

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022008655

化学试剂,2022,44(4),604~607

氘标记克伦丙罗新的合成方法研究与结构表征

曹炜东¹,韩世磊^{1,2},马秀婷¹,徐银^{1,2},石静飞^{1,2},佟庆龙^{1,2},张磊^{*1,2}

(1.天津阿尔塔科技有限公司,天津 300457;2.阿尔塔标准物质研究院,天津 300457)

摘要:稳定同位素内标试剂与同位素稀释质谱法相结合的检测技术,为快速准确地检测 β_2 受体激动剂克伦丙罗的含量提供了可能。报道了一种新型的稳定同位素氘标记克伦丙罗的合成方法,以4-氨基-3,5-二氯- α -溴代苯乙酮为原料,经改良的Gabriel方法合成了伯胺化合物,再与丙酮- D_6 经还原胺化反应制备了稳定性同位素标记的克伦丙罗- D_7 ,该方法具有路线短、操作简便、总收率高等优点。该产物经核磁共振氢谱($^1\text{H NMR}$)和质谱(ESI-MS)表征确认,氘同位素丰度可达98.3 atom% D,可作为质谱内标试剂应用于兽残检测领域。

关键词:稳定同位素标记;克伦丙罗- D_7 ;质谱内标试剂;兽残检测

中图分类号:TQ463.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2022)04-0604-04

Novel Synthesis Method and Characterization of Deuterium Clenproperol CAO Wei-dong¹, HAN Shi-lei^{1,2}, MA Xiu-ting¹, XU Yin^{1,2}, SHI Jing-fei^{1,2}, TONG Qing-long^{1,2}, ZHANG Lei^{*1,2} (1. Alta Scientific Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 2. Alta Institute for Reference Materials Co., Ltd., Tianjin 300457, China), Huaxue Shiji, 2022, 44(4), 604~607

Abstract: Stable isotope internal standard reagent combined with isotope dilution mass spectrometry can offer a feasible method with accuracy and precision for the detection of β_2 receptor agonist clenproperol. A novel synthetic method of stable isotope deuterium clenproperol. The primary amines were synthesized from 1-(4-amino-3,5-dichlorophenyl)-2-bromoethan-1-one by improved Gabriel method, and then the stable isotope labeled clenproperol- D_7 was prepared by reductive amination with acetone- D_6 . The novel synthesis route has the advantages of short route, easy operation, and higher yield. The deuterium-labeled product was confirmed by nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$) and mass spectrometry (ESI-MS) characterization with more than 98.3 atom% D deuterium isotope abundance, which can be used as MS internal standards in the field of veterinary residues detection.

Key words: stable isotope labeling; clenproperol- D_7 ; MS internal standard reagent; veterinary residues detection

克伦丙罗属于一种 β_2 受体激动剂,俗称瘦肉精,除可用于支气管炎和喘息性支气管炎的治疗外,还被用作饲料添加剂以增加瘦肉组织的比率,其残留物会在动物体内积累,人食用含有瘦肉精残留的动物性产品,如果残留量达到一定程度,就会出现毒副作用,甚至出现急性中毒症状^[1]。我国严格禁止将该类药物给动物使用,并要求动物性食品中不得检出。目前国内关于食品中克伦丙罗残留检测方法主要有高效液相色谱法^[2]、气质联用法^[3]、液质联用法^[3]、放射免疫法^[4]、酶联免疫吸附测定法^[5]等,但是这些方法存在前处理繁琐、基质效应影响大等问题,对测定结果影响较大。采用同位素稀释质谱法(Isotope dilution mass spectrometry, IDMS),可有效地解决上述问题,同时能够有效校正方法中出现的误差,显著提高检测方法的稳定性^[6-9]。

目前,对于稳定同位素氘标记的克伦丙罗的合成已有文献报道, Sun 等^[10]、徐仲杰等^[11]以4-

氨基-3,5-二氯- α -溴代苯乙酮为原料,与异丙胺- D_6 发生取代反应生成氨基酮化合物,然后用硼氢化钠还原羰基合成了克伦丙罗- D_6 ,其中所用的同位素标记原料异丙胺- D_6 ,则需要以丙酮- D_6 为起始原料经6步化学反应合成,该路线反应步骤较长,且合成过程中的中间体分离纯化难度高,胺化过程中副产物较多,总收率仅为11.2%,不适合大批量制备,无法从根本上解决制约我国食品安全检测领域严重依赖产品进口的问题。为解决当前合成方法中的不足,本文设计了一条全新的合

收稿日期:2021-09-09;网络首发日期:2022-01-29

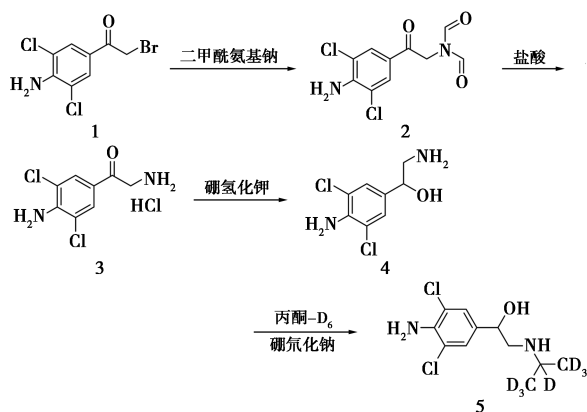
基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFC1604804)。

作者简介:曹炜东(1994-),男,山西吕梁人,学士,主要从事有机合成研究。

通讯作者:张磊, E-mail: lei.zhang@altasci.com.cn。

引用本文:曹炜东,韩世磊,马秀婷,等.氘标记克伦丙罗新的合成方法研究与结构表征[J].化学试剂,2022,44(4):604-607。

成路线,以 4-氨基-3,5-二氯- α -溴代苯乙酮为原料,通过改良的 Gabriel 方法合成了氨基醇中间体,然后直接与廉价的丙酮- D_6 缩合得到克伦丙罗- D_7 ,本文进一步对其合成工艺进行了优化,合成路线如下图所示。

克伦丙罗- D_7 的合成路线Synthesis route of clenproperol- D_7

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

IKA-RCT 加热型磁力搅拌器、IKA HB10 型旋转蒸发器(德国 IKA 集团);Bruker 400 MHz 型核磁共振谱仪(德国布鲁克公司);1260+6120 型高效液相色谱-质谱联用仪(配自动进样器与 DAD 检测器,美国安捷伦科技公司);CHEETAH MP200 型快速柱纯化仪(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

4-氨基-3,5-二氯- α -溴代苯乙酮、二甲酰胺基钠(萨恩化学技术(上海)有限公司);硼氢化钠(化学纯度 95%,同位素纯度 99 atom% D)、丙酮- D_6 (化学纯度 100%,同位素纯度 >99 atom% D)(美国剑桥稳定同位素公司);其他试剂与药品均为市售分析纯,除特别说明外,可直接使用。

1.2 实验方法

1.2.1 2-*N,N*-甲酰基-1-(4-氨基-3,5-二氯苯基)乙酮(2)的合成

将 27 g(95 mmol)4-氨基-3,5-二氯- α -溴代苯乙酮(1)和 11 g(110 mmol)二甲酰胺基钠溶于 400 mL 乙腈中,升温至 70 °C 搅拌 2 h。反应结束后,向反应体系中加水淬灭,用乙酸乙酯萃取,合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤后减压蒸馏除去溶剂。粗品用甲基叔丁基醚打浆得到 23 g 目标产物,产率 88.1%。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 9.02(s, 2H); 7.84(s, 2H); 5.05(s, 2H); 4.97

(s, 2H)。

1.2.2 2-氨基-1-(4-氨基-3,5-二氯苯基)乙酮(3)的合成

将 23 g(84 mmol)化合物 2 溶于 100 mL (6 mol/L) HCl 水溶液中,升至 80 °C 搅拌 1 h。反应结束后,冷却析出固体,过滤得到 21 g 化合物 3,产率 85.7%。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz), δ : 7.90(s, 2H); 4.46(s, 2H)。

1.2.3 2-氨基-1-(4-氨基-3,5-二氯苯基)乙醇(4)的合成

将 21 g(72 mmol)化合物 3 溶于 250 mL 甲醇中,缓慢加入 10 g(185 mmol)硼氢化钾,室温搅拌反应 1 h。反应结束后,加入水和二氯甲烷,萃取、浓缩,粗产品经 Flash 柱色谱纯化得到 15 g 化合物 4,产率 94.9%。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz), δ : 7.20(s, 2H); 4.46(t, 1H, $J=4$ Hz); 2.75~2.68(m, 2H)。

1.2.4 克伦丙罗- D_7 (5)的合成

将 5 g(23 mmol)化合物 4 溶于 30 mL 甲醇- D 溶液中,加入 2.9 g(45 mmol)丙酮- D_6 ,室温下搅拌 2 h,缓慢加入 1.4 g(33 mmol)硼氢化钠,室温搅拌 14 h。反应结束后,加入水和二氯甲烷,萃取、浓缩,粗产品经 Flash 柱色谱纯化得到 3.5 g 化合物,产率 57.4%,经 ESI-MS 检测,同位素丰度 98.3 atom% D。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz), δ : 7.21(s, 2H); 4.6~4.57(m, 1H); 2.74~2.63(m, 2H)。ESI-MS, m/z : 270.2 [$M+H$] $^+$ 。

2 结果与讨论

2.1 合成方法

2.1.1 化合物 2 的合成

本文针对二甲酰胺基钠的投料量和反应温度对反应的影响进行研究, TLC 监控反应,以化合物 1 转化完全为反应终点,结果列于表 1。从表中可以看出,化合物 2 的产率随着反应温度的升高而

表 1 化合物 2 合成工艺优化

Tab.1 Optimization of synthesis process of compound 2

序号	n (二甲酰胺基钠): n (化合物 1)	反应 温度/°C	反应 时间/h	产率/ %
1	1:1	25	2	微量产物
2	1:1	50	2	~35.0
3	1:1	70	2	~75.3
4	1.2:1	70	2	~88.1
5	1.2:1	80	2	~85.1
6	2.0:1	70	2	~87.5

增加,升至 80 °C 时产率略有降低;而二甲酰氨基钠的投料量对反应产率的影响较小。最终,本文确定了最佳的反应工艺条件,即 n (二甲酰氨基钠): n (化合物 1)=1.2:1、反应温度为 70 °C、反应时间 2 h,产率达到 88.0% 左右。

2.1.3 化合物 4 的合成

在化合物 4 的合成当中,本文针对还原剂投料量对反应的影响进行了研究,结果列于表 2。从表中可以看出,随着还原剂投料量的增加,产物产率随之升高,当 n (硼氢化钾): n (化合物 3)=2.5:1 时,产率提高明显,若继续增加投料量,产物产率无显著提高。

表 2 化合物 4 的合成工艺优化

Tab.2 Optimization of synthesis process of compound 4

序号	n (硼氢化钾): n (化合物 3)	反应 温度/°C	反应 时间/h	产率/ %
1	1:1	25	1	~45.0
2	1.5:1	25	1	~62.4
3	2:1	25	1	~82.5
4	2.5:1	25	1	~94.0
5	3:1	25	1	~94.5

2.1.4 克伦丙罗-D₇ 的合成

本文以硼氢化钠和氰基硼氢化钠这两种较为常用的还原剂作为考察对象来研究还原剂的选择对还原胺化反应的影响。由表 3 可知,硼氢化钠与氰基硼氢化钠作为还原剂,在产物产率及同位素丰度方面相差不大,但考虑到经济方面的因素,最终选用价格相对较低的硼氢化钠作为还原剂。值得关注的是,在溶剂选择上,若使用天然丰度的甲醇作溶剂,将极大地降低产物的同位素丰度值(91.5 atom% D)。此外,四氢呋喃(THF)作反应溶剂时,由于反应速率较低,同等条件下产率仅为 25% 左右。

表 3 克伦丙罗-D₇ 合成工艺优化

Tab.3 Optimization of synthesis process of clenproperol-D₇

序号	还原剂	溶剂	反应 时间/h	产率/ %	同位素丰度/ atom% D
1	硼氢化钠	甲醇-D	14	~57.4	~98.3
2	硼氢化钠	甲醇	14	~57.0	~91.5
3	硼氢化钠	THF	14	~25.5	~97.2
4	氰基硼氢化钠	甲醇-D	14	~40.4	~97.2

2.2 克伦丙罗-D₇ 的结构表征

2.2.1 ¹HNMR 确证

本文中克伦丙罗-D₇ 的 ¹HNMR 谱图见图 1。谱图中 δ 7.21 处的单峰为苯环上两个对称氢的

信号峰; δ 4.60~4.57 处的一组四重峰为与羟基相连的一个次甲基氢信号峰,其受到邻位羟基氢和邻位亚甲基氢的耦合作用,故而呈现为多重峰信号;由于分子结构中羟基相连的碳为手性碳,因此,与氨基相连的亚甲基中的两个 H 质子化学不等价,在核磁谱图中表现为不同化学位移的两组信号峰,两个 H 质子同时又受到同碳氢和邻碳氢以及氨基氢的综合影响,最终表现为一组多重峰信号,即 δ 2.74~2.63。此外,由于分子中异丙基的次甲基氢与两个甲基的氢均被氘原子所取代,因而在核磁谱图上不会呈现出相关信号峰,与预期结果一致。

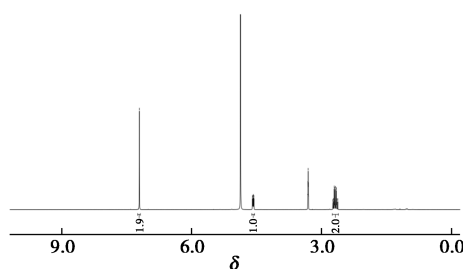


图 1 克伦丙罗-D₇ 的 ¹HNMR 谱图

Fig.1 ¹HNMR spectra of clenproperol-D₇

2.2.2 ESI-MS 确证及同位素丰度确认

经 ESI-MS 检测,克伦丙罗-D₇ 正离子模式的质谱图如图 2 所示,其分子离子峰实测值 $[M+H]^+ = 270.2$,与理论计算结果 270.1 ($C_{11}H_{10}D_7Cl_2N_2O^+$) 相符。

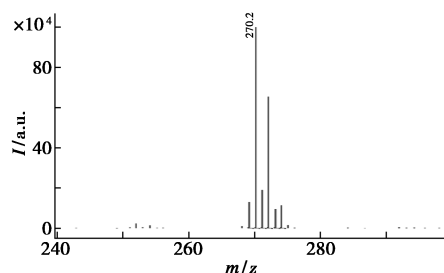


图 2 克伦丙罗-D₇ 的 ESI-MS 谱图

Fig.2 ESI-MS spectrum of clenproperol-D₇

同时,产物经质谱分析,用“质量簇分类法”^[12] 计算,克伦丙罗-D₇ 同位素氘的丰度为 98.3 atom% D。具体计算过程如下:

克伦丙罗-D₇ 的质谱峰簇为: $m/z = 263 \sim 275$,非氘标记的化合物天然丰度分布的占比(归一化后)应为 $A_{263} : A_{264} : A_{265} : A_{266} : A_{267} : A_{268} = 0.505 : 0.063 : 0.327 : 0.042 : 0.054 : 0.007$,将所采集到的质谱图中 $m/z = 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270$ 的峰强度数据归一化后分别记为 $A_0 \sim A_7$,代

入方程组(1)计算,解 $x_j(j=0,1,2,3,4,5,6,7)$ 。

$$\begin{aligned} A_0 &= 0.505x_0 = 0 \\ A_1 &= 0.063x_0 + 0.505x_1 = 0 \\ A_2 &= 0.327x_0 + 0.063x_1 + 0.505x_2 = 0 \\ A_3 &= 0.327x_1 + 0.063x_2 + 0.505x_3 = 0 \\ A_4 &= 0.327x_2 + 0.063x_3 + 0.505x_4 = 0 \\ A_5 &= 0.327x_3 + 0.063x_4 + 0.505x_5 = 0.3 \\ A_6 &= 0.327x_4 + 0.063x_5 + 0.505x_6 = 5.6 \\ A_7 &= 0.327x_5 + 0.063x_6 + 0.505x_7 = 46 \end{aligned} \quad (1)$$

从上述方程组中求得 $x_0=0, x_1=0, x_2=0, x_3=0, x_4=0, x_5=0.60, x_6=11.12, x_7=90.05$, 进一步归一化后即标记了 0~7 个氘的克伦丙罗的分子百分比,列于表 4。

表 4 不同氘标记个数的克伦丙罗的分子百分比

Tab.4 Molecular percentage of clenproperol for different number of deuterium labeling

m/z	X_0	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
分子百分比/%	0	0	0	0	0	0.59	10.92	88.49

克伦丙罗-D₇ 的同位素丰度值以 E 表示,按式(2)计算得到同位素丰度, $E=98.3 \text{ atom\% D}$ 。

$$E = \left(\sum_{j=0}^7 jX_j \right) / \left(7 \sum_{j=0}^7 X_j \right) \quad (2)$$

式中: X_j 表示标记 j 个 D 原子的克伦丙罗-D_j 分子的摩尔分数,其中 $j=0,1,2,3,4,5,6,7$ 。

3 结论

本文以 4-氨基-3,5-二氯- α -溴代苯乙酮为起始原料,经 4 步常规反应合成了克伦丙罗-D₇,产物经 ¹HNMR 和 ESI-MS 确证结构正确,同位素丰度达到了 98.3 atom% D,工艺稳定、操作简便,总收率达 40.9%,可实现规模化生产。本文设计的新合成路线,以廉价的丙酮-D₆ 作为标记源在最后一步反应中引入,极大地提高了工艺的可操作性和原子经济性,降低了克伦丙罗标记产品的合成成本。此外,若将文中丙酮-D₆ 替换为其他标记原子,如 ¹³C 或者 ¹³C 和 D 双标记试剂,或将第 4 步还原胺化反应中硼氟化钠替换为硼氢化钠,可方便地合成相对应的多种类标记化合物。综上,本文所设计的合成路线短、原料廉价、反应条件温和、操作简单,总收率较高。同时,本文为 β 受体激素类内标试剂的合成提供了制备思路,西

马特罗、菲诺特罗、奥西那林、氯丙那林等相关内标试剂均可通过本文提及的方案进行制备,具有重要的社会应用价值。

参考文献:

- [1] 沈建忠,江海洋.畜产品中 β -受体激动剂残留及其危害[J].中国动物检疫,2011,28(6):27-28.
- [2] 刁志祥,王旭堂,张培杨,等.动物源性食品中磺胺类药物和 β -受体激动剂残留的色谱和质谱检测技术研究进展[J].中国畜牧杂志,2020,56(5):12-19.
- [3] 彭涛,赖卫华,张富生,等.20 种 β_2 受体激动剂的性质及检测方法研究进展[J].食品与机械,2013,29(3):254-260.
- [4] 韩宁娟,杜玮,常春,等.食品中 β_2 受体激动剂快速检测方法的建立与应用[J].西北药学杂志,2016,31(6):574-578.
- [5] 廖艳华.动物源性食品中 β -受体激动剂分类及检测方法研究进展[J].食品研究与开发,2019,40(20):213-218.
- [6] 周霄,王军,张丽娟,等.同位素稀释质谱法测量环境样品中的微量元素[J].质谱学报,2001,(4):1-10.
- [7] WANG R G, ZHANG S, DONG S J, et al. Determination of ultratrace indicator polychlorinated biphenyls in animal feed by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with isotope internal standards [J]. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2018, 46(12):178-183.
- [8] BOWERS G N, FASSETT J D, WHITE E. Isotope dilution mass spectrometry and the national reference system [J]. *Anal. Chem.*, 1993, 65(12):475-479.
- [9] HAN C N, LI X Q, LU H, et al. Determination of steroid hormones in milk by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J. Food Saf. Food Qual.*, 2018, 9(7):1 669-1 675.
- [10] SUN K, FANG C, YANG W C, et al. Efficient synthesis of D₆-clenproperol and D₆-cimeterol using deuterium isopropylamine as labelled precursor [J]. *J. Labelled Compd. Rad.*, 2016, 59(13):552-556.
- [11] 徐仲杰,罗勇,孙凯,等.一种稳定同位素标记克伦普罗化合物及其合成方法:CN 105 968 021A[P].2016-09-28.
- [12] 中华人民共和国工业和信息化部.化工行业标准:HG/T 5170—2017[S].北京:化学工业出版社,2017-11-07.