技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)04-0586-05

酮洛芬对映体的分离、分析方法的研究及其应用

李小梅,周 凤,赵 华,靳红卫
(重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:考察酮洛芬(Ketoprofen,KT)对映体在多糖衍生物手性固定相的色谱行为,建立酮洛芬对映体的分离分析方法,并用于血浆样品中酮洛芬对映异构体的测定。方法:色谱柱 ChiralpakAD(250 mm × 4.6 mm,10 μm,Daicel Chemicals),流动相组成为正己烷:异丙醇:TFA(80:20:0.02),检测波长 254 nm,流速 1.0 ml/min,柱温为 25℃。结果:酮洛芬对映体在 10 min 内实现分离,分离度大于 2.0,对映体 R 和 S 分别在血药浓度 0.1~10 μg/ml 范围内线性关系良好 R-(-)(r=0.999 8),S-(+)(r=0.999 6),单一对映体的最低检测限为 2 ng(S/N=3)。结论:建立了用 ChiralpakAD 柱分离分析酮洛芬对映异构体的方法,可用于单一对映异构体的光学纯度检测及药理学研究。

【关键词】高效液相色谱法;酮洛芬;对映体;手性分离
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-02

The separation and determination of ketoprofen enantiomers in plasma by chiral column

LI Xiao-mei, et al
(*Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical Univercity*)

【Abstract】*Objective*: The separation effect for the enantiomers of ketoprofen on four diferent chiral columns was investigated and established a sensitive and stereospecific HPLC separation and determination method for ketoprofen enantiomers in animal plasma. *Methods*: The enantiomers of ketoprofen was resolved in the normal phase mode by using n-hexane:isopropanol:TFA(80:20:0.02) as mobile phase with UV detector at a wavelength of 254 nm.The flow rate was 1.0 ml/min. *Results*: Linear calibration curves were obtained in the range 0.1~10 μg/ml for R-(+)-ketoprofen(r=0.999 8) and S-(+)-ketoprofen(r=0.999 6) in plasma.The detection limit (S/N=3) was 2 ng for each enantiomer. *Conclusion*: This method is simple, fast and can be used to detect optical purity of S-(+)-ketoprofen and monitor pharmacokinetic studies of ketoprofen enantiomers.

【Key words】HPLC; Ketoprofen; Enantiomers; Chiral separation

酮洛芬(Ketoprofen,KT)是 2-芳基丙酸类非甾体抗炎药(Non-steroidal anti-inflammatory drug,NSAIDs),该药物具有一个手性中心(如图 1),药理学研究发现,只有 S-(+)-KT 才具有抗炎抗风湿和镇痛作用[1,2]。现已有 S-(+)-KT 的产品上市。因此建立快速、简便、灵敏度高的 KT 对映体分析方法将有助于生产过程中药品的质量控制。目前 KT 对映体的分析方法大致有:柱前手性衍生化法[3],手性柱色谱法[4-8],手性流动相添加剂法[9],毛细管电泳法[10]。柱前手性衍生化法步骤繁琐,可能引起消旋化;手性流动相添加剂法则分离效果不如手性固定相,毛细管电泳法则稳定性相对较差。手性固定相高效液相色谱法可直接分离手性药物,该方法有操作简便、分离效果好、不需衍生化、不改变组分结构、便于收集等特点。本文考察了酮洛芬对映体在多糖手性色谱柱:ChiralcelOJ 柱,ChiralcelOD 柱,ChiralpakAD 柱和 ChiralpakAS 柱上的色谱行为,并建立了用 ChiralpakAD 柱分析血浆样品中酮洛芬对映体的浓度的方法,获得了满意效果。为酮洛芬单一对映体异构体的光学纯度检测与药理学研究提供了有效的分析方法。

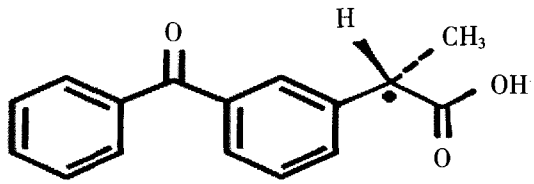


图 1 Ketoprofen 结构图

作者介绍:李小梅(1984-),女,硕士,
研究方向:药物分析。
通讯作者:赵 华,女,副教授,E-mail:zhaohua.cq@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

日本岛津公司高效液相色谱仪 LC-2010AHT;Classic-VP 色谱工作站。TGL-16 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司);BF 2000 氮气吹干仪 (北京八方世纪科技有限公司),BS210S 电子分析天平(精度 0.000 1 g,Sartorious 公司)。

(±)-酮洛芬和 S-(+)-酮洛芬(>98%,西南合成制药厂提供),甲醇,无水乙醇、正己烷、异丙醇(均为美国天地公司,色谱纯),正丙醇、异辛烷(天津市光复精细化工研究所,均为色谱纯),乙醚(上海马陆制药厂),三氟乙酸(Trifluoroacetic acid,TFA)等均为分析纯。

日本大耳兔由重庆医科大学动物中心提供。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取(±)-酮洛芬 10.3 mg,加甲醇溶解配得浓度为 1.03 mg/ml 的(±)-酮洛芬储备溶液。取 100 μl 储备液至 5 ml 容量瓶内,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 20.6 μg/ml (±)-酮洛芬的对照品溶液。同上操作制得 10.6 μg/ml 的 S-(+)-酮洛芬对照品溶液。

1.3 色谱条件

酮洛芬拆分色谱条件:ChiralpakAD 柱 (250 mm × 4.6 mm,10 μm,Daicel Chemicals)、ChiralcelOJ 柱 (250 mm × 4.6 mm ,10 μm,Daicel Chemicals),氰基保护柱(4 mm × 4 mm,10 μm,江苏汉邦),流动相:正己烷:异丙醇:TFA、正己烷:乙醇:TFA、正己烷:正丙醇:TFA、正己烷:异丙醇:甲醇:TFA、正己烷:正丙醇:甲醇:TFA、正己烷:乙醇:甲醇:TFA。流速 1.0 ml/min,柱温:25 ℃,检测波长 254 nm。

血浆样品含量测定条件:Chiralpak AD 柱 (250 mm × 4.6 mm,10 μm,Daicel Chemicals),氰基保护柱(4 mm × 4 mm,10 μm,江苏汉邦),流动相:正己烷:异丙醇:TFA(80:20:0.02);流速 1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:25℃。

1.4 血浆样品预处理

分别取试验兔子血浆样品 0.4 ml 于离心管中, 加 1 mol/L 盐酸 100 μl,乙醚 3 ml,涡旋 5 min ,3 000 r/min 离心 15 min,分取有机层 2 ml,N_2 挥干,残渣加流动相 200 μl 溶解,涡旋混合 30 s 后 15 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μl 进样。

2 结 果

2.1 手性固定相的选择

酮洛芬分子中有 2 个苯环,1 个羰基,1 个羧基, 可能与多糖衍生手性固定相形成 π-π 作用, 偶极-偶极作用,氢键等,根据 3 点作用原理[11],多糖衍生物类手性固定相可能适宜酮洛芬对映体的拆分。因此我们考察了酮洛芬对映体在 4 种最常用的多糖衍生物手性固定相色谱柱:ChiralpakAD 柱、ChiralpakAS 柱、ChiralcelOD 柱和 ChiralcelOJ 柱上的拆分情况。结果发现酮洛芬对映体在 ChiralcelOJ 上的拆分效果最为理想, 分离度达到了 3.12, 分离因子为 1.40;ChiralpakAD 柱最大分离度为 2.29,分离因子为 1.27,色谱图见图 2。在本实验条件下,ChiralpakAS 柱和 ChiralcelOD 对酮洛芬对映体无法实现有效拆分。

2.2 流动相的组成对分离度的影响

2.2.1 酸性调节剂对酮洛芬对映体拆分的影响 酮洛芬具有羧基,显酸性,添加酸性添加剂可增加分离度和峰的对称性,在 ChiralpakAD 柱和 ChiralcelOJ 柱上,固定流动相中正己烷:醇的体积比为 80:20,考察不同浓度三氟乙酸对酮洛芬对映体的分离度(Resolusion,R)的影响,结果见图 3。三氟乙酸的加入对酮洛芬对映体的分离有显著改善,三氟乙酸含量增加至 0.02%时分离效果已趋于稳定,因此,作者选择添加三氟乙酸的浓度为 0.02%。

2.2.2 醇类置换剂对分离的影响 多糖衍生物手性固定相色谱柱的基础流动相通常是正己烷:异丙醇、正己烷:乙醇,正己烷:正丙醇,通常醇的含量增加,流动相的极性增加,洗脱能力增强,药物的保留时间减小。为了得到酮洛芬对映体的最佳分离效果我们考察了异丙醇、乙醇、正丙醇对酮洛芬对映体分离的影响,结果发现:在 ChiralpakAD 柱上使用乙醇分离效果最佳; 在 ChiralcelOJ 柱上则异丙醇分离效果较好,具体结果见表 1。洗脱顺序都是 R 先出峰,S 后出峰。在 2 种手性固定相上,几种不同的流动相环境中都未见反转现象。

流动相中少量甲醇的加入对对映体的分离有一定的影响。固定流动相中正己烷的浓度,用不同比列的甲醇分别代替异丙醇、乙醇、正丙醇,酮洛芬对映体的分离情况如图 4。ChiralpakAD 柱上,在正己烷:异丙醇、正己烷:正丙醇体系中随着甲醇的增加,对映体的分离度增大;而在正己烷:乙醇体系中随着乙醇被逐渐替换对映体的分离度逐渐减小。在 ChiralcelOJ 柱上甲醇的加入使上述 3 种体系的拆分能力都呈下降趋势。

2.3 血浆样品的分析方法

2.3.1 方法专属性 为避免血浆中内源性杂质对酮洛芬对映体分离的干扰, 我们选择色谱柱:ChiralpakAD 柱(250 mm × 4.6 mm,10 μm,Daicel Chemicals);流动相:正己烷:异丙醇:TFA(80:20:0.02);流速 1.0 ml/min;柱温 25 ℃;检测波长:254 nm 作为血浆样品的分析条件。在此条件下血浆中杂质不干扰测定,酮洛芬对映体达基线分离,适宜血浆样品的快速分析,结果见图 5。

2.3.2 线性及最低检测限 取试验兔子空白血浆,分别加入(±)-酮洛芬对照品溶液适量, 使其血浆药物浓度分别为 0.2、0.5、1、2、5、10、20 μg/ml。按"1.4"项下处理,取上清液 20 μl 进样,分别将 R-(-)和 S-(+)酮洛芬峰面积(Y)对酮洛芬血浆浓度(X)作直线回归得 R-(-)-酮洛芬标准曲线方程:

Y=217 035X+8 591.5,r =0.999 8,S-(+)-酮洛芬标准曲线方程:Y=209 535X-2 776.6,r =0.999 6。

最低检测限:取对照品溶液 20 μl 进样,当信噪比为 3 时,测得酮洛芬对映体最低检测限均为 2 ng。

2.3.3 回收率与精密度实验 取试验兔子空白血浆,加入不同浓度的(±)-酮洛芬对照品溶液,配制高、中、低(1、10、20 μg/ml)3 种浓度的血浆样品各 3 份,按"1.4"项下处理,取 20 μl 进样,测得的 R-(-)、S-(+)酮洛芬回收率,结果见表 2。

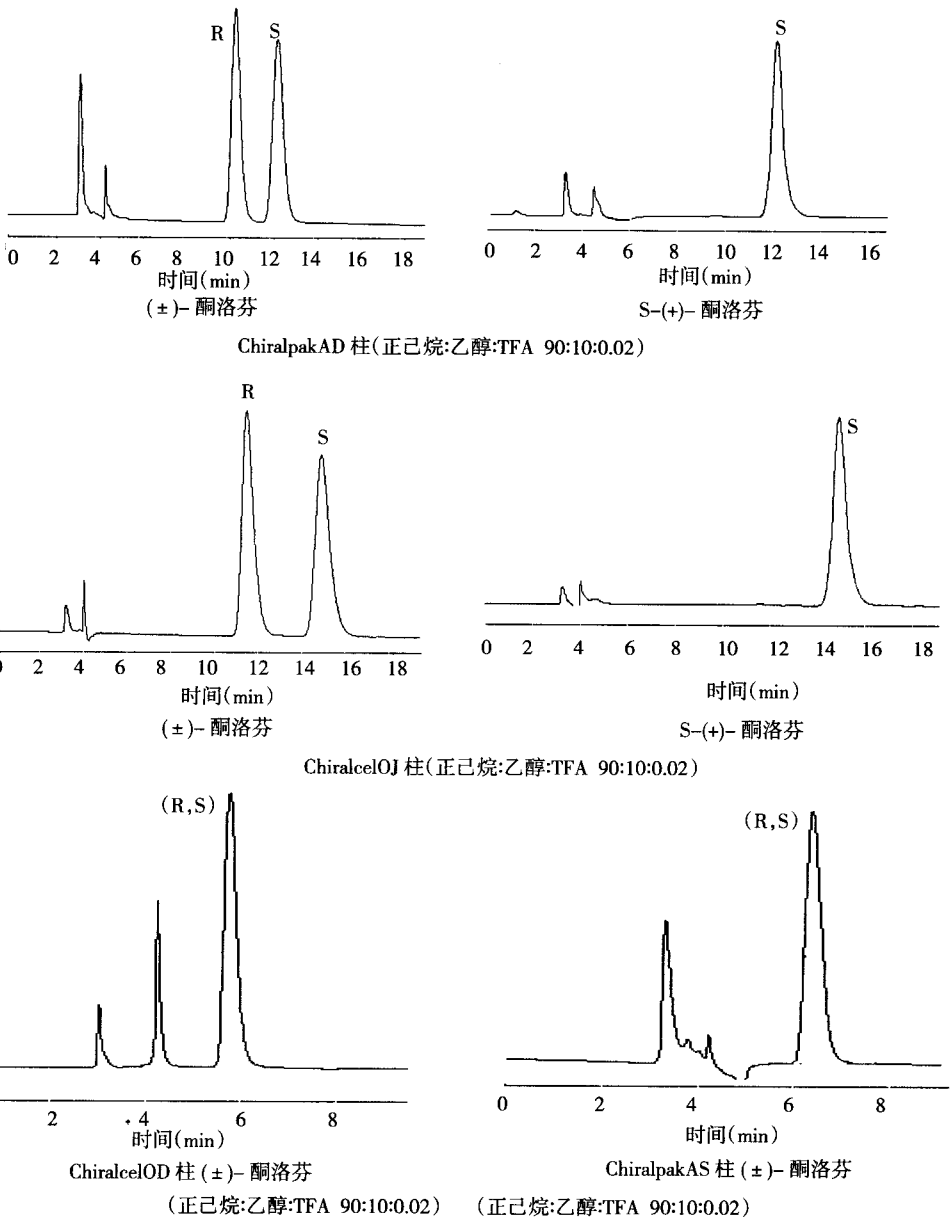


图 2　酮洛芬在 4 种多糖手性柱的色谱图

表 1　醇类置换剂对分离的影响

流动相组成正己烷/醇/TFA	醇类置换剂	ChiralpakAD 柱			ChiracelOJ 柱		
		R	K_R	K_S	R	K_R	K_S
80/20/0.02	异丙醇	1.59	1.04	1.27	2.20	1.08	1.51
	正丙醇	0.32	0.83	0.94	1.18	1.09	1.30
	乙醇	1.99	0.94	1.24	0.79	1.12	1.28
85/15/0.02	异丙醇	1.74	1.50	1.82	2.63	1.60	2.25
	正丙醇	1.40	1.36	1.60	1.10	1.32	1.55
	乙醇	2.01	1.31	1.68	0.98	1.56	1.78
90/10/0.02	异丙醇	1.86	2.31	2.78	3.12	2.50	3.50
	正丙醇	1.71	2.34	2.76	1.43	2.51	2.88
	乙醇	2.29	2.13	2.71	1.26	2.48	2.86

K_R、K_S：容量因子

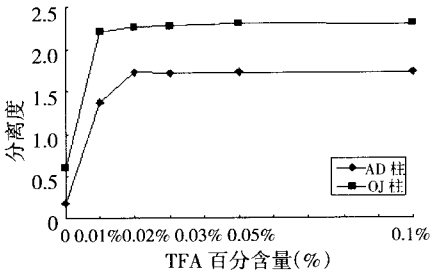
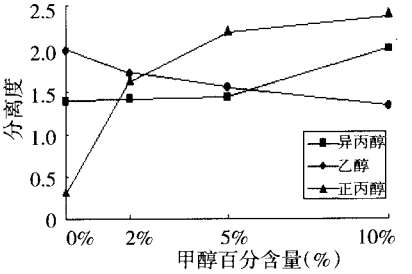
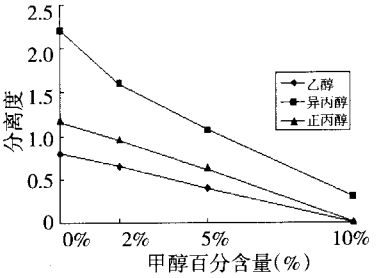


图 3 TFA 浓度对拆分的影响

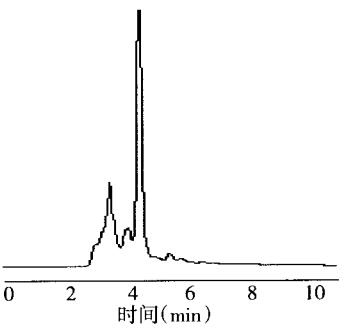


AD 柱上甲醇对拆分的影响

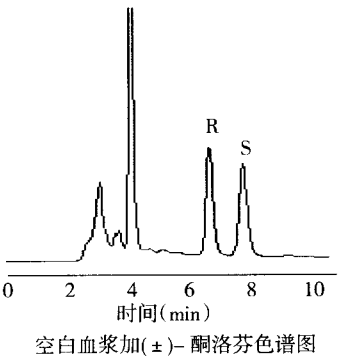


OJ 柱上甲醇对拆分的影响

图 4 甲醇用量对酮洛芬对映体拆分效果的影响



空白血浆色谱图

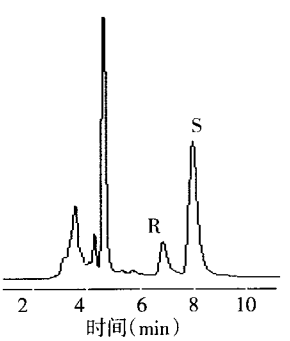


空白血浆加(±)- 酮洛芬色谱图

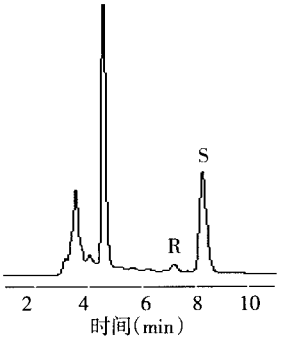
图 5 酮洛芬对映体色谱图

表 2 血浆样品中酮洛芬的回收率(n=3)

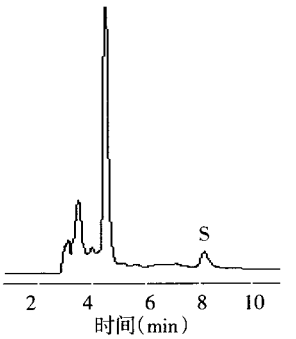
加入量 μg/ml	测得平均值 μg/ml		平均回收率		精密度 RSD%	
	R-(-)	S-(+)	R-(-)	S-(+)	R-(-)	S-(+)
1	0.46	0.47	93.7	95.5	1.46	2.40
10	5.10	5.12	102.0	102.5	0.79	1.50
20	9.96	9.93	99.6	99.3	0.81	0.68



1 h 时血药浓度图谱



3 h 时血药浓度图谱

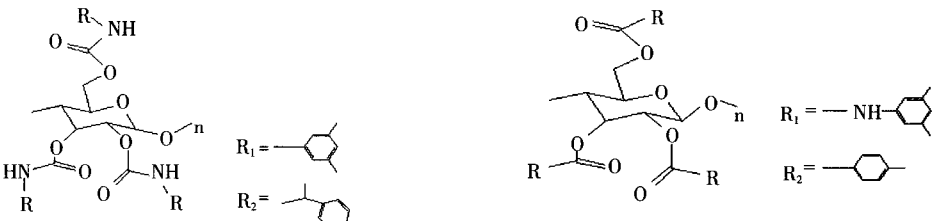


12 h 时血药浓度图谱

图 6 兔子血浆样品图谱

表 3 样品测定结果

时间	R-(-)-KT 峰面积	S-(+)-KT 峰面积	测得浓度 μg/ml		S/R 浓度比率
			R-(-)-KT	S-(+)-KT	
0.5 h	292 901	1 459 852	1.30	6.80	5.2
1 h	140 593	1 011 211	0.62	4.73	7.6
1.5 h	74 713	1 166 172	0.32	5.44	17.0
2.5 h	55 143	963 086	0.23	4.5	19.5
3 h	37 806	676 915	0.15	3.05	20.3
12 h	nd	93 999	nd	0.48	-



ChiralcelOD 柱固定相:R_1　　ChiralcelOD 柱固定相:R_1

ChiralcelOD 柱固定相:R_2　　ChiralcelOD 柱固定相:R_2

图 7　4 种多糖衍生物手性柱固定相的结构图

2.3.4　样品测定　取健康日本大耳兔(1.8 kg)禁食 12 h,自由饮水,将原料药制成混悬剂予以空腹灌胃(5 mg/kg)。于给药后 0.5、1、1.5、2.5、3、12 h 分别采耳缘静脉血,按照"1.4"项下处理,取上清液 20 μl 进样,色谱图见图 6。

将 R 和 S 的峰面积分别带入 R-(-)- 酮洛芬标准曲线和 S-(+)- 酮洛芬标准曲线,即可算出体内药物的浓度,结果如表 3。

3　讨　论

ChiralpaAD 柱的固定相是直连淀粉 - 三(3,5- 二甲苯基氨基甲酸酯),ChiralpakAS 柱的固定相是直连淀粉 - 三(S-α- 甲基苯基氨基甲酸酯),ChiralcelOJ 柱的固定相是纤维素 - 三(4- 甲基苯甲酸酯),ChiralcelOD 柱的固定相是纤维素 - 三 (3,5- 二甲苯基氨基甲酸酯), 结构见图 7。ChiralpakAD 柱和 ChiralcelOD 柱固定相的衍生基团完全相同,两者的差别在于葡萄糖单元之间连接的糖苷键的构象差别(α-,β-)。酮洛芬对映体在 AD 柱上能得到很好的拆分效果,而在 OD 柱不能有效拆分,也有文献报道兰索拉唑奥美拉唑在 AD 柱和 OD 柱上有不同的分离效果[12],这说明在此类手性固定相中葡萄糖单元的空间构象对对映体的拆分具有直接影响。ChiralpakAD 柱与 ChiralpakAS 柱,ChiralcelOJ 柱与 ChiralcelOD 柱的葡萄糖单元构象相同,它们的区别仅在于衍生基团的微小差异。酮洛芬对映体在这几种色谱柱的色谱行为差异说明不同的衍生基团对手性识别也具有显著影响。

在不同的色谱柱、不同的醇类置换剂对酮洛芬对映体拆分造成的影响不同,可能是醇类置换剂不仅可以与固定相形成氢键, 还可与手性空腔作用而改变手性空腔的空间环境,使对映体分子与手性空腔的作用发生变化。有文献报道在 chiralcelOJ 柱上异丙醇的洗脱能力大于乙醇[8]。本实验中,由于作者在流动相中加入微量的三氟乙酸后,体系的极性显著增大,药物保留都减弱,而引起各醇类置换剂的洗脱能力几乎没有差异。少量甲醇的加入对拆分有一定的影响,这提示在拆分对映体过程中可通过加入适当量的甲醇改善对映体的分离度,以达到理想的分离效果。

样品测定结果显示,试验兔子血浆中酮洛芬 S,R 对映体的浓度随着时间的推移,两者的比率逐步增大(表 3、图 6)。国外学者 P.Lees 等[13-16]的研究结果表明,在部分动物体内(猫、小鼠、兔子、马等)酮洛芬 R 对映体的代谢速度大于 S 对映体; 针对 R 对映体的实验研究证实 R 对映体有向 S 对映体转化的现象(转化率约 15%~37%)。由此可见此结果可能是由于在一些生物体内酮洛芬 R 对映体比 S 对映体代谢快且 R 对映体向 S 对映体部分转化的共同作用所造成。

本实验建立的方法操作简单、快速有效,可用于酮洛芬对映体的血浆样品的分析。

参　考　文　献

[1] 梅之南,裴小平,蔡鸿生.右旋酮洛芬的药动学和药效学性质[J].中国新药杂志,1998,7(5):339-341.

[2] 陈　亮,何凤慈,蒋耀光.非甾体抗炎药及其手性对映体[J].中国药业,2005,14(1):27-29.

[3] 赵　华,母昭德,李惠芝.柱前手性衍生化反相高效液相色谱分离酮洛芬对映体[J].中国药学杂志,2000,3(35):194-196.

[4] 叶晓霞,俞　雄.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[J].药学学报,2003,38(3):211-214.

[5] Boisvert J,Mc Gilvray,Qureshi S A,et al.Quantification of ketoprofen enantiomers in human plasma based on solid-phase extraction and enantoselective column chromatograhy[J].ChromatographyB, 1997,690(1-2):189-193

[6] Lovlin R,Vakily M,Jamali F.Rapid,sensitive and direct chiral high-performance liquid chromatographic method for ketoprofen enantiomers[J].ChromatographyB,1996,679(1-2):196-198.

[7] Carr R A,Ngoc A H,Foster R T.Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of ketoprofen in human plasma and urine[J].ChromatographyB, 1995,668(1):175-181.

[8] 余　勤,南　峰,向　瑾.OJ 手性柱分离芳基烷酸类非甾体解热镇痛药的色谱保留特性和拆分机理[J].化学学报,2008,66(9):1079-1085.

[9] 杨　青,唐瑞仁,曾莎莎.高效液相色谱手性流动相法拆分酮基布洛芬对映体[J].分析试验室,2007,26(8):84-86.

[10] 张智超,张　锴,高如瑜.以高取代磺酸基环糊精为手性选择剂毛细管电泳法拆分 4 种药物对映体[J].药物分析杂志,2000,20(6):363-366.

[11] William H,Pirkle,David W,et al.Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases[J].Chromatography A,1980,192(1):143-158.

[12] 崔　欣,付芳敏,朱　槿.奥美拉唑、兰索拉唑对映体及相关物质在不同手性柱的分离比较[J].分析化学研究简报,2002,30(12):1494-1496.

[13] Lees P,Taylor P M,Landoni F M,et al.Ketoprofen in the Cat:Pharmacodynamics and Chiral Pharmacokinetics[J].The Veterinary Journal,2003,165(6):21-35.

[14] Abas A,Meffin P J.Enantioselective disposition of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti- inflammatory drugs. Ⅳ.Ketoprofen disposition[J].Pharmacology and Experimental Therapeutics,1987,240(2):637-641.

[15] Foster R T,Jamali F.Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat.Influence of route of administration[J].Drug Metabolism and Disposition,1988,16(4):623-626.

[16] Landoni M F,Soraci A.Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen enantiomers in the horse[J].PharrnacoL.Therap,1996,19(13):466-474.

(责任编辑:关蕴良)