技术与方法

用薄层色谱扫描法测定微生物酶反应液中的布洛芬

徐诗伟 徐 清 王维庆*

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘要 用薄层色谱扫描法(TLCS)测定由微生物酶立体选择性水解布洛芬消旋酯生成布洛芬的转化率。酶水解的反应液经酸化处理后用正己烷提取,在硅胶薄层板上用甲苯-乙酸乙酯-乙酸(70:30:1.5)上行展开,然后对布洛芬斑点进行原位吸光度扫描,测定波长212nm,以外标二点法面积校正定量。本法在测定布洛芬量2—6μg范围内,响应呈现良好的线性关系。测定水解反应液转化率的最大相对标准偏差小于4%,加量回收率为97.4—101.0%。

关键词 薄层色谱扫描;布洛芬

布洛芬(Ibuprofen)化学结构为2-(4-异丁基苯基)丙酸,是常用的非甾类抗炎药(NSAID),具有解热镇痛和消炎抗风湿等作用。此酸在α位有一个不对称中心,存在两种光学活性S(+)-和R(—)-对映体。而生理活性主要来自S(+)-布洛芬,R(—)-布洛芬无活性[1]。近年来,用微生物酶法立体选择性水解布洛芬消旋酯制备S(+)-布洛芬已成为重要手段之一[2]。我们筛选微生物或利用脂肪酶水解布洛芬消旋酯得到光学纯度S(+)-布洛芬。为了提高微生物酶的水解性能,优化酶反应条件,需要建立一种灵敏、快速、准确的定量分析水解反应液中的S(+)-布洛芬的方法。现已有报道用色谱(HPLC、GC或TLC)方法对这类2-芳基丙酸药物进行对映体分离和光学纯度测定,但通常均需用手性固定相(CSP)[3-5]或进行手性试剂衍生化[6,7]。本文介绍用薄层色谱扫描法(TLCS)测定微生物酶水解产物中布洛芬的转化率。另文将进一步再报道用CSP-HPLC测定S(+)-布洛芬对映体过量(ee)的方法。

材料和方法*

(一)仪器与材料

瑞士CAMAG薄层扫描仪Ⅰ型,SP4290型积分仪,双底展开槽,微量点样器。硅胶GF254(青岛海洋化工厂),羧甲基纤维素钠(CMC,上海长虹塑料厂),消旋布洛芬及其酯类(山东新华制药厂)。甲苯、乙酸、乙酸乙酯、正己烷、乙醇等有机溶剂均为分析纯。20×20cm玻璃板。

(二)实验步骤

1. 涂铺薄层板:称取0.9g CMC加入蒸馏水300ml煮沸溶解,冷却后在搅拌下加入硅胶GF254 120g,静置24h使其充分溶胀,搅匀后用此匀浆铺板,板厚约0.2—0.3mm,一般可铺15块,室温下晾干,于烘箱中105℃活化30min备用。

2. 标准溶液的配制:以乙醇为溶剂,准确

---

* 山东新华制药厂研究所。

* 本文曾在中国化学会第三届全国平板色谱学术会(1992,大连)上交流。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

配制1.0mg/ml和5.0mg/ml的两种不同浓度的布洛芬标准溶液。

3. 水解反应液预处理及色谱分离：将微生物酶反应液经浓盐酸酸化至pH≤3后用两倍体积正已烷提取，取一定量有机相作为试样和外标用标准溶液分别点于同一块薄板上，每个试样和标样斑点数为2—3个，然后置于双底展开槽中用甲苯-乙酸乙酯-乙酸(70：30：1.5)上行法展开，展开前预平衡15分钟，展距8cm，取出板将溶剂挥尽，在波长254nm紫外灯下可观察到完全被分离的布洛芬及其酯的暗色斑点。

4. 扫描定量方法：对布洛芬斑点进行原位吸光度扫描，固定狭缝式。扫描仪使用氘灯做光源，测定波长为212nm，自动调零，以外标二点法定量[8]。即根据线性范围内两种浓度的标样与试样的峰面积计算出试样中的布洛芬含量(W)，重量转化率(T%)的计算可按下式：

$$T(\%)=\frac{W}{C\cdot\frac{V_1}{V_2}\cdot V_3}\times 100$$

式中：W为试样中布洛芬含量(μg)；V_1为取样体积(ml)；V_2为溶剂体积(ml)；V_3为点样量(μl)；C为布洛芬酯投料浓度(mg/ml)。

结果与讨论

(一) 布洛芬的薄层扫描紫外吸收光谱

图1为实验测得的薄层上布洛芬的紫外吸收光谱图。

(二) 线性范围

取不同量的标准溶液，按上述方法点在同一薄层板上展开扫描，在实验测定的2—6μg范围内，标样量(W)与峰面积(A)具有良好的线性关系，回归方程为：$W=1.81\times10^{-5}A-0.082$ 相关系数 $r=0.999$。

(三) 转化率的测定

取不同条件下微生物酶反应液1ml经酸化后用2ml正已烷提取，以1μl提取液按上述实验部份进行色谱分离和扫描测定。根据峰面积用外标法求得布洛芬含量(W)计算转化率(T)。由测定结果(表1)可以看出，最大相对标准偏差(CV)在4%之内。

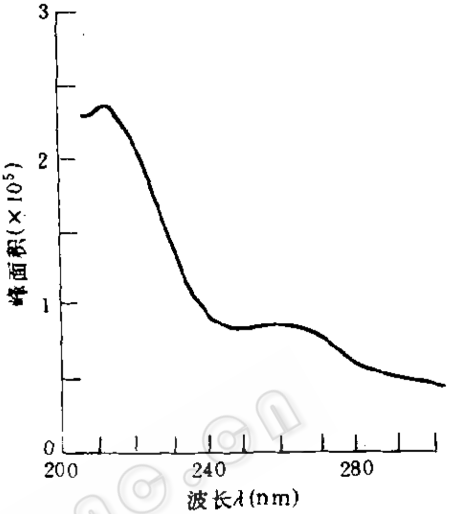

图1　布洛芬薄层扫描紫外吸收光谱图

(四) 精密度考察

取一试样在同一块薄层板上点6个相同量斑点以及取四个不同试样在四块薄层板上点相同量，分别展开扫描，测得板内和板间的相对标准偏差(表2,3)，结果表明前者小于2%，后者在2—4%之间。

表1　转化率的测定

试样	W(μg)	T(%)	T(%)	SD(%)	CV(%)
1	4.47 4.48 4.21	19.1 19.1 18.0	18.7	0.64	3.4
2	3.27 3.34	27.9 28.5	28.2	0.42	1.5
3	4.25 4.15	36.3 35.5	35.9	0.57	1.6
4	4.46 4.67	38.1 39.9	39.0	1.3	3.3

试样1点样量为2μl

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表2　薄层板内相对标准偏差的测定

W(μg)	4.58	4.65	4.72	4.71	4.71	4.59
T(%)	39.1	39.7	40.3	40.3	40.3	39.2
T̄(%)	39.8					
SD(%)	0.57					
CV(%)	1.4					

表3　薄层板间相对标准偏差的测定

薄层板 \ T(%) 试样	1	2	3	4
1	38.5	39.6	34.0	32.8
2	36.8	37.9	33.1	33.2
3	36.3	39.6	32.2	32.0
4	37.6	39.8	32.2	35.0
T̄(%)	37.3	39.2	32.9	33.2
SD(%)	0.96	0.89	0.86	1.3
CV(%)	2.6	2.3	2.6	3.8

（五）回收率的测定

回收率测定采用标准品加入法，将一定量布洛芬加入到试样中，然后与原试样分别点在同一薄层板上，展开后扫描，由峰面积测定布洛芬含量，计算回收率（表4）。四次测定结果的回收率在97.4－101.0%之间，相对标准偏差为1.7%。

表4　回收率的测定

测定次数	W(μg)			回收率(%)
	原试样	添加量	检出总量	
1	3.73	1.20	4.80	97.4
2	3.11	2.00	5.11	100.0
3	2.91	2.25	5.20	100.8
4	2.59	2.67	5.31	101.0

用上述薄层色谱扫描法测定微生物酶水解反应液中布洛芬的转化率具有操作简便，检测灵敏的特点，具有较好的重复性和较高的准确性。此外，本法可为进一步采用手性薄层色谱法测定布洛芬对映体的含量作一准备。

参 考 文 献

1. Adams S S et al.: *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**: 256－257, 1976.
2. 徐诗伟，徐清：微生物学通报，**20**(4)：47－52，1993。
3. Wainer I W et al.: *J. Chromatogr.*, **284**: 117－124, 1984.
4. Geisslinger G et al.: *J. Chromatogr.*, **491**: 139－149, 1989.
5. Menzel-Soglowek S et al.: *J. Chromatogr.*, **532**: 295－303, 1990.
6. Blessingtou B et al.: *J. Chromatogr.*, **469**: 183－190, 1989.
7. Brunner C A et al.: *J. Chromatogr.*, **472**: 277－283, 1989.
8. 孙毓庆主编：薄层扫描法及其在药物分析中的应用，p83－84，人民卫生出版社，北京，1990。

（1992-11-30收稿）

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn