

## 手性试剂柱前衍生化高效液相色谱法测定 $\alpha$ -苯乙胺的光学纯度

王金朝<sup>1,2</sup>, 曾 苏<sup>1</sup>, 王丹华<sup>2</sup>, 胡功允<sup>2\*</sup>

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江华海药业股份有限公司质量研究部, 浙江 台州 317024)

**摘要**: 建立了一种简便的手性试剂柱前衍生化反相高效液相色谱测定  $\alpha$ -苯乙胺光学纯度的方法。采用 2,3,4,6-四-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖异氰酸酯(GITC)对  $\alpha$ -苯乙胺进行衍生化,优化了衍生化反应参数;使用 Agilent Zorbax C18 色谱柱分离衍生化产物,流动相为甲醇-磷酸盐缓冲溶液(pH 3.0)(体积比为 58:42),流速 1.0 mL/min,检测波长 241 nm,柱温为 30  $^{\circ}$ C。实验结果表明, $\alpha$ -苯乙胺两个对映体的衍生化产物分离良好,在 0.15 ~ 15.0 mg/L 范围内呈现良好的线性关系。方法的检出限为 0.05 mg/L,定量限为 0.15 mg/L,日内和日间精密度考察中测定值的相对标准偏差(RSD)均小于 0.5%。建立的方法适用于  $\alpha$ -苯乙胺的质量控制。

**关键词**: 高效液相色谱法;手性衍生试剂;柱前衍生化; $\alpha$ -苯乙胺;光学纯度

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)03-0376-03 栏目类别: 技术与应用

## Determination of optical purity of $\alpha$ -phenylethylamine by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization

WANG Jinzhao<sup>1,2</sup>, ZENG Su<sup>1</sup>, WANG Danhua<sup>2</sup>, HU Gongyun<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Department of Quality Research, Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 317024, China)

**Abstract**: A simple pre-column derivatization-high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established for the determination of optical purity of  $\alpha$ -phenylethylamine. The enantiomers of  $\alpha$ -phenylethylamine were derivatized with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC). The resulted diastereoisomers were separated on an Agilent Zorbax C18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) with a mobile phase of methanol-phosphate buffer (1.36 g/L aqueous solution of potassium dihydrogen phosphate, adjusted to pH 3.0 with concentrated phosphoric acid) (58:42, v/v). The flow rate was set at 1.0 mL/min and the detection wavelength was set at 241 nm. The method was linear from 0.15 - 15.0 mg/L for both enantiomers. The limit of detection and the limit of quantification were 0.05 mg/L and 0.15 mg/L, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of inter- and intra-day determination were below 0.5%. The method is easy to handle, accurate, and suitable for the quality control of the optical purity of  $\alpha$ -phenylethylamine.

**Key words**: high performance liquid chromatography (HPLC); chiral derivatization reagent; pre-column derivatization;  $\alpha$ -phenylethylamine; optical purity

$\alpha$ -苯乙胺( $\alpha$ -phenylethylamine)含有一个手性中心,因此具有 *R*- $\alpha$ -苯乙胺和 *S*- $\alpha$ -苯乙胺两个对映异构体。在医药化工领域,两个对映体都是重要的手性拆分剂,同时又是不对称合成的重要手性原料<sup>[1]</sup>。因此,建立一种简便的测定  $\alpha$ -苯乙胺光学纯度的方法具有十分重要的意义。

有关  $\alpha$ -苯乙胺光学纯度测定的方法主要有旋

光法、质谱法<sup>[1]</sup>、核磁共振法<sup>[2]</sup>等。旋光法存在样品消耗量大、操作繁琐、灵敏度低的缺点,且对于微量光学杂质很难检测。核磁共振法需要配备昂贵的仪器设备,因此不易普及使用。目前,高效液相色谱法(HPLC)是手性药物分析领域应用最广泛的方法。徐旭等<sup>[3]</sup>和唐琴<sup>[4]</sup>分别报道了使用商品化的或自制的DNBPG(二硝基苯甲酰苯基甘氨酸丙基

\* 通讯联系人: 胡功允, 高级工程师. E-mail: hu@huahaipharm.com.

基金项目: 浙江省博士后科研择优资助项目(No. 2007-bsh-33).

收稿日期: 2008-11-07

硅胶)手性柱来测定  $\alpha$ -苯乙胺光学纯度。由于  $\alpha$ -苯乙胺在该类手性固定相上不能直接拆分,所以他们分别采用 4-甲氧基苯甲酸或酰氯 A 对样品进行衍生化。但该衍生化反应时间较长,完全反应需要 1 h 或 2 h,不利于常规分析。手性试剂柱前衍生化技术是一种常用的手性药物分析方法。它利用手性药物与高光学纯度的手性衍生化试剂形成非对映异构体对,从而在普通液相色谱柱或手性柱上实现分离<sup>[5]</sup>。2,3,4,6-四-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖异氰酸酯(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate, GITC)是一种广泛应用于伯胺类手性药物的手性衍生化试剂,具有反应条件温和、不消旋化等优点<sup>[6-9]</sup>。本文对  $\alpha$ -苯乙胺与 GITC 的反应进行了优化,考察了衍生化产物分析的 HPLC 方法学,并用于实际样品的光学纯度测定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters 2695-2996 液相色谱仪,配备二极管阵列检测器(DAD),操作软件为 Empower 色谱工作站。*R*- $\alpha$ -苯乙胺和 *S*- $\alpha$ -苯乙胺对照品(纯度  $\geq 99.0\%$ )购自 Fluka 公司; $\alpha$ -苯乙胺样品购自辽宁某医药化工有限公司;GITC(纯度  $\geq 99.5\%$ )购自 Sigma 公司;乙腈、甲醇、磷酸二氢钾、浓磷酸均为色谱纯;水为 Milli-Q 超纯水。

### 1.2 色谱条件

Agilent Zorbax C18 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-磷酸盐缓冲液(1.36 g 磷酸二氢钾溶于 1 000 mL 水中,用浓磷酸调节 pH 值至 3.0)(体积比为 58:42);流速:1.0 mL/min;检测波长 241 nm;进样量 20  $\mu$ L;柱温 30  $^{\circ}$ C。

### 1.3 溶液的配制

对照品溶液、供试品溶液:精密称取 15.0 mg  $\alpha$ -苯乙胺对照品或样品置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并定容,摇匀,得到对照品溶液或供试品溶液。将两个对映体对照品溶液稀释约 15 倍用于分离度的测定。以上溶液均置于室温避光保存。

衍生化试剂溶液:准确称取 GITC 20.0 mg 置于具塞三角瓶中,用 4 mL 乙腈溶解,混匀,得质量浓度为 5.0 g/L 的 GITC 溶液。该溶液在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中放置一个月不影响样品分析结果。

1%(体积分数)三乙胺溶液:准确移取 1 mL 三乙胺置于 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容即得。

### 1.4 样品处理

用移液枪准确移取对照品溶液或供试品溶液 100  $\mu$ L 于 2 mL 玻璃进样小瓶中,准确加入衍生化

试剂溶液 150  $\mu$ L,涡旋混匀,室温放置 30 min,加入 750  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液终止反应,混匀后进样分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 衍生化反应条件的优化

GITC 与胺类化合物的反应需要在无水环境中进行,常用介质主要为乙腈、二氯甲烷、二甲亚砜等。本实验选用乙腈作为反应介质是因为乙腈是液相色谱中常用的流动相组分,可简化样品前处理过程。考察了反应温度(30  $^{\circ}$ C 和 55  $^{\circ}$ C)、时间(15 ~ 60 min)、衍生化试剂和催化剂用量对衍生化反应的影响。有文献报道,胺类药物与 GITC 的反应常需要添加三乙胺来作为催化剂<sup>[7]</sup>,然而本实验表明,反应温度和添加三乙胺对  $\alpha$ -苯乙胺与 GITC 的反应并无显著影响。当添加衍生化试剂 150  $\mu$ L,于 30  $^{\circ}$ C 下放置 30 min,所得产物色谱峰峰面积达到最大并保持恒定,表明衍生化反应已基本完成。

### 2.2 色谱条件的优化

手性化合物的两个对映异构体除旋光相反外,具有相同的理化性质,但其与手性试剂反应后的非对映异构体的紫外吸收情况可能不尽相同。DAD 扫描结果表明,两个对映体的 GITC 衍生化产物的紫外吸收情况虽略有差异,但在 241 nm 处两者具有相同的紫外吸收,因此检测波长选在 241 nm 处,并采用面积归一化法来计算样品的光学杂质含量。以用于分离度测定的溶液的衍生化样品来进行色谱条件优化。当以乙腈作为有机相时,两个对映体始终不能获得基线分离,然而使用甲醇作为流动相,两个对映体的衍生化产物分离良好(见图 1-a)。综合考虑样品的分离度和检测灵敏度,最终确定了“1.2”节所述的色谱条件。

### 2.3 方法学考察

对分析方法的专属性、线性、灵敏度、精密度和准确度进行了考察。由于过量的衍生化试剂约在 11.5 min 出峰,因此其不干扰样品的分析。该方法在 0.15 ~ 15 mg/L 范围内线性关系良好,*R*-和 *S*- $\alpha$ -苯乙胺的回归方程分别为  $Y = 118\,781X - 9\,864$  ( $r^2 = 0.999\,9$ )和  $Y = 117\,508X - 9\,418$  ( $r^2 = 0.999\,8$ )。方法的检出限( $S/N = 3$ )和定量限( $S/N = 10$ )分别为 0.05 和 0.15 mg/L。加标回收率测定采用向已知光学杂质含量的 *R*-或 *S*- $\alpha$ -苯乙胺样品(终浓度 150 mg/L)中添加光学杂质(终浓度 1.5 mg/L),以扣除样品中的本底杂质浓度后检测到的浓度与实际加入浓度的比值来计算方法的回收率。计算结果如表 1 所示,两个对映体的杂质回收率均大于 98%。同日内分别进行 5 次平行分析,并连续测定 5 d,所

获得的测定结果的相对标准偏差(RSD)均小于 0.5%(见表 1)。连续进样分析表明,两个对映体在

乙腈中可稳定保存至少 5 d,衍生化产物峰面积在 24 h 内无显著变化。

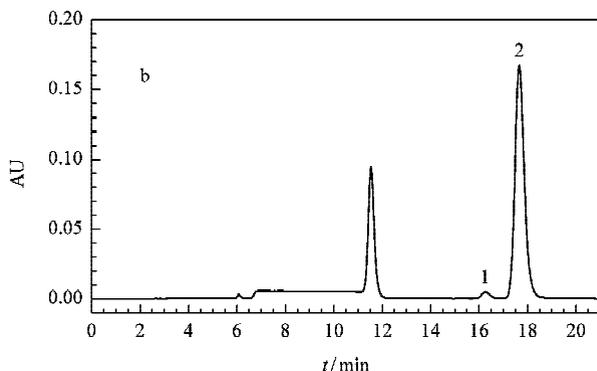
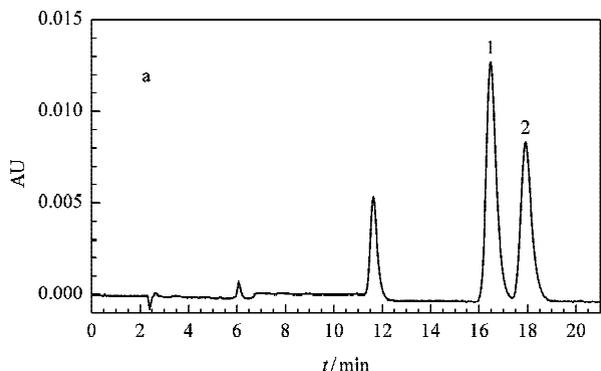


图 1 (a)优化的色谱条件下两个对映体对照品衍生化产物的分离图谱和(b)一批 *S*- $\alpha$ -苯乙胺样品的衍生化产物色谱图

Fig. 1 Chromatograms of (a) resolution of  $\alpha$ -phenylethylamine-GITC derivatives under the optimized HPLC conditions and (b) *S*- $\alpha$ -phenylethylamine derivative

1. *R*- $\alpha$ -phenylethylamine derivative; 2. *S*- $\alpha$ -phenylethylamine derivative.

表 1 方法的回收率和精密度( $n=5$ )

Table 1 Recovery and precision of the method ( $n=5$ )

Sample	Background/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	Precisions/%	
					intra-day	inter-day
<i>R</i> -isomer	2.76	1.50	4.25	99.3	0.30	0.46
<i>S</i> -isomer	0.26	1.50	1.73	98.0	0.18	0.41

### 2.4 实际样品测定

应用建立的方法对外购的 *R*-和 *S*- $\alpha$ -苯乙胺样品各 3 批进行测定,代表图谱见图 1-b,以面积归一化法计算光学杂质的含量,同时也采用以外标法测得的光学杂质浓度与实际样品浓度的比值来计算杂质含量(见表 2)。从表 2 可以看出,两种计算方法的结果差别不大。由于面积归一化法操作简单,在没有杂质标准品的情况下也可以进行准确定量,所以推荐采用面积归一化法进行光学纯度计算。手性试剂的光学纯度对于保证分析结果的准确性具有重要的意义。由于本实验采用的 GITC 仍含有痕量的光学杂质,因此建立的方法可用于检测光学杂质含量较高的  $\alpha$ -苯乙胺样品,此时结果误差较小。对于高光学纯度的样品,采用手性固定相法将能得到更为准确的结果,这是由于手性固定相法重现性好,一般不需要高纯度的衍生化试剂<sup>[10]</sup>。

表 2 采用两种方法计算实际样品中光学杂质的含量

Table 2 Contents of optical impurity in three batches of *R*- and *S*- $\alpha$ -phenylethylamine samples calculated by the two methods %

Sample	Batch number	External standard method	Normalization method
<i>R</i> - $\alpha$ -phenylethylamine	07001	0.13	0.10
	07002	0.28	0.25
	07003	0.32	0.30
<i>S</i> - $\alpha$ -phenylethylamine	07001	2.81	2.76
	07002	2.26	2.21
	07003	1.60	1.55

### 3 结论

本文报道了一种简便的测定  $\alpha$ -苯乙胺光学纯度的方法,可用于  $\alpha$ -苯乙胺的质量控制。

#### 参考文献:

[1] Wu Y N, Tu Y P, Pan Y J, et al. Chemical Journal of Chinese Universities (吴忆南,涂亚平,潘远江,等.高等学校化学学报),1996,17(9):1421

[2] Jiang X D, Su K M, Cai S H, et al. Spectroscopy and Spectral Analysis (江向东,苏克曼,蔡水洪,等.光谱学与光谱分析),2001,21(3):404

[3] Xu X, Song H, Sun J, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (徐旭,宋航,孙娟,等.分析试验室),2007,26(4):89

[4] Tang Q. Journal of Hubei Institute for Nationalities (唐琴.湖北民族学院学报),2006,24(2):880

[5] Zeng S. Chiral drug and chiral pharmacology. Hangzhou: Zhejiang University Press (曾苏.手性药物与手性药理学.杭州:浙江大学出版社),2002:74

[6] Yu L S, Yao T W, Wang X J, et al. Journal of Zhejiang University (余露山,姚彤炜,王向军,等.浙江大学学报),2002,31(6):414

[7] Tang Y H, He Y, Yao T W, et al. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2):159

[8] He Y, Zeng S. Chirality, 2006, 18(1):64

[9] Jin Y X, Tang Y H, Zeng S. J Pharm Biomed Anal, 2008, 46(5):953

[10] State Food and Drug Administration. Guideline of research on quality control of chiral drugs. [2006-12-09]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0055/10635.html>