

手性 HPLC 法测定布洛芬立体选择性酯化的转化率和对映体过量

谢渝春 刘会洲 陈家镛

(中国科学院化工冶金研究所分离科学与工程青年实验室 北京 100080)

提 要 以脂肪酶在正己烷中催化消旋布洛芬与正丁醇的立体选择性酯化反应为例,研究了用手性 HPLC 法进行分析时产物及底物的峰面积变化与转化率的关系,确定了布洛芬丁酯与未反应布洛芬的峰面积-浓度响应因子的比值,从而可通过一次进样用峰面积直接测定布洛芬的转化率和对映体过量。

关键词 手性高效液相色谱法,布洛芬,转化率,对映体过量

分类号 O658/R9

1 前言

α -芳基丙酸是重要的非甾体抗炎药,在 α -碳原子上有一个不对称的手性中心,这类药物的活性主要来自(+)-S-对映体^[1]。布洛芬[(R, S)-2-(4-异丁基苯基)-丙酸]是其中重要的一种,目前仍以消旋体的形式出售。在研究制备 S-布洛芬方面,除用不对称合成^[2]等方法外,脂肪酶催化的消旋布洛芬酯的水解^[3]和在有机溶剂中布洛芬与醇的酯化^[4]等立体选择性过程近来也受到高度重视。在对拆分过程进行条件优化特别是在进行动力学研究时,需要监测转化率和对映体过量随时间的变化进程。手性 HPLC 法无疑是完成这类分析的有力手段,但大多通过(内标或外标)标准曲线对反应物或产物进行定量。实际上,在检测器的线性范围内,结合质量守恒定律可以通过产物和底物的峰面积归一化求出转化率。这时,唯一需要事先确定的是产物和底物的峰面积-浓度响应因子的比值,文献[5]就用这种“自归一化法”测定了萘普生对映体的转化率。鉴于此法的快捷性和准确性,我们以皱落假丝酵母(*Candida rugosa*)脂肪酶在正己烷中催化消旋布洛芬与正丁醇的酯化反应为例,在 Regis(S, S) Whelk-01 柱^[6]上研究了用这种方法分析布洛芬的拆分过程。

2 自归一化法原理

在紫外检测器的线性范围内,峰面积 A 与各组

分的浓度呈正比,而反应物和产物的总摩尔浓度在反应进程中是守恒的,因此转化率 c 可表示为

$$c = A_e / [A_e + (f_e/f_R)A_R + (f_e/f_S)A_S] \quad (1)$$

其中 f 为峰面积-摩尔浓度响应因子,下标 i, e, R, S 分别表示布洛芬、酯和不同对映体。

由于在本实验条件下产物酯的对映体分不开,所以两个酯对映体只有一个峰。这样,只要能够得到产物与底物的响应因子之比,就可通过式(1)用峰面积直接计算转化率。

3 实验部分

3.1 仪器

HP-1090 高效液相色谱仪, HP-A. 04. 01 色谱工作站。

3.2 色谱条件

Regis(S, S) Whelk-01 手性柱,流动相为正己烷-异丙醇-乙酸-三乙胺(15: 85: 0.2: 0.05),流速为 0.4 mL/min,测定波长为 UV 254nm。

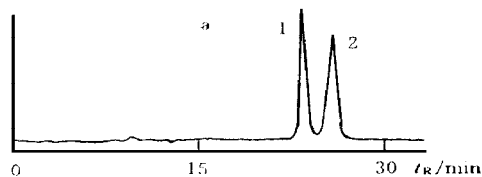
3.3 材料

消旋布洛芬和皱落假丝酵母脂肪酶(type VII, 835 Sigma 活力单位/毫克固体,在 103°C 下用失重法测得含水量为 6.9%) 购自 Sigma 公司,色谱纯正己烷和异丙醇购自天津四友公司,色谱纯乙酸、分析纯丁醇和三乙胺购自北京试剂公司。

3.4 消旋布洛芬的立体选择性酯化

在数个 15mL 小瓶中,分别加入含布洛芬(5g/L, 24mmol/L)、正丁醇(5mL/L, 54.7mmol/L)

的正己烷溶液 5 mL, 在 1 ~ 20 g/L 的酶浓度范围内加入不同量的脂肪酶后密封, 放入 40°C 恒温水浴摇床中反应, 转速 150 r/min。经一定时间后得到不同转化率的样品, 酶浓度大的体系转化率相应较大。取 50 μ L 样品在室温下将溶剂蒸干, 然后用流动相定容至 1 mL 进样分析。用溶于流动相的已知浓度的消旋



布洛芬作外标, 测定反应液中未反应布洛芬对映体的浓度, 根据各对映体浓度的减少确定转化率和底物的对映体过量。

4 实验结果和讨论

4.1 布洛芬对映体及酯的色谱分离

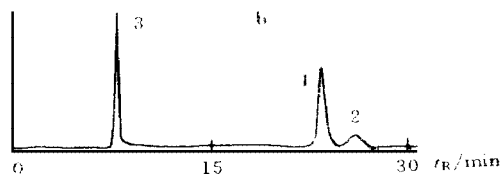


图 1 消旋布洛芬对映体(a)、布洛芬对映体和布洛芬丁酯(b)的色谱分离

Fig. 1 Separation of (a) enantiomers of racemic ibuprofen, (b) *n*-butyl ibuprofen ester and the unreacted ibuprofen enantiomers

1. R-布洛芬, 2. S-布洛芬, 3. (R+S)-布洛芬正丁酯。

1. R-ibuprofen, 2. S-ibuprofen, 3. (R+S)-*n*-butyl ibuprofen ester.

布洛芬对映体和布洛芬丁酯的分离如图 1 所示, 用对映体的分离度足以精确地测定对映体的纯度。布洛芬丁酯的对映体在本实验条件下分不开, 用色谱图上的峰面积通过式(1)只能直接计算总转化率 c , 但在底物的对映体纯度 ee_i 已知的情况下, 酯的对映体纯度 ee_e 可以通过 $c = ee_i/(ee_i + ee_e)$ 计算。

4.2 消旋布洛芬外标标准曲线

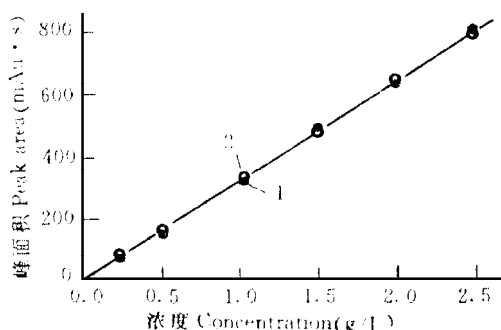


图 2 消旋布洛芬作外标的布洛芬对映体标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of ibuprofen enantiomers with racemic ibuprofen as external standard

1. R-对映体, 2. S-对映体。

1. R-isomer, 2. S-isomer.

图 2 是用消旋布洛芬作外标的各对映体峰面积(mAu \times s)-浓度(g/L)标准曲线, 显然, 两对映体的标准曲线是重合的, 即 $f_R = f_S = f_i$, 经回归分析的相关系数分别为 0.999 8 和 0.999 5。因此, 在经过立体选择性酯化以后, 未反应底物的对映体过量 ee_i

可通过 A_R 和 A_S 直接计算:

$$ee_i = (A_R - A_S)/(A_R + A_S) \quad (2)$$

4.3 f_e/f_i 的实验确定 (两种方法)

第一种方法, 将式(1)写成如下形式:

$$c^{-1} - 1 = (f_e/f_i)[(A_R + A_S)/A_e] \quad (3)$$

用外标法测定各样品的转化率 c , 再将 $(A_R + A_S)/A_e$ 对 $(c^{-1} - 1)$ 作图, 得到一条斜率为 1 的直线 (如图 3 所示), 由式(3)得 $f_e/f_i = 1$ 。

第二种方法, 用和样品反应前浓度相同的消旋布洛芬正己烷溶液与已知转化率为 c_0 (51.76%, 外标法测定) 的反应液按体积比 m/n (1/20, 1/10, 1/5, 1/2, 1/1, 2/1, 5/1) 混合, 则混合后样品的转化率为 $c = c_0/(1 + m/n)$, 但该样品的转化率同样可根据其色谱图由式(1)计算, 因此下式成立:

$$c_0^{-1}(1 + m/n) - 1 = (f_e/f_i)[(A_R + A_S)/A_e] \quad (4)$$

图 4 是这些混合样品的 $(A_R + A_S)/A_e$ 随 $(1/c_0)(1 + m/n) - 1$ 的变化关系, 也是一条斜率为 1 的直线, 由式(4)得 $f_e/f_i = 1$ 。因此, 布洛芬丁酯和布洛芬的峰面积-浓度响应因子相等, 即酯化反应引入的丁基不影响 UV 254nm 的吸收, 这个结果有望能够用于布洛芬与其它烷基醇的酯化。

上述反应液混合前底物的 ee_i [由式(2)计算] 为 90.47%, 与不同体积比的消旋布洛芬混合 (相当于加标) 后各样品 ee_i 的计算值为 $[n/(m + n)] \times 90.47%$, 各混合样品进样后由式(2)测定的 ee_i 对其计算值的平均回收率为 99.8%, RSD 为 1.6%。

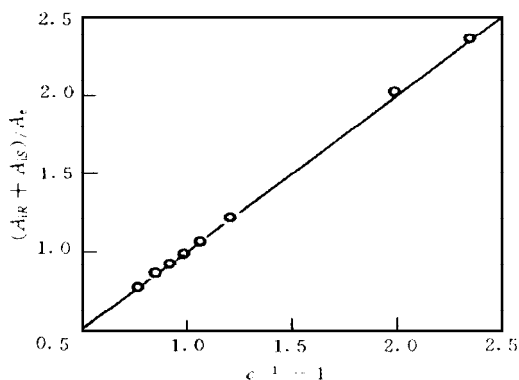


图3 未反应布洛芬和布洛芬丁酯的峰面积比 $(A_R + A_S)/A_e$ 与 $(c^{-1} - 1)$ 的关系

Fig. 3 Variation of the area ratio of unreacted ibuprofen to ibuprofen butyl ester $(A_R + A_S)/A_e$ against $(c^{-1} - 1)$

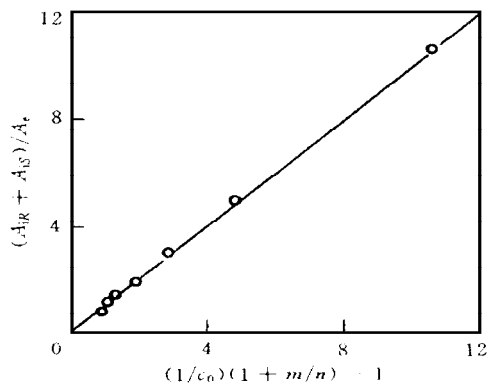


图4 改变消旋布洛芬溶液与转化率为 c_0 的反应液混合体积比 m/n 时 $(A_R + A_S)/A_e$ 与 $[(1/c_0)(1 + m/n) - 1]$ 的关系

Fig. 4 Variation of $(A_R + A_S)/A_e$ against $[(1/c_0)(1 + m/n) - 1]$ at different volume ratio m/n

参 考 文 献

- Hutt A J, Caldwell J. Clin Pharmacokin, 1984, 9: 371-379
- Sonawane H R, Bellur N S, Ahuja J R et al. Tetrahedron: Asymmetry, 1992, 3: 163-192
- Sih C J, Gu Q M, Fulling G, Wu S H, Reddy D R. Dev Ind Microb, 1988, 29: 221-229
- Arroyo M, Sinisterra J V. J Org Chem, 1994, 59: 4410-4417
- Tsai S W, Wei H J. J Liq Chromatogr, 1993, 16: 2993-3001
- Pirkle W H, Welch C J. J Liq Chromatogr, 1992, 15: 1947-1955

Chiral HPLC Determination of Conversion and Enantiomeric Excess of Enzyme Catalyzed Stereoselective Esterification of Racemic Ibuprofen

Xie Yuchun, Liu Huizhou and Chen Jiayong

(Young Scientist Lab. of Separation Science & Engineering, Institute of Chemical Metallurgy, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Abstract In the study of enzyme catalyzed kinetic resolution of racemates, it is imperative to assay how the optical yield varies with chemical conversion. In this paper, a method using one-time injection to determine enantiomeric excess and conversion of the stereoselective esterification of racemic ibuprofen with *n*-butanol catalyzed by lipase was developed with a commercially available HPLC CSP column Regis(S, S) Welch-01. In the linear range of detector, all peak areas of products and substrates are proportional to their concentrations. Because the total mole concentration remains unchanged (equal to the initial value of ibuprofen) in the reaction process, the conversion could be calculated from the peak areas, provided the ratio of response factors was known. The calibration curves of two ibuprofen enantiomers with racemic ibuprofen as external standard were overlapped, indicating $f_R = f_S$. By investigating the variation of peak areas of products and substrates against conversion (determined by external standard), the ratio of peak area-concentration response factor of ibuprofen butyl ester to that of unreacted ibuprofen was determined to be 1 through linear regressions, from which the conversion could be directly determined by the self normalization of the peak areas. With a mobile phase of IPA/hexane/HAc/triethylamine (15/85/0.2/0.05, V/V, flow rate 0.4 mL/min), the resolution of ibuprofen enantiomers was sufficient for precise enantiomeric purity determination.

Key words chiral high performance liquid chromatography, ibuprofen, conversion, enantiomeric excess