

柱前荧光试剂衍生化 RP-HPLC法 测定布洛芬对映体

刘雁鸣 缪建荣 汪文涛 谭凤门

(湖南省药品检验所, 长沙 410001)

摘要 采用新一代用于手性拆分羧酸类药物的荧光衍生化试剂 NBD-(L)-Apy, 在 Hypersil BDS(4.6 mm×200 mm)色谱柱上分离了布洛芬的对映体; HPLC的流动相为: 甲醇-水-磷酸(70:30:0.2), 紫外检测波长:

490 nm, 荧光检测器: EX=490 nm, EM=540 nm

关键词 布洛芬; NBD-(L)-Apy; 手性拆分; RP-HPLC

布洛芬(ibuprofen)是常用的非甾体抗炎药, 其分子属于芳基烷酸类, 含有手性碳原子, 该药的对映异构体在药效、毒性和动力学性质上存在很大差异, 据报道有采用手性拆分试剂^[1~3]、手性色谱柱^[4~5]、高效毛细管电泳法拆分^[6]等方法。本文采用 NBD-(L)-Apy 进行拆分。NBD(L or R)-Apy 为新一代用于手性拆分羧酸类药物的荧光衍生化试剂, 关于该类试剂的使用已有报道^[7~10], 由于其有良好的水溶性, 衍生物较为稳定, 体液中的内源性物质无干扰, 荧光特性和试剂稳定性均优于丹酰氯类衍生化试剂。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器

HP1100高效液相色谱仪, RF-530荧光检测器, CR-6A色谱数据处理机。

1.1.2 试剂

右旋布洛芬对照品(美国 Alderich 化学公司), 4-nitro-7-(3-(L)-amino pyrrolidine)-2,1,3-benzoxadiazole(NBD-(L)-Apy): 日本东京化成工业株式会社, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride(EDC): 日本半井化学药品株式会社。

1.2 色谱条件

1.2.1 色谱柱和流动相

色谱柱: Hypersil BDS 5 μ m ID 4.6 mm×200 mm, 流动相: 甲醇-水-磷酸(70:30:0.2), 流速: 1.0 ml/min。上述色谱条件下右旋和左旋衍生物的保留时间分别为 11.1 min 和 15.1 min, 两者可达基线分离($R_s > 5$)。

1.2.2 测定波长的选择

在二极管阵列检测器上, 可观察到未反应完的衍生化试剂在 342 nm 和 490 nm 波长处有最大吸收, 右旋和左旋衍生物的最大吸收均为 355 nm 和 490 nm, 490 nm 波长处的吸收强度约为 355 nm 波长处吸收强度的 3 倍, 故选择 490 nm 为测定波长。衍生产物的吸收光谱见图 1。将反应完全的样品在荧光分光光度计上扫描, 其最大激发波长为 490 nm, 最大发射波长为 540 nm, 故选择荧光检测器: $\lambda_{ex}=490$ nm, $\lambda_{em}=540$ nm。

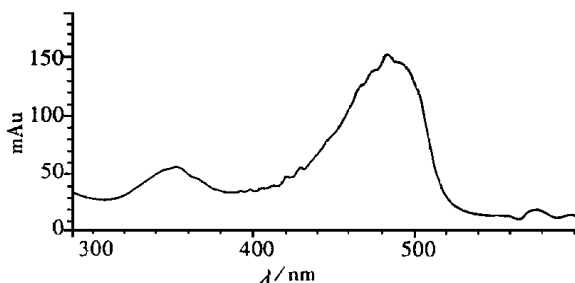


Fig 1. UV absorbance profiles of derivative

1.3 衍生条件的选择

1.3.1 衍生物反应与时间的关系

在 1 ml具塞试管中加入 100 μ g/ml布洛芬溶液 200 μ l, 20% 吡啶溶液 50 μ l, 0.5 mol/L EDC水溶液 100 μ l, NBD-(L)-Apy 溶液 150 μ l,再加入 50%乙腈水溶液,使最终体积为 600 μ l,混匀,放置于暗处,间隔一定时间进样,记录放置时间和峰面积,当放置 4 h后,峰面积基本稳定,测定结果见表 1

Tab 1. Derivative reaction vs time profiles

Derivation time	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Peak Area(1) (μ V $\cdot$ s)	152361	269321	321621	342624	340929	349167
Peak Area(2) (mAU $\cdot$ S)	1537.0	2654.1	3215.0	3498.6	3526.7	3518.4

(1) is fluorescent detector, (2) is ultraviolet detector.

上述结果表明: 在样品放置 4 h后,峰面积基本稳定,实际测定时放置 5 h

1.3.2 催化剂浓度对衍生化反应的影响

方法同上,催化剂 EDC的加入量为 0~ 100 μ l,当 EDC的加入量达到 80 μ l时,衍生速度已达最大,衍生速度与催化剂浓度的关系见表 2

上述结果表明: 当 EDC的加入量达到 80 μ l时,衍生化的速度已达最大,实际测定时,加入 100

μ l的 EDC

Tab 2. EDC concentration vs effect of derivative reaction

EDC	20 μ l	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
Peak Area(1) (μ V $\cdot$ s)	188872	248663	298632	341218	340929
Peak Area(2) (mAU $\cdot$ S)	1912.36	2446.33	2945.67	3498.55	3510.18

(1) is fluorescent detector, (2) is ultraviolet detector.

1.4 测定方法

供试品溶液的制备: 取右旋布洛芬适量,加 50% 甲醇制成 1 ml中含 50 μ g的溶液,取此溶液 200 μ l,置 1 ml量瓶中,加 20% 吡啶溶液 50 μ l, 0.5 mol/L 的 EDC溶液 100 μ l, 1.25 mg/ml NBD-(L)-Apy 乙腈溶液 150 μ l,室温下避光放置 5 h,即得供试品溶液

对照溶液的制备: 取消旋布洛芬适量,加入 50% 甲醇制成 2 μ g/ml的溶液,同上操作,即得对照溶液。

空白溶液的制备: 用 50% 甲醇代替样品溶液,同上操作,即得空白溶液

在上述条件下,将预试溶液进样 20 μ l,调节检测器灵敏度,使布洛芬峰为记录满刻度的 10%~ 20%,然后分别进样 20 μ l,结果见图 2

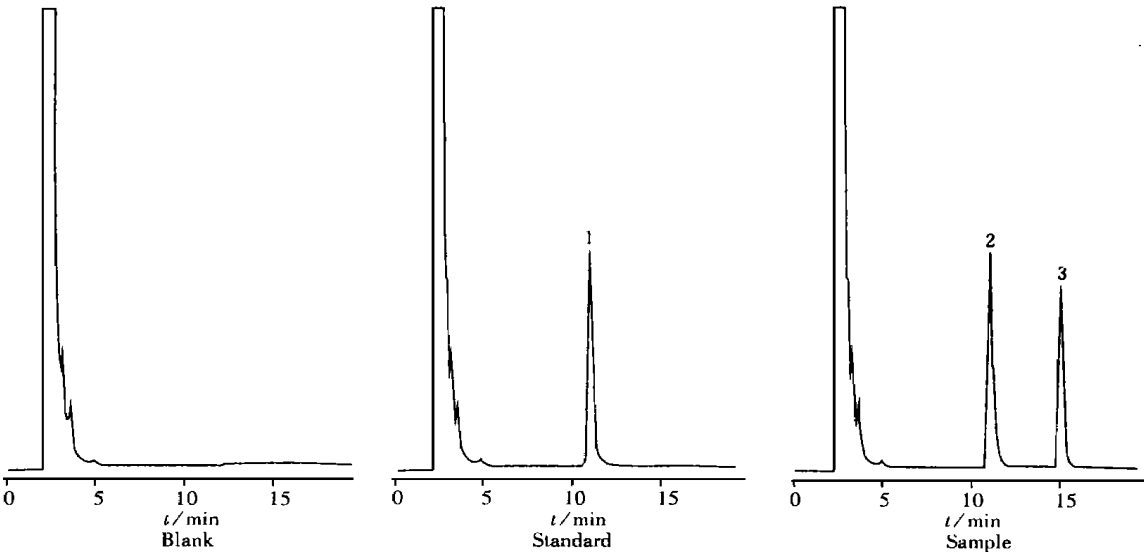


Fig 2 Chromatograms of blank, standard and sample
1 S-(+)-ibuprofen; 2 S-(+)-ibuprofen; 3 R-(-)-ibuprofen

1.4 检出限度

1.4.1 紫外检测器

布洛芬对照溶液的浓度为 2 μ g/ml,按左旋体和右旋体为 1: 计算,左旋异构体浓度为 1 μ g/ml,

峰面积为 75, 仪器设定的最小峰面积为 10, 最小检出量为 $0.133 \mu\text{g/ml}$, 检出限度 0.26%。

1.4.2 荧光检测器

布洛芬对照溶液的浓度为 $2 \mu\text{g/ml}$, 检测器衰减为 32, 按左旋体和右旋体为 1:1 计算, 左旋异构体浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$, 峰面积为 66600, 仪器设定的最小峰面积为 500, 在此条件下最小检出量为 $0.0075 \mu\text{g/ml}$, 检出限度 0.015%。

上述结果表明: 荧光检测器的灵敏度比紫外检测器的灵敏高。

1.5 不同异构体在检测器上的响应

取用消旋体制成的溶液, 进样 $10 \mu\text{l}$, 分别记录在紫外检测器和荧光检测器上的响应值, 计算右旋体响应值和左旋体响应值之比, 在紫外检测器上两者响应值之比为 1:0.999 ($n=6$), 说明两者紫外吸收响应值基本相同, 在荧光检测器上两者响应值之比为 1:0.916 ($n=6$), 说明在上述条件下, 右旋体荧光强度高于左旋体。

3 讨论

在流动相中加入少量的酸, 可使峰形得到很大的改善^[7-10]。当用 NBD-(R)-Apy 作衍生化试剂时, 左旋体衍生物与右旋体衍生物出峰次序相反。

参考文献

1 Kindy S, Santa T, Fukushima T. 1-(5-Dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl)-(S)-3-aminopyrrolidine (DNS-Apy) as a fluorescence chiral labelling reagent for carboxylic acid enan-

tiomers. *Carcinogenesis*, 1997, **18**(3): 485

2 Hayamizu T, Kudoh S, Nakamura H. Methylated nepsilon-dansyl-L-lysine as a fluorogenic reagent for the chiral separation of carboxylic acid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, **710**(1-2): 211

3 Steijger OM, Kamminga DA, Lingeman H. An acridinium sulphonylamide as a new chemiluminescent label for the determination of carboxylic acids in liquid chromatography. *J Biolumin Chemilumin*, 1998, **13**(1): 31

4 Tan SC, Jackson SH, Swift CG. Stereospecific analysis of the major metabolites of ibuprofen in urine by sequential achiral-chiral high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, **701**(1): 53

5 Ducret A, Trani M, Pepin P. Chiral high performance liquid chromatography resolution of ibuprofen esters. *J Chromatogr A*, 1998, **793**(1): 165

6 张振中, 蒋红丽, 吴逸明. 高效毛细管电泳拆分布洛芬对映异构体. 中国药科大学学报, 1998, **29**(4): 278

7 缪建荣, 刘雁鸣. 柱前荧光试剂衍生生化反相高效液相色谱法测定 loxoprofen 对映体. 中国药科大学学报, 1998, **29**(4): 284

8 Toshimasa Toyooka, Mumio Ishibashi and Tadao Terao. Further studies on the resolution of carboxylic acid enantiomers by liquid chromatography with fluorescence and laser-induced fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 1993, **278**: 71

9 Toshimasa Toyooka, Mumio Ishibashi and Tadao Terao. Resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with highly sensitive laser-induced fluorescence detection. *Chromatography*, 1992, **625**: 357

10 Toshimasa Toyooka, Mumio Ishibashi and Yasushi Takeda. Precolumn fluorescence tagging reagent for carboxylic acid in high performance liquid chromatography: 4-substituted-7-aminoalkylamino-2, 1, 3-benzoxadiazoles. *Chromatography*, 1991, **588**: 61

Fluorescence Tagging of Ibuprofen and Its Separation by RP-HPLC

Liu Yanming, Miao Jianrong, Wang Wentao, Tan Fengmen

Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001

Abstract A new method is developed to separate of ibuprofen by reversed-phase high performance liquid chromatography with derivatized 4-nitro-7-(3-(L)-amino pyrrolidine)-2, 1, 3-benzoxadiazole as chiral selector on a Hypersil BDS column and with a mobile phase of methanol, water and phosphoric acid (70:30:0.2), and with a ultraviolet detector the wavelength was 490 nm, if a fluorescent detector the excitation wavelength was 490 nm, and the emission wavelength 540 nm. This method can be used to determine ibuprofen in plasma.

Key words Ibuprofen; NBD-(L)-Apy; Chiral separation; RP-HPLC