将玻璃仪器内壁残留载体洗掉, 以减少玻璃仪器内壁对放射性物质的吸附. 滤纸对放射性物质的吸附能力非常强, 在合成 **D** 的过程中, 用载体稀溶液先对滤纸进行预处理, 并尽量采用面积小的滤纸(直径为 1.2 cm)进行抽滤, 可有效地减少放射性物质的损失.

在丙酯草醚放射性标记合成中, 反应速度、后处理和产物状态与在相同条件下非放模型反应有明显的不同, 如标记合成的最后一步反应比较缓慢, 即使较非放反应延长 24 h, 仍有 45% 原料未反应, 因而在本实验中延长反应时间至 48 h, 以提高原料的转化率和产品的收率. 在制备 **B** 的后处理过程中, 饱和碳酸氢钠溶液加入之后, 体系分为两层, 加入乙酸乙酯则体系变为三层, 萃取结束时, 萃取余液依然为两层. 此外, 实验中得到的 **A**, **B** 均为粘稠的块状物, 很难得到结晶, 上述这些现象均与非放模型反应差异很大, 其原因有待研究.

References

- Lu, L.; Chen, J.; Wu, J.; Ling, W.; Mao, L.-S.; Li, M.-Z.; Cai, X.; Peng, W.-L.; Wu, Y.; Wu, S.-G.; Wang, H.-J.; Wang, G.-C.; Cui, H.; Han, S.-D.; Qiu, W.-L.; Wang, Y.-H. *WO 02/34724 A1*, **2002** (in Chinese) [*Chem. Abstr.* **2002**, 136, 355244].
(吕龙, 陈杰, 吴军, 凌文, 毛利胜, 李明智, 蔡娴, 彭伟立, 吴勇, 吴声敢, 王红军, 王国超, 崔虎, 韩世栋, 邱维莲, 王勇华, *WO 02/34724 A1*, **2002**.)
- Lu, L.; Wu, J.; Chen, J.; Ling, W.; Peng, W.-L.; Mao, L.-S.; Wang, G.-C.; Li, M.-Z. *ZL 1348690A*, **2002** (in Chinese).
(吕龙, 吴军, 陈杰, 凌文, 彭伟立, 毛利胜, 王国超, 李明智, *ZL 1348690A*, **2002**.)
- Wu, J.; Lu, L.; Chen, J.; Wang, H.-J.; Peng, W.-L.; Cui, H.; Han, S.-D.; Qiu, W.-L.; Wu, S.-G. *ZL 1347876A*, **2002** (in Chinese).
(吴军, 吕龙, 陈杰, 王红军, 彭伟立, 崔虎, 韩世栋, 邱维莲, 吴声敢, *ZL 1347876A*, **2002**.)
- Wu, J.; Zhang, P.-Z.; Lu, L.; Yu, Q.-S.; Hu, X.-R.; Gu, J.-M. *Chin. J. Struct. Chem.* **2003**, 22, 613 (in Chinese).
(吴军, 张培志, 吕龙, 俞庆森, 胡秀荣, 顾建明, *结构化学*, **2003**, 22, 613.)
- Cobb, K. *Herbicides and Their Mechanisms of Action*, Eds.: Andrew, H. B.; Ralh, C. K., Sheffield Academic Press Ltd., England Sheffield, **2000**.
- Mersie, W.; Foy, C. L. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 89.
- Slade, P.; Smith, A. E. *Nature* **1967**, 213, 919.
- Sree Ramulu, S. *Isotope in Agriculture*, Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, Bombay, Calcutta, India, **1982**, pp. 173~203.
- Chen, Z.-Y.; Sun, J.-H.; Zhang, Q.-Z.; Xu, Y.-L.; Zhang, Y.-X. *Chen Zi-Yuan's Selected Papers on Nuclear-Agricultural Science*, Ed.: Xie, X.-M., Zhejiang Education Press, Hangzhou, **1998**, pp. 455~464 (in Chinese).
(陈子元, 孙锦荷, 张勤争, 徐寅良, 张永熙, 陈子元核农学论文选集, 谢学民编, 浙江教育出版社, 杭州, **1998**, pp. 455~464.)
- Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, Oxford, **1980**.
- Hosangadi, B. D.; Dave, R. H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(35), 6375.
- Ye, Q.-F.; Ding, W.; Wang, H.-Y. *J. Environ. Sci.* **2005**, 17, 215.
- Catriona, J. M.; Bondi, G.; Kevin, C. J. *Environ. Pollut.* **2005**, 133, 25.
- Quantification, Nature and Bioavailability of Bound ^{14}C -pesticide Residues in Soil, Plants and Food*, International Atom Energy Agency, Vienna, Austria, **1986**, pp. 13~119.
- Burauel, P.; BaBmann, F. *Environ. Pollut.* **2005**, 133, 11.
- Ye, Q.-F.; Wu, J.-M.; Sun, J.-H. *J. Environ. Sci.* **2004**, 16(1), 73.

(A0505207 CHENG, B.)