

稳定同位素标记化合物二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的合成与表征

韩世磊^{1,2}, 张 治¹, 徐 银^{1,2}, 石静飞^{1,2}, 杨立凤^{1,2}, 陈菊玲^{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: 目的 建立稳定性同位素标记的化合物二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ (二乙基-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸酯- $^{13}\text{C}_4$)的合成方法。**方法** 以同位素标记的乙酰乙酸乙酯-1,3- $^{13}\text{C}_2$ 为原料,经 Hantzsch 反应合成得到稳定性同位素标记的化合物二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ (二乙基-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸酯- $^{13}\text{C}_4$),并对其结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 MS(ESI)进行表征。**结果** 所合成的目标产品,化学纯度大于 99.0%, ^{13}C 丰度为 99.4% (atom ^{13}C)。**结论** 该化合物可作为食品安全领域检测用同位素内标试剂,具有重要的应用价值。

关键词: 二氢吡啶; 稳定性同位素标记化合物; 内标试剂; 食品安全

Synthesis and characterization of stable isotope labelled diludine- $^{13}\text{C}_4$

HAN Shi-Lei^{1,2}, ZHANG Zhi¹, XU Yin^{1,2}, SHI Jing-Fei^{1,2}, YANG Li-Feng^{1,2},
CHEN Ju-Ling^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2*}

(1. Alta Scientific Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 2. Alta Institute of Reference Materials, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: Objective To develop a synthetic procedure for the stable isotope labeled Diludine- $^{13}\text{C}_4$. **Methods** Starting from stable isotope labelled ethyl acetoacetate-1,3- $^{13}\text{C}_2$, the stable isotope labelled diludine- $^{13}\text{C}_4$ (diethyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridine dicarboxylate- $^{13}\text{C}_4$) was obtained via Hantzsch reaction. Meanwhile, the chemical structure of novel compound was characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and MS (ESI). **Results** The chemical purity was more than 99.0%, and the ^{13}C enrichment was more than 99.4%. **Conclusion** The product can be used as isotope labelled internal standard for testing in the field of food safety industries, which has important application values.

KEY WORDS: diludine; stable isotope labelled compound; internal standard reagent; food safety

1 引 言

因兽药和药物添加剂在畜禽饲养过程中的不合理使用,其残留已经是导致动物源性食品安全问题的主要原因^[1]。二氢吡啶(diludine)(结构式见图 1),又称地罗定、

畜禽旺,是一种新型绿色多功能的饲料添加剂,具有促进动物生长、改善皮毛质量、提高瘦肉率、提高繁殖性能及防病抗病等功能,还具有天然抗氧化剂 VE 的某些作用,可抑制脂类化合物的过氧化过程,具有保护饲料中油脂及维生素 VA、胡萝卜素等不被氧化的作用,提高饲

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1604804)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China (2019YFC1604804)

*通讯作者: 张磊, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为药物化学、分析检测标准物质、稳定同位素标记化合物研究。E-mail: lei.zhang@altasci.com.cn

*Corresponding author: ZHANG Lei, Ph.D, Senior Engineer, Alta Scientific Co., Ltd., Tianda S&T Park, 80 The Fourth Street, TEDA, Binhai New Area, Tianjin 300457, China. E-mail: lei.zhang@altasci.com.cn

料利用率、改善肉质等功效, 因此在畜牧生产中得到广泛应用^[1-4]。2019 年央视 3.15 晚会曝光了部分饲料企业违规使用二氢吡啶、硫酸黏杆菌素、喹乙醇等药物, 引起社会的广泛关注和政府的高度重视^[5]。目前对其检测主要是运用高效液相色谱-串联质谱法, 在实际操作中, 鉴于食品中非法添加剂的种类多样, 基质中存在多种共提物, 导致检测灵敏度、准确度较低。同位素稀释质谱法(isotope dilution mass spectrometry, IDMS)采用稳定性同位素标记化合物作为内标试剂, 很好地结合了色谱的分离能力和质谱的定性能力, 通过检测相应质量数的离子的比值与标准的比值比较可达到准确定量的目的, 同时有效消除样品在化学和物理的前处理中引起的基质效应和回收率差异, 提高了检测准确度^[6,7]。二氢吡啶同位素标记物 IDMS 的检测, 其关键在于二氢吡啶同位素标记物内标的获得。

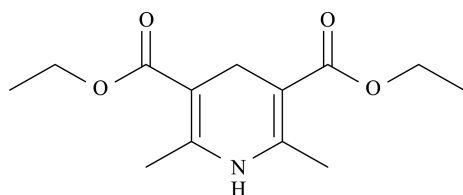


图 1 二氢吡啶结构式

Fig.1 Molecular structure of diludine

目前, 市场上尚未搜索到稳定同位素标记的二氢吡啶产品供应厂家。尽管文献有少量氘代二氢吡啶的相关应用^[8], 但是碳-13 标记的二氢吡啶为未知的新化合物, 其合成方法及应用尚无文献报道。本研究利用 Hantzsch 多组分合成方法, 采用 ^{13}C 标记的乙酰乙酸乙酯和甲醛水溶液、醋酸铵进行缩合, 首次合成并报道了碳-13 稳定同位素标记化合物二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ (图 2), 以期解决分析检测用二氢吡啶同位素内标试剂的问题。

2 材料与方法

2.1 主要仪器与试剂

IKA-RCT basic 型加热型磁力搅拌器、IKA HB10 型旋转蒸发仪(德国 IKA 集团); Bruker 400 MHz 型核磁共振色谱仪(德国布鲁克公司); Agilent1260+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)。

37% 甲醛水溶液(日本 TCI 公司); 乙酰乙酸乙酯-1,3- $^{13}\text{C}_2$ (99% CP, 99 atom% ^{13}C , 美国 Sigma-Aldrich 公司); 醋酸铵[97%, 萨恩化学技术(上海)有限公司]; 其他试剂与药品均为市售分析纯, 除特别说明外, 未经处理直接使用。

2.2 合成方法

于 20 mL 的反应瓶中加入甲醛(37% 的水溶液, 0.07 mL, 1 equivalent), 乙酰乙酸乙酯-1,3- $^{13}\text{C}_2$ (0.5 mL, 4 equivalent), 醋酸铵(0.15 g, 2 equivalent)和水(5 mL), 反应混合物加热到 85~90 °C 反应 3 h, 冷却, 析出的固体经过滤, 滤饼再用水和丙酮重结晶, 过滤、干燥得到目标化合物二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ (0.2 g, 得率 80%)。

3 结果与分析

3.1 合成工艺

鉴于二氢吡啶环上 4-位的 2 个氢具有一定的活性, 在一定的条件下 4-位氘代的化合物可能发生氢-氘交换, 从而使化合物的同位素丰度降低, 即同位素丰度稀释。3,5-位二羧酸乙酯的乙基无论是氘代或是碳-13 标记均可获得较低廉的同位素标记试剂做原料, 但是其在较强的碱性条件下可能发生皂化而失去, 生成非标记二氢吡啶-3,5-二羧酸, 因此在实际应用中具有一定的风险。相较于 2 个羧酸酯乙基的氘代或碳-13 标记, 或 4-位 2 个氢原子的氘代标记物, 二氢吡啶环上和羰基上碳-13 标记具有很大的优势, 既不会发生同位素稀释, 也不会因为酯基皂化而丢失, 而且碳-13 标记原料乙酰乙酸乙酯-1,3- $^{13}\text{C}_2$ 比较易得、成本也较低, 因此本研究选择碳-13 标记位置在二氢吡啶环的 2,6-位和 3,5-位 2 个羰基的位置。

Hantzsch 反应是多组分反应, 广泛用于合成 1,4-二氢吡啶类化合物, 非标记二氢吡啶的合成方法诸多文献已有报道^[9-13], 工艺相对比较成熟, 因此本研究采用 Hantzsch 合成法制备目标化合物。本研究确定了乙酰乙酸乙酯-1,3- $^{13}\text{C}_2$:甲醛水溶液:醋酸铵=4:1:2 的摩尔比, 用水作溶剂, 于 85~90 °C 反应 3 h 左右, 析出的固体再经水和丙酮重结晶得到目标产物, 得率较高(80%), 化学纯度达 99.3%, 同位素丰度达到 99.4%。

3.2 结构表征

3.2.1 MS 确证和同位素丰度确认

通过对碳-13 标记二氢吡啶与非标记二氢吡啶的液相色谱-质谱比较发现, 二者的保留时间相同, 分子离子峰与理论值相符合。二氢吡啶的分子量为 253.13, 二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的分子量为 257.14, 如质谱图 ESI-MS 所示(图 3), 在负离子模式下(m/z , $[\text{M}-\text{H}]$)二氢吡啶的分子离子峰为 252.2(图 3a), 而二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的分子离子峰为 256.2(图 3b), 由于 4 个 ^{12}C 原子被 ^{13}C 同位素取代, 其质量数相较于未标记化合物增加了 4 个单位。同时, 经“质量簇分类法”^[14,15]计算, 该化合物的 ^{13}C 同位素丰度为 99.4%, 而标记试剂乙酰乙酸乙酯-1,3- $^{13}\text{C}_2$ 的同位素丰度也是 99.4%, 因此本研究所使用的标记方法不会造成同位素

丰度的稀释。

3.2.2 ^1H NMR 谱图分析

^{13}C 标记的二氢吡啶的核磁谱图见图 4。其中, δ 8.27 ppm 峰为 1,4-二氢吡啶环上的 1-NH 活泼氢; δ 4.06 ppm 峰为 1,4-二氢吡啶环 3,5-位羧酸乙酯支链上与氧相连的 2 个乙基的亚甲基氢; δ 3.11 ppm 峰为 1,4-二氢吡啶环上 4-位亚甲基氢; δ 2.11 ppm 峰为 1,4-二氢吡啶环 2,6-位相连的 2 个甲基氢; δ 1.19 ppm 峰为 1,4-二氢吡啶环 3,5-位羧酸乙酯支链上与氧相连的 2 个乙基的甲基氢。该化合物的平面化学结构(图

2)是一个具有对称面的对称结构,但是其立体结构因为二氢吡啶环扭曲而呈现出非对称的特性,造成 2 个亚甲基 b 不同而表现出双四重峰(dq),同理,亚甲基 d 上的 2 个氢不同而表现出双重峰。其他各基团的归属及耦合常数均也符合理论推断,且与文献^[13]报道的非标记二氢吡啶以及二氢吡啶标准品的氢谱数据一致。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 8.27 (s, 1H, NH), 4.06 (dq, $J=7.1, 3.2$ Hz, 4H, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.11 (s, 2H, CH_2), 2.11 (d, $J=6.4$ Hz, 6H, 2 CH_3), 1.19 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, 2 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$)。

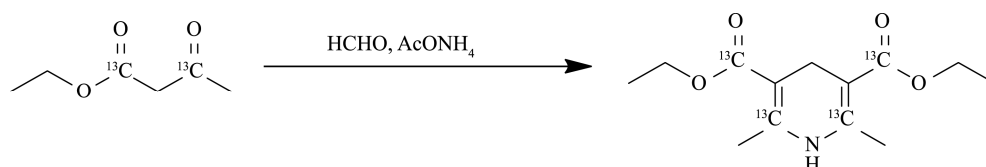


图 2 二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的合成路线
Fig.2 Synthesis route of diludine- $^{13}\text{C}_4$

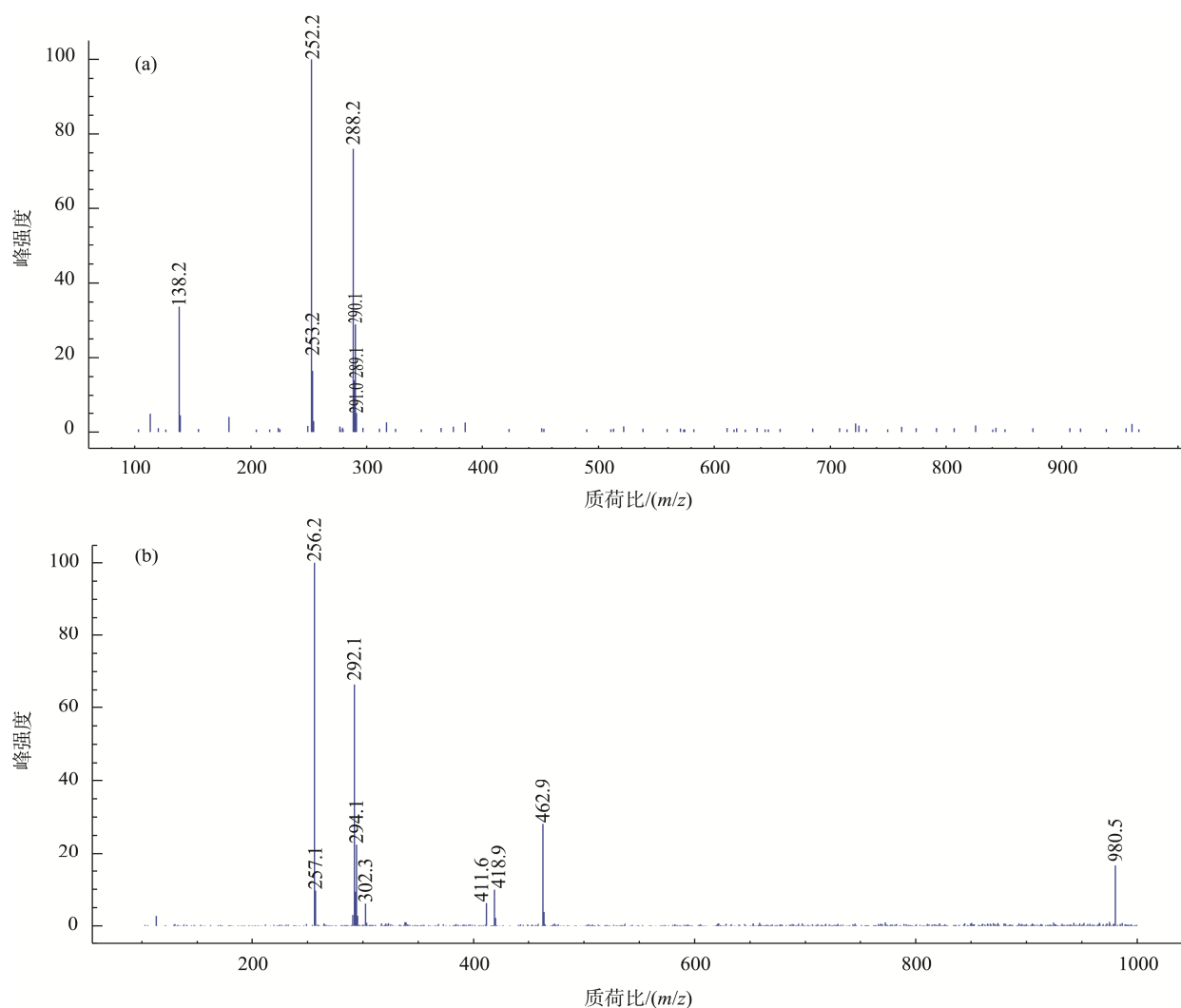
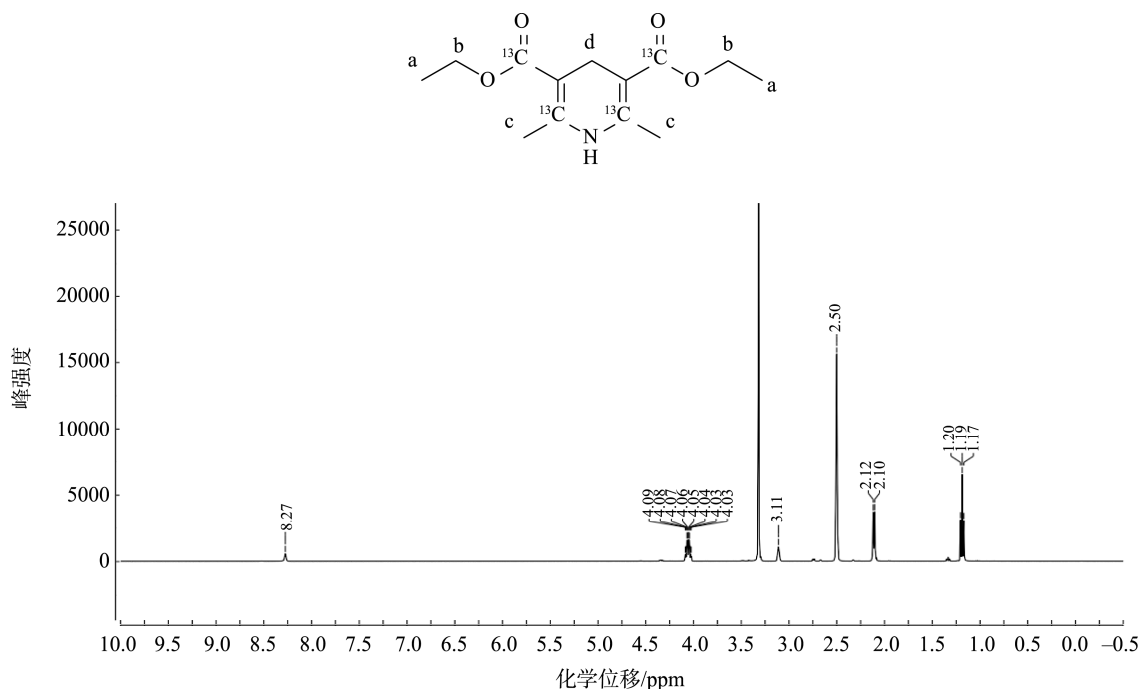


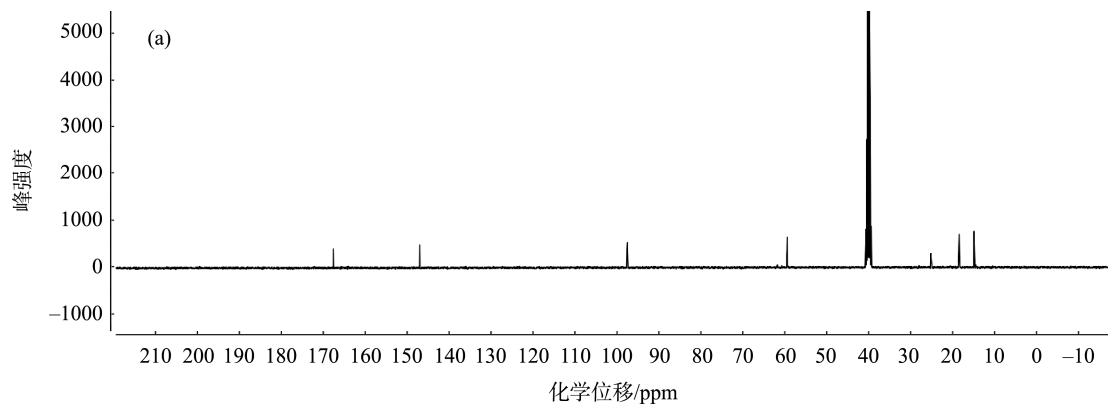
图 3 二氢吡啶(a)和二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的 MS 谱图(b)
Fig.3 MS spectrum of diludine(a) and diludine- $^{13}\text{C}_4$ (b)

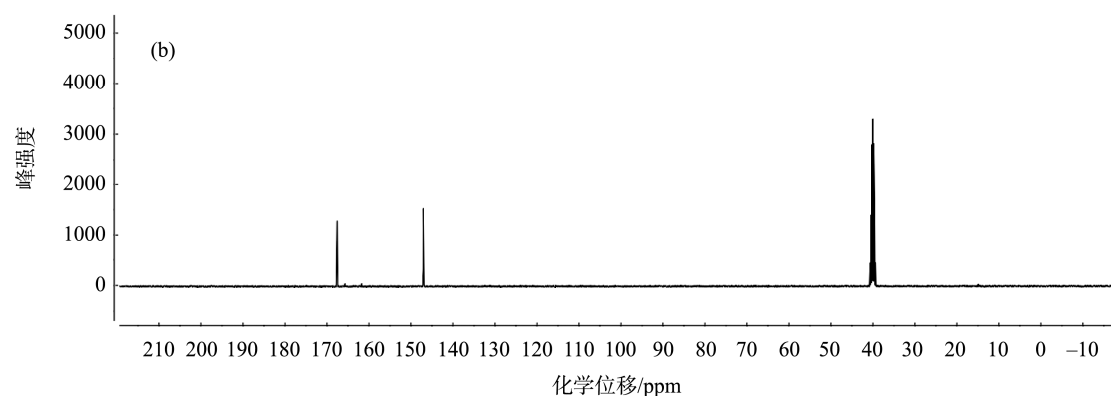
图 4 二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的 ^1H NMR 谱图Fig.4 ^1H NMR spectrum of diludine- $^{13}\text{C}_4$

3.2.3 ^{13}C NMR 谱图分析

未标记二氢吡啶的碳-13 核磁谱图(a)和碳-13 标记的二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ (b)的碳-13 核磁谱图如图 5 所示。二氢吡啶的 ^{13}C NMR 谱图(图 5a)显示, 与 3,5-位相连的羰基峰为 δ 167.6 ppm, 环上 2,6-位碳的化学位移为 δ 147.1 ppm, 3,5-位碳的化学位移为 δ 97.51 ppm, 4-位亚甲基的化学位移为 δ 25.21 ppm。 δ 59.39、14.90 ppm 分别为乙基的亚甲基和甲基峰, δ 18.42 ppm 为 2,6-位甲基峰。二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 的碳核磁谱图(图 5b)显示, 碳-13 标记的 2 个羰基的化学位移和碳-13 标记的环上 2,6-位碳

的化学位移与母体化合物对应的碳原子的化学位移一致^[16], 由于被标记的原因, 其 ^{13}C 丰度大大超过了其他位点的非标记碳原子(~99 倍), 导致其他未标记位点的碳原子峰在核磁谱图中未明显体现。因此, 目标化合物的结构与碳-13 标记的位点与本文所设计的相符。其中, 与 3,5-位相连的羰基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 与环上 2,6-位 ^{13}C 耦合, 两者均呈现为双峰, 其耦合常数均为 5.9 Hz。二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ 解析数据: ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 167.59 (d, $^2J_{\text{C-C}}=5.9$ Hz), 147.02 (d, $^2J_{\text{C-C}}=5.9$ Hz), 非标记碳原子未明显显示。

图 5 二氢吡啶(a)的 ^{13}C NMR 核磁谱图Fig.5 ^{13}C NMR spectra of diludine (a) and diludine- $^{13}\text{C}_4$ (b)



续图 5 二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$ (b)的 ^{13}C NMR 核磁谱图
Fig.5 ^{13}C NMR Spectra of diludine (a) and diludine- $^{13}\text{C}_4$ (b)

4 结 论

本研究以市售的乙酰乙酸乙酯- $1,3\text{-}^{13}\text{C}_2$ 为标记试剂,经 Hantzsch 多组分缩合反应合成了二氢吡啶- $^{13}\text{C}_4$, 产品化学纯度达到 99.3%。所得到的化合物结构经质谱 MS、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 鉴定确证,并经“质量簇”分类法计算同位素丰度为 99.4%,可以满足科研、药品检测、食品安全检测、饲料检测、环境监测等相关机构进行二氢吡啶残留的检测和代谢研究。

参考文献

- [1] 李成会, 王继龙, 朱莲英, 等. 二氢吡啶在奶牛养殖中的应用研究[J]. 中国奶牛, 2004, 1: 21–23.
- [2] Li CH, Wang JL, Zhu LY, *et al.* Application of diludin in dairy cattle feeding [J]. Chin Dairy Catt, 2004, 1: 21–23.
- [3] 刘鸿, 毛华明. 二氢吡啶的生理功能及其应用[J]. 中国饲料, 2003, 24: 19–20.
- [4] Liu H, Mao HM. The physiological function and application of diludin [J]. Chin Feed, 2003, 24: 19–20.
- [5] 许梓荣, 马玉龙, 邹晓庭. 二氢吡啶对蛋鸡产蛋率的影响及其机理[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(5): 500–503.
- [6] Xu ZR, Ma YL, Zhou XT. Effect of diludin on laying rate of laying hens and its mechanism [J]. Chin J Vet Sci, 1999, 19(5): 500–503.
- [7] 王伟, 刘占峰, 杜晓宁. 稳定性同位素在兽药残留检测中的应用[J]. 原子能科学技术, 2010, 44(7): 813–819.
- [8] Wang W, Liu ZF, Du XN. Application of stable isotopes in veterinary drug residue detection [J]. Atom Energ Sci Technol, 2010, 44(7): 813–819.
- [9] 肖志明, 王俊, 索德成, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中的二氢吡啶[J]. 中国农业科学, 2018, 51(9): 1806–1814.
- [10] Xiao ZM, Wang J, Suo DC, *et al.* Determination of diludin in feed by superhigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Integr Agric, 2018, 51(9): 1806–1814.
- [11] 杨总, 李秀琴, 王娟, 等. 同位素稀释液相色谱-串联质谱法准确测定猪肉中的氯霉素[J]. 色谱, 2011, 29(9): 927–931.
- [12] Yang Z, Li XQ, Wang Juan, *et al.* Determination of chloramphenicol in pork by isotope dilution chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(9): 927–931.
- [13] George B, John F, Edward W. Isotope dilution mass spectrometry and the national reference system [J]. Anal Chem, 1993, 65(12): 475–479.
- [14] Zhu XQ, Liu YC, Cheng JP. Which hydrogen atom is first transferred in the NAD(P)H model Hantzsch ester mediated reactions via one-step and multistep hydride transfer? [J]. J Org Chem, 1999, 64(25): 8980–8981.
- [15] Loev B, Snader KM. The Hantzsch reaction. I. oxidative dealkylation of certain dihydropyridines [J]. J Org Chem, 1965, 30: 1914.
- [16] Sabitha G, Reddy GSKK, Reddy CS, *et al.* A novel TMSI-mediated synthesis of Hantzsch 1,4-dihydropyridines at ambient temperature [J]. Tetrahedron Lett, 2003, 44: 4129–4131.
- [17] 蔡小华, 张国林. 无溶剂—锅法合成 1, 4-二氢吡啶[J]. 有机化学, 2005, 25(8): 930–933.
- [18] Cai XH, Zhang GL. Solvent-free-one-pot synthesis of 1, 4-dihydropyridine [J]. Chin J Org Chem, 2005, 25(8): 930–933.
- [19] 白少飞, 王进敏, 樊强文, 等. 新型双-1, 4-二氢吡啶的水相微波辅助合成[J]. 合成化学, 2017, 25(5): 389–394.
- [20] Bai SF, Wang JM, Fan QW, *et al.* Microwave assisted synthesis of a novel diludin in water phase [J]. Chin J Synth Chem, 2017, 25(5): 389–394.
- [21] Lisa MS, Volker MS, Tommaso P, *et al.* Asymmetric synthesis of carbocyclic propellanes [J]. Org Lett, 2017, 19(9): 2310–2313.
- [22] HG/T 5170-2017 稳定同位素氘标记试剂卤代苯的同位素丰度测定-气相色谱-质谱联用法[S].
- [23] HG/T 5170-2017 Determination of isotope abundance of halogenated benzene with stable isotope deuterium labeling reagent-Gas chromatography-mass spectrometry method [S].

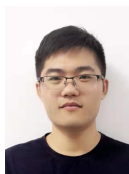
- [15] 雷雯, 杜晓宁, 张维冰. 气相色谱-质谱法研究 ^{13}C 标记脂肪酸的同位素丰度和化学纯度[J]. 质谱学报, 2015, 36(5): 434-441.

Lei W, Du XN, Zhang WB. Isotopic abundance and chemical purity of ^{13}C -labeled fatty acids were studied by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2015, 36(5): 434-441.

- [16] Rekunge DS, Khatri CK, Chaturbhuj GU. Sulfated polyborate: An efficient and reusable catalyst for one pot synthesis of Hantzsch 1,4-dihydropyridines derivatives using ammonium carbonate under solvent free conditions [J]. Tetrah Lett, 2017, 58(12): 1240-1244.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



韩世磊, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为有机合成。

E-mail: shilei.han@altascientific.com



张磊, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为药物化学、分析检测标准物质、稳定同位素标记化合物研究。

E-mail: lei.zhang@altasci.com.cn

食品接触材料专题征稿函

食品接触材料是指用于制造食品包装容器和构成食品包装的材料总称, 包括纸、塑料、金属、玻璃、陶瓷等原材料以及粘合剂, 涂覆材料等各种辅助材料。食品包装是食品的重要组成部分, 具有保护食品不受外来生物、化学和物理因素的影响, 维持食品质量稳定的特点。为了满足各种食品的包装要求, 接触材料必须具备适当的阻隔性、足够的机械强度、化学稳定性、耐高温及光学性能等多种性能。此外, 当接触材料直接与食品接触时, 有些物质会迁移渗透到食品中, 可能导致食品的安全隐患。因此, 食品接触材料的安全问题也显得尤为重要。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品接触材料”专题, 由广州海关技术中心 钟怀宁 研究员担任专题主编, 主要围绕食品接触材料的制备、性能(机械性能、阻隔性、化学稳定性、抗菌性及其他性能)、接触材料中有害物质的检测及其向食品中的迁移行为、绿色及智能接触材料的研究与开发等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁技术总师和专题主编钟怀宁 研究员特请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2020 年 11 月正刊出版, 请在 2019 年 10 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com 选择“2020 专题: 食品接触材料”

E-mail: jfoodsq@126.com 备注“2020 专题: 食品接触材料”

《食品安全质量检测学报》编辑部