

用(+)-FLEC 手性试剂自动柱前衍生高效液相色谱法拆分麻黄碱类药物对映体

金 晓 崔凯荣

(国家体委运动医学研究所, 北京 100029)

提要 报道了以(+)-FLEC 作为手性衍生化试剂, 用反相高效液相色谱技术分离麻黄碱类药物对映异构体的方法。*dl*-麻黄碱、*dl*-伪麻黄碱、*dl*-去甲麻黄碱、*dl*-去甲伪麻黄碱先与(+)-FLEC 形成衍生物后, 经过一 ODS Hypersil 柱分离, 以水和乙腈为流动相梯度洗脱, 二极管阵列检测器在 266 nm 检测。该法从样品衍生化到最后报告全部自动完成。上述各对对映体均达到基线分离, 分离度 *R* 均大于 1.5, 方法灵敏度高, 最低检出限达 10 pmol, 保留时间和峰面积的重现性较好, RSD 分别为 1.1% 和 3.0%。

关键词 手性衍生化; (+)-FLEC 衍生化试剂; 麻黄碱; 高效液相色谱法

麻黄碱、伪麻黄碱、去甲麻黄碱、去甲伪麻黄碱为拟肾上腺素类药物, 有松弛支气管平滑肌、收缩血管和兴奋中枢等药理作用, 临床应用十分广泛, 常见于治疗哮喘、伤风、过敏等症的各种制剂中。麻黄碱类药物有二个手性碳原子, 每个均有一对对映体(见图 1)。鉴于每对对映

R	Compound	Absolute configuration
CH ₃	<i>L</i> -Ephedrine	1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> -
	<i>D</i> -Ephedrine	1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> -
CH ₃	<i>L</i> -Pseudoephedrine	1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> -
	<i>D</i> -Pseudoephedrine	1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> -
H	<i>L</i> -Norephedrine	1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> -
	<i>D</i> -Norephedrine	1 <i>S</i> , 2 <i>R</i> -
H	<i>L</i> -Norpseudoephedrine	1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> -
	<i>D</i> -Norpseudoephedrine	1 <i>S</i> , 2 <i>S</i> -

Fig 1 The chemical structure and absolute configuration of the compounds studied.

体的药理活性有显著差异^(1,2), 且在体内的代谢过程不同⁽³⁾, 故研究麻黄碱类药物对映异构体的拆分有重要意义。色谱法拆分这类药物曾有报道, Beckett 等将三对麻黄碱对映体经三氟乙酰丙酰化后再用 GLC 分离⁽⁴⁾; Konig 将合成的新手性 GLC 固定相装填玻璃毛细管柱, 气相法拆分麻黄碱对映体⁽⁵⁾, 随后又发展了用手性 HPLC 法拆分麻黄碱对映体的方法; Wainer 建立了以萘甲醛为手性试剂, 将 *dl*-麻黄碱缩合成噁唑烷衍生物后, 以手性固定相分离^(6,7); Schill 等报道了手性流动相拆分麻黄碱对映异构体的方法⁽⁸⁾。此外, 还有采用柱前衍生化的技术, 用手性试剂将对映体转变成一对非对映异构体后, HPLC 分离的方法^(9~11)。在上述报道的方法中, 均没

有四对对映异构体同时拆分的报道,且分离不佳⁽⁴⁾,衍生化时间长,形成的衍生物需重结晶^(6,7),手性柱价钱较为昂贵以及离线柱前衍生化重现性较差等问题。本文建立了以(+)-FLEC为衍生化试剂,利用自动进样器在线的衍生功能,实现四对麻黄碱对映体拆分的反相HPLC法。该法具如下优点:1.麻黄碱对映体与FLEC的衍生过程全自动实现,具高度重现性;2.衍生化试剂为商品化试剂,且具手性高纯度,衍生用量极微,仅为1 μ l;3.衍生后,引入了发色基团,提高了检出灵敏度;4.四对麻黄碱对映体均达到基线分离。

实 验 部 分

试剂和样品 乙腈(色谱试剂优级纯,北京防化研究院化工厂),高纯水(采用Millipore纯水器制得),(+)-FLEC[1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate]购自Fluka Chemicals。其它试剂均为国产分析纯。

dl-麻黄碱、*dl*-伪麻黄碱、*dl*-去甲伪麻黄碱均由加拿大INRS-Sante赠送,*dl*-去甲麻黄碱购自Sigma,*D*-麻黄碱、*L*-麻黄碱由中国药品生物制品检定所赠送,*L*-去甲麻黄碱由中国医学科学院药物研究所赠送。

仪器和设备 高效液相色谱仪:Hewlett-Packard 1090M型HPLC系统,配有三元梯度泵(带柱温箱),自动进样系统(带衍生功能),二极管阵列检测器(DAD),Pascal工作站。pH计(Beckman Φ 40),纯水器(Millipore)。

样品制备 称样品1mg,用含10%三乙胺的乙腈溶液溶解,制成浓度为1mg/ml的样品溶液,置冰箱中备用。

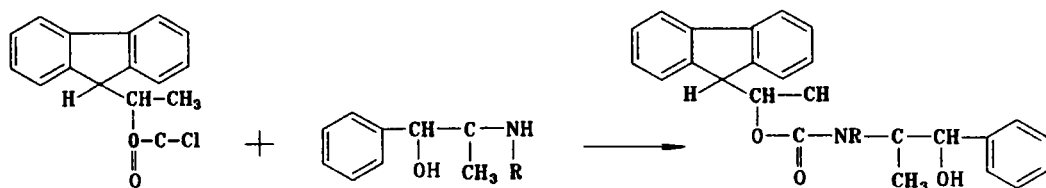
色谱条件 色谱柱:HP ODS Hypersil柱,5 μ m,200mm \times 4.6mm;流动相:A.纯水;B.乙腈;柱温:40 $^{\circ}$ C。

自动进样器的衍生程序:

样品位置:0号:水,洗针用;1号:硼酸盐缓冲液,pH 7.40;2号:(+)-FLEC衍生试剂;3~6号:麻黄碱样品。

衍生程序:1—draw 0.0 μ l from vial 0; 2—draw 3.0 μ l from vial 1; 3—draw 0.0 μ l from vial 0; 4—draw 1.0 μ l from vial 2; 5—draw 0.0 μ l from vial 0; 6—draw 1.0 μ l from sample; 7—draw 0.0 μ l from vial 0; 8—draw 2.0 μ l from vial 1; 9—draw 0.0 μ l from vial 0; 10—mix 7.0 μ l cycles 6; 11—inject。

衍生反应:



梯度条件:0.0 min B;35% \rightarrow 30.0 min B;75%;流速程序:0.0 min flow rate 1.5 ml/min \rightarrow 10.0 min flow rate 1.5 ml/min \rightarrow 20.0 min flow rate 2.0 ml/min;检测器:检测波长为266 nm,检测带宽4 nm,参比波长为350 nm,检测带宽为30 nm。

结果和讨论

麻黄碱对映体的拆分

四对麻黄碱对映体拆分的结果见表 1。非对映体衍生物峰位的确定是通过在完全相同的实验条件下,将不含手性试剂的样品色谱图、不含样品的 FLEC 试剂色谱图及样品衍生化后的色谱图比较,得知,只有当样品与 FLEC 衍生化后,才能得到一对完全对称的峰,而上述两种空白溶液在该处均无峰。另分别以 *D*-麻黄碱、*L*-麻黄碱及 *L*-去甲麻黄碱样品衍生化后与其消旋体衍生物的色谱图对照,显示药物对映体的出峰顺序为 *L* 先于 *D* 洗脱,这与文献报道的一致⁽¹⁰⁾。

Tab 1 Chromatographic resolution for enantiomers of ephedrines by derivatization with (+)-FLEC reagent

Compound	k_1	k_2	α	R_s	t_R (min)
<i>d,l</i> -Norephedrine	8.60	8.89	1.03	1.92	17.43(<i>l</i>), 17.96(<i>d</i>)
<i>d,l</i> -Norpseudoephedrine	8.65	9.17	1.06	2.67	17.50(<i>l</i>), 18.44(<i>d</i>)
<i>d,l</i> -Ephedrine	9.43	9.81	1.04	1.99	18.94(<i>l</i>), 19.61(<i>d</i>)
<i>d,l</i> -Pseudoephedrine	10.44	10.97	1.05	2.67	20.84(<i>l</i>), 21.80(<i>d</i>)

对映体的分离度

根据峰保留时间和峰宽,得到了各对对映体的分离度 R 及分离系数 α 。如果两组分的流出峰符合高斯曲线,且峰高相等时, $R=1.5$,两组分几乎完全分离⁽¹²⁾,我们得到四对对映体的分离度均大于 1.5,即完全达到了基线分离,好于以往报道的 GLC 和 HPLC 方法^(4~11)。

手性试剂

FLEC 作为手性试剂,可用于一级、二级胺类和氨基酸对映体的拆分,由于其能迅速地与胺类对映体反应生成稳定的非对映体,反应条件温和、快速,反应产物单一,且 FLEC 为商品化试剂,具手性高纯度,优于目前常用的胺类拆分试剂——异氰酸酯类和异硫氰酸酯类。异氰酸酯类试剂活性较强,不仅能与麻黄碱类的氨基反应,还可与其 C_1 上的羟基反应,反应产物不单一⁽¹³⁾,而异硫氰酸酯类试剂活性较差。另外,过量的 FLEC 衍生化试剂不干扰样品检测,不需在色谱分离前除去,使衍生化方法简便易行。

衍生化时间的确定

为了得到最佳的衍生化结果,在固定其余实验条件下,我们试验了麻黄碱对映体与 FLEC 经不同的时间衍生后对形成的非对映体衍生物色谱峰高的影响,结果见图 2。从图可见,样品与 FLEC 在进样器中混合 6 次后,衍生反应趋于完全,其余三对对映体的衍生情形与麻黄碱类似,故我们以混合 6 次作为衍生化的时间。

方法重现性

对每对样品均进行了 6 次重复进样,以确定其方法重现性,结果见表 2。该重现性包括了从衍生化到色谱分离的整个过程,从结果可以看出,由于从衍生到分析全部自动完成,条件易于控制,该法具高度重现性。

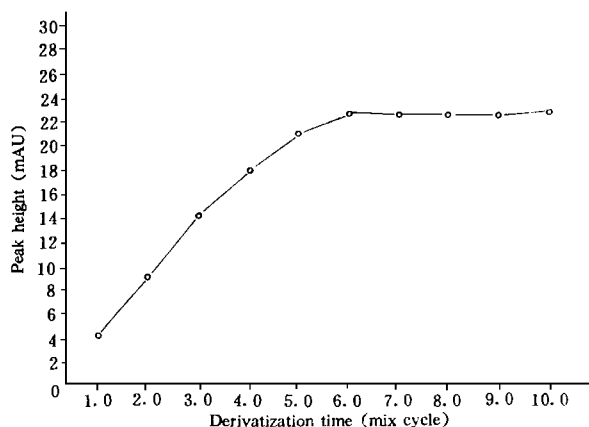


Fig 2 Derivatization time-peak height curve of the reaction of *dl*-ephedrine with (+)-FLEC.

Tab 2 Retention time and peak area reproducibility

Compound	RSD(%)	
	Retention time	Peak area
<i>L</i> -Ephedrine	0.18	1.21
<i>D</i> -Ephedrine	0.19	1.26
<i>L</i> -Pseudoephedrine	0.18	2.13
<i>D</i> -Pseudoephedrine	0.25	2.24
<i>L</i> -Norephedrine	0.05	0.95
<i>D</i> -Norephedrine	0.08	1.13
<i>L</i> -Norpseudoephedrine	0.10	2.30
<i>D</i> -Norpseudoephedrine	0.12	2.16

灵敏度

以信噪比为 2 : 1 时,作为麻黄碱类药物的检出限,则该法灵敏度达 10 pmol,相当于 1.65 ng 麻黄碱和 1.51 ng 去甲麻黄碱。由于衍生化同时,在麻黄碱类结构中引入了一个发色基团,使麻黄碱对映体与 FLEC 的衍生产物具强的紫外吸收,从而使检测灵敏度达到毫微克级水平,故上述方法有可能用于体液中麻黄碱药物对映体的检测。

本文所建立的以(+)-FLEC 作为柱前衍生化试剂,反相液相技术拆分麻黄碱类对映体的方法,具有自动化程度高,重现性好;衍生化试剂易得,与麻黄碱对映体的反应快速温和,产物单一,形成的非对映体衍生物稳定,具有很强的紫外吸收和荧光,检出灵敏度高,四对麻黄碱对映体均达基线分离;且本法采用普通的反相色谱系统,试剂、样品用量极微,是麻黄碱类对映体拆分和测定的一个易于推广的方法。

参 考 文 献

- 1 王晓鸣节译. 药物对映体的人体药效学和药动学差异. 国外医学药学分册 1987;14: 280.

- 2 Smissman EE, et al. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 7th ed. Lippincott; Academic Press, 1977 : 441~442.
- 3 Jenner P, et al. Metabolism of carbamate insecticides. *Drug Metab Rev* 1973;2 : 117.
- 4 Beckett AH, et al. Stereochemical separation and configurational assignment by gas-liquid chromatography of *N*-trifluoroacetyl-*l*-propyl amides of asymmetric *l*-phenylisopropylamines. *J Chromatogr* 1972;69 : 285.
- 5 Konig WA, et al. Gas chromatography separation of enantiomers of amines and amino alcohols on chiral stationary phases. *Ibid* 1981;209 : 91.
- 6 Wainer IW, et al. Application of high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases to pharmaceutical analysis-resolution of ephedrine. *Ibid* 1983;261:123.
- 7 Wainer IW, et al. Chiral resolution model for the resolution of ephedrine and related α , β -aminoalcohols as enantiomeric oxazolidine derivatives. *Ibid* 1986;355:149.
- 8 Schill G. Chiral separations of cationic and anionic drugs on an α_1 -acid glycoprotein-bonded stationary phase. *Ibid* 1986;365:73.
- 9 Doyle TD. The application of HPLC chiral stationary phases to stereochemical problems of pharmaceutical interest; a general method for the resolution of enantiomeric amines as β -naphthyl-carbamate derivatives. *J Liq Chromatogr* 1986;9:455.
- 10 Gal J. Resolution of the enantiomers of ephedrine, norephedrine and pseudoephedrine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984;307:220.
- 11 Gal J. *R*- α -Methylbenzyl isothiocyanate, a new and convenient chiral derivatizing agent for the separation of enantiomeric amino compounds by high-performance liquid chromatography. *Ibid* 1984;314:275.
- 12 于如暇主编. 分析化学. 第二版. 下册. 北京:人民卫生出版社, 1986:254.
- 13 杨青,等. 利用 Pirkle 型手性固定相拆分对映药物:用异氨酸- α 萘酯作衍生化试剂拆分胺类、醇类药物. *药学报* 1988;23:921.

RESOLUTION OF THE ENANTIOMERS OF EPHEDRINES USING (+)-FLEC CHIRAL DERIVATIZATION AND REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY

X Jin and KR Cui

*(National Research Institute of Sports Medicine, The State
Commission of Physical Culture and Sports, Beijing 100029)*

ABSTRACT An automatic and rapid reversed phase liquid chromatographic method for the resolution of enantiomers of four ephedrines using (+)-FLEC as on-line pre-column chiral derivatizing reagent has been developed. After *dl*-ephedrine, *dl*-pseudoephedrine, *dl*-norephedrine and *dl*-norpseudoephedrine were derivatized with the chiral reagent (+)-FLEC [1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate], the resulting diastereomers were separated by using an acetonitrile-water gradient elution on an ODS Hypersil column. This method was fully automated from sample derivatization to final report. Four enantiomers of ephedrines were well separated with resolution better than 1.5. The sensitivity was 10 pmol and reproducibility better than 1.0% RSD for retention time and 3.0% for peak area.

Key words Chiral derivatization; (+)-FLEC reagent; Ephedrines; RP-HPLC