

手性高效液相色谱法

测定 S(+)-布洛芬对映体过量

徐诗伟 徐清 曹桂芳 王维庆*

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘要 用手性固定相高效液相色谱法(CSP-HPLC)测定了样品或微生物酶不对称水解反应液中 S(+)-布洛芬对映体过量(ee)。该法首先将布洛芬转化为二苯酰胺衍生物,然后在 N-3,5-二硝基苯甲酰-(R)-苯甘氨酸[(R)-DNB-PG]的共价型 CSP 柱上进行对映体 HPLC 分离。流动相选择正己烷-异丙醇(98:2),流速 1ml/min,对映体分离度 1.47。按相同方法同时进行消旋布洛芬的二苯酰胺衍生物的分离,由其对应映体峰高比可测定 S(+)-布洛芬 ee(%),测定加量回收率相对标准偏差为 3.3%。

关键词 手性 HPLC, S(+)-布洛芬, 对映体过量(ee)

S(+)-布洛芬是消旋布洛芬中两种光学异构体的组成之一。它是生理活性的来源, R(-)-对映体则无活性^[1]。近年来,用微生物酶法不对称水解布洛芬消旋酯制备 S(+)-布洛芬已成为重要手段之一。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 S(+)-布洛芬。为了提高微生物酶的水解拆分能力、优化反应条件,需要建立一种灵敏、快速、准确的定量分析水解反应液中布洛芬的转化率及其 S(+)-布洛芬的光学纯度。现常用对映体过量(Enantiomeric Excess 简称 ee)表示光学活性物质的纯度。前文^[2]已介绍了用薄层扫描法(TLCS)测定微生物酶不对称水解反应液中布洛芬转化率的方法。而对 S(+)-布洛芬 ee(%)的测定则需要对映体分离。分离对映体的方法很多,其中色谱法具有灵敏、快速、准确等特点,已成为进行对映体纯度监控的重要手段^[3-6]。色谱法拆分 2-芳基丙酸类化合物通常是先将其衍生成适宜的酰胺后,用手性固定相(CSP)分离^[7,8];或是以手性试剂衍生成非对称异构体,再以常规方法分离^[4,9,10]。本文用 N-3,5-二硝基苯甲酰-(R)-苯甘氨酸的共价型 CSP 柱,对样品及微生物酶水解反应液中 S(+)-布洛芬 ee(%)的 HPLC 法测定进行了研究。

材料和方法

(一) HPLC 系统

仪器:法国 GILSON HPLC 仪。色谱柱:共价型(R)-DNB-PG(5 μ , 25.0cm \times 4.6mm)(Supelco)。流动相:正己烷-异丙醇 98:2(V/V),流速:1ml/min。柱压 23-25Bar。检测 UV254nm, 0.2AUFS。

(二) 试剂与溶剂

氯化亚砷、二苯胺、正己烷、异丙醇和氯仿等有机溶剂均为分析纯。消旋布洛芬及酯类由山东新华制药厂提供。

(三) 微生物和酶

酵母菌由本研究组收集。脂肪酶(I)由无锡酶制剂厂赠送,脂肪酶(I)为美国 SIGMA 化学公司商品 L1754。

(四) 制备布洛芬二苯酰胺^[11]

首先用氯化亚砷将布洛芬转化为酰基氯,然后加入二苯胺,反应生成二苯酰胺衍生物。反应步骤按下列程序进行。

(1)布洛芬样品的酰胺衍生化:称取 2mg 布洛芬样品置于 100 \times 10mm 试管,加一滴(约

* 山东新华制药厂研究所
本研究属国家重点科技攻关项目的一部分

50μl)氯化亚砷,在85℃水浴中加热10min,蒸发除去过量氯化亚砷至干;加入0.5ml4mg/ml二苯胺氯仿溶液,振荡10min,蒸去氯仿。以正己烷-异丙醇(98:2)定容至一定体积。同时衍生消旋布洛芬标准样品备用。

(2)微生物或酶水解反应液中布洛芬的酰胺衍生物:取一定量水解反应液,用浓盐酸调至pH≤3,以2倍反应液体积的正己烷提取。取0.5ml提取液置于100×10mm试管,蒸发溶剂至干。然后加一滴氯化亚砷,其余步骤同(1)所述。

(五) S(+)-布洛芬 ee(%)的测定

将上述以正己烷-异丙醇(98:2)平衡的布洛芬二苯胺溶液进样HPLC系统。其对映体在(R)-DNB-PG柱上得到完全分离,测定对映体的峰高值(H)。可按式(3)计算S(+)-布洛芬 ee(%)。

$$ee(\%) = \frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100 \quad (1)$$

S, R 为一对对映体的含量。以酰胺衍生物

峰高值表示对映体含量。则

$$S = \frac{a}{b} R \quad (2)$$

a, b 分别为待测样品和消旋体中-对酰胺衍生物对映体的峰高比($\frac{H_S}{H_R}$)。将(2)代入(1)

得:

$$ee(\%) = \frac{(a-b)}{(a+b)} \times 100 \quad (3)$$

结果与讨论

(一) 消旋布洛芬二苯胺的分离

选择不同比例97:3、98:2和99:1的正己烷-异丙醇为流动相,进行消旋布洛芬二苯胺的HPLC分离(表1)。结果表明,选择上述不同比例正己烷-异丙醇均能达到足够的分离。我们采用98:2为流动相,不仅分离度高,且分析时间短(图1)。由布洛芬酰胺衍生物与(R)-DNB-PG的CSP之间相互作用模式可知,S-构型比R-构型先流出^[7]。这一流出次序从我们的结果(图1B)中也得到了辅证。

表1 消旋布洛芬二苯胺的分离

正己烷-异丙醇	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	R _s *
97:3	7.8	8.7	1.38
98:2	8.2	9.3	1.47
99:1	12.7	14.4	1.74

$$*R_s = (tr_2 - tr_1) [2 / (w_1 + w_2)]$$

此式中 tr 为保留时间, w 为色谱峰底宽。

表2 消旋布洛芬二苯胺的 S 和 R-对映体的峰高比测定

(土)布洛芬二苯胺	1	2	3	4	5
b	1.16	1.18	1.18	1.23	1.18
B			1.18		
CV(%)			2.3		

(二) 消旋布洛芬二苯酰胺的S-和R-对映体峰高比的测定

五次测量消旋布洛芬二苯酰胺S-和R-对映体的峰高比(b)(表2)。结果表明,其平均值为1.18,相对标准偏差(CV)为2.3%。

(三) 样品中S(+)-布洛芬ee(%)的测定

我们由酵母T₁₅₈水解布洛芬消旋乙酯得到样品1[MP48—49℃; $[\alpha]_D^{20} = +57.0$ (C=1, EtOH)],由脂肪酶(1)分别水解消旋乙酯,氯乙酯得到样品2[MP48—49℃; $[\alpha]_D^{20} = +47.7$ (C=1, EtOH)]和样品3[MP65—69℃; $[\alpha]_D^{20} = +26.2$ (C=1, EtOH)].将上述三种样品分别按前述步骤衍生为二苯酰胺进行HPLC测定(表3),五次测量结果平均.S(+)-布洛芬ee值分别为92.9%、77.6%和43.5%,相对标准偏差(%)分别为0.2、1.4和3.1。

由于同一种光学活性物质样品的比旋值与其所测ee(%)之比应近似于恒定值,该值可视为100%光学纯异构体的比旋值。上述测定结果与Kaisei^[9]和Blessington^[4]报道的样品比旋值与分别由GC和HPLC所测得的ee(%)的关系基本吻合。

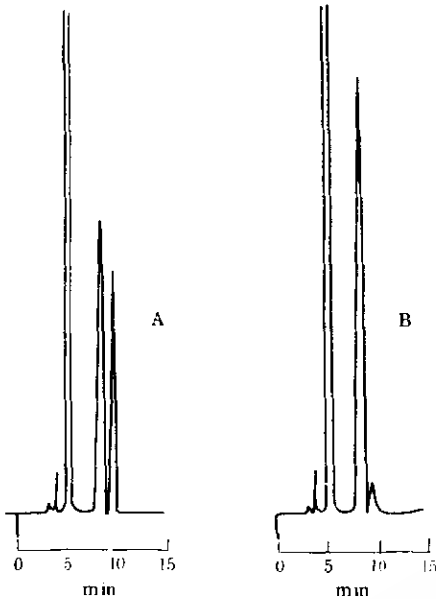


图1 分离布洛芬二苯酰胺对映体混合物

A. 消旋体 B. S(+)-和R(-)-对映体 92:8

表3 样品中S(+)-布洛芬ee(%)的测定(b=1.18)

二苯酰胺 衍生物	样品1					样品2					样品3				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
a	32.63	31.22	31.73	33.63	31.25	9.65	9.25	8.60	9.50	9.89	3.06	3.02	2.98	2.85	3.10
ee(%)	93.0	92.7	92.8	93.2	92.7	78.2	77.4	75.9	77.9	78.7	44.3	43.8	43.3	41.4	44.9
\bar{ee} (%)	92.9					77.6					43.5				
CV(%)	0.2					1.4					3.1				

(四) 微生物或酶水解反应液中S(+)-布洛芬ee(%)的测定

测定了几株酵母菌及两种脂肪酶的水解布洛芬消旋乙酯的反应液中S(+)-布洛芬ee(%)。每种反应液重复2—3次。表4结果表明,该法测定的最大相对标准误差不超过1%。

(五) 回收率的测定

在已知样品(1)中以不同比例加入消旋布洛芬(1),由相应的峰高比(H_s/H_r)计算混合样品中S(+)-布洛芬ee值,测定其回收率。表5结果表明,按上述方法测定加样回收率相对标准偏差为3.3%。

综上所述,我们采用布洛芬的二苯酰胺衍生物、以消旋布洛芬为外标,在(R)-DNB-PG柱上进行对映体的HPLC分离技术,不仅能简便、准确地测定样品中S(+)-布洛芬对映体过量,而且同样也适用于测定微生物酶拆分的水解反应液。从实验结果还发现:(1)酰胺衍生物

的对映体峰高比与其衍生物产率无关;(2)布洛芬酯(如乙酯、氯乙酯)在上述条件下不形成酰胺衍生物,因而在测定微生物酶水解反应液时,可省去分离未反应酯的步骤;(3)消旋布洛芬及其酯在(R)-DNB-PG手性柱上均不能直接获得对映体的分离。

表4 水解反应液中S(+)-布洛芬ee(%)的测定(b=1.17)

酵母菌或酶	样品号	a	ee(%)	\bar{ee} (%)	CV(%)
C ₉	1	5.79	66.4	66.7	0.5
	2	5.90	66.9		
C ₉₂	1	11.70	81.8	81.6	0.4
	2	11.27	81.3		
	3	11.66	81.8		
C ₈₀	1	14.31	84.9	84.5	0.6
	2	14.05	84.6		
	3	13.35	83.9		
T ₁₅₈	1	27.50	91.8	91.9	0.3
	2	28.67	92.2		
	3	26.54	91.6		
脂肪酶 I	1	9.56	78.2	77.9	0.5
	2	9.27	77.6		
脂肪酶 II	1	21.57	89.7	90.1	0.6
	2	23.46	90.5		

表5 回收率的测定*

I / II		样品 I	样品 II	20 : 80	40 : 60	50 : 50	60 : 40	80 : 20	90 : 10
测定值	a	8.71	1.19	1.65	2.24	2.61	3.08	4.96	5.91
	ee(%)	76.0	0	16.1	30.6	37.4	44.3	61.3	66.5
计算值 ee(%)				15.2	30.4	38.0	45.6	60.8	68.4
回收率(%)				105.9	100.7	98.4	97.1	100.8	97.2
平均回收率(%)				100.0					
CV(%)				3.3					

*混合样品中ee(%)计算值为已知样品(I)ee%乘以其在混合样中的百分含量

参 考 文 献

1. Evans A M; *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **42**(3):237-256,1992.
2. 徐诗伟等; *微生物学通报*, **20**(5):311-313,1993.
3. 林炳承; *色谱*, **8**(6):363-367,1990.
4. Blessington B et al.; *J. Chromatogr.*, **469**:183-190,1989.
5. Rustum A M et al.; *J. Chromatogr.*, **503**:115-125,1990.

6. Heldim E; *J. Chromatogr.*, **592**:339-343,1992.
7. Wainer I W et al.; *J. Chromatogr.*, **284**:117-124,1984.
8. Bertola M A et al.; *Eur. Patent office*, 0299588,1988.
9. Kaiser D G et al.; *J. Pharm. Sic.*, **65**(2):269-273,1976.
10. Chen C S; *Biochim. Biophys. Acta*, **1033**(1):1-6,1990.
11. Blessington B et al.; *J. Chromatogr.*, **454**:450-454,1988.

(1992-12-24 收稿)