

卵类粘蛋白柱手性拆分酮基布洛芬

王解静, 曹桂芳, 徐诗伟

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要: 在卵类粘蛋白柱上, 考察了酮洛芬对映体在 3 种流动相体系下的保留行为, 建立了同时分离酮洛芬及其甲酯两对对映体的较佳色谱条件。方法可用于酶法立体选择性水解或酯化过程中生成的 4 种化合物的同时测定。

关键词: 高效液相色谱法; 卵类粘蛋白; 酮洛芬及其甲酯; 手性拆分

中图分类号: O658. R9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2000)06-0536-03

1 前言

酮基布洛芬[简称酮洛芬, 化学名(±)-2-(3-苯甲酰苯基)丙酸]是一种优良的非甾体抗炎镇痛药。其 S(+)构型具有较高生理或药理活性, 而 R(-)酮洛芬对牙周病有极好的防治作用。对手性药物酮洛芬的拆分研究, 不仅可提高其外消旋体的疗效, 降低药物毒性, 还可以将两种对映体分别开发为不同适应症的治疗药物^[1]。为此, 我们开展酶法立体选择性水解或酯化拆分酮洛芬的研究, 首先要建立一种简便快速分离对映体和测定对映体过量(e. e.)的方法^[2]。天然蛋白质通常有较高的手性识别能力, 对手性药物对映体选择性高。现有多种蛋白质, 如牛血清白蛋白(BSA)、 α -酸性糖蛋白(α -AGP)、人血清白蛋白(HSA)、胃蛋白酶(pepsin)和卵类粘蛋白(OVM)等^[3-7]键合微粒硅胶的手性固定相被商品化。卵类粘蛋白是一类新型的蛋白质色谱填料, 具有众多手性识别位点和宽的对映选择范围, 已被应用于一些药物的手性拆分^[8-10]。本文建立了用卵类粘蛋白柱同时分离酮洛芬及其甲酯两对对映体的高效液相色谱(HPLC)分析方法, 考察了一些热力学因素对酮洛芬对映体分离的影响, 并比较了 3 种流动相体系下的手性拆分效果。

2 材料和方法

2.1 仪器和试剂

法国 Gilson HPLC 仪; SP4290 积分仪; DiGi-Sense pH 计(Cole-Parmer); 乙腈(Fluka)为色谱纯; 甲醇、乙醇(北京化工厂)和 KH_2PO_4 (北京红星化工厂)等试剂均为分析纯, 酮洛芬(KE)样品由西南合成制药厂赠送, 酮洛芬甲酯(MKE)样品由本实验室化学合成。

2.2 色谱条件

色谱柱 Ultron ES-OVM($5\ \mu\text{m}$, $150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ i. d.) 购自惠普公司; 流动相以磷酸盐(KH_2PO_4)溶液为主体, 选择乙腈、甲醇和乙醇作为改良添加剂, 流速(F) $0.8\ \text{mL}/\text{min} \sim 1.2\ \text{mL}/\text{min}$, 检测波长 $255\ \text{nm}$, 检测灵敏度 $0.1\ \text{AUFS}$; 纸速 $0.25\ \text{cm}/\text{min}$, 柱温为室温, 进样量 $4\ \mu\text{L}$ 。

2.3 样品制备

分别在电子天平(Sartorius)上准确称取 $20\ \text{mg}$ 样品(KE 和 MKE), 用甲醇- $20\ \text{mmol}/\text{L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 3.0)(体积比为 3:5)溶液各自配制成质量浓度为 $0.25\ \text{g}/\text{L}$ 的溶液。同时分离 KE 和 MKE 时, 上述溶液以 1:1 的体积比混合进样。

3 结果与讨论

3.1 流动相组成对分离的影响

试验了流动相中添加不同体积分数的有机溶剂(甲醇、乙醇和乙腈)对手性分离的影响。为了保护蛋白柱免受破坏, 流动相中有机溶剂的体积分数不宜超过 50%。

3.1.1 甲醇体积分数的影响 表 1 为不同体积比的甲醇和 $30\ \text{mmol}/\text{L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 3.0)组成的流动相对酮洛芬对映体分离的容量因子(k')和分离度(R_s)的影响。在该流动相体系中, 甲醇比例增加, k' 值减小, 而 R_s 值明显降低。选择甲醇- $30\ \text{mmol}/\text{L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ 的体积比为 34:100 时对映体既得到较好分离, 且保留时间也短。但甲醇的体积分数较大时, 柱压也随之升高, 而该蛋白柱允许最大操作压力为 $20\ \text{MPa}$, 因此甲醇的体积分数应视系统压力的情况而定。

3.1.2 乙醇体积分数的影响 试验了不同体积比的乙醇和 $20\ \text{mmol}/\text{L}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 2.5)组成的流动

相对分离的影响(见表 2)。增加乙醇比例, k' 和 R_s 值均相应降低, 其中对 R_s 影响尤为明显。选择乙醇-20 mmol/L KH_2PO_4 体积比为 14:100 作为流动相时, 既可达到完全分离, 分离时间也较短, 但由于流动相 pH 值偏低, 易使蛋白柱造成不可逆的损坏(通常 pH 值应不低于 3.0)。将磷酸盐的 pH 值升至 3.0 时, 虽 R_s 值可从 1.48 提高至 1.60, 但保留时间显著增加, k' 值几乎相应增大 1 倍。考虑到大量微生物筛选的需要, 还应进一步设法缩短分析时间。

表 1 流动相中甲醇体积分数对酮洛芬对映体分离的影响*

Table 1 Effect of methanol volume fraction on the separation of ketoprofen enantiomers*

V(MeOH): V(30 mmol/L KH_2PO_4)	k_1'	k_2'	R_s
10:100	-	-	-
16:100	19.24	32.40	2.47
26:100	9.10	13.23	2.60
30:100	5.91	7.67	1.67
34:100	4.78	5.89	1.28

* $F = 0.8 \text{ mL/min}$; - 在 1 h 内未出峰(no peaks observed in one hour)

表 2 流动相中乙醇体积分数对酮洛芬对映体分离的影响*

Table 2 Effect of ethanol volume fraction on the separation of ketoprofen enantiomers*

V(EtOH): V(20 mmol/L KH_2PO_4)	pH	k_1'	k_2'	R_s
14:100	2.5	4.33	5.34	1.48
16:100	2.5	3.64	4.38	1.05
18:100	2.5	3.10	3.65	0.80
14:100	3.0	8.43	10.80	1.60

* $F = 0.8 \text{ mL/min}$.

3.1.3 乙腈体积分数的影响 表 3 为不同体积比的乙腈与 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH 3.0) 组成的流动相对分离的影响。由表 3 可知, 该体系下选择乙腈-20 mmol/L KH_2PO_4 的体积比为 10:100 时较适宜, 既可使对映体得到很好分离, 而且分离时间也较短。

表 3 流动相中乙腈体积分数对酮洛芬对映体分离的影响*

Table 3 Effect of acetonitrile volume fraction on the separation of ketoprofen enantiomers*

V(MeCN): V(20 mmol/L KH_2PO_4)	k_1'	k_2'	R_s
5:100	24.70	34.00	1.94
10:100	4.54	5.53	1.36
11:100	4.40	4.76	1.25
12:100	3.51	4.09	1.03

* $F = 1.0 \text{ mL/min}$.

3.2 流动相中磷酸盐浓度对分离的影响

流动相的离子强度对卵类粘蛋白柱上每种对映体的 k' 值影响较大。我们试验了在 10 mmol/L~30 mmol/L 范围内 KH_2PO_4 浓度对上述 3 种流动相体系下酮洛芬对映体分离的影响。结果表明, k' 均随盐浓度增高而减小, 而对 R_s 而言, 乙醇和乙腈体系中以 20 mmol/L 时为最高; 而甲醇体系中以 30 mmol/L 时对映体分离最佳。图 1 表示乙醇体系中, 盐浓度对 k' 和 R_s 的影响。

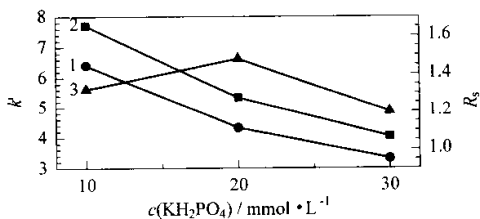


图 1 流动相中盐浓度对 k' (1, 2) 和 R_s (3) 的影响

Fig. 1 Effect of salt concentration on k' (1, 2) and R_s (3)

V(EtOH): V(KH_2PO_4 (pH 2.5)) = 14:100, $F = 0.8 \text{ mL/min}$.

3.3 pH 值对酮洛芬对映体分离的影响

酮洛芬对映体在卵类粘蛋白柱上的分离对 pH 值变化颇为敏感。为了保护蛋白柱不受损坏, 在允许的 pH 范围内, 上述 3 种溶剂体系最适宜的 pH 皆为 3.0。随 pH 升高, 容量因子激增, 分离度明显降低。图 2 表示乙腈体系中, pH 从 3.0 增至 4.0 时对酮洛芬对映体分离的显著影响。

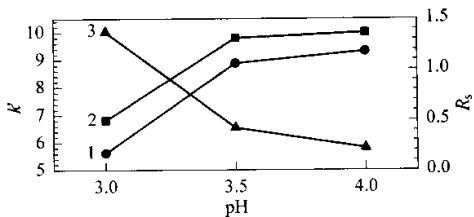


图 2 流动相的 pH 对 k' (1, 2) 和 R_s (3) 的影响

Fig. 2 Effect of pH on k' (1, 2) and R_s (3)

V(MeCN): V(20 mmol/L KH_2PO_4) = 10:100, $F = 1.0 \text{ mL/min}$.

3.4 流速对分离的影响

试验了两种体积比(10:100 和 12:100)的乙腈-20 mmol/L KH_2PO_4 (pH 3.0) 作流动相的条件下, 不同流速(0.8 mL/min, 1.0 mL/min 和 1.2 mL/min) 对 k' 和 R_s 的影响(见表 4)。结果表明, 随着流速的

降低 k' 虽然有所增长,但 R_s 有明显提高,表明该蛋白质手性柱对手性化合物的识别是一个相对较慢的动力学过程,是造成峰展宽的主要因素^[11]。因此在符合分离要求的前提下,若流动相中有机溶剂比例较高,流速应低些;反之流速可以高些,以尽量缩短分离时间。

3.5 同时分离酮洛芬及其甲酯两对对映体

在适宜色谱条件下,卵类粘蛋白柱上不仅能分离酮洛芬对映体,还能将酮洛芬甲酯对映体与一对酮洛芬对映体同时分离。图 3 给出乙腈体系中分离上述两对对映体的色谱图。由图 3 可见,甲酯洗脱时间先于酮洛芬,两对对映体不仅达到完全分离,而且整个分析可在 15 min 之内完成。

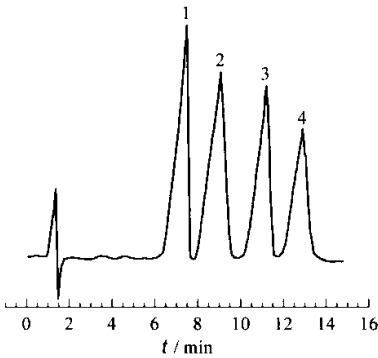


图 3 同时分离酮洛芬及其甲酯两对对映体的色谱图

Fig. 3 A chromatogram of simultaneous separation of the two pairs of enantiomers of ketoprofen and its methyl ester

V(MeCN): V(20 mmol/L KH₂PO₄(pH 3.0))=10 : 100, F=1.2 mL/min, UV-255 nm.

1 2 酮洛芬甲酯; 3 4 酮洛芬。

1 2 methyl ester of ketoprofen; 3 4 ketoprofen.

表 4 流速对酮洛芬对映体分离的影响

Table 4 Effect of flow rates on the separation of ketoprofen enantiomers

V(MeCN): V(20 mmol/L KH ₂ PO ₄)	F/mL·min ⁻¹	k ₁ '	k ₂ '	R _s
10:100	0.8	5.78	7.01	1.44
	1.0	5.62	6.81	1.37
	1.2	5.46	6.58	1.32
12:100	0.8	4.40	5.10	1.21
	1.0	4.35	5.03	1.03
	1.2	3.97	4.46	0.65

参考文献:

[1] Stinson S C. Chem Eng News, 1995, 73(41): 44-74
 [2] XU Shi-wei, XU Qing, CAO Gui-fang, et al (徐诗伟, 徐清, 曹桂芳等). Microbiology (微生物学通报), 1993, 20: 371-374
 [3] Allenmark S, Andersson S. Chirality, 1989, 1: 154
 [4] Hermansson J, Eriksson M. J Liq Chromatogr, 1986, 9: 621-639
 [5] Noctor T A G, Felix G, Wainer I W. Chromatographia, 1991, 31: 55-59
 [6] Risley D S, Sharp V S, Palmer J R. J Liq Chromatogr, 1996, 19: 449-465
 [7] Miwa T, Miyakawa T, Kayano M, et al. J Chromatogr, 1987, 408: 316-322
 [8] Kirkland K M, Neilson K L, McCombs D A. J Chromatogr, 1991, 545: 43-58
 [9] Miwa T, Kuroda H, Sakashita S, et al. J Chromatogr, 1990, 511: 89-95
 [10] Iredale J, Aubry A F, Wainer I. Chromatographia, 1991, 31: 329-334
 [11] WANG Hai-lin, ZOU Han-fa, LÜ Mei-ling, et al (汪海林, 邹汉法, 吕美玲等). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 1998, 26(1): 68-72

Enantiomeric Separation of Ketoprofen on an Ovomuroid Column

WANG Xie-jing, CAO Gui-fang, XU Shi-wei

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The enantiomeric separation of ketoprofen in three mobile phase systems on an ovomucoid (OVM) chiral stationary phase (CSP) column was investigated. Suitable chromatographic conditions for simultaneous separation of the two pairs of enantiomers of ketoprofen and its methyl ester were adopted. All of the four compounds occurring in the process of enzymatic stereoselective hydrolysis or esterification can be simultaneously separated.

Key words: high performance liquid chromatography; ovomucoid; ketoprofen and its methyl ester; chiral separation