

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022008656

化学试剂,2022,44(4),599~603

## 标准物质与标准品

**编者按:**本期栏目由编委天津阿尔塔科技有限公司张磊博士进行专题组稿,共收录了 3 篇文章,分别涉及稳定同位素氘标记盐酸曲托喹酚的制备、氘标记克伦丙罗新的合成方法研究与结构表征,以及盐酸莱克多巴胺-D6 新的合成方法研究与结构表征。

借助内标试剂的同位素稀释质谱法,只需对样品进行简单的前处理即可利用高分辨质谱进行检测,既便捷高效、降本降耗,又大大提高检测的准确性和灵敏度。因此,对天然丰度的检测用标准品进行稳定同位素标记,高效地合成出相应的内标物,对于食品检测领域具有重要意义。

## 稳定同位素氘标记盐酸曲托喹酚的制备

秦爽<sup>1</sup>,韩世磊<sup>1,2</sup>,邵文哲<sup>1</sup>,徐银<sup>1,2</sup>,石静飞<sup>1,2</sup>,佟庆龙<sup>1,2</sup>,张磊<sup>\*1,2</sup>

(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:**以 2-(3,4,5-三甲氧基苯基)乙酸为起始原料,经过脱甲基、酰胺化、甲基化、比希勒-纳皮拉斯基(Bischler-Napieralski)环化反应、还原、脱保护基等关键反应步骤,得到稳定同位素氘标记的盐酸曲托喹酚。该合成方法原料廉价易得、简单成熟,目标产物氘同位素丰度较高。该产物经核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)和高分辨质谱(HR-MS)表征确认,氘同位素丰度为 99.9 atom% D,适合作为同位素标记质谱内标试剂用于曲托喹酚的定性定量分析。

**关键词:**稳定同位素标记;氘标记盐酸曲托喹酚;质谱内标试剂;同位素丰度

**中图分类号:**0628.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2022)04-0599-05

**Preparation of Stable Isotope Deuterium Labeled Tretroquinol Hydrochloride** QIN Shuang<sup>1</sup>, HAN Shi-lei<sup>1,2</sup>, SHAO Wen-zhe<sup>1</sup>, XU Yin<sup>1,2</sup>, SHI Jing-fei<sup>1,2</sup>, TONG Qing-long<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>\*1,2</sup> (1. Alta Scientific Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 2. Alta Institute of Reference Materials Co., Ltd., Tianjin 300457, China), Huaxue Shiji, 2022, 44(4), 599~603

**Abstract:** A novel deuterium labelled tretroquinol hydrochloride was synthesized from 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) acetic acid via the steps of demethylation, amidation, alkylation, Bischler-Napieralski cyclization reaction, reductive, and deprotection. The synthetic route has the advantages of cheap, accessible starting materials and high isotope abundance. The deuterium-labelled product was confirmed by nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and high-resolution mass spectrometry (HR-MS) characterization with 99.9 atom% D deuterium isotope abundance, which can be used as stable isotope-labeled MS internal standards for qualitative and quantitative analysis.

**Key words:** stable isotope labelling; deuterium labelled tretroquinol hydrochloride; MS internal standards; isotopic abundance

盐酸曲托喹酚又名喘速宁,是  $\beta_2$  受体激动剂,可松弛支气管平滑肌,使哮喘症状明显减轻,临床用于支气管哮喘、喘息型支气管炎的治疗<sup>[1,2]</sup>。世界反兴奋剂机构(World Anti-Doping Agency, WADA)在《2019 年禁用清单国际标准》中已将曲托喹酚明确列为  $\beta_2$  激动剂类禁用物质。2019 年 8 月中国体育总局反兴奋剂中心关于印发《大型赛事食源性兴奋剂防控工作指南(暂行)》的通知中,明确规定了要检测沙丁胺醇、莱克多巴胺、沙美特罗、克伦丙罗、去甲乌药碱和曲托喹酚等  $\beta_2$  激动剂。目前世界范围内均采用传统的外标法进行测定<sup>[3]</sup>,由于运动员药检样品存

在着物质浓度低、样品基质复杂、干扰物质多、代谢物多样等问题,该方法有较大的偏差,而同位素稀释质谱法(Isotope Dilution Mass Spectrometry, IDMS)很好的解决了这一问题<sup>[4,5]</sup>,该方法采用稳定性同位素标记化合物作为内标试剂,可以很好

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)。

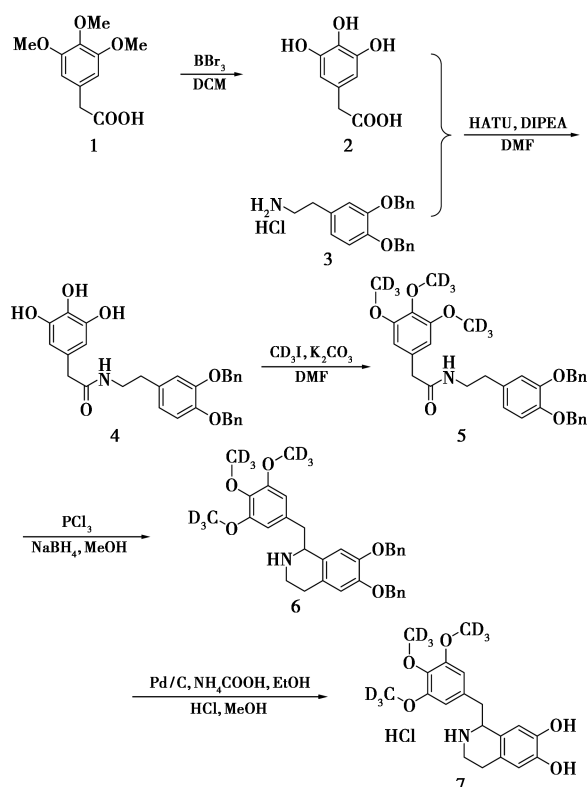
作者简介:秦爽(1990-),男,河北唐山人,硕士,主要从事有机标准品研究。

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

引用本文:秦爽,韩世磊,邵文哲,等.稳定同位素氘标记盐酸曲托喹酚的制备[J].化学试剂,2022,44(4):599-603。

地结合色谱的分离能力和质谱的定性定量能力。因此,合成稳定同位素标记的盐酸曲托喹酚对于准确检测食品和人体代谢物中曲托喹酚的含量具有重要意义。

当前,天然丰度的盐酸曲托喹酚的合成已有报道<sup>[6-9]</sup>,但关于稳定同位素标记的盐酸曲托喹酚的合成还未见报道。本文以廉价的 2-(3,4,5-三甲氧基苯基)乙酸为起始原料,将其具有天然丰度的 3 个甲基通过化学手段置换为具有氘标记的甲基,进而在曲托喹酚分子中引入 9 个氘原子,使其具有“内标试剂”的特性。本文参考天然丰度曲托喹酚的合成方法,并在此基础上做进一步地改进,最终合成了稳定性同位素标记的盐酸曲托喹酚(盐酸曲托喹酚-D<sub>9</sub>),合成路线如下图所示。具有较高化学纯度与同位素丰度的盐酸曲托喹酚-D<sub>9</sub>可以作为药品质检、运动员药检以及盐酸曲托喹酚代谢机理研究的内标物,具有重要的实际应用价值。



盐酸曲托喹酚-D<sub>9</sub>的合成路线

Synthesis route of tretoquinol hydrochloride-D<sub>9</sub>

## 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 600 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);LC-IT-TOF-MS 型高分辨质谱仪(日本岛津公司);QPH-1L 型氢气发生器(上海全浦科学仪器有限公司);LGJ-8 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司)。

2-(3,4,5-三甲氧基苯基)乙酸(98%)、碘甲烷-D<sub>3</sub>(>99 atom% D)(萨恩化学技术(上海)有限公司);3,4-(二苄氧基)苯乙胺盐酸盐(95%,哈辉(上海)医药技术有限公司);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-(3,4,5-三羟基苯基)乙酸(2)的合成

在 500 mL 三口瓶中,加入 15.0 g (66.3 mmol) 2-(3,4,5-三甲氧基苯基)乙酸(1)和 200 mL 无水的二氯甲烷(DCM),置换氮气 3 次,将体系放入冰水浴中。将 150.0 g (598.8 mmol) 三溴化硼溶于 100 mL 无水二氯甲烷中,然后将其滴加至上述反应液中,升至室温搅拌反应 16 h。反应结束后,将体系放至冰水浴中,滴加 50 mL 饱和氯化铵溶液淬灭反应,分出有机相,水相用乙酸乙酯萃取(200 mL×6),合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤后减压蒸馏除去溶剂。残留物经快速柱层析得到 8.2 g 产物,产率 68.0%。

#### 1.2.2 N-(3,4-双(苄氧基)苯乙基)-2-(3,4,5-三羟基苯基)乙酰胺(4)的合成

在 500 mL 圆底烧瓶中,加入 8.2 g (44.5 mmol) 化合物 2、17.0 g (46.0 mmol) 2-(3,4-双(苄氧基)苯基)乙胺盐酸盐(3)、20.5 g (53.9 mmol) 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)和 160 mL 干燥的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF),冰浴下滴入 28.7 g (222.1 mmol) N,N-二异丙基乙胺(DIPEA),升至室温搅拌 16 h。反应结束后,向体系中加入 200 mL 水淬灭反应,用乙酸乙酯萃取(300 mL×5),合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤后减压蒸馏除去溶剂。残留物经柱层析得到 11.0 g 产物,产率 49.0%。<sup>1</sup>HNMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 600 MHz), δ: 7.85 (t, 1H, J = 5.6 Hz); 7.44 (t, 4H, J = 8.3 Hz); 7.40~7.34 (m, 4H); 7.31 (ddd, 2H, J = 9.3, 7.2, 5.5 Hz); 6.93 (dd, 2H, J = 13.8, 5.1 Hz); 6.66 (dd, 1H, J = 8.2, 1.9 Hz); 6.18 (s, 2H); 5.08 (d, 4H, J = 7.4 Hz);

3. 19(dd, 2H,  $J = 14.2, 6.3$  Hz); 3. 10(s, 2H); 2. 59(t, 2H,  $J = 7.4$  Hz)。

### 1. 2. 3 *N*-(3,4-双(苄氧基)苯乙基)-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)乙酰胺-D<sub>9</sub>(5)的合成

室温下,向 250 mL 单口瓶中加入 5.0 g(10.0 mmol) 化合物 4、50 mL 干燥的 DMF 和 5.5 g(39.8 mmol) 无水 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,立即滴加 5.8 g(40.0 mmol) CD<sub>3</sub>I,室温继续搅拌 16 h。反应结束后,加入 150 mL 水淬灭反应,乙酸乙酯萃取(150 mL×3),合并有机相,用无水硫酸钠干燥,过滤后减压蒸馏除去溶剂。残留物经柱层析得到 3.5 g 产物,产率以化合物 4 计为 60.0%,产率以 CD<sub>3</sub>I 计为 45.0%,氘同位素丰度为 99.9 atom% D。<sup>1</sup>HNMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz),  $\delta$ : 7.97(dd, 1H,  $J = 10.4, 4.8$  Hz); 7.44(t, 3H,  $J = 7.5$  Hz); 7.40~7.34(m, 4H); 7.31(dd, 2H,  $J = 13.2, 7.2$  Hz); 6.93(dd, 2H,  $J = 7.9, 5.7$  Hz); 6.67(dd, 1H,  $J = 8.2, 1.9$  Hz); 6.52(s, 1H); 5.07(t, 4H,  $J = 3.0$  Hz); 3.30(s, 2H); 3.26~3.19(m, 2H); 2.62(t, 2H,  $J = 7.2$  Hz)。

### 1. 2. 4 6,7-双(苄氧基)-1-(3,4,5-三甲氧基苄基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-D<sub>9</sub>(6)的合成

室温下,向 250 mL 单口瓶中加入 70 mL PCl<sub>3</sub>,分批加入 7.0 g(12.6 mmol) 化合物 5,90 °C 加热搅拌 2 h。反应结束后减压除去 PCl<sub>3</sub>,加入甲苯(20 mL×3)减压蒸馏除净剩余的 PCl<sub>3</sub>。将粗品溶解于 30 mL 甲醇,分批加入 0.5 g(13.2 mmol) 硼氢化钠,室温搅拌 2 h。反应结束后减压蒸馏除去溶剂,残留物经柱层析得到 3.3 g 化合物,产率 49.0%。

### 1. 2. 5 盐酸曲托唑啉-D<sub>9</sub>(7)的合成

室温下,向 100 mL 单口瓶中加入 1.4 g(2.6 mmol) 化合物 6、280 mg(0.06 mmol) 10% Pd/C、504 mg(8.0 mmol) 甲酸铵、28 mL 乙醇,置换氮气 3 次,室温反应 16 h。反应结束后过滤,滤液减压蒸馏除去溶剂,残留物经柱层析得到曲托唑啉-D<sub>9</sub>,将其溶于 5 mL 甲醇中,加入 9 mL(1 mol/L) 盐酸,减压蒸馏除去甲醇,冷冻干燥后得到 600 mg 盐酸曲托唑啉-D<sub>9</sub>,产率 58.0%。HPLC 纯度 99.9%,氘同位素丰度为 99.9 atom% D。HR-MS,  $m/z$ : 353.206 8 [M-H]<sup>-</sup>(理论值 353.206 3)。<sup>1</sup>HNMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz),  $\delta$ : 6.65(d, 2H,  $J = 12.5$  Hz); 6.62(s, 2H); 4.68(dd, 1H,  $J = 8.7, 5.6$  Hz); 3.45(ddd, 2H,  $J = 19.8, 13.5, 5.9$  Hz); 3.27

(ddd, 1H,  $J = 12.8, 7.4, 5.8$  Hz); 3.01(ddd, 2H,  $J = 12.9, 9.7, 5.1$  Hz); 2.92(dt, 1H,  $J = 17.0, 6.2$  Hz)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 产物合成

#### 2.1.1 化合物 5 的合成

在化合物 5 的合成研究中,按照常规 S<sub>N</sub>2 反应投料方式,即将化合物 4 与碳酸钾于 DMF 中活化 30 min,再加入碘甲烷,实验发现虽然反应物消失,但只有少量的产物生成,推测可能是化合物 4 的二价或三价负离子不稳定易降解所致,因此对不同的碱、溶剂、反应时间进行了优化,结果列于表 1。从表中可以看出,相同条件下,不对化合物 4 进行活化,可以有效地提高产物产率;此外,与 THF 和 DMSO 相比,DMF 作溶剂反应效果更好;使用碱性更强的氢氧化钠,产率欠佳。

表 1 化合物 5 合成的反应条件筛选

Tab.1 Reaction condition screening for the synthesis of compound 5

序号	碱	溶剂	活化时间/min	产率/%
1	碳酸钾	DMF	30	微量产物
2	碳酸钾	DMF	10	13
3	碳酸钾	DMF	0	49
4	氢氧化钠	DMF	0	微量产物
5	碳酸钾	THF	0	26
6	碳酸钾	DMSO	0	微量产物

#### 2.1.2 化合物 6 的合成

如下页图所示,在化合物 6 的合成过程中,曾尝试分步合成,即先合成 6,7-双(苄氧基)-1-(3,4,5-三甲氧基苄基)-3,4-二氢异喹啉-D<sub>9</sub>(8),但是在将反应液进行后处理及纯化的过程中,发现(6,7-双(苄氧基)-3,4-二氢异喹啉-1-基)-(3,4,5-三甲氧基苄基)-甲酮-D<sub>9</sub>(副产物 11)(见下页图)的含量逐渐增加且最终完全转化。推测可能是化合物 8 中  $\alpha$ -亚甲基活性较高,极易发生卤代反应生成 6,7-双(苄氧基)-1-(氯(3,4,5-三甲氧基苄基)甲基)-3,4-二氢异喹啉-D<sub>9</sub>(9),进而水解、氧化,最终生成副产物 11。此外通过核磁进一步确证(见图 1)了该化合物的化学结构,从图中可以明显看到异喹啉环  $\alpha$ -位的亚甲基氢信号消失。为解决该问题,将环化和还原反应两步反应合并进行,有效地降低了该副产物的含量,并取得了很好的产率。





$$\begin{aligned}
 A_0 &= 0.800x_0 = 0 \\
 A_1 &= 0.171x_0 + 0.800x_1 = 0 \\
 A_2 &= 0.026x_0 + 0.171x_1 + 0.800x_2 = 0 \\
 A_3 &= 0.003x_0 + 0.026x_1 + 0.171x_2 + 0.800x_3 = 0 \\
 A_4 &= 0.003x_1 + 0.026x_2 + 0.171x_3 + 0.800x_4 = 0 \\
 A_5 &= 0.003x_2 + 0.026x_3 + 0.171x_4 + 0.800x_5 = 0 \\
 A_6 &= 0.003x_3 + 0.026x_4 + 0.171x_5 + 0.800x_6 = 0 \\
 A_7 &= 0.003x_4 + 0.026x_5 + 0.171x_6 + 0.800x_7 = 0 \\
 A_8 &= 0.003x_5 + 0.026x_6 + 0.171x_7 + 0.800x_8 = 0.518 \\
 A_9 &= 0.003x_6 + 0.026x_7 + 0.171x_8 + 0.800x_9 = 80.070
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

从上述方程组中求得  $x_0 = 0, x_1 = 0, x_2 = 0, x_3 = 0, x_4 = 0, x_5 = 0, x_6 = 0, x_7 = 0, x_8 = 0.648, x_9 = 99.9$ , 进一步归一化后即标记了 0~9 个氘的盐酸曲托喹酚的分子百分比, 列于表 3。

表 3 不同氘标记个数的盐酸曲托喹酚的分子百分比

Tab.3 Molecular percentage of tetroquinol hydrochloride for different number of deuterium labeling

$m/z$	$X_0$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
分子百分比/%	0	0	0	0	0
$m/z$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$
分子百分比/%	0	0	0	0.64	99.36

盐酸曲托喹酚-D<sub>9</sub> 的同位素丰度值以  $E$  表示, 按式(2)算得到同位素丰度, 即氘原子标记率  $E = 99.9 \text{ atom\% D}$ 。

$$E = \left( \sum_{j=0}^9 jX_j \right) / \left( 9 \sum_{j=0}^9 X_j \right) \tag{2}$$

式中:  $X_j$  表示标记  $j$  个 D 原子的盐酸曲托喹酚-D<sub>j</sub> 分子的摩尔分数, 其中  $j = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ 。

### 3 结论

本文以 2-(3,4,5-三甲氧基苯基)乙酸为起始原料, 以廉价易得的氘代碘甲烷为稳定同位素标记原料, 经过一系列常规化学反应合成了稳定同位素标记化合物盐酸曲托喹酚-D<sub>9</sub>, 并且取得了较高的氘代率和化学纯度, 合成产物经 <sup>1</sup>H NMR 和 HR-MS 进行表征确证结构及丰度。此外, 若将文中碘甲烷-D<sub>3</sub> 替换为其他标记试剂, 如 <sup>13</sup>C 标记或者 <sup>13</sup>C 和 D 双标记的碘甲烷, 可方便地合成相对应的多种标记化合物, 如曲托喹酚-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> 等, 均可以作为内标试剂满足曲托喹酚的定性

与定量分析。

### 参考文献:

- [1] BABICH M, ATKINSON J, PIASCIK M T. The effects of trimetoquinol on the intact rabbit heart and myocardial adenylate cyclase activity: Evidence for spare myocardial beta receptors [J]. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1985, **17**(6): 565-574.
- [2] 王志远, 王成章, 王福祥, 等. 四氢异喹啉衍生物的合成及其抑制血小板聚集作用 [J]. *中国医药工业杂志*, 2005, **36**(5): 261-263.
- [3] OKANO M, SATO M, KAGEYAMA S. Determination of higenamine and coclaurine levels in human urine after the administration of a throat lozenge containing Nandina domestica fruit [J]. *Drug Test. Anal.*, 2017, **9**(11/12): 1788-1793.
- [4] GEORGE B, JOHN F, EDWARD W. Isotope dilution mass spectrometry and the national reference system [J]. *Anal. Chem.*, 1993, **65**(12): 475-479.
- [5] 田甜, 刘书好, 李双青, 等. 高分辨质谱测定氘标记化合物同位素分布与丰度的方法研究 [J]. *分析化学*, 2021, **49**(4): 563-570.
- [6] KUNIKO H, KEIZO K, NAZMUL Q, et al. Asymmetric synthesis of 1-benzyltetrahydroisoquinolines using chiral oxazolo[2,3-l]tetrahydroisoquinolines [J]. *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**(5): 1126-1131.
- [7] MASATO K, YI H, MASAKO O, et al. General asymmetric synthesis of isoquinoline alkaloids. Enantioselective hydrogenation of enamides catalyzed by BINAP-ruthenium (II) complexes [J]. *J. Org. Chem.*, 1994, **59**(2): 297-310.
- [8] RUIZ-OLALLA A, WURDEMANN M A, WANNER M J, et al. Organocatalytic enantioselective pictet-spengler approach to biologically relevant 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids [J]. *J. Org. Chem.*, 2015, **80**(10): 5125-5132.
- [9] NOYORI R, OHTA M, HSIAO Y, et al. Asymmetric synthesis of isoquinoline alkaloids by homogeneous catalysis [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**(22): 7117-7119.
- [10] 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.