

洛索洛芬钠的高效液相色谱手性拆分

丁文静^{1,2} 郑文华¹ 许 旭^{*1} 王德才¹ 吕 龙¹

¹(中国科学院上海有机化学研究所,金属有机化学国家重点实验室,
分析测试中心,有机氟化学国家重点实验室,上海 200032)

梁宏^{1,2} 郁韵秋² 阮锦满³

²(复旦大学药学院,上海 200032) ³(南京宇道科技开发公司药物研究所,南京 210018)

摘 要 使用三(对甲苯甲酸)纤维素酯手性固定相(Chiralcel OJ-R 手性柱),建立了洛索洛芬钠 4 个手性异构体的高效液相色谱拆分方法。以甲醇与 pH 3.0 的 0.1 mol/L 醋酸-三乙胺或 0.5 mol/L HClO₄-NaClO₄ 按 80:20 组成流动相,4 个异构体中相邻峰的分离度均达到 1.7 以上。确认了 4 个组分的结构按出峰次序依次为:(1 R,2R)、(1 S,2R)、(1 R,2S) 和 (1 S,2S)。对流动相中不同的 pH、缓冲溶液浓度和类型以及有机改性剂类型对分离结果的影响作了系统考察,其结果有助于更好地了解这类固定相的手性识别机理。

关键词 高效液相色谱,手性分离,OJ-R,洛索洛芬钠

1 引 言

洛索洛芬钠(loxoprofen sodium)是由日本三共公司开发上市的非甾体抗炎药^[1],具有抗炎、镇痛、解热作用,其抗炎镇痛作用是吲哚美辛、酮洛芬及萘普生的 4~6 倍,而消化道副作用较小^[1,2]。洛索洛芬钠有 2 个手性中心,4 个手性异构体,目前洛索洛芬钠是以外消旋体的形式上市。已有的含手性中心的非甾体抗炎药如布洛芬、萘普生、酮基布洛芬,其对映异构体之间的药理作用均被证明存在差异。因此,有必要研究洛索洛芬钠的手性拆分方法,这是研究洛索洛芬钠 4 个异构体药理作用的必要前提,也是新药研究开发的必须环节。

本实验使用高效液相色谱法,在三(对甲苯甲酸)纤维素酯手性固定相(Chiralcel OJ-R)柱上用极性流动相直接拆分洛索洛芬钠,得到完全分离的 4 个异构体的色谱峰,确认了各峰的结构归属,并详细考察了不同流动相条件对分离结果的影响。Kanazawa 等^[3]使用非极性流动相在不同的 Chiralcel OJ 柱上拆分洛索洛芬钠的 4 个对映体,但是分离时间是本方法的 2 倍,分离度也不如本方法。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与样品

Waters 液相色谱仪(包括 510 泵、481 紫外检测器和 U6K 进样阀);色谱工作站(上海军锐);pHs-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);J-820 型圆二色谱仪(日本 JASCO 公司)。

甲醇(色谱纯,上海化学试剂研究所);乙腈(色谱纯,Merck 公司);三氟醋酸为国产化学纯,其它均为国产分析纯。纯蒸馏水(上海斯柏克林公司)。

洛索洛芬钠外消旋体样品自行合成,其结构式见图 1;两个手性中心分别位于丙酸的 α 位(1 位),环戊酮的 α 位(2 位)。样品溶解在甲醇中配制,浓度约为 0.3 g/L,进样量 10 μ L。

2.2 色谱条件

手性色谱柱 Chiralcel OJ-R (15 cm $\times$ 4.6 mm i. d.)系日本 Daicel 公司产品。检测波长 222 nm;流速均为 0.5 mL/min。所有的色谱分离均在室温(约 20 $^{\circ}$ C)下进行。

3 结果与讨论

3.1 手性分离结果

2003-05-21 收稿;2004-01-12 接受

本文系上海市自然科学基金资助项目(No. 01ZA14077)

在所用仪器条件下,使用 Chiralcel OJ-R 手性柱,在甲醇 0.1 mol/L 醋酸-三乙胺 (pH 3.0) = 8020 的流动相条件下,拆分洛索洛芬钠的 4 个异构体的典型分离谱图见图 2。

3.2 流动相中缓冲溶液 pH 对分离的影响

使用 0.1 mol/L 醋酸溶液 (pH 为 2.7),并以三乙胺调缓冲溶液的 pH 分别为 3.0、3.5、4.0 和 5.0 的缓冲溶液,用甲醇 0.1 mol/L 醋酸-三乙胺 = 8020 作为流动相,考察了在不同 pH 条件下对洛索洛芬钠分离度的影响。结果表明:洛索洛芬钠后 3 个峰之间均能得到很好地分离。最难分离的是第一个峰和第二个峰,所以用洛索洛芬钠消旋体的第一个峰与第二个峰的分度 R_s 作为考察指标,其与缓冲溶液 pH 的关系见图 3。由图 3 可见,缓冲溶液 pH 在 2.7、3.0 和 3.5 时分离较好, R_s 在 1.7 以上。pH 大于 3.5 时,分离度下降较大。其原因可能是提高缓冲溶液酸性使洛索洛芬钠离子化程度降低,更容易与 OJ-RH 手性固定相发生相互作用,有利于手性分离。但使用不加三乙胺的 pH 2.7 的醋酸溶液时,分离重现性不好,峰对称性较差,故实验选择 pH 3.0。

3.3 缓冲溶液浓度对分离的影响

选择甲醇醋酸-三乙胺 (pH 3.0) = 8020,考察缓冲溶液浓度对分离的影响,结果见图 4。 R_s 表示洛索洛芬钠的第一个与第二个异构体峰的分度, k' 表示洛索洛芬钠第一个峰的保留因子。可见,浓度在 0.20 mol/L 时保留因子最大,但分度反而下降;此时紫外本底吸收也较大,0.10 mol/L 时保留因子最小,分度较好,所以实验选用此浓度。

3.4 有机改性剂的比例对分离的影响

用甲醇与 0.1 mol/L 醋酸-三乙胺 (pH 3.0) 不同配比混合作流动相,随着甲醇比例从 80 % 每减小 5 %,洛索洛芬钠的保留因子增大接近 1 倍,但分度 R_s 增加较少,而且峰变宽。根据此柱使用的要求,实验中使用 80 % 甲醇,没有使用更大比例。

3.5 不同缓冲溶液种类对分离的影响

使用 0.1 mol/L 醋酸-三乙胺缓冲溶液,0.5 mol/L HClO_4 - NaClO_4 缓冲溶液,0.2 mol/L 磷酸-磷酸二氢钠作缓冲溶液,甲醇作有机改性剂。在相同的 pH 和相同甲醇比例条件下,使用醋酸-三乙胺缓冲溶液和 HClO_4 - NaClO_4 缓冲溶液对洛索洛芬钠 4 个异构体的相邻峰均具有 ≥ 1.7 的分度,保留因子也很接近,磷酸-磷酸二氢钠作缓冲溶液对洛索洛芬钠的保留因子明显增大,但第一个峰与第二个峰的分度却明显降低 (小于 1.0)。另外,用 0.5 mol/L HClO_4 - NaClO_4 作缓冲溶液, pH 2.0 时分度比 pH 为 3.0 时差。

3.6 不同有机改性剂对分离的影响

用 0.5 mol/L HClO_4 - NaClO_4 作缓冲溶液,比较甲醇缓冲溶液 = 8020 和乙腈缓冲溶液 = 3070 这两种流动相,乙腈体系对洛索洛芬钠的保留时间较长,但分度却下降。表明在分离洛索洛芬钠时,甲醇是优良的有机改性剂。流动相中有机改性剂对 Chiralcel OJ-R 柱手性分离能力有很大影响,可能是有机改

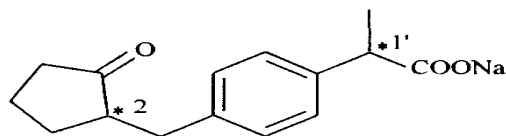


图 1 洛索洛芬钠的分子结构式

Fig. 1 The molecular structure of loxoprofen sodium

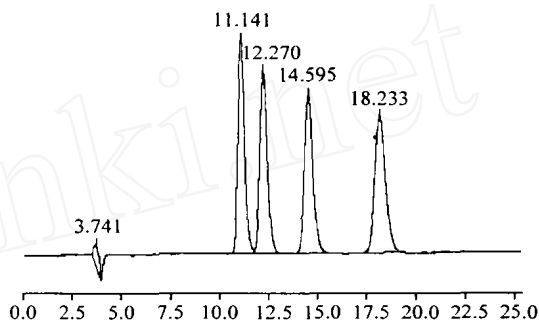


图 2 洛索洛芬钠的手性分离图谱

Fig. 2 Chromatogram of loxoprofen sodium

流动相 (mobile phase): $\text{CH}_3\text{OH}/0.1 \text{ mol/L}$ 醋酸-三乙胺 (triethylamine-acetic acid) pH 3.0 = 8020; 流速 (flow rate): 0.5 mL/min。

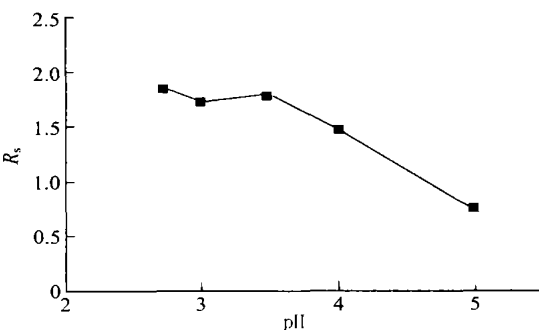


图 3 pH 对前两个峰分离度的影响

Fig. 3 Effect of pH on resolution of original two peaks

性剂会和溶质竞争手性和非手性位点,各改性剂的占位效应不同,有机改性剂的结构不同,可能会影响纤维素手性固定相螺旋沟槽的性质,从而影响它的嵌合作用。

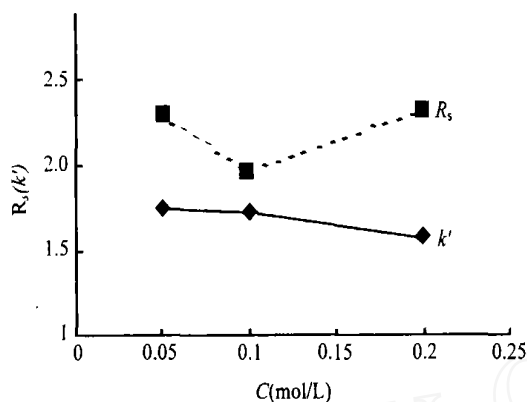


图 4 缓冲溶液浓度对前两个峰的分离和第一个峰保留的影响

Fig. 4 Effect of concentration of buffer on resolution of original two peaks and retention of first peak

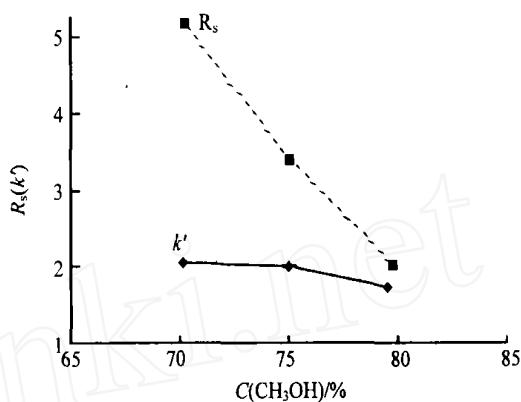


图 5 甲醇比例对前两个峰的分离和第一个峰保留的影响

Fig. 5 Effect of CH₃OH content on resolution of original two peaks and retention of first peak

3.7 峰的构型归属

为了确定每个峰的构型归属,使用本方法加大进样量采集流出组分溶液,但在旋干时出现了消旋的现象,无法获得纯品。而文献[3]中用圆二色谱确定了每个峰的构型归属,因此采用该文献的色谱分离条件。色谱柱为 Chiralcel OJ (250 mm × 4.6 mm i. d., 日本 Daicel 公司),流动相为正己烷-异丙醇-三氟醋酸(9550.1)。加大进样量,采集每个已知构型归属峰的流出组分溶液之后马上用 0.05 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 7.0)萃取,然后取水相用本文的高效液相色谱方法分析,确认本法每个峰的构型归属,同时用圆二色谱验证,证实本法出峰次序依次为:(1 R, 2R), (1 S, 2R), (1 R, 2S), (1 S, 2S)。

本实验所用手性柱 Chiralcel OJ-R 的固定相是将三(对甲苯甲酸)纤维素酯涂渍在 5 μm 的担体上得到的,此手性柱应用范围广^[4,5]。但纤维素类手性固定相的手性识别机理较复杂^[6,7],分离结果不仅取决于基团间的手性相互作用,还受到固定相空间结构的影响,非手性相互作用也很复杂。本实验对流动相条件的方法考察有助于更好地了解这种手性固定相的性质。

References

- 1 Tang Wensheng(唐文生), Pan Likun(潘丽坤), Sun Pinghua(孙平华), Sun Tiemin(孙铁民). *Chinese J. Medicinal Chem.* (中国药物化学杂志), **2002**, 12(5): 292 ~ 294
- 2 Liu Anchang(刘安昌), Chen Hong(陈洪), Hu Yeli(户业丽). *Chinese J. New Drugs* (中国新药杂志), **2000**, 9(11): 765 ~ 767
- 3 Kanazawa H, Tsubayashi A, Nagata Y, Matsushima Y, Mori C, Kiza J, Higaki M. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 948: 303 ~ 308
- 4 Aboul-Enein H Y, Bakr S A. *Enantiomer*, **1996**, 1: 223 ~ 226
- 5 Van Overbeke A A L, Baeyens W R G, Beyaert A, Aboul-Enein H Y, Oda H. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **1997**, 20(5): 693 ~ 705
- 6 Cui Xin(崔欣), Wang Bin(王斌), Feng Xiaoming(冯小明), Jiang Yaozhong(蒋耀忠). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2002**, 30(9): 1099 ~ 1101
- 7 Wei Feng(危凤), Yang Yiwen(杨亦文), Ren Qilong(任其龙), Wu Pingdong(吴平东). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31(6): 735 ~ 738

Chiral Separation of Loxoprofen Sodium by High Performance Liquid Chromatography

Ding Wenjing^{1,2}, Zheng Wenhua¹, Xu Xu^{*1}, Wang Decai¹, L ÜLong¹, Liang Hongxi², Yu Yunqiu², Ruan Jinman³

¹(State Key Laboratory of Organometallic Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, State Key Laboratory of Organofluorine Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

²(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032)

³(Nanjing Yudao Research & Development Company, Institute of Pharmaceutics, Nanjing 210018)

Abstract A method for chiral separation of four loxoprofen sodium optical isomers was developed by high performance liquid chromatography on the chiral stationary phase of cellulose tris(4-methylbenzoate) (Chiralcel OJ-R). The effects of pH, concentration and type of the buffer, and organic modifier's kind in the mobile phase on the resolution and retention were investigated. The good resolution was obtained with the mobile phases of methanol/0.1 mol/L acetic acid-triethylamine (or 0.5 mol/L HClO₄-NaClO₄) at pH 3.0 = 80/20. The resolutions with over 1.7 for all continuous peaks were shown at the mobile phase conditions. The peak sequence was identified as (1 R,2R), (1 S,2R), (1 R,2S), (1 S,2S). The investigated results facilitate to understand the recognized mechanism of the cellulose-based chiral stationary phase.

Keywords High performance liquid chromatography, chiral separation, cellulose-based chiral stationary phase, loxoprofen sodium

(Received 21 May 2003; accepted 12 January 2004)

欢迎订阅《分析化学》(2005 年)

邮发代号 12 - 6

本刊承办广告业务

《分析化学》(ISSN 0253 - 3820, CODEN FHHHDT, CN 22 - 1125/O6) 是中国科学院和中国化学会共同主办的专业性学术期刊, 主要报道我国分析化学创新性研究成果, 反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 1999 年荣获首届国家期刊奖, 2000 年获中国科学院优秀期刊奖特别奖, 2001 年入选“中国期刊方阵”高知名度、高学术水平的“双高”期刊, 2002 年又荣获第二届国家期刊奖和第三届中国科协优秀科技期刊奖。论文已被包括美、英、日、俄等国内外近 30 种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所历年来发布的“中国科技期刊引证报告”获悉, 本刊被引频次和影响因子均居中国科技期刊排序前列, 1999 年和 2000 年被引频次和影响因子均居国内化学期刊第一名, 2001 年被引频次和影响因子分别居化学期刊第二名和第三名。多年来, 本刊逐年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA) 摘引量最大的 1000 种期刊(简称“CA 千种表”)中, 并居我国入选“CA 千种表”期刊的前列。从 1999 年第 27 卷第一期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information)正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index-Expanded, SCIE, also known as SciSearch), 同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等 ISI 系列。本刊是我国发行量、报道容量和国内外影响较大的科技学术期刊之一。

本刊为月刊, 2005 年每期从 128 页增至 144 页(大 16 开), 由科学出版社出版。国内单价 15.00 元, 全年 180.00 元。邮发代号 12 - 6, 全国各地邮局订阅, 国外代号 M336, 中国国际书店订购, 漏订读者, 可与编辑部联系。

编辑部地址: 长春市人民大街 5625 号 邮政编码: 130022 电话: (0431) 5262017/5262018