

氘标记稻瘟酯的合成及其杀菌活性

范鑫鑫¹, 韩敏晖², 丁宇轩², 张学博², 李恒朝^{*2}, 安杰^{*2}

(1. 国家知识产权局专利局 专利审查协作北京中心, 北京 100160; 2. 中国农业大学 理学院, 北京 100193)

摘要: 氘标记农药作为探针或者内标在农药代谢、毒理研究或者农药残留分析中发挥着重要作用。由于动力学同位素效应, C-D 键比 C-H 键更为稳定, 因此氘标记农药可能具有更长的半衰期, 以及对非靶标生物更小的毒性。稻瘟酯是一种对水稻恶苗病和稻瘟病有良好防治效果的农用杀菌剂。本研究利用单电子转移还原氘化反应和氘标记中间体, 成功合成了 4 个不同位点被选择性氘代的稻瘟酯, 其中 3 个化合物未见文献报道, 并对其进行了杀菌活性测试。离体杀菌活性测试结果显示, 上述 4 种氘代稻瘟酯对水稻稻瘟病菌和水稻恶苗病菌均具有良好的生物活性, 与未被标记的稻瘟酯无显著差异。氘标记稻瘟酯未来可作为代谢、毒理研究的探针及农药残留分析中的内标。

关键词: 氘标记农药; 氘代稻瘟酯; 还原氘化反应; 杀菌活性

中图分类号: TQ450.1; TQ455 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2020)01-0027-08

Synthesis and fungicidal activity of deuterated pefurazoate

FAN Xinxin¹, HAN Minhui², DING Yuxuan², ZHANG Xuebo², LI Hengzhao^{*2}, AN Jie^{*2}

(1. Patent Examination Cooperation (Beijing) Center of the Patent Office, CNIPA, Beijing 100160, China;

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Deuterium labeled agrochemicals have been widely used as probes in the metabolism and toxicology study or internal standards in the agrochemical residue analysis. Because of the primary deuterium kinetic isotope effect, the cleavage of C-D bonds requires higher activation energy than that of C-H bonds. Deuterium labelled agrochemicals may have longer half-lives and reduced toxicity to non-target organism. Pefurazoate has good control effect on rice bakanae disease and rice blast. In this study, four types of deuterated pefurazoate was synthesized using novel sodium dispersions mediated single electron transfer reductive deuterations developed by Jie An's lab, and three of them were first reported in this work. Their fungicidal activities against *Pyricularia oryzae* and *Gibberella fujikuroi* were evaluated, which were comparable to that of the unlabeled pefurazoate. The deuterated pefurazoate can be used as the probe in the metabolism study, the toxicity study or as the MS internal standard in the residue analysis.

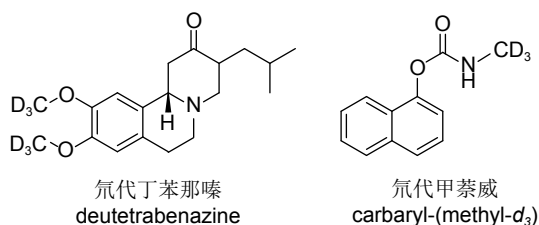
Keywords: deuterium labeled agrochemicals; deuterated pefurazoate; reductive deuteration reaction; fungicidal activity

收稿日期: 2019-07-26; 录用日期: 2019-09-06.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (21602248); 国家重点研发计划 (2017YFD0200504).

作者简介: 范鑫鑫, 男, 助理研究员, 从事有机化学领域发明专利审查工作, E-mail: fanxinxin@cnipa.gov.cn; *李恒朝, 共同通信作者 (Co-author for correspondence), 男, 农药学专业在读博士, E-mail: lihengzhao@cau.edu.cn; *安杰, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 教授, 主要从事氘化学研究, E-mail: jie_an@cau.edu.cn

氘标记有机物是重要的药物活性化合物^[1]、质谱检测内标物质^[2]、探针化合物^[3-4]及聚合物单体^[5]，其在氘代药物研发^[1,6-8]、药代动力学研究^[3-4]、食品安全检测^[2]、生命科学研究^[4]及光电材料研发^[9]等领域中发挥着重要作用。近年来，氘代药物作为一个新兴领域受到了越来越多的重视^[3,8,10]。由于动力学同位素效应，C-D 键较 C-H 键更为稳定。因此，氘的引入可被用于提升药物代谢稳定性及药代动力学特性，使得药物具有更长的半衰期和更小的毒副作用^[1]。2017 年，美国食品和药品管理局 (FDA) 正式批准全球首例氘代药物 (氘代丁苯那嗪)(图式 1) 上市^[10]。目前，大量氘代药物已经进入临床试验^[1]。



图式 1 氘代丁苯那嗪和氘代甲萘威的结构式

Scheme 1 Structural formular of deutetrabenazine and carbaryl-(methyl- d_3)

在农药学相关领域，氘标记农药作为探针或者质谱内标在农药代谢、毒理学研究或者农药残留分析中发挥着重要作用^[11-13]。近年来发布的涉及氘代内标的农药、兽药残留检测国家及行业标准逐年增加，例如：国家标准 GB 23200.5—2016 中涉及的农药残留检测方法需要利用图式 1 中所示的氘代甲萘威^[14]。另外，由于在某些位点引入氘可以

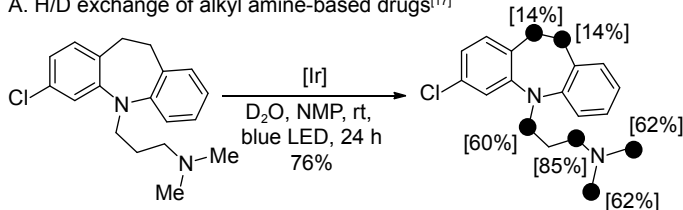
提升生物活性化合物在动、植物体内的代谢稳定性，甚至抑制产生有毒代谢产物的代谢途径^[15-16]。因此，合理设计的氘代农药将有望具有更长的半衰期、更低的施药量以及对非靶标生物更小的毒性，从而减少因为农药施用而导致的环境污染等问题。然而，传统氘代化合物合成方法有限的适用范围和昂贵的价格限制了氘代农药的研发与应用。此外，中国市场上的氘代内标等功能性氘标记有机化合物严重依赖进口，价格昂贵且供给不稳定，因此亟待开发具有中国自主知识产权的氘代化合物合成技术。

氘标记有机化合物的合成策略主要包括以下 2 类：1) 氢/氘交换法。基于这一策略的合成方法大多需要昂贵的催化剂，以及苛刻的反应条件。另外，较低的氘代率和较差的区位选择性也限制了此类方法的应用 (图式 2, A)^[4,17-19]。图式 2 中黑点表示氘代位点，百分数表示氘代率。2) 还原氘化法。利用氘代还原剂 (例如 NaBD_4 和 LiAlD_4) 还原有机化合物，同时将氘引入分子中的特定位置。这一策略具有氘代率高、区位选择性好等优点，然而该类反应需要使用昂贵且易燃的金属氘化物作还原剂，且适用范围较为有限 (图式 2, B)^[20-22]。

针对传统还原氘化反应的上述问题，安杰实验室提出了新型单电子转移还原氘化策略 (图式 3)^[23-27]。与传统还原氘化方法中使用的金属氘化物同时具有还原剂与氘供体的双重作用不同，在单电子转移还原氘化方法中，单电子供体与氘供体分别由 2 种可以直接购买且廉价的试剂提供，无需通过额外步骤合成氘代还原剂，因此极大地简化了合成

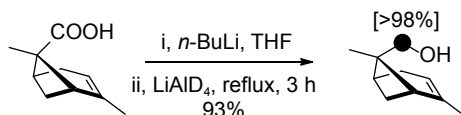
A. 氢/氘交换策略举例^[17]

A. H/D exchange of alkyl amine-based drugs^[17]



B. 传统还原氘化策略举例^[16]

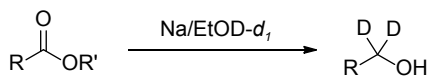
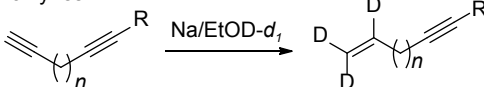
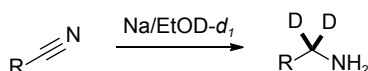
B. Reductive deuteration mediated by alkali metal deuteride^[16]



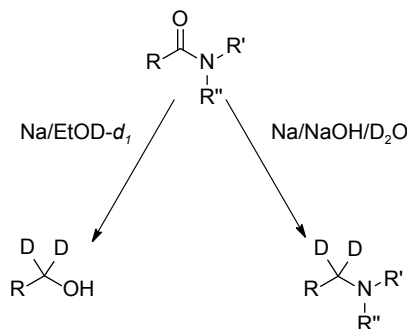
图式 2 氘代化合物的合成策略

Scheme 2 Strategies for the synthesis of deuterium labeled compounds

羧酸酯 esters:

炔
alkynes:腈
nitriles:

酰胺 amides:



氘代率可达98%；产率可达98%；底物适应范围广；反应条件温和；试剂廉价易得。

up to 98% D₂-incorporation; up to 98% yields; broad substrate scope; mild reaction conditions; benign, low-cost reagents.

图式 3 新型单电子转移还原氘化反应

Scheme 3 Novel single electron transfer reactions of reductive deuteration

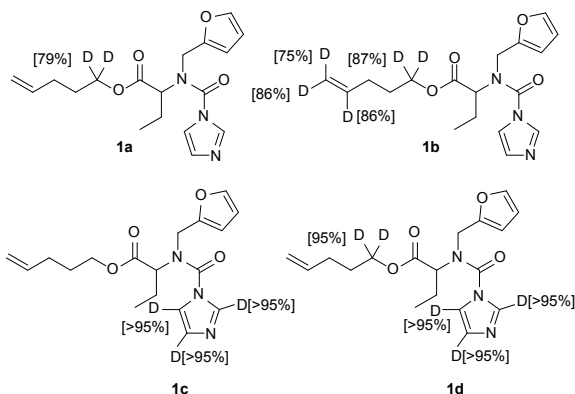
操作与生产成本。基于这一策略，安杰实验室目前已利用钠分散体为电子供体试剂、重水或氘代乙醇为氘供体试剂，建立了羧酸酯、酰胺、炔、烯、腈等多种官能团的还原氘化反应，实现了氘代醇、氘代胺、氘代烯烃、氘代烷烃等多样化氘代化合物的合成^[23-27]。

在本项研究中，我们基于上述新型还原氘

化方法合成了 4 种不同位点被氘标记的稻瘟酯(图式 4)。稻瘟酯是一种高效的咪唑类杀菌剂，对种传病原真菌病害，特别是水稻恶苗病、水稻稻瘟病和水稻胡麻叶斑病的防治卓有成效^[28]。氘标记稻瘟酯可用于针对该农药的毒理、代谢研究，同时可作为氘代内标用于该农药的残留检测^[29]。

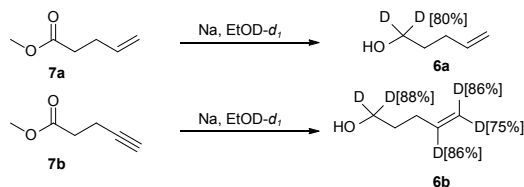
A. 氘代稻瘟酯的结构式

A. The structural formula of deuterated pefurazate



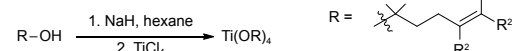
B. 氘标记合成砌块的合成

B. The synthesis of deuterium labeled building blocks



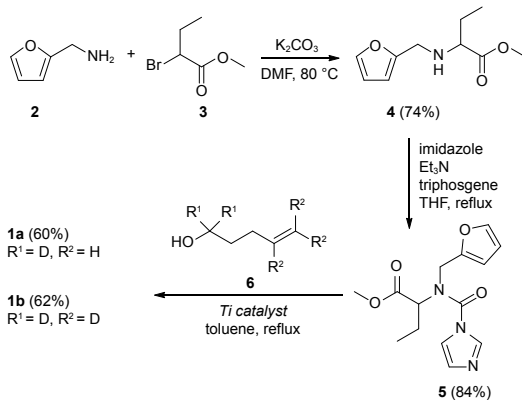
C. 氘标记钛催化剂的合成

C. The synthesis of titanium catalyst



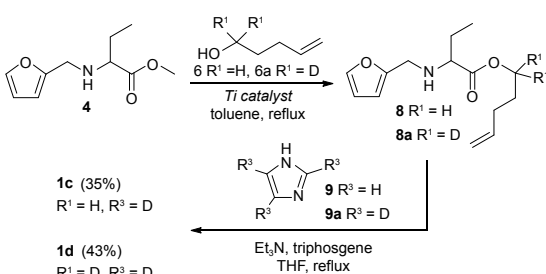
D. 氘代稻瘟酯 1a 和 1b 的合成路线

D. The synthesis route of 1a and 1b



E. 氘代稻瘟酯 1c 和 1d 的合成路线

E. The synthesis route of 1c and 1d



图式 4 氘代稻瘟酯及其合成路线

Scheme 4 The structural formula and synthesis route of deuterated pefurazate

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

玻璃仪器在使用前, 烘干过夜。薄层色谱使用 HSGF254 型玻璃硅胶板, 使用 254 nm 紫外灯或者高锰酸钾显色剂显色。色谱柱分离法使用硅胶 (48~75 μm) 作为固定相。利用 300 MHz 核磁共振仪检测核磁共振数据。除非另有说明, 核磁溶剂使用氘代氯仿。本项研究使用的溶剂和其他试剂均为市售分析纯, 在使用前未经进一步纯化处理。

1.2 氘代稻瘟酯的合成

1.2.1 氘代稻瘟酯 1a 的合成 将糠胺 (**2**, 3.00 mmol, 291 mg) 和 2-溴丁酸甲酯 (**3**, 3.00 mmol, 543 mg) 滴入无水碳酸钾 (9.00 mmol, 1.24 g) 在 *N,N*-二甲基甲酰胺 (3.0 mL) 的悬浊液中, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 26 h。待反应冷却至室温后, 过滤除去碳酸钾, 反应混合液用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并后的水相用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 5:1) 得化合物 **4** 436 mg, 产率 74%。

将咪唑 (**9**, 4.00 mmol, 272 mg) 和三乙胺 (2.00 mmol, 202 mg) 在四氢呋喃 (10 mL) 中的溶液转移至三光气 (0.700 mmol, 208 mg) 的四氢呋喃 (10 mL) 溶液中, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 1 h。之后向反应混合物中加入化合物 **4** (1.00 mmol, 197 mg) 在四氢呋喃 (10 mL) 中的溶液。继续加热回流反应 3 h, 待反应冷却至室温, 用水 (5.0 mL) 淬灭反应。反应混合液用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL), 合并后的水相用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 1:1) 得化合物 **5** 245 mg, 产率 84%。

将化合物 **7a** (2.40 mmol, 274 mg) 溶于无水正己烷 (13 mL) 中, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 氮气保护下依次加入无水氘代乙醇 EtOD- d_1 (10.8 mmol, 508 mg) 和钠在矿物油中的分散体 (34.5 wt%, 10.8 mmol, 720 mg), 剧烈搅拌反应混合物。在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min 后, 用盐酸水溶液 (3.0 mol/L, 2.0 mL) 淬灭反应, 反应混合液用无水乙醚 (10 mL) 稀释。有机相用饱和

食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用无水乙醚萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。得到以化合物 **6a** 与矿物油为主要成分的混合物 703 mg。

将 **6a** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6a** 约 0.400 mmol, 118 mg) 溶于无水正己烷 (2.5 mL) 的溶液缓慢滴加入氢化钠 (60 wt%, 0.50 mmol, 20 mg) 的无水正己烷 (1.0 mL) 悬浊液中, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30 min, 将四氯化钛 (0.10 mmol, 19 mg) 滴加进入反应混合物, 继续在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min。使用旋转蒸发仪除去溶剂, 得到氘标记钛催化剂 ($\text{R}^1 = \text{D}$, $\text{R}^2 = \text{H}$)。

将化合物 **5** (0.500 mmol, 146 mg)、化合物 **6a** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6a** 约 1.50 mmol, 439 mg) 和氘标记钛催化剂 ($\text{R}^1 = \text{D}$, $\text{R}^2 = \text{H}$) (0.025 mmol, 9.9 mg) 加入甲苯 (10 mL) 中加热至回流反应 24 h。关闭加热, 继续在室温下搅拌 12 h, 用水 (5 mL) 淬灭反应, 反应混合液用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释。有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL), 合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 3:1) 得淡棕色液体化合物 **1a** 109 mg, 产率 62%, 氘代率见图式 4。

1.2.2 氘代稻瘟酯 1b 的合成 采用 1.2.1 节方法合成化合物 **5**。

将化合物 **7b** (2.10 mmol, 236 mg) 溶于无水正己烷 (16 mL) 中, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 氮气保护下依次加入无水氘代乙醇 EtOD- d_1 (21.0 mmol, 988 mg) 和钠悬浊液 (34.5 wt%, 21.0 mmol, 1.40 g), 剧烈搅拌反应溶液。在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min 后, 用饱和碳酸氢钠水溶液 (2.0 mL) 淬灭反应。反应混合液用无水乙醚 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用无水乙醚萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。得到以化合物 **6b** 与矿物油为主要成分的混合物 1.13 g。

将 **6b** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6b** 约 0.400 mmol, 215 mg) 溶于无水正己烷 (2.5 mL) 的溶液滴加入氢化钠 (60 wt%, 0.50 mmol, 20 mg) 的无水正己烷 (1.0 mL) 悬浊液中, 在 0 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 30 min。将四氯化钛 (0.10 mmol, 19 mg) 滴加进入反应体系, 继续反应 30 min。使用旋转蒸发

仪除去溶剂, 得到氙标记钛催化剂 ($R^1 = D$, $R^2 = D$)。

将化合物 **5** (0.500 mmol, 146 mg)、化合物 **6b** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6b** 约 1.50 mmol, 804 mg) 和氙标记钛催化剂 ($R^1 = D$, $R^2 = D$) (0.025 mmol, 10 mg) 加入甲苯 (10 mL) 中, 加热回流反应 24 h。关闭加热, 继续在室温下搅拌 12 h, 用水 (5 mL) 淬灭反应。反应混合液用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 3 : 1) 得淡棕色液体化合物 **1b** 纯品 109 mg, 产率 62%, 氙代率见图式 4。

1.2.3 氙代稻瘟酯 **1c** 的合成 采用 1.2.1 节方法合成化合物 **4**。

将化合物 **7a** (2.40 mmol, 274 mg) 溶于无水正己烷 (13 mL) 中, 在 0 °C 氮气保护下依次加入无水乙醇 (10.8 mmol, 498 mg) 和钠在矿物油中的分散体 (34.5 wt%, 10.8 mmol, 720 mg), 剧烈搅拌反应混合物。在 0 °C 下反应 5 min 后, 用盐酸水溶液 (3.0 mol/L, 2.0 mL) 淬灭反应。反应混合物用无水乙醚 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用无水乙醚萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。得到以化合物 **6** 与矿物油为主要成分的混合物 695 mg。

将 **6** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6** 约 0.40 mmol, 114 mg) 溶于无水正己烷 (2.5 mL) 的溶液滴加入氢化钠 (60 wt%, 0.50 mmol, 20 mg) 的无水正己烷 (1.0 mL) 悬浊液中, 在 0 °C 下搅拌反应 30 min, 将四氯化钛 (0.10 mmol, 19 mg) 滴加进入反应混合物, 继续反应 30 min。使用旋转蒸发仪除去溶剂, 得到钛催化剂 ($R^1 = H$, $R^2 = H$)。

将化合物 **4** (1.00 mmol, 197 mg)、化合物 **6** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6** 约 3.00 mmol, 862 mg) 和钛催化剂 ($R^1 = H$, $R^2 = H$) (0.050 mmol, 19 mg) 加入甲苯 (10 mL) 中, 在 150 °C 下反应 24 h。待反应冷却至室温, 用水 (5.0 mL) 淬灭反应。反应混合液用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用

柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 8:1) 得化合物 **8** 纯品 199 mg, 产率 79%。

将氙代咪唑- d_3 (**9a**, 1.50 mmol, 108 mg) 和三乙胺 (1.00 mmol, 101 mg) 的无水四氢呋喃 (5 mL) 溶液缓慢滴入固体光气 (0.350 mmol, 104 mg) 的无水四氢呋喃 (10 mL) 溶液中, 在 0 °C 下搅拌反应 1 h。升温至 5~10 °C, 将化合物 **8** (0.500 mmol, 126 mg) 的无水四氢呋喃 (1 mL) 溶液加入反应混合物中, 之后加热回流反应 1.5 h。待反应冷却至室温, 用水 (5.0 mL) 淬灭反应。反应混合物用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4 : 1) 得淡棕色液体化合物 **1c** 61 mg, 产率 35%, 氙代率见图式 4。

1.2.4 氙代稻瘟酯 **1d** 的合成 采用 1.2.1 节方法合成化合物 **4**、**6a** 和氙标记钛催化剂 ($R^1 = D$, $R^2 = H$)。

将化合物 **4** (1.00 mmol, 197 mg)、化合物 **6a** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6a** 约 3.00 mmol, 879 mg) 和氙标记钛催化剂 ($R^1 = D$, $R^2 = H$) (0.050 mmol, 20 mg) 加入甲苯 (10 mL) 中, 加热回流反应 24 h。待反应混合物冷却至室温, 用水 (5.0 mL) 淬灭反应, 反应混合物用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释。有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 8 : 1) 得化合物 **8a** 200 mg, 产率 79%。

将氙代咪唑- d_3 (**9a**, 1.50 mmol, 108 mg) 和三乙胺 (1.00 mmol, 101 mg) 的无水四氢呋喃 (5 mL) 溶液缓慢滴入固体光气 (0.350 mmol, 104 mg) 的无水四氢呋喃 (10 mL) 溶液中, 在 0 °C 下搅拌反应 1 h。在 5~10 °C 下将化合物 **8a** (0.500 mmol, 126 mg) 的无水四氢呋喃 (1 mL) 溶液加入反应体系中, 加热回流反应 1.5 h。待反应混合物冷却至室温, 用水 (5.0 mL) 淬灭反应。反应混合物用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3×10 mL)。合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 4 : 1) 得淡棕色

液体化合物 **1d** 75 mg, 产率 43%, 氙代率见图式 4。
1.2.5 稻瘟酯原药的合成 采用 1.2.1 节方法合成化合物 **5**。采用 1.2.3 节方法合成化合物 **6** 以及钛催化剂 ($R^1 = H$, $R^2 = H$)。

将化合物 **5** (0.500 mmol, 146 mg)、化合物 **6** 与矿物油为主要成分的混合物 (含有 **6** 约 1.50 mmol, 428 mg) 和钛催化剂 ($R^1 = H$, $R^2 = H$) (0.025 mmol, 9.5 mg) 加入甲苯 (10 mL) 中, 加热至回流反应 24 h。关闭加热, 继续在室温下搅拌 12 h, 用水 (5 mL) 淬灭反应。反应混合液用乙酸乙酯 (10 mL) 稀释, 有机相用饱和食盐水洗涤 (3 × 10 mL), 合并水相, 用乙酸乙酯萃取 (3 × 10 mL)。合并有机相, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 使用旋转蒸发仪除去溶剂。粗产物用柱色谱纯化 (V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 3 : 1) 得淡棕色液体化合物稻瘟酯原药 106 mg, 产率 60%。

1.3 杀菌活性测试方法

采用菌丝生长速率法^[30]测定氙代稻瘟酯类化合物 **1a~1d** 的杀菌活性, 以合成的稻瘟酯原药为对照。供试菌种为中国农业大学理学院应用化学系保存及提供的水稻稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae*、水稻恶苗病菌 *Gibberella fujikuroi*。

分别称取氙代稻瘟酯类化合物和对照药剂稻瘟酯原药, 用二甲基亚砷配制成质量浓度为 1 ×

10⁴ mg/L 的母液, 分别移取适量母液, 加入到已灭菌、冷却的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基中, 制备成质量浓度分别为 6.25、3.125、1.56、0.78、0.39、0.19 和 0.09 μg/mL 带药培养基。将其倒入直径 9 cm 的培养皿中, 每皿 15 mL, 制成带药 PDA 平板。每个药剂 4 次重复。设二甲基亚砷为溶剂空白对照。将菌株置于人工气候培养箱中以 28 ℃ 黑暗环境培养。将培养好的病原菌平板, 沿菌落边缘用打孔器制备成直径 0.7 cm 的菌饼, 分别接种于带药和空白对照 PDA 平板中, 置于 25 ℃ 培养箱中黑暗培养。等空白对照 PDA 平板中菌落充分生长后, 以十字交叉法测量各处理的菌落直径, 取其平均值, 计算菌丝生长抑制率^[30]。

2 结果与讨论

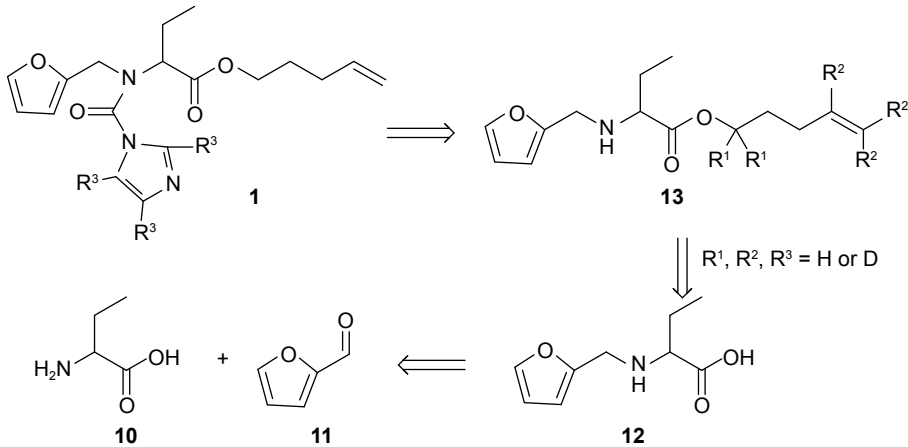
2.1 化合物的合成

本项研究利用本实验室建立的新型单电子转移还原氧化反应合成了氙标化合物 **6a** 和 **6b** (图式 4B), 并以 **6a**、**6b** 以及氙代咪唑 **9a** 为合成砌块合成了 4 种氙标记的稻瘟酯 **1a~1d**; 同时使用同样的合成路线合成了未被氙标记的稻瘟酯。所有化合物的核磁共振氢谱及碳谱数据见表 1。

在设计氙代稻瘟酯的合成路线时, 首先尝试了如图式 5 所示的合成策略。首先以氨基酸 **10** 和

表 1 目标化合物 **1a~1d** 和稻瘟酯的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR
Table 1 ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of compounds **1a-1d** and pefurazoate

化合物 Compound	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)
1a	8.13 (s, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.11 (m, 1H), 6.38 – 6.33 (m, 2H), 5.78 (m, 1H), 5.08 – 4.92 (m, 2H), 4.72 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J = 9.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.19 – 1.89 (m, 4H), 1.72 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.74 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).	170.1, 151.4, 148.4, 143.4, 137.2 × 2, 129.3, 118.4, 115.7, 110.7 × 2, 65.1 (m), 62.5, 46.6, 30.0, 27.5, 21.6, 10.8.
1b	8.16 (s, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.13 (m, 1H), 6.40 – 6.36 (m, 2H), 4.74 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 9.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.15 – 1.98 (m, 4H), 1.74 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.77 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).	170.2, 151.8, 148.7, 143.3, 137.3, 137.0 (m), 130.2, 118.2, 115.2 (m), 110.7, 110.6, 64.8 (m), 62.4, 46.4, 29.8, 27.6, 21.7, 10.8.
1c	7.47 (m, 1H), 6.40 – 6.35 (m, 2H), 5.80 (m, 1H), 5.08 – 4.97 (m, 2H), 4.74 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.01 (dd, $J = 9.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.18 – 1.97 (m, 4H), 1.75 (m, 2H), 0.77 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).	170.1, 151.7, 148.6, 143.2, 137.1, 137.0 (m), 129.6 (m), 117.8 (m), 115.6, 110.6, 110.5, 65.0, 62.4, 46.3, 29.9, 27.7, 21.6, 10.7.
1d	7.47 (m, 1H), 6.40 – 6.35 (m, 2H), 5.80 (m, 1H), 5.09 – 4.97 (m, 2H), 4.74 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 9.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.19 – 1.99 (m, 4H), 1.74 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.77 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).	170.0, 151.7, 148.6, 143.2, 137.1, 136.8 (m), 129.4 (m), 117.6 (m), 115.5, 110.6, 110.5, 64.6 (m), 62.3, 46.3, 29.9, 27.5, 21.6, 10.7.
稻瘟酯 pefurazoate	8.15 (s, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 6.40 – 6.35 (m, 2H), 5.81 (m, 1H), 5.15 – 4.89 (m, 2H), 4.74 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.01 (dd, $J = 9.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.25 – 1.99 (m, 4H), 1.81 – 1.70 (m, 2H), 0.76 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).	169.8, 151.5, 148.4, 143.1, 137.0 × 2, 129.9, 117.9, 115.4, 110.5, 110.4, 64.8, 62.2, 46.2, 29.8, 27.50, 21.4, 10.5.



图式 5 氘代稻瘟酯合成方法的逆合成分析

Scheme 5 Retro synthesis analysis of deuterated pefurazoate

糠醛 **11** 为原料经过还原胺化反应合成氨基酸衍生物 **12**，再通过酯化反应合成化合物 **13**，最后以三光气与咪唑为原料合成目标化合物。然而此路线在合成氨基酸衍生物 **12** 时的还原胺化反应操作较为复杂，产率极低；此外，第 2 步酯化反应同样难以提高产率。

因此，我们对上述合成路线进行了改进(图式 4D)。首先，以糠胺 (**2**) 和 2-溴丁酸甲酯 (**3**) 为原料实现了氨基酸衍生物 **4** 的合成，产率 74%；之后，使用酯交换反应替换酯化反应成功实现了目标化合物的合成，产率>60% (图式 4D)。催化酯交换反应需要以四烷氧基钛酸酯为催化剂。钛酸丁酯虽然催化效果良好，但是由于催化剂中的丁氧基也会与化合物 **5** 发生酯交换反应，生成副产物，影响产品的纯度。因此，该步反应的钛催化剂需采用由 TiCl_4 和化合物 **6** (或 **6a**、**6b**) 合成的钛催化剂以保证产物纯度 (图式 4C)。由化

合物 **4** 合成化合物 **5** 的步骤以三光气、三乙胺与咪唑为试剂。试剂的加入顺序对于该步反应具有显著影响：需先将咪唑与三乙胺的四氢呋喃溶液在 0℃ 冰浴条件下缓慢加入固体光气的四氢呋喃溶液后反应 1 h，再将氨基酸衍生物 **8** 加入反应体系中加热回流反应。如果先将氨基酸衍生物 **8** 和三光气混合，再向反应体系中加入咪唑，则无法获得目标产物。目标产物 **1a**、**1b**、**1c** 与 **1d** 的 3 步合成反应总产率分别为 37%、39%、28% 与 34%。产物中氘代位点的氘代率平均可达 90% 以上，非目标氘代位点的氢原子均未发生氢氘交换。

2.2 杀菌活性

离体杀菌活性测试结果(表 2)表明：4 种不同位点被氘代的稻瘟酯 (**1a**~**1d**) 对稻瘟病菌的抑制率与未被氘代的稻瘟酯对照无明显差异，而 4 种氘代稻瘟酯对水稻恶苗病菌的抑制率则略优于相应的未氘代稻瘟酯。

表 2 氘代稻瘟酯对水稻稻瘟病菌和水稻恶苗病菌的离体活性

Table 2 *In vitro* antibacterial activity of the deuterated pefurazoate against *Pyricularia oryzae* and *Gibberella fujikuroi*

化合物 Compound	水稻稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>			水稻恶苗病菌 <i>Gibberella fujikuroi</i>		
	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC ₅₀ /(mg/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC ₅₀ /(mg/L)
稻瘟酯 pefurazoate	$y = 0.801\ 2x + 4.819\ 1$	0.986\ 4	1.68	$y = 0.849\ 4x + 5.580\ 7$	0.984\ 9	0.20
1a	$y = 0.723\ 2x + 4.870\ 6$	0.998\ 0	1.51	$y = 1.116\ 4x + 5.581\ 8$	0.949\ 2	0.19
1b	$y = 0.658\ 8x + 4.848\ 3$	0.995\ 0	1.70	$y = 0.961\ 8x + 5.718\ 0$	0.963\ 0	0.18
1c	$y = 0.813\ 4x + 4.782\ 0$	0.974\ 7	1.85	$y = 1.073\ 6x + 5.791\ 4$	0.965\ 2	0.18
1d	$y = 0.752\ 4x + 4.808\ 0$	0.984\ 9	1.80	$y = 1.102\ 4x + 5.800\ 0$	0.964\ 4	0.19

有研究表明，对于农药分子，如果将在代谢过程中涉及 C-H 键断裂的位点氘代有可能会改变该农药的代谢速率、甚至是代谢途径，从而改变

农药的生物活性^[1]。根据上述杀菌活性试验结果，本项研究中合成的 4 种氘代稻瘟酯与未氘代的稻瘟酯的离体杀菌活性无明显差别。由此可以推

测, 所述氘代稻瘟酯中的氘代位点均不是易代谢位点。因此, 上述 4 种氘代稻瘟酯未来可作为探针用于稻瘟酯代谢及毒理相关的研究。

3 结论

本研究利用新型单电子转移还原氘化策略合成了 2 种氘代合成砌块, 以此为基础合成了 4 种氘代稻瘟酯, 并对其离体杀菌活性进行了测试研究。合成路线的总收率平均在 30% 以上, 氘代位点的氘代率平均可达 90% 以上, 可以满足代谢、毒理研究对氘代率的要求。本项研究体现了新型单电子转移还原氘化反应在氘代生物活性分子合成中的潜在应用价值。

参考文献 (References):

- [1] PIRALI T, SERAFINI M, CARGNIN S, et al. Applications of deuterium in medicinal chemistry[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(11): 5276-5297.
- [2] CHENG T D, SHELVER W L, HONG C C, et al. Urinary excretion of the *beta*-adrenergic feed additives ractopamine and zilpaterol in breast and lung cancer patients[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(40): 7632-7639.
- [3] MUTLIB A E. Application of stable isotope-labeled compounds in metabolism and in metabolism-mediated toxicity studies[J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(9): 1672-1689.
- [4] ATZRODT J, DERDAU V, KERR W J, et al. Deuterium- and tritium-labelled compounds: applications in the life sciences[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 57(7): 1758-1784.
- [5] KAINO T, JINGUJI K, NARA S. Low loss poly(methylmethacrylate-d8) core optical fibers[J]. *Appl Phys Lett*, 1983, 42(7): 567-569.
- [6] GANT T G. Using deuterium in drug discovery: leaving the label in the drug[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(9): 3595-3611.
- [7] DART A. Cancer immunotherapy: Rewiring cancer cells[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(12): 828.
- [8] KATSNELSON A. Heavy drugs draw heavy interest from pharma backers[J]. *Nat Med*, 2013, 19(6): 656.
- [9] KOIKE Y, KOIKE K. Progress in low-loss and high-bandwidth plastic optical fibers[J]. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 2011, 49(1): 2-17.
- [10] SCHMIDT C. First deuterated drug approved[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 493-494.
- [11] VANDERFORD B J, SNYDER S A. Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(23): 7312-7320.
- [12] YANG X J, DU Z X, LIN A J, et al. Simultaneous determination of neutral, basic and acidic pesticides in aquatic environmental matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Methods*, 2013, 5(8): 2083.
- [13] FANG K, JIANG Z J, WANG J, et al. Simulation of nonylphenol degradation in leafy vegetables using a deuterated tracer[J]. *Environ Sci: Processes Impacts*, 2015, 17(7): 1323-1330.
- [14] 除草剂残留量检测方法第5部分: 液相色谱-质谱质谱法测定食品

中硫代氨基甲酸酯类除草剂残留量: GB 23200.5—2016[S].

National food safety standards: determination of thiocarbamate herbicide residues in foods liquid chromatography-mass spectrometry: GB 23200.5—2016[S].

- [15] KURIHARA N. Application of deuterium isotope effects to the xenobiotic metabolism study[J]. *J Mass Spectrom Soc Jpn*, 1998, 46(3): 157-172.
 - [16] NGUYEN B C, CHOMPOO J, TAWATA S. Insecticidal and nematocidal activities of novel mimosine derivatives[J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 16741-16756.
 - [17] ATZRODT J, DERDAU V, FEY T, et al. The renaissance of H/D exchange[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46(41): 7744-7765.
 - [18] LOH Y Y, NAGAO K, HOOVER A J, et al. Photoredox-catalyzed deuteration and tritiation of pharmaceutical compounds[J]. *Science*, 2017, 358(6367): 1182-1187.
 - [19] YU R P, HESK D, RIVERA N, et al. Iron-catalysed tritiation of pharmaceuticals[J]. *Nature*, 2016, 529(7585): 195-199.
 - [20] SCHOFIELD J, DERDAU V, ATZRODT J, et al. Effect of deuteration on metabolism and clearance of Nerispiridine (HP184) and AVE5638[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(13): 3831-3842.
 - [21] UPSHUR M A, CHASE H M, STRICK B F, et al. Vibrational mode assignment of *alpha*-pinene by isotope editing: one down, seventy-one to go[J]. *J Phys Chem A*, 2016, 120(17): 2684-2690.
 - [22] RODRIGUEZ S, CAMPS F, FABRIAS G. Synthesis of gem-dideuterated tetradecanoic acids and their use in investigating the enzymatic transformation of (*Z*)-11-tetradecenoic acid into (*E,E*)-10,12-tetradecadienoic acid[J]. *J Org Chem*, 2001, 66(24): 8052-8058.
 - [23] DING Y, LUO S, ADIJIANG A, et al. Reductive deuteration of nitriles: the synthesis of *alpha*, *alpha*-dideuterio amines by sodium-mediated electron transfer reactions[J]. *J Org Chem*, 2018, 83(19): 12269-12274.
 - [24] HAN M, MA X, YAO S, et al. Development of a modified bouveault-blanc reduction for the selective synthesis of *alpha*, *alpha*-dideuterio alcohols[J]. *J Org Chem*, 2017, 82(2): 1285-1290.
 - [25] LI H, ZHANG B, DONG Y, et al. A selective and cost-effective method for the reductive deuteration of activated alkenes[J]. *Tetrahedron Lett*, 2017, 58(28): 2757-2760.
 - [26] ZHANG B, LI H, DING Y, et al. Reduction and reductive deuteration of tertiary amides mediated by sodium dispersions with distinct proton donor-dependent chemoselectivity[J]. *J Org Chem*, 2018, 83(11): 6006-6014.
 - [27] HAN M, DING Y, YAN Y, et al. Transition-metal-free, selective reductive deuteration of terminal alkynes with sodium dispersions and EtOD- *d*₁[J]. *Org Lett*, 2018, 20(10): 3010-3013.
 - [28] WADA T, HIRAMATU M, TAKENAKA M, et al. Development of a new seed disinfectant, pefurazoate[J]. *J Pestic Sci*, 1999, 24(2): 230-240.
 - [29] TAKENAKA M, SAKAI S, NISHIDA H, et al. Degradation and adsorption of a seed fungicide pefurazoate in paddy soil[J]. *J Pestic Sci*, 1991, 16(4): 631-639.
 - [30] 农药室内生物测定实验准则杀菌剂第2部分: 抑制病原真菌菌丝生长实验平皿法: NY/T1156. 2—2006[S]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006.
- Pesticides guidelines for laboratory bioactivity tests: Part 2: Petri plate test for determining fungicide inhibition of mycelial growth: NY/T1156. 2—2006[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.

(责任编辑: 金淑惠)