

## 安非他明相关药物的对映体及其结构异构体的分离

使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 分离并联用质谱仪进行检测



### 作者

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

### 摘要

本应用简报介绍了对安非他明相关药物的对映体及其位置异构体以及相同化合物对映体的分离。使用手性柱和 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统进行该分离。采用 Agilent 6495 三重四极杆质谱仪和 Agilent 6150 单四极杆质谱仪，实现对结构异构体以及对映体的定性检测和定量测定。

## 前言

异构化合物 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 是结构与安非他明相关的致幻剂，在化学类别上属于苯并咪喃化合物（图 1）<sup>1</sup>。这三种化合物是包含一个手性中心的结构异构体；因此，各自存在两种对映体形式。

本应用简报介绍利用手性色谱法对这些结构异构体及其对映体的分离。使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统与质谱联用系统实现该分离，其中质谱用于定性和定量测定。

## 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 高容量柱温箱 (MCT) (G7116A)，配备
- Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀 (部件号 5067-4287)
- 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
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6150 单四极杆 MSD

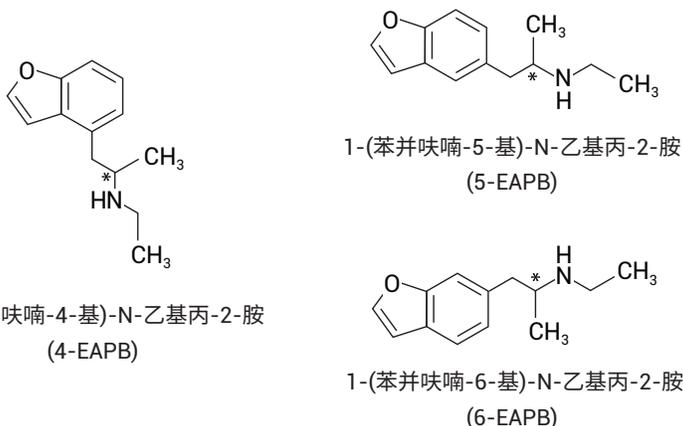


图 1. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的化学式。每种异构化合物还具有一个立体中心（星号），因此各自存在两种对映体形式

在色谱柱 1 上分离所有六种异构体（对映体和结构异构体）的 SFC 方法

参数	值
SFC 流速	3 mL/min
改性剂	甲醇 + 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	7 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

在色谱柱 2 上分离三种结构异构体的 SFC 方法

参数	值
SFC 流速	2.5 mL/min
改性剂	甲醇 + 0.1% 氨水
等度	11% 改性剂
柱温	30 °C
BPR 温度	60 °C
BPR 压力	200 bar
总运行时间	3.5 分钟
进样量	1 µL
注入速度	400 µL/min
灌洗体积	4 µL
进样针清洗	3 秒，甲醇

## 仪器设置

Agilent 1260 Infinity II 分析型 SFC 系统与安捷伦 LC/MS 系统的推荐配置如之前所述<sup>2</sup>。

### 软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 适用于 LC 和 LC/MS 系统, 修订版 C.01.07 SR3
- MassHunter LC/TQ 采集软件, B.08.02 版
- MassHunter Optimizer 软件, B.08.02 版
- MassHunter 离子源和 iFunnel Optimizer 软件, B.08.02 版
- MassHunter 定量分析软件, B.08.00 版
- MassHunter 定性分析软件, B.07.00 SP1 版

### 色谱柱

1. Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-H, 250 × 4.6 mm, 5 μm
2. Chiral Technologies, CHIRALPAK AD-3, 150 × 4.6 mm, 3 μm

### 化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。

### 样品

单独的 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 储备液 (1 ppm 的甲醇溶液) 分别经稀释后使用, 如文本中所概述。

### 三重四极杆质谱仪和单四极杆质谱仪所用的质谱方法

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	150 °C, 11 L/min
鞘气温度	350 °C, 12 L/min
雾化器	45 psi
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	0 V
iFunnel*	高压 RF: 90 低压 RF: 70
三重四极杆参数	
ESI 极性	正离子
扫描类型	MRM
离子对	2
分析周期	502 ms
ΔEMV	+200 V
单四极杆参数	
ESI 极性	正离子
扫描类型	SIM (m/z 204.1)
驻留时间	590 ms
碎裂电压	70 V
增益	1.0

\* 仅用于三重四极杆系统

化合物	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)
4/5/6-EAPB	204.1	159.1	250	380	12	1
4/5/6-EAPB	204.1	131.1	250	380	22	1

## 结果与讨论

### 分离对映体并用三重四极杆质谱仪进行定量测定

选择之前开发的用于 D-安非他明和 L-安非他明的手性分离方法<sup>3</sup> 作为开发 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 六种异构体分离方法的起点。该方法有望实现全部六种可能立体异构体的分离 (图 2)，其中全部六种异构体在 2.8 分钟至 6.0 分钟之间获得了部分分离。由于分离不完全，因此需对该分离进行进一步优化。

图 2 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20 °C
流动相	10% B (EtOH + 0.1% 氨水)
流速	4 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

下一步改变改性剂 B 的乙醇含量，但结果表明分离效果未得到改善。降低改性剂 B 的含量导致保留时间延长，同时峰展宽、分离度降低，对于后洗脱的峰而言尤其如此 (数据未示出)。还考察了柱温对对映体分离的影响 (图 3)。

图 3 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20、30、40、45 °C
流动相	10% B (EtOH + 0.1% 氨水)
流速	4 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

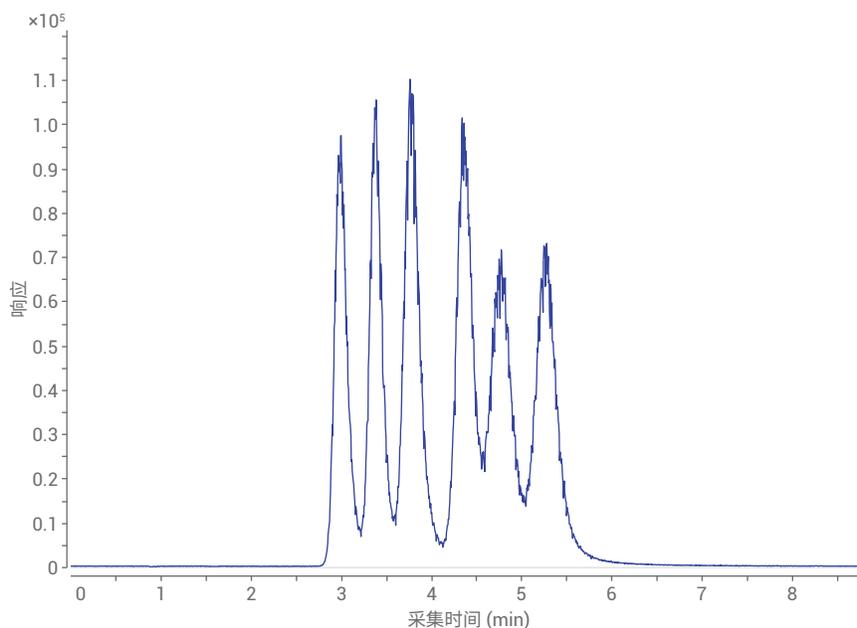


图 2. 用于分离 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种异构体的初始方法

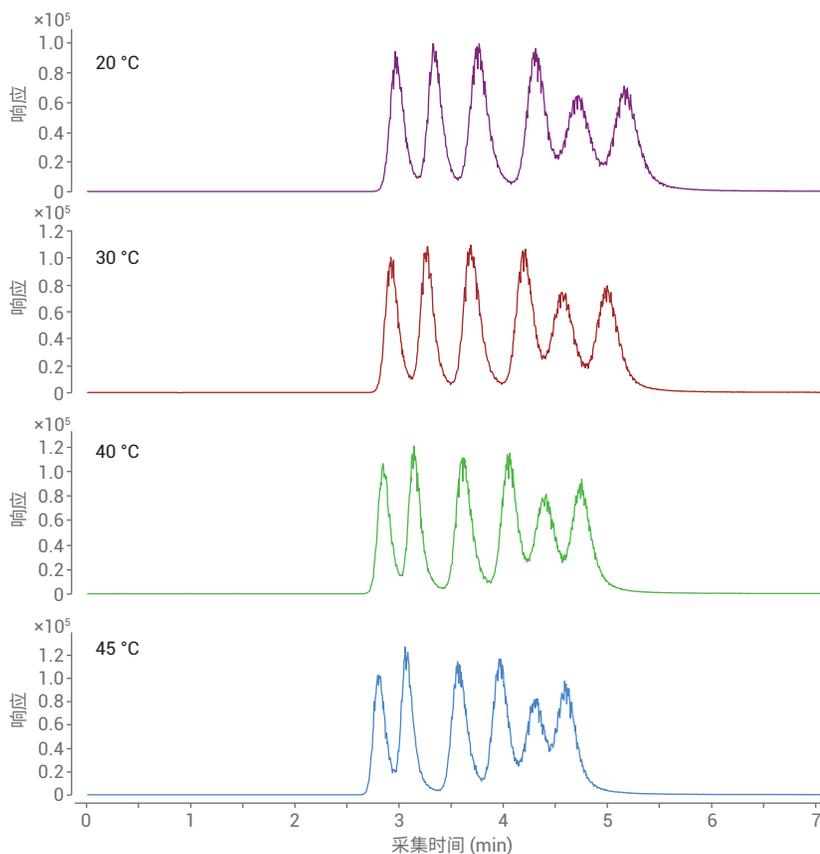


图 3. 取决于柱温的 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 所有六种异构体的分离

在 20–30 °C 的较低柱温下获得了最高分离度，而使用较高温度的时，分离度有所下降。还测试了不同溶剂，以改善六种异构体之间的分离度。采用甲醇代替乙醇作为改性剂时，色谱峰洗脱时间更早（介于 2.0 和 3.5 分钟之间），且获得了更出色的峰形。然而，峰仍未得到完全分离（图 4）。

图 4 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20 °C
流动相	10% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	4 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

最后，发现用 10% 甲醇（含 0.1% 氨水）作为改性剂，在 3 mL/min 的流速下可获得最佳分离效果（图 5）。

图 5 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-H, 4.6 × 250 mm, 5 μm
柱温	20 °C
流动相	10% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	3 mL/min
进样量	5 μL
样品	浓度各为 10 ppb 的甲醇溶液

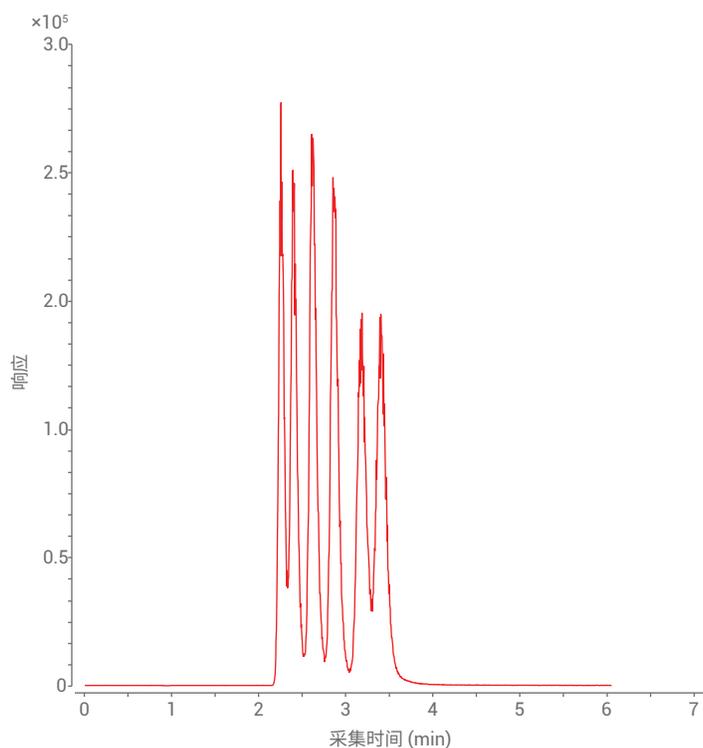


图 4. 采用甲醇作为改性剂分离 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种异构体的方法

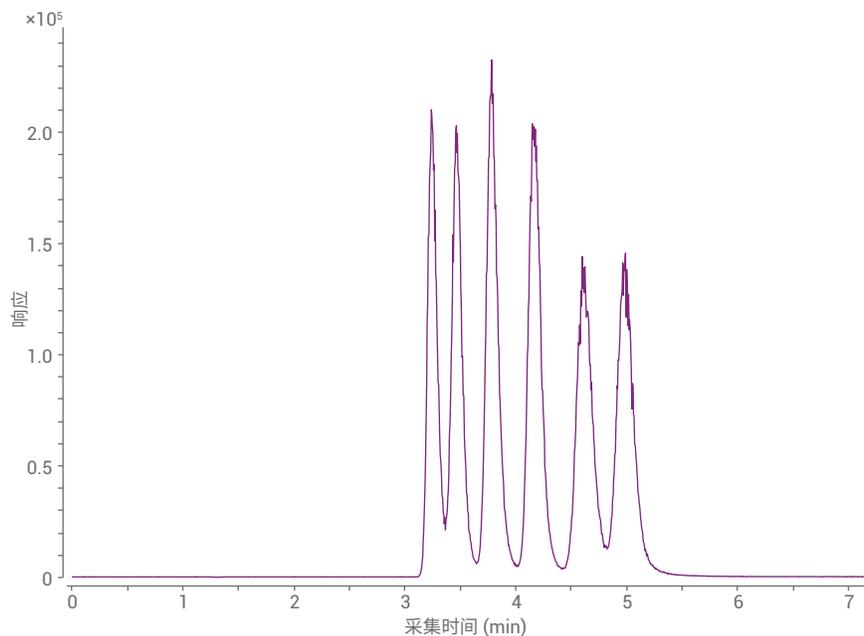


图 5. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种异构体的优化分离效果

化合物在 3.2 至 5.5 分钟之间洗脱。通过比较 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的外消旋单标,对化合物进行鉴定(图 6)。在优化的条件下:

- 4-EAPB 在 3.1 至 3.7 分钟之间洗脱
- 5-EAPB 在 3.6 至 4.6 分钟之间洗脱
- 6-EAPB 在 4.4 至 5.4 分钟之间洗脱

具体而言,利用所开发的方法成功实现了 5-EAPB 和 6-EAPB 的分离,达到方法开发的目的。

对质谱离子源和所有相关质谱参数进行优化后,绘制 100 ppt 至 100 ppb 之间的 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的校准曲线(图 7),其中每种校准浓度重复测定三次。4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的线性  $R^2$  值分别为 0.9998、0.9993 和 0.9990。在信噪比(S/N)为 10 的条件下,确定定量限(LOQ)为 100 ppt。在 S/N 为 3 的条件下,确定检测限(LOD)为 30 ppt。

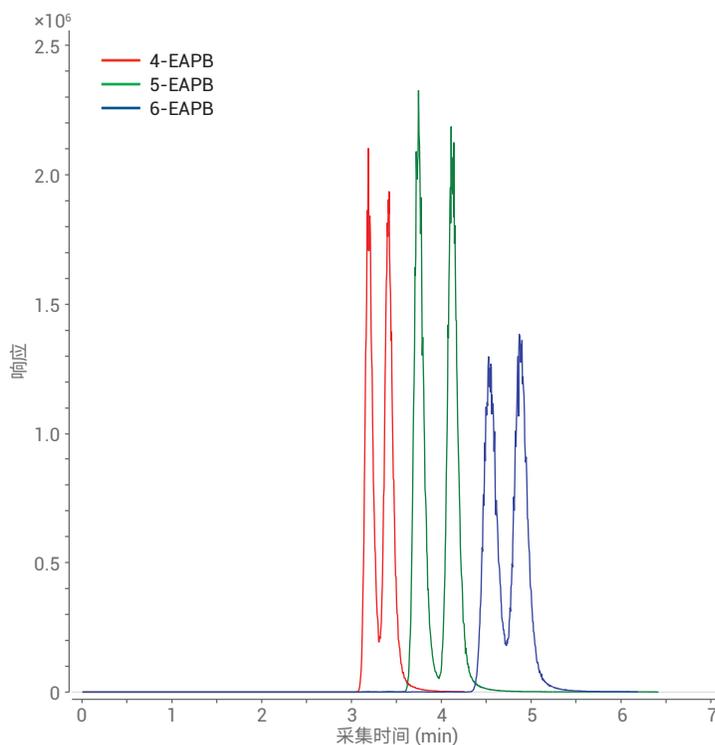


图 6. 通过进样对映化合物 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 外消旋单标对其进行鉴定

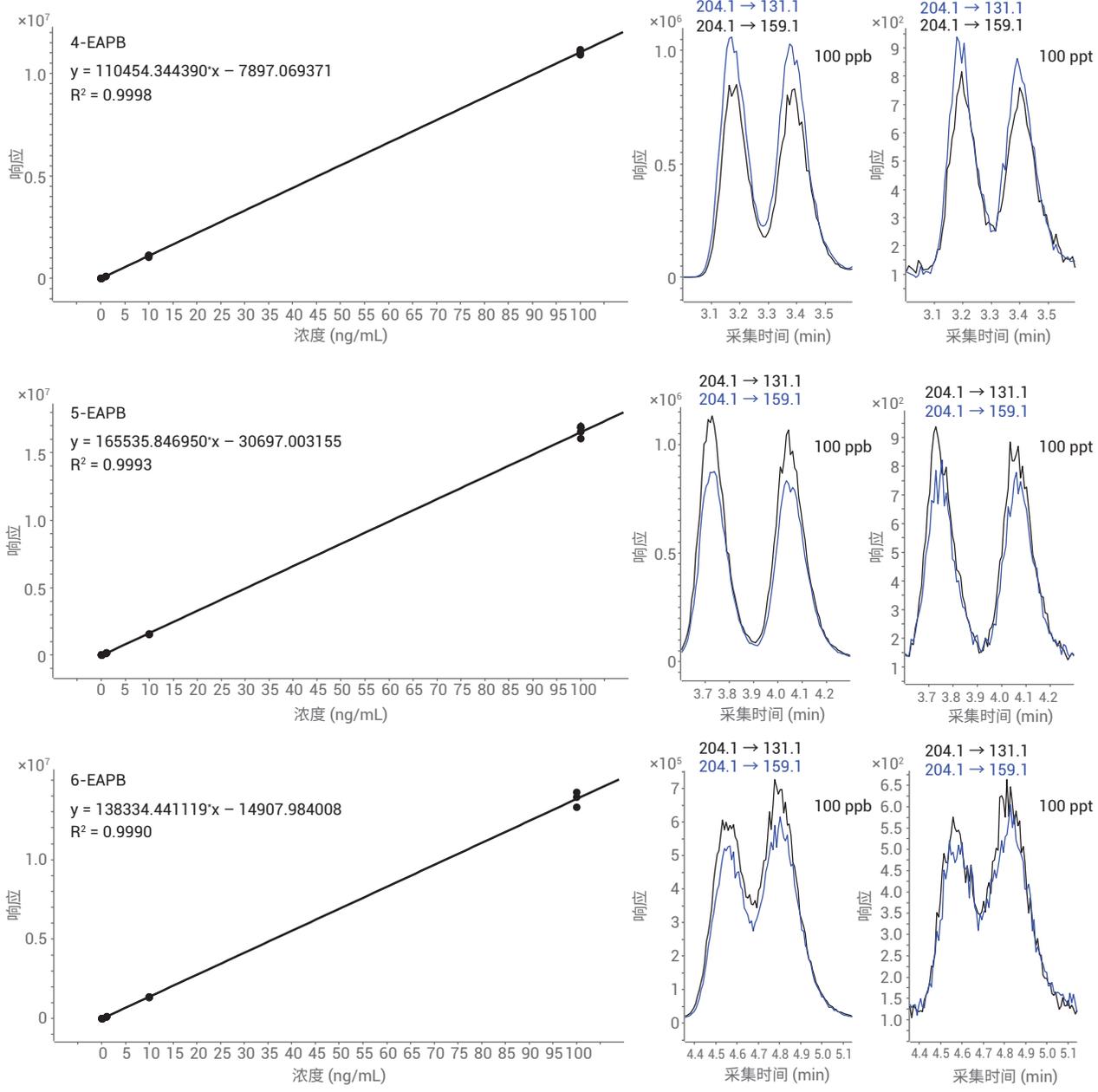


图 7. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 在 100 ppt 至 100 ppb 之间的校准曲线。100 ppb 和 100 ppt (LOQ) 下的定量离子对和定性离子对显示在各个校准曲线旁

## 利用单四极杆质谱仪对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的位置异构体进行分离

测定 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的另一种可能性是对结构异构体的非手性分离。遗憾的是，现有分离方法均无法采用非手性固定相并分离所有三种结构异构体。通常，4-EAPB 能够得到分离，但另外两种异构体 5-EAPB 和 6-EAPB 完全共洗脱或分离不完全。为解决这一问题，试图在手性固定相上仅分离异构体而不分离对映体。

初始实验采用 CHIRALPAK AD-3 色谱柱并以甲醇作为流动相（甲醇含量 15%，含 0.1% 氨水），结果表明三种结构异构体获得一定程度的分离，但是对映体未得到分离（图 8）。为改善三种异构体的部分分离情况，逐步将甲醇含量降至 1%。结果发现，用 11% 甲醇（含 0.1% 氨水）作为改性剂，能够使三种化合物实现充分分离并获得可接受的峰宽和运行时间（图 9）。

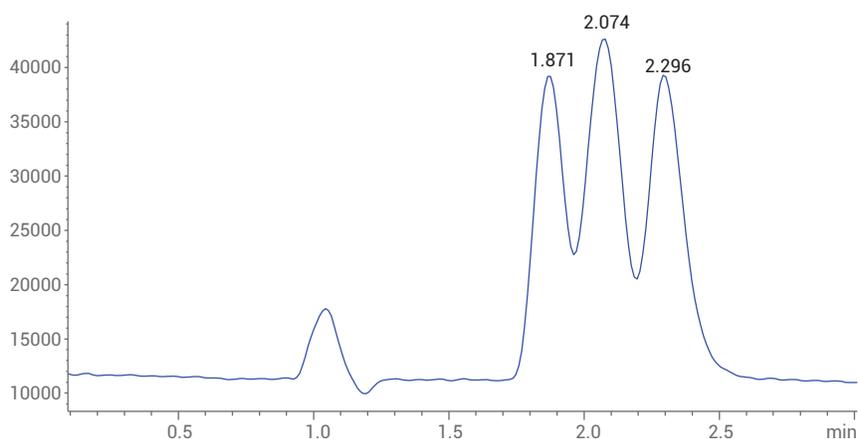


图 8. 采用 15% 甲醇作为改性剂对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体的分离

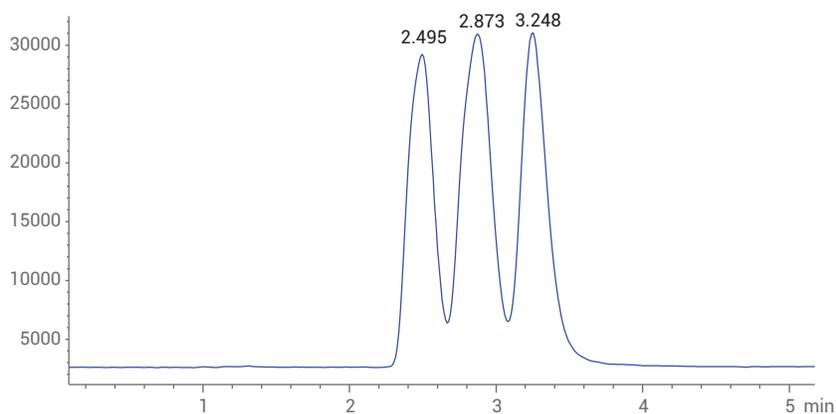


图 9. 采用 11% 甲醇作为改性剂对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体的分离

图 8 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm
柱温	30 °C
流动相	15% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	2 mL/min
进样量	1 μL
样品	浓度各为 100 ppb 的甲醇溶液

图 9 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm
柱温	30 °C
流动相	11% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	2 mL/min
进样量	1 μL
样品	浓度各为 100 ppb 的甲醇溶液

通过提高流速将运行时间缩短至 3.5 分钟，由此得到最终方法（图 10）。进样分析三种非手性异构体的单标，对化合物的特性进行确认（图 11）。4-EAPB 在 2.15 分钟洗脱，5-EAPB 在 2.50 分钟洗脱，而 6-EAPB 在 2.83 分钟洗脱。该方法采用 SFC 与 SIM 模式下运行的单四极杆质谱仪相结合，能够用于 EAPB 的快速定性检测。为实现正确的定量分析，可采用 SFC 与选择性更高的三重四极杆质谱仪相结合的方法。

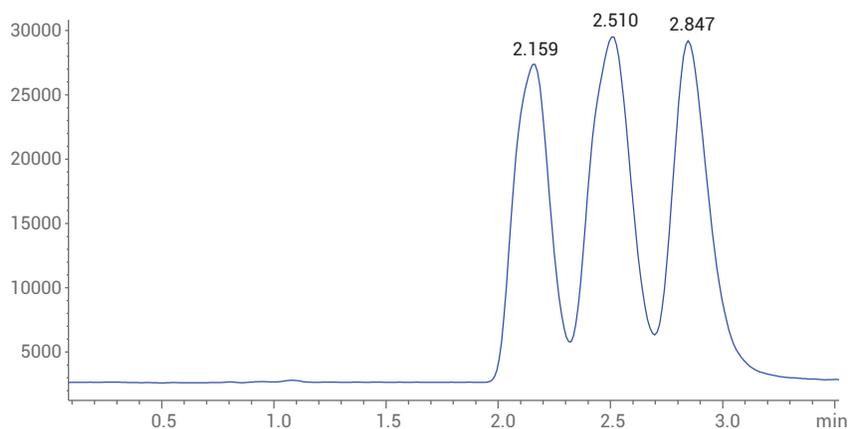


图 10. 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体的最终分离方法

图 10 的方法参数

参数	值
色谱柱	Chiralpak AD-3, 4.6 × 150 mm, 3 μm
柱温	30 °C
流动相	11% B (MeOH + 0.1% 氨水)
流速	2.5 mL/min
进样量	1 μL
样品	浓度各为 100 ppb 的甲醇溶液

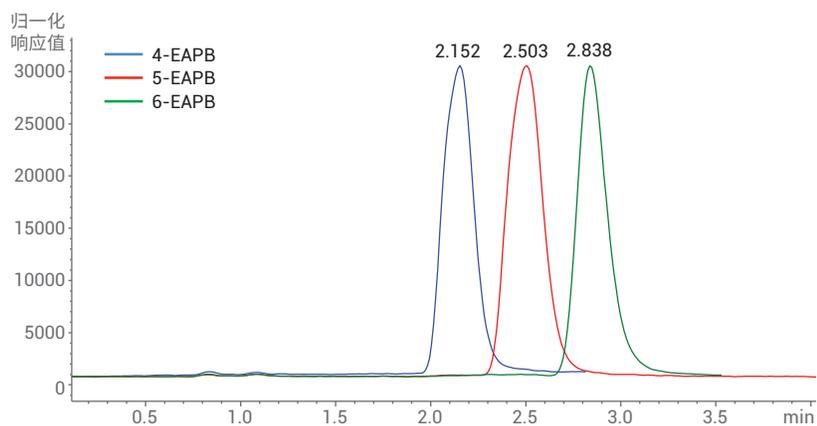


图 11. 采用最终方法分离 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 结构异构体单标样品所得到的叠加谱图

## 结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 对 4-EAPB、5-EAPB 和 6-EAPB 的所有六种可能异构体的分离以及仅对三种相应结构异构体的分离。将 SFC 与单四极杆质谱仪或三重四极杆质谱仪联用，实现了检测和定量测定。采用三重四极杆质谱仪绘制用于定量分析的校准曲线，结果表现出优异的线性 ( $R^2 > 0.9990$ ) 和灵敏度。确定的 LOQ 为 100 ppt，LOD 为 30 ppt。

## 参考文献

1. Taschwer, M.; Hofer, M. G.; Schmid, M. G. Enantioseparation of benzofurys and other novel psychoactive compounds by CE and sulfobutylether  $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector added to the BGE. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 19, 2793–2799
2. The 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**
3. M. Muelek, H. Godel, E. Naegele. D/L-安非他明手性分离方法的开发，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8262ZHCN，**2017**

## 致谢

感谢瑞典林雪平国家法医学委员会的 Martin Josefsson 和 Markus Roman 提供样品。

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://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 11 月 1 日，中国出版  
5991-8416ZHCN