

HPLC 万古霉素手性柱和手性流动相添加剂法分离酮洛芬对映体

叶晓霞, 俞 雄*

(上海医药工业研究院, 上海 200040)

摘要: 目的 以万古霉素为手性选择子, 建立酮洛芬对映体以手性柱法和流动相添加剂法进行手性分析的方法。方法 考察万古霉素用量、有机改性剂用量及缓冲液 pH 值对酮洛芬对映体手性拆分的影响, 并进行了定量分析的方法验证。结果 两种拆分方法都使酮洛芬对映体达到了基线分离, 都适合于酮洛芬对映体的定性和定量分析。结论 所建立的两种方法均可用于 *S*(+)-酮洛芬的光学纯度检测。

关键词: 高效液相色谱; 手性柱; 手性流动相添加剂; 酮洛芬; 对映体; 万古霉素

中图分类号: R917; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)03-0211-04

Enantiomeric separation of ketoprofen by HPLC using Chirobiotic V CSP and vancomycin as chiral mobile phase additives

YE Xia-xia, YU Xiong

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China)

Abstract: **Aim** To establish HPLC chiral separation method for ketoprofen enantiomers by using Chirobiotic V chiral separation phase (CSP) (A) and vancomycin as chiral mobile phase additives (B).

Methods The separation was first performed on Chirobiotic V CSP with the mobile phase of tetrahydrofuran (THF)-0.5% triethylamine acetate (TEAA) buffer (15:85) at the flow rate of 0.7 mL·min⁻¹. When using vancomycin as chiral mobile phase additive, the separation was carried out on C₈ column (150 mm × 4.6 mm), the mobile phase was methanol-0.25% TEAA buffer (50:50), the flow rate was 0.7 mL·min⁻¹. The effects of the concentration of vancomycin, organic modifier and the pH of the buffer on the resolution of ketoprofen enantiomers were investigated. Also, the feasibility of these two methods to be used as quantitative method was studied. **Results** Ketoprofen enantiomers were separated at a baseline level under the chromatographic condition of both methods A and B, the resolution was 2.28 and 2.22, respectively. In method A the linearity of enantiomer was obtained from 0.5 mg·L⁻¹ to 100 mg·L⁻¹, the detection limit was 1 μg·L⁻¹. When using vancomycin as mobile phase additive the system was shown to have a high efficiency. In this system, the assay of enantiomer is linear from 2.5 mg·L⁻¹ to 250 mg·L⁻¹. The detection limit was 14.5 μg·L⁻¹. **Conclusion** Both methods can be used to detect optical purity of *S*(+)-ketoprofen.

Key words: high performance liquid chromatography; chiral stationary phase; chiral mobile phase additive; ketoprofen; enantiomer; vancomycin

酮洛芬(ketoprofen, KT)是2-芳基丙酸类非甾体抗炎药(NSAIDs),该药物具有一个手性中心,一般以外消旋体的形式供临床使用。药理学研究发现,只有*S*(+)-KT才具有抗炎抗风湿和镇痛作用。若以单一对映体*S*(+)-KT给药可减少给药剂量,降低

毒副作用^[1],现已有*S*(+)-KT的产品上市,因此有必要建立快速、简便、灵敏度高的KT对映体分析方法。目前KT对映体的HPLC分析方法大致有两类:柱前衍生化法^[2,3]和手性柱法^[4,5]。1994年,Armstrong等^[6]首次将万古霉素(图1)应用于手性分析,万古霉素目前已成功地应用于HPLC, TLC, CE和SFC等的手性分析,并显示出独特的优势。万古霉素是多手性中心,多官能团的糖肽抗生素,可通过多

收稿日期: 2002-04-16.

* 通讯作者 Tel: 86-21-62792871, Fax: 86-21-62791715,

E-mail: Xiong-Yu@guomai.sh.cn

种手性识别机制,如:静电作用、氢键作用、立体识别作用、 $\pi-\pi$ 作用等,进行手性识别,是一种高效的手性选择子。将万古霉素作为手性流动相添加剂成功地在普通的 HPLC 色谱柱上进行手性分析,未见文献报道。

本文以万古霉素为手性选择子,采用手性柱法

和流动相添加剂法对 KT 进行对映体分析,两种方法均获得了良好的手性分离。其中流动相添加剂法以普通的 C_8 柱为色谱柱,不需衍生即可获得良好的手性分离,建立了简便快捷的 $S-(+)$ -KT 对映体纯度检测方法。

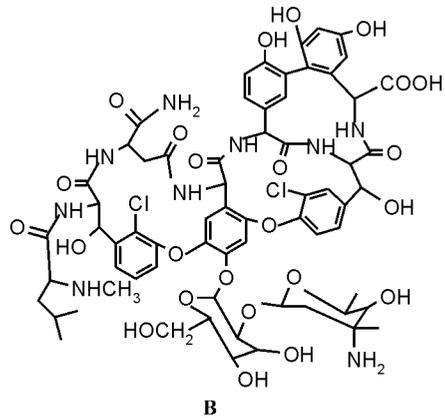
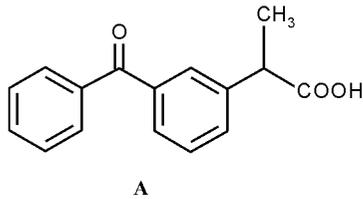


Figure 1 Structures of ketoprofen (A) and vancomycin(B)

材料与amp;方法

仪器 HP-1100 型高效液相色谱仪(美国),精密数显酸度计 pHs-2TC(浙江海天电子仪器厂)。

试剂和试样 万古霉素(上海医药工业研究院,纯度为 93%),酮洛芬、 $S-(+)$ -酮洛芬(上海医药工业研究院,纯度分别为 99.7%和 99.5%)。

色谱条件 (1)手性柱法 色谱柱:Chirobiotic V, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m(Astec, 美国);流动相:四氢呋喃-0.5%三乙胺醋酸(TEAA)缓冲液, pH 7.0(15:85);柱温:15 $^{\circ}$ C;流速:0.7 mL \cdot min $^{-1}$;检测波长:254 nm。(2)流动相添加剂法 色谱柱:Symmetry C_8 , 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m(Waters, 美国);流动相:甲醇-0.25%TEAA 缓冲液, pH 5.5(50:50);万古霉素:3.5 mmol \cdot L $^{-1}$;柱温:20 $^{\circ}$ C;流速:0.7 mL \cdot min $^{-1}$;检测波

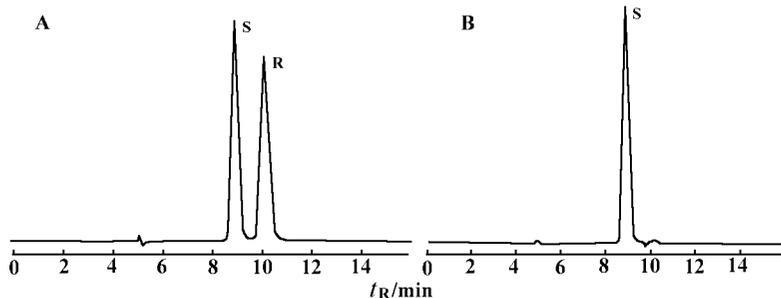
长:300 nm。

结果与amp;讨论

1 手性柱法

1.1 四氢呋喃用量 试验了甲醇、乙腈、四氢呋喃 3 种有机改性剂,结果显示四氢呋喃的分离效果最好,且手性选择性系数随着四氢呋喃用量的增加而降低。四氢呋喃用量为 10%~15%时,分离效果较好。

1.2 缓冲液 pH 值 缓冲液 pH 值为 6~7 时具有较好的分离度,但是随着缓冲液 pH 值的降低保留时间明显延长。故实验中选择缓冲液 pH 值为 7.0。在所选择的色谱条件下,KT 对映体的手性选择性系数为 1.13,分离度可达 2.28, $S-(+)$ -KT 和 $R(-)$ -KT 的理论塔板数分别为 5 542 和 4 962。色谱图见图 2。



S: $S-(+)$ -Ketoprofen; R: $R(-)$ -Ketoprofen

Figure 2 Chromatograms of ketoprofen (KT) race mate (A) and $S-(+)$ -KT enantiomer (B) by HPLC using Chirobiotic V chiral separation phase (CSP)

1.3 定量分析 配制一定浓度的 KT 溶液,进行有关含量分析。 $S(+)$ -KT 和 $R(-)$ -KT 的质量浓度在 $0.5 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 与其响应面积呈线性关系。回归方程: $S(+)$ -KT 为 $Y = 88.175 X + 43.382$, $r = 0.9999$; $R(-)$ -KT 为 $Y = 89.260 X + 35.317$, $r = 0.9999$ 。当 $S/N = 2$ 时, 计算二者检出限均为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。RSD 为 0.6% ($n = 5$)。由此可见, 检出限和精密度均符合定量分析要求。

2 手性流动相添加剂法

2.1 万古霉素用量

用含不同浓度万古霉素的流动相拆分 KT 对映体, 结果见表 1。

Table 1 Effect of the concentration of vancomycin in the mobile phase on the separation

Concentration/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Resolution (R_s)	Selectivity (α)	Capacity factor		Efficiency	
			k'_R	k'_S	N_R	N_S
0	0	1.00	6.85	6.85	5 987	5 987
1.0	0.62	1.03	6.92	7.16	6 814	6 053
2.0	1.35	1.06	6.80	7.29	8 460	7 924
3.0	1.90	1.09	6.67	7.34	8 300	8 257
3.5	2.22	1.10	6.42	7.16	9 092	9 171
4.0	2.42	1.11	6.30	7.12	8 061	8 334
5.0	2.81	1.13	6.17	7.12	8 301	8 278

由表 1 可见随着万古霉素用量的加大, 分离度 R_s 和选择性系数 α 均逐步增大。流动相中加入万古霉素后, $R(-)$ -KT 和 $S(+)$ -KT 的容量因子出现了不同的变化趋势。随着万古霉素用量的增大, k'_S 逐步增大到 7.34 ($3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 用量) 后又有所减少, $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 用量时 k'_S 仍达 7.12, 而 k'_R 只有 6.17。流动相中引入万古霉素后, 一方面流动相中的万古霉素有一小部分占据色谱柱上的结合位

点, 同时又引入新的结合位点, 改变了色谱柱的性质, 使 KT 在色谱柱上的保留时间延长。另一方面, KT 能与游离的万古霉素形成暂时复合物, 在色谱柱上的保留行为类似万古霉素在色谱柱上的保留行为, 而万古霉素在色谱柱上几乎无保留 ($k' = 0.19$), 所以暂时复合物的形成使 KT 在色谱柱上的保留时间缩短。由于 $R(-)$ -KT 和 $S(+)$ -KT 与万古霉素形成暂时复合物的能力不同, 在不同浓度下, 万古霉素对 $R(-)$ -KT 和 $S(+)$ -KT 的保留时间影响程度不同。万古霉素与 $R(-)$ -KT 的结合力较强, 形成的暂时复合物较稳定。万古霉素的浓度越大, $R(-)$ -KT 万古霉素暂时复合物越多, 保留时间就越短。所以随着万古霉素用量的增大, k'_R 稍有增大后逐渐减小。而万古霉素与 $S(+)$ -KT 的结合力较弱, 形成的复合物不稳定, $S(+)$ -KT 大多以独立的形式在色谱柱上保留, 因此 $S(+)$ -KT 的保留时间先随吸附在色谱柱上的万古霉素的增加而增加, 当万古霉素在色谱柱上的吸附达到饱和后 ($3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 再增加万古霉素的浓度只能使游离的万古霉素对 $S(+)$ -KT 保留行为的影响增强, 导致 k'_S 又有所减少。加入万古霉素后, 该色谱系统的柱效明显提高, 这可能是由于万古霉素的介入加快了 KT 对映体在色谱系统内的传质过程。

由于万古霉素用量为 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时具有良好的分离度、合适的保留时间, 本实验选择万古霉素用量为 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其分离色谱图见图 3。由图 3 可见流动相添加剂法中, $R(-)$ -KT 先出峰, 而手性柱法中则是 $S(+)$ -KT 先出峰。这说明该系统中的手性识别作用主要来自分配在流动相中的万古霉素, 而不是分配在 C_8 色谱柱上的万古霉素。

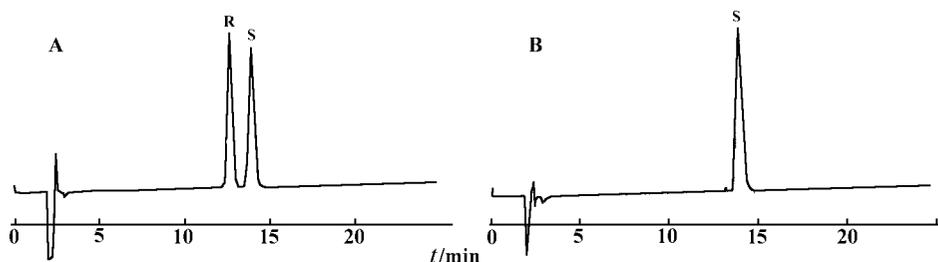


Figure 3 Chromatograms of KT racemate (A) and $S(+)$ -KT enantiomer (B) by HPLC using vancomycin as chiral mobile phase additive

2.2 甲醇用量

由于万古霉素易溶于甲醇, 选择甲醇为有机改

性剂。将含 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 万古霉素但甲醇比例不同的流动相的拆分结果进行比较, 结果见图 4A。可见

随甲醇用量的增加,分离度逐渐降低。综合保留时间考虑选择 50% 的甲醇用量。

2.3 缓冲液 pH 值

将含 3.5 mmol·L⁻¹ 万古霉素但缓冲液 pH 值不

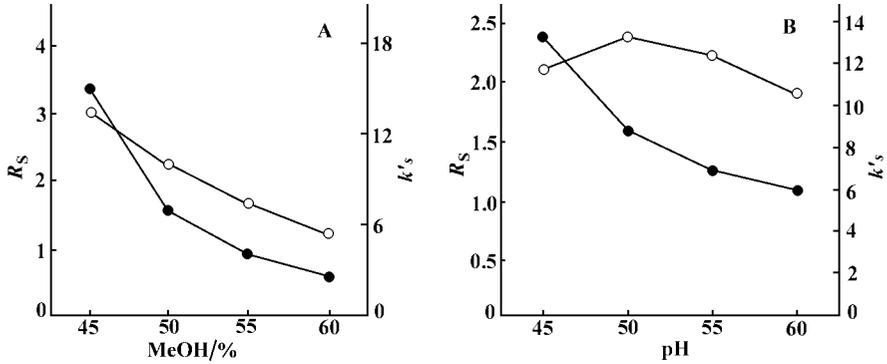


Figure 4 Effect of the concentration of methanol in the mobile phase (A) and the pH of the buffer (B) on resolution (R_s) ($\circ-\circ$) of KT race mate and capacity factor of $S(-)$ -KT (k'_s) ($\bullet-\bullet$)

2.4 检测波长的选择

由于万古霉素在低波长有较大的吸收,在 300 nm 处几乎无吸收,而 KT 在 300 nm 处仍有较大吸收。所以选择 300 nm 为检测波长以降低系统噪声,提高检测灵敏度。

2.5 定量分析

配制一定浓度的 KT 溶液,进行有关含量分析。 $R(-)$ -KT 和 $S(+)$ -KT 的质量浓度在 2.5 ~ 250 mg·L⁻¹ 分别与其响应面积呈线性关系。回归方程 $R(-)$ -KT 为 $Y = 9.8764 X + 18.4$, $r = 0.9999$; $S(+)$ -KT 为 $Y = 9.7994 X + 14.0$, $r = 0.9999$ 。当 $S/N = 2$ 时,计算最小检出限,两者均为 14.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD ($n=5$) 为 0.6%。检出限和精密度均达到定量分析的要求。

3 光学纯度检测

分别用手性柱法和流动相添加剂法检测 $S(+)$ -KT 样品的光学纯度。以手性柱法测得的 $e.e$ 值为 98.47%,以流动相添加剂法测得的 $e.e$ 值为 98.30%。两种方法的检测结果基本一致,均可用于 $S(+)$ -KT 的光学纯度检测。

结论

以万古霉素手性柱拆分 KT 对映体和以万古霉素为手性添加剂拆分 KT 对映体两种方法均不需衍生生化操作,即可用于 $S(+)$ -KT 的光学纯度检测。由于手性柱法灵敏度高,可用于生物样品的检测。而流动相添加剂法采用普通的色谱柱即可进行对映

体的含量检测,柱效高且简便快捷,可用于生产过程中的质量监测。

致谢:上海医药工业研究院易大年研究员对本文的实验工作提供指导。

致谢:上海医药工业研究院易大年研究员对本文的实验工作提供指导。

References:

- [1] Mei ZL, Pei XP, Cai HS. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of dexketoprofen [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1998, 7(5):339 - 340.
- [2] Zao H, Mu ZD, Li HZ, et al. Separation of enantiomeric ketoprofen by pre-column chiral derivatization reversed-phase HPLC [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35(3):194 - 196.
- [3] Santo T, Luo J, Lim CK, et al. Enantiomeric separation and detection by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of 2-arylpropionic acids derivatized with benzofurazan fluorescent reagents [J]. *Biomed Chromatogr*, 1998, 12(2):73 - 77.
- [4] Boisvert J, Caille G, Mcgilveray IJ, et al. Quantification of ketoprofen enantiomers in human plasma based on solid-phase extraction and enantioselective column chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 690(1 - 2):189 - 193.
- [5] Lovlin R, Vakily M, Jamali F. Rapid sensitive and direct chiral high-performance liquid chromatographic method for ketoprofen enantiomers [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 679(1 - 2):196 - 198.
- [6] Armstrong DW, Tang YB, Chen SS, et al. Macroyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1994, 66(9):1473 - 1478.