

D/L-安非他明手性分离方法的开发

利用 SFC/MS 对真实的全血样品进行定量测定

应用简报

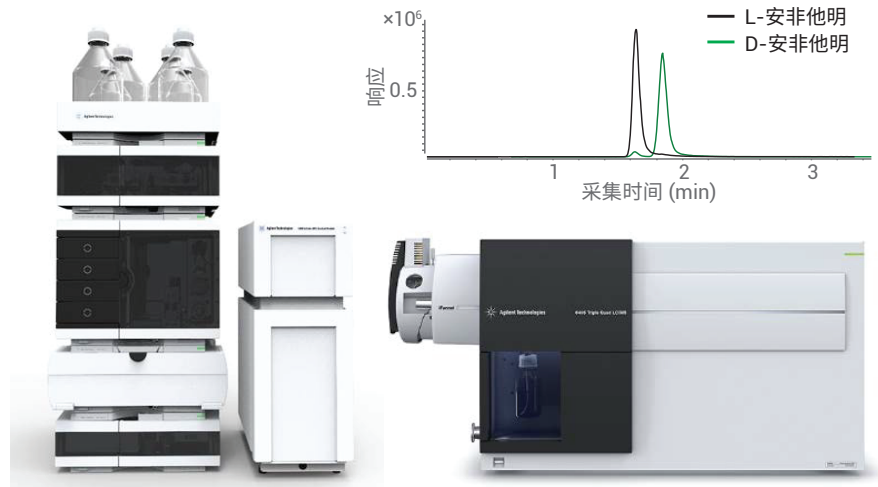
法医毒理学，刑侦学

作者

Melanie Muelek, Herbert Godel,
Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统开发 D/L-安非他明的手性分离方法。研究证明 Agilent 6495 三重四极杆质谱系统可用于这两种手性对映体形式的定量分析。介绍了方法开发过程，并利用最终分析方法确定校准曲线和三重四极杆质谱的定量限。展示了对经过处理的真实全血样品的分析。



Agilent Technologies

前言

化合物 D/L-安非他明具有两种手性对映体形式（图 1）。D-安非他明异构体的活性更高，在制药过程中以纯对映体形式生产¹。

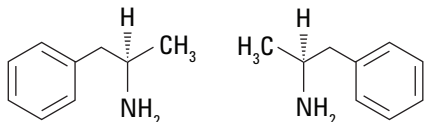


图 1. D-安非他明和 L-安非他明的化学式

在法医毒理学中，可利用色谱法（如 HPLC 与质谱联用法）对体液中的安非他明进行定性和定量测定²。

本应用简报介绍了使用三重四极杆质谱仪开发用于分离并定量测定 D-安非他明和 L-安非他明的快速分析 SFC/MS 方法。该分析方法能够区分医用 D-安非他明的量与非法来源的 D/L-安非他明的量。最后，通过分析真实的提取全血样品，对该方法在法医毒理学领域的应用进行验证。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC/MS 系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (MCT) (G7116B)，带有四色谱柱选择阀
- Agilent 1260 Infinity II 等度泵 (G7110B) 和 SFC/MS 分流器套装 (G4309-68715)
- 采用安捷伦喷射流和 iFunnel 技术的 Agilent 6495 三重四极杆 MSD

仪器设置

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统与安捷伦 LC/MS 系统的推荐配置如之前所述³。

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3
- Agilent MassHunter 三重四极杆采集软件，B.08.02 版
- Agilent MassHunter Optimizer 软件，B.08.02 版
- Agilent MassHunter 离子源和 iFunnel Optimizer 软件，B.08.02 版

- Agilent MassHunter 定量分析软件，B.08.00 版
- Agilent MassHunter 定性分析软件，B.07.00 SP1 版

色谱柱

- Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H 150 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H 250 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK IA 250 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK IC 250 × 4.6 mm, 5 μm
- Chiral Technologies, CHIRALPAK ID 250 × 4.6 mm, 5 μm

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。

样品

根据所述校准曲线的相关浓度，在甲醇中用各种储备液（储备液：分析物浓度为 1 ppm 的甲醇溶液）配制 D-安非他明、L-安非他明和 D/L-安非他明溶液。

提供经处理的真实全血样品（参见“致谢”部分）。

样品前处理

用乙腈通过蛋白质沉淀法对真实的全血样品进行处理，并在分析前用流动相 B（乙醇 + 0.1% NH₃ 水溶液）按 1:1000/1:100/1:10 的比例进行稀释。

最终 SFC 方法

参数	值
SFC 流速	4 mL/min
改性剂	乙醇 + 0.1% 氨水
等度	10% 改性剂
柱温	20 °C
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
总运行时间	3 分钟
进样量	5 µL
注入速度	400 µL/min
灌洗体积	4 µL
进样针清洗	3 秒, 甲醇

三重四极杆质谱方法

参数	值
补偿流组成	甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸
补偿流流速	0.4 mL/min
采用安捷伦喷射流离子源进行电喷雾电离	
干燥气	170 °C, 16 L/min
鞘气温度	300 °C, 9 L/min
雾化器	60 psi
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	500 V
iFunnel	高压 RF: 80, 低压 RF: 60
质谱参数	
ESI 极性	正离子
扫描类型	MRM
离子对	2
分析周期	502 ms
ΔEMV	+200 V

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (ms)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速器电压 (V)
D/L-安非他明	136.1	119.1	250	380	7	1
D/L-安非他明	136.1	91.1	250	380	17	1

结果与讨论

利用外消旋安非他明标准溶液 (100 ppb) 对四种不同的手性固定相色谱柱和两种有机改性剂进行筛选 (参见“实验部分”色谱柱 2 至 5)。由于安非他明是一种碱性化合物,因此在甲醇和乙醇中加入 0.1% 氨水 (碱性添加剂) 并将其用作 CO₂ 改性剂。在初始方法开发步骤中,在所有色谱柱上分别进行不同的等度分离。实验结果表明,色谱柱 2 上实现了初始分离 (图 2)。两种对映体的分离性能均随着改性剂用量的减小而增强。在所选条件下,采用甲醇无法实现基线分离。

为获得更出色的安非他明分离效果,在色谱柱 2 上对洗脱强度较弱的乙醇溶剂进行了测试 (图 3)。当改性剂浓度低于 10% B 时,两个对映体获得了清晰的分离。当改性剂浓度为 10% B 时,对映体在 3.5 至 4.5 分钟之间洗脱;当改性剂浓度为 6% B 时,对映体在 7 至 9 分钟之间洗脱。

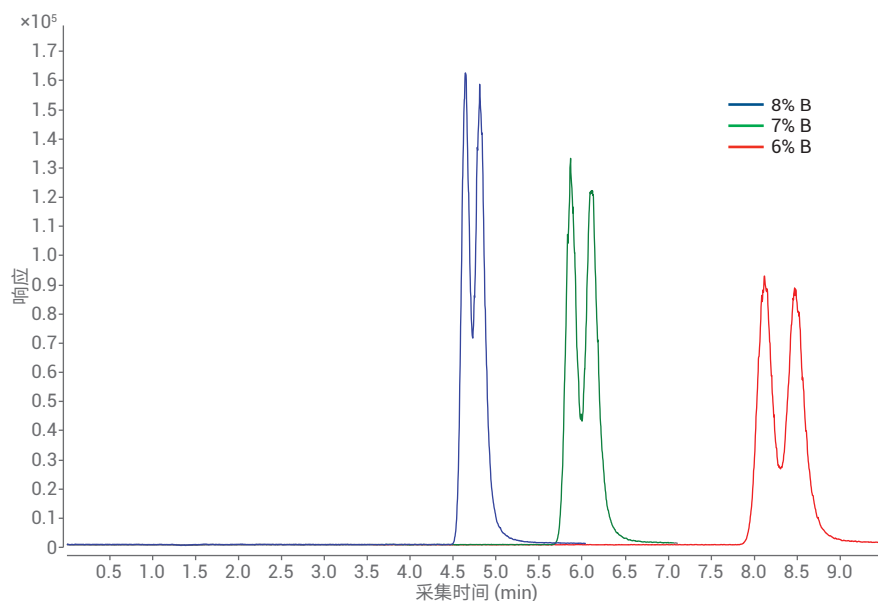


图 2. 使用不同改性剂含量 (改性剂 B: MeOH + 0.1% 氨水, 流速: 3 mL/min, 柱温: 20 °C, 色谱柱: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm, 5 μm) 对 D/L-安非他明对映体 (100 ppb) 的手性分离

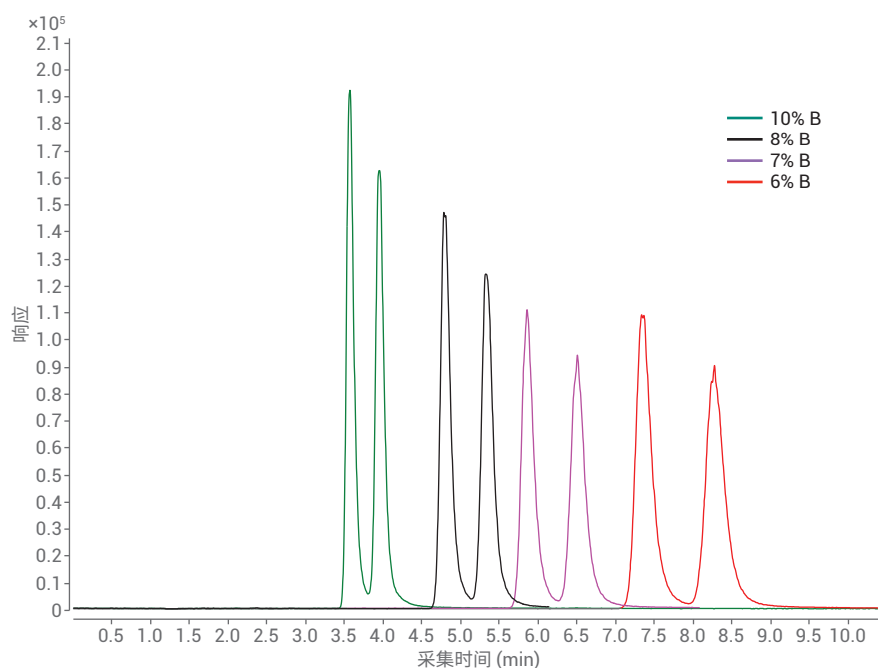


图 3. 使用不同改性剂含量 (改性剂 B: EtOH + 0.1% 氨水, 流速: 3 mL/min, 柱温: 20 °C, 色谱柱: CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm, 5 μm) 对 D/L-安非他明对映体 (100 ppb) 的手性分离

在最终步骤中，将流速从 3 mL/min 提高至 4 mL/min，对方法运行时间进行优化。提高流速后，导致对映体在 2.5 至 3.2 分钟之间洗脱（图 4）。为进一步缩短运行时间，采用固定相、内径和粒径相同而柱长更短的色谱柱（色谱柱 1，图 5）。将 250 mm 色谱柱改为更短的 150 mm 色谱柱，将使两种对映体在 1.5 至 2.1 分钟之间提前洗脱。此外，对不同的温度（40、30、20 °C）进行测试，结果发现采用 20 °C 的柱温能够获得最高的分离度（数据未示出）。

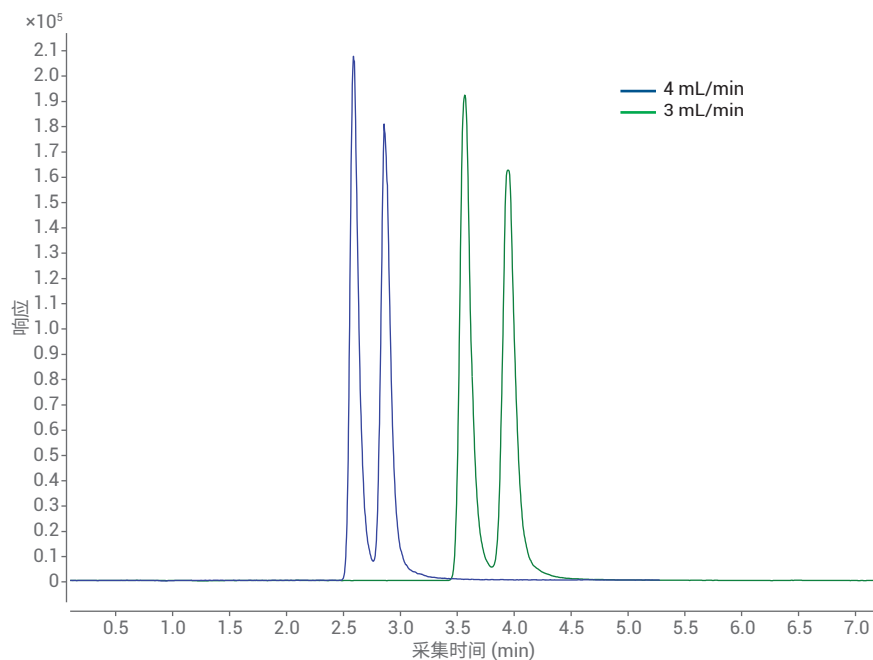


图 4. 使用不同流速（改性剂 B: 10% EtOH + 0.1% 氨水，流速：3 mL/min 和 4 mL/min，柱温：20 °C，色谱柱：CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm, 5 μ m）对 D/L-安非他明对映体（100 ppb）的手性分离

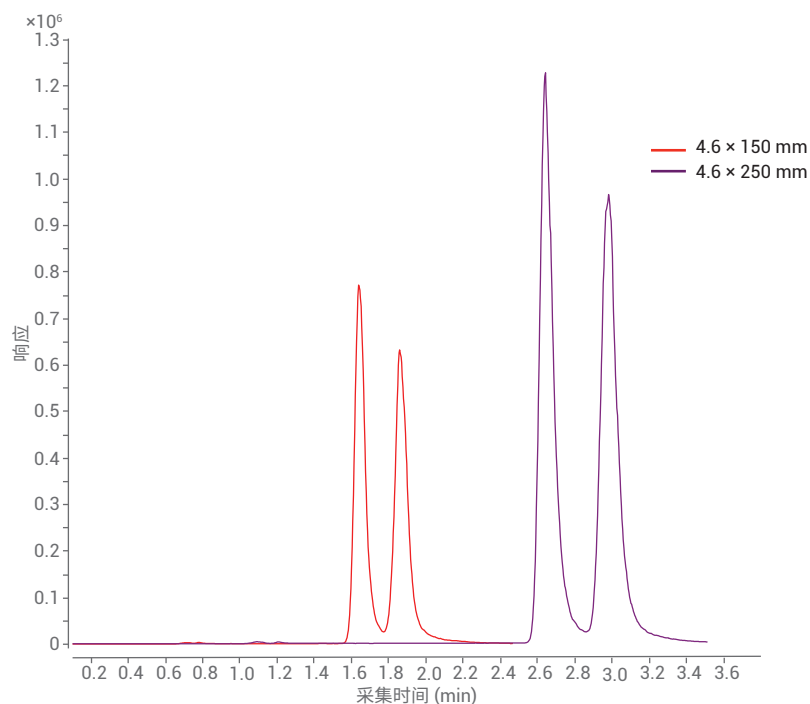


图 5. 使用不同色谱柱尺寸（改性剂 B: 10% EtOH + 0.1% 氨水，流速：4 mL/min，柱温：20 °C，色谱柱：CHIRALPAK AD-H 4.6 × 250 mm 和 4.6 × 150 mm, 5 μ m）对 D/L-安非他明对映体（100 ppb）的手性分离

最后，在转移到质谱仪离子源的过程中添加补偿溶剂以实现适当的电离，这一优化步骤用于获得最高灵敏度。为此，对不同的反压设置进行测试，因为借助分流器设置，反压可调节色谱柱洗脱物转移到离子源的量（图 6）。对于最终方法，采用的反压为 200 bar。还考察了添加的补偿溶剂（甲醇/水 (95/5) + 0.2% 甲酸）对流速的影响，但由于对灵敏度几乎没有影响，因此流速仍保持在 0.4 mL/min。对质谱的所有离子源参数进行全面优化，以获得最高的灵敏度（参见“实验部分”）。

为最终确认 SFC/MS 方法，对市售纯对映体形式中的 D-安非他明和 L-安非他明标准品单独进行了分析。单个峰来自相应的对映体：1.632 分钟洗脱的 L-安非他明和 1.860 分钟洗脱的 D-安非他明（图 7）。

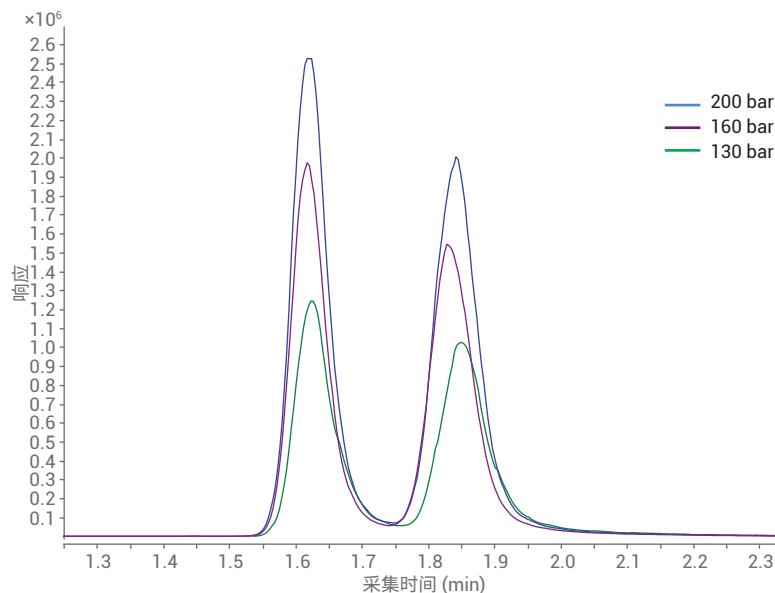


图 6. 优化 SFC 反压设置以最大程度提高质谱灵敏度

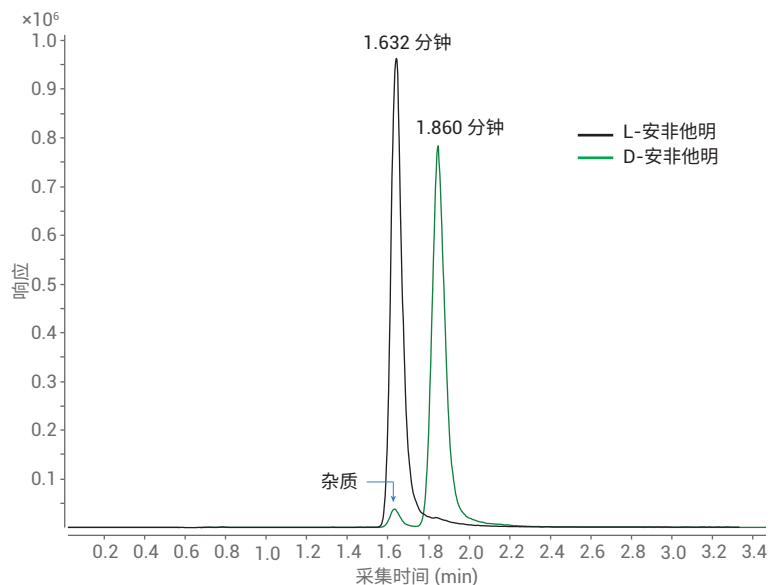


图 7. 利用所开发的手性方法对市售光学纯 D-安非他明和 L-安非他明标准品 (100 ppb) 的手性分离结果。箭头指示 D-安非他明标准品中的 L-对映体杂质

为定量测定 D-安非他明和 L-安非他明，分别绘制 100 ppt 至 100 ppb 的校准曲线，结果呈现出优异的线性（图 8）。根据信噪比 (S/N) 为 10 时的浓度，确定定量限 (LOQ) 为 100 ppt，并确定检测限 (LOD) 为 40 ppt (S/N = 3)。L-安非他明和 D-安非他明的线性系数分别为 0.9998 和 0.9996。

为证明所开发 SFC/MS 方法的能力，使用所开发的方法对按照“实验部分”所述步骤制备的实际全血样品进行测量。用改性剂 B 按 1:10、1:100 和 1:1000 的比例对血液样品进行稀释（图 9 和表 1）。表 1 列出了测得

的样品中的 D-安非他明和 L-安非他明的峰面积和峰高等详细信息，并证明安非他明在体内以外消旋形式存在，其主要来源于非药用毒品。图 9 显示了 1:1000 和 1:10 稀释液所对应的色谱图。

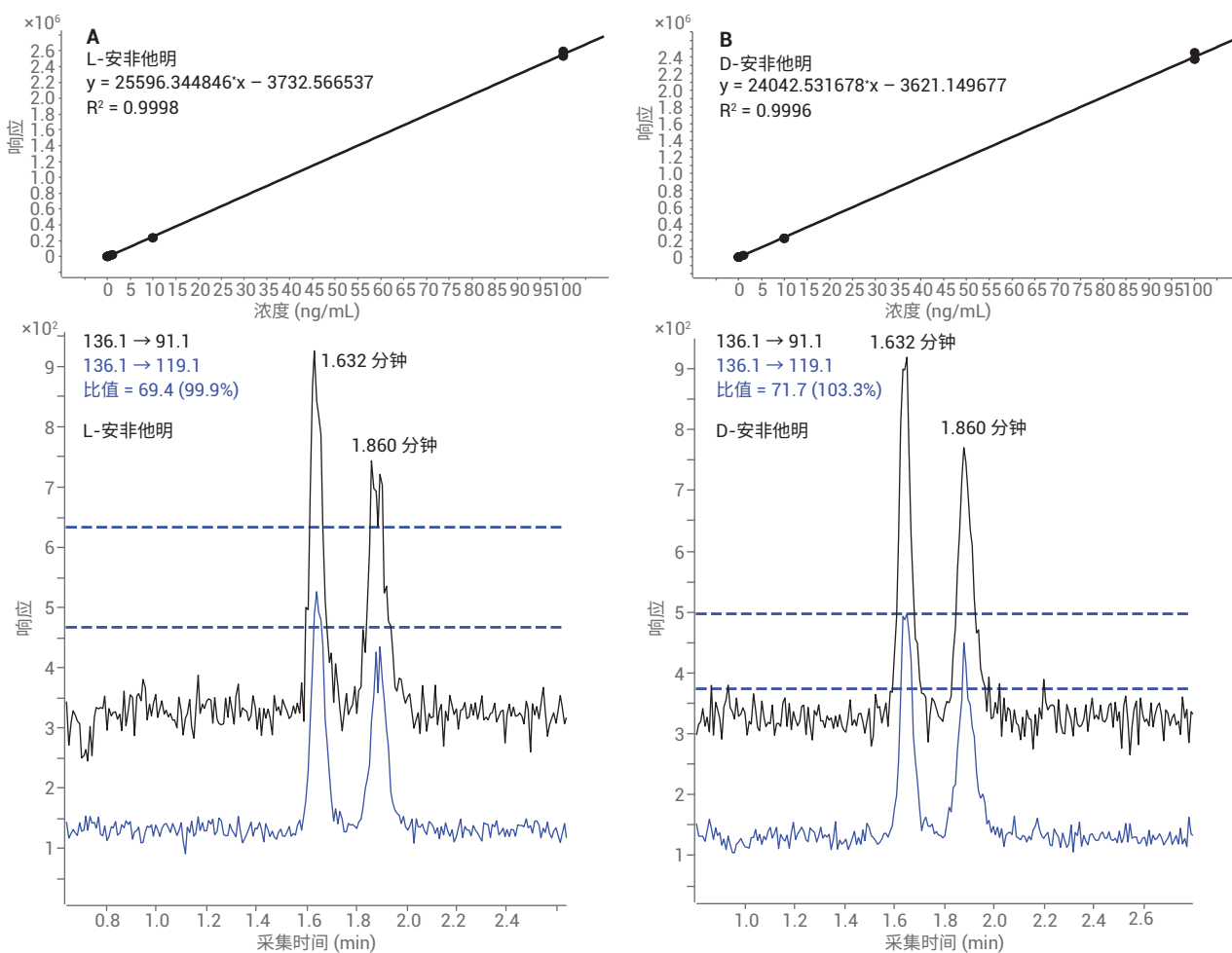


图 8. 校准曲线以及 100 ppt 的 L-安非他明在保留时间 1.632 分钟处 (A) 和 D-安非他明在保留时间 1.860 分钟处 (B) 的定性/定量离子信号。获得的 D-安非他明和 L-安非他明之间的分离度大于 1，总运行时间为 3 分钟

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 快速分离 D/L-安非他明对映体并使用 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪进行高灵敏度定量测定的方法开发。SFC 分离能够在 3 分钟的总运行时间内完成，表明分析时间很快。定量测定的 LOQ 低于 100 ppt。最后，表明所开发的方法成功应用于可靠测定全血制备样品中的安非他明。

致谢

感谢瑞典林雪平国家法医学委员会的 Martin Josefsson 和 Markus Roman 提供经处理的真实全血样品。

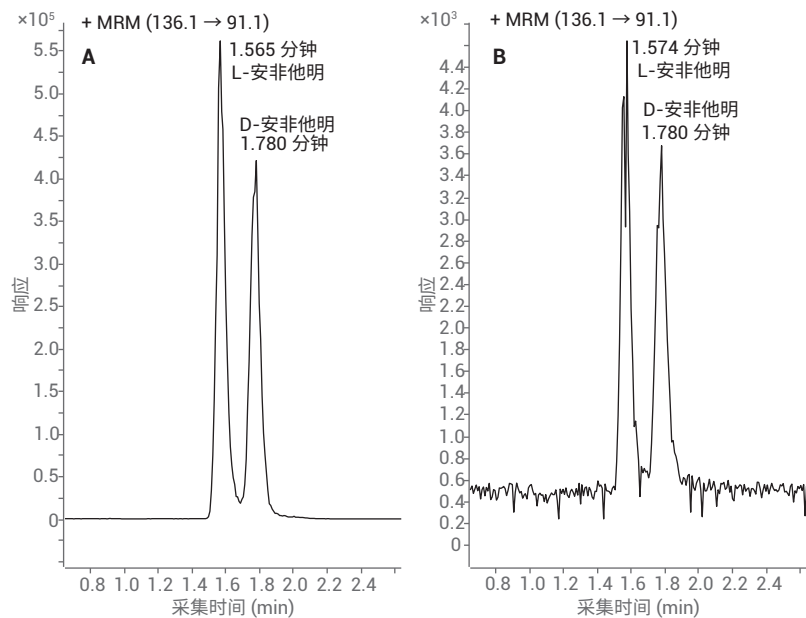


图 9. 用改性剂按 1:10 (A) 和 1:1000 (B) 比例稀释的经处理实际全血样品中的 D/L-安非他明

表 1. 用改性剂按 1:10、1:100 和 1:1000 的比例稀释制得的实际全血样品中 D-安非他明和 L-安非他明的详细测量结果

名称	L-安非他明结果			D-安非他明结果		
	RT	峰面积	峰高	RT	峰面积	峰高
Case 2 Dil 1_1000	1.574	14605.41	4129.08	1.780	14342.73	3159.12
Case 2 Dil 1_100	1.574	178409.64	48475.84	1.780	165744.26	34952.28
Case 2 Dil 1_100	1.574	165569.54	45037.95	1.780	154606.59	35124.32
Case 2 Dil 1_100	1.565	156671.29	44736.99	1.780	139086.04	32365.24
Case 2 Dil 1_10	1.565	2073946.07	561571.92	1.780	1780961.78	417402.00

参考文献

1. Heal, D. J; *et al.* Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. *Journal of Psychopharmacology* **2013**, 27 (6), 479–496
2. Kde Mariotti, C.; *et al.* Simultaneous analysis of amphetamine-type stimulants in plasma by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicology* **2014**, 38(7), 432–437
3. Use of the SFC-MS Splitter Kit G4309-68715 (SFC-MS 分流器套装 G4309-68715 的使用), 安捷伦科技公司技术简报, 出版号 G4309-90130, **2015**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

用于司法鉴定。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017年10月15日，中国出版
5991-8262ZHCN



Agilent Technologies