

Л. Д. Аснин

МИКРОПРЕПАРАТИВНОЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНАНТИОМЕРОВ НАПРОКСЕНА

Институт технической химии УРО РАН, Пермь, Россия

Изучена возможность хроматографического микропрепаративного разделения энантиомеров напроксена из рацемической смеси на хиральной неподвижной фазе Chiralcel OJ-H. Определены оптимальные условия разделения. Показано, что для одновременного выделения обоих энантиомеров следует использовать схему сбора фракций с промежуточным участком между точкой минимума и максимумом второго пика. В этом случае с использованием стандартной аналитической колонки можно добиться получения за один цикл по $\approx 0,12$ мг (*S*)- и (*R*)-напроксена с чистотой 99,4 и 94,5 % соответственно.

Профены — производные 2-арилметилпропионовой кислоты, представителем которых является напроксен (2-(6'-метокси-2'-нафтил)пропионовая кислота), обладают противовоспалительными и анальгетическими свойствами. Благодаря наличию хирального атома углерода в α -положении к карбоксильной группе они могут существовать в виде 2 оптических изомеров. Фармакологическая активность профенов связана с (*S*)-(+)-изомером [1, 2], тогда как активность (*R*)-(-) формы либо существенно ниже, либо отсутствует; в некоторых случаях (*R*)-изомер проявляет нежелательные побочные эффекты [3]. Таким образом, в лекарственных формах предпочтительно использование чистого (*S*)-энантиомера. В то же время в клинических и биохимических исследованиях требуются оба энантиомера. Особенно интерес к (*R*)-изомеру возрос после обнаружения явления оптической инверсии ($R \rightarrow S$) профенов в живых организмах [2].

Прямое хроматографическое разделение энантиомеров на хиральных неподвижных фазах (ХНФ) широко используется в аналитических целях в фармацевтическом производстве, при изучении фармакокинетики и метаболизма хиральных веществ [4]. Однако этот метод может быть использован и для препаративного получения чистых энантиомеров [5]. В случае миллиграммовых количеств разделение может быть осуществлено в лабораторных условиях на стандартных аналитических колонках.

Число работ, посвященных препаративному получению энантиомеров профенов, невелико [6 – 11]. Полупрепаративному разделению рацемического напроксена посвящена работа [11]. Используя ХНФ (S,S) Whelk O1, удалось осуществить разделение до нулевой линии 12,6 мг рацемической смеси. Других упоминаний о препаративно-хроматографическом разделении напроксена нами не обнаружено.

Представленная работа посвящена выделению энантиомеров напроксена с помощью полисахаридной ХНФ Chiralcel OJ-H. Подобная колонка применялась для препаративного энантиоразделения кетопрофена [6, 7]. Сообщалось, что коэффициент энантиоселективности по отношению к кетопрофену и ибупрофену может достигать значений 1,43 и 1,41 соответственно

при правильном выборе подвижной фазы [12]. К достоинствам полисахаридных фаз можно также отнести их высокие технологические характеристики [13].

Экспериментальная часть

Работу выполняли на хроматографе “Agilent 1100” с диодно-матричным детектором, оснащенным термостатированными колонками, автоматическим дозатором и насосом с задатчиком градиента низкого давления. Использовали колонку Chiralcel OJ-H (4,6 × 250 мм) фирмы Daicel. Температура колонки в препаративных экспериментах составляла 22 °С, при последующем анализе состава фракций — 18 °С для достижения более высокого разрешения пиков. В качестве элюента служили смеси гексана с этанолом с добавкой трифторуксусной кислоты (ТФУ). Подачу элюента осуществляли при помощи задатчика градиента из 2 емкостей, в одной из которых находился раствор ТФУ в гексане, во второй — этанол. Скорость потока элюента 1 мл/мин. Гексан (ч. д. а) и энантиомеры напроксена фирмы “Sigma Aldrich” использовали без дополнительной очистки, ТФУ (ч.) очищалась перегонкой, этанол (высш. оч.) осушался перегонкой над СаО. Рацемическая смесь готовилась смешением рабочих растворов чистых (*S*)- и (*R*)-энантиомеров в элюенте с концентрацией 9,8 г/л, что на ≈ 10 % ниже концентрации насыщенного раствора. Такая мера предосторожности принята для предотвращения выпадения осадка напроксена в соединительных линиях и узлах хроматографа.

Подбор условий разделения выполняли при 25 °С для сокращения времени анализа. В качестве критерия качества разделения использовали коэффициент энантиоселективности, который рассчитывали по формуле:

$$\alpha = (t_2 - t_0)(t_1 - t_0),$$

где t_1 и t_2 время выхода первого элюируемого и второго элюируемого энантиомера соответственно, t_0 — “мертвое” время, определяемое по времени выхода пика элюента.

Увеличение доли этанола в подвижной фазе от 10 до 20 об. % вызывало снижение времени выхода в $\approx 1,7$ раз, при этом α практически не изменялся, сохра-

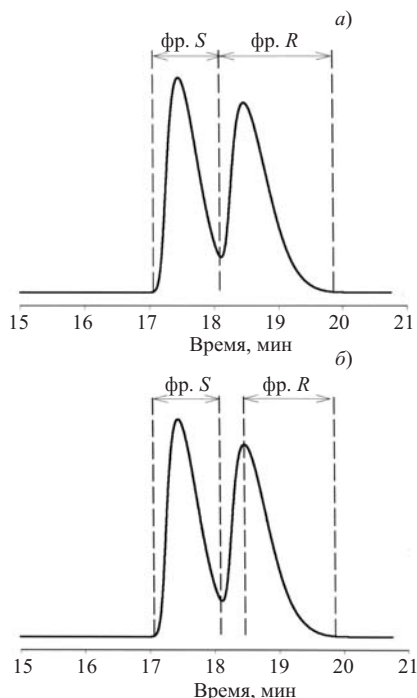


Рис. 1. Схемы сбора фракций при препаративном разделении энантиомеров напроксена; (а) схема 1, (б) схема 2; фр. S — фракция (S)-напроксена; фр. R — фракция (R)-напроксена.

няя значение 1,06. Дальнейшее увеличение доли спирта в элюенте, желательное для повышения скорости процесса, было невозможно вследствие достижения предельного для данной колонки значения входного давления (50 атм). Увеличение доли ТФУ с 0,1 до 0,4 об. % не влияло заметно на время выхода, но вело к уменьшению α до значений 1,04 – 1,05. На основании приведенных данных для дальнейших исследований был выбран состав подвижной фазы гексан — этанол — ТФУ (79,9:20:0,1).

Препаративное разделение осуществляли по 2 схемам. В первой схеме участок хроматограммы рацемической смеси, содержащий пики целевых компонентов, делился на 2 части (фракции) как показано на рис. 1, а. Во второй схеме, представленной на рис. 1, б, второй пик делился на 2 части; целевой фракцией считался участок от максимума до конца пика. Промежуточная фракция — от точки минимума между пиками до максимума второго пика — может быть собрана для повторного обогащения. Каждая фракция собира-

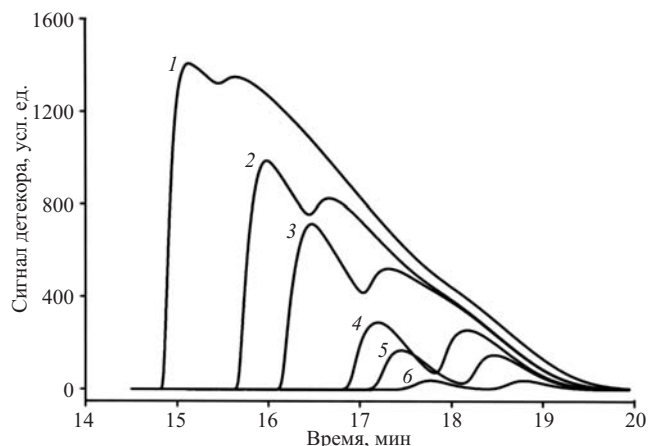


Рис. 2. Хроматограммы рацемического напроксена. Объем пробы: (1) 100 мкл, (2) 50 мкл, (3) 30 мкл, (4) 10 мкл, (5) 5 мкл и (6) 1 мкл.

лась в отдельную емкость, переключение между емкостями осуществлялось вручную; момент переключения определялся с точностью 0,04 мин (0,04 мл). Каждый эксперимент повторялся не менее двух раз.

Результаты и их обсуждение

Хроматограммы рацемических смесей различного объема приведены на рис. 2. Хорошо видно, что с увеличением объема пробы ложбина между пиками исчезает. Как видно из данных табл. 1, это не приводит к заметному ухудшению качества фракции (S)-напроксена, но сопровождается уменьшением выхода энантиомера. Поскольку теоретический выход составляет половину от массы рацемической смеси, то для пробы объемом 1 мкл выход составляет 96 %, а для пробы 100 мкл только 46 %. Фракция (R)-напроксена, собранная по схеме 1, сильнее загрязнена вторым энантиомером. Так, относительно чистый (R)-изомер может быть собран при объеме пробы менее 5 мкл, что соответствует загрузке рацемата 0,012 г/мл объема колонки. Отсюда легко рассчитать с помощью данных табл. 1, что для получения 1 мг (R)-напроксена (чистота 94 %) за 1 цикл требуется колонка диаметром 29 мм.

Тот факт, что даже при слабом разделении пиков фракция (S)-напроксена сохраняет высокую оптиче-

Т а б л и ц а 1

Результаты препаративного разделения рацемического напроксена по схеме 1

Объем пробы, мкл	Загрузка, мг	Фракция (S)-напроксена				Фракция (R)-напроксена			
		объем, мл	(S), %	масса S, мг	масса R, мг	объем, мл	(R), %	масса S, мг	масса R, мг
1	0,0098	1,16	95,7	0,0047	0,0002	1,48	95,4	0,0002	0,0047
5	0,049	1,06	99,1	0,0230	0,0002	1,83	94,1	0,0015	0,0243
10	0,098	1,04	100	0,0450	0,0000	2,01	92,5	0,0040	0,0490
30	0,294	0,96	99,4	0,1212	0,0007	2,82	84,8	0,0262	0,1460
50	0,49	0,77	100	0,1449	0,0000	3,32	71,0	0,1001	0,2450
100	0,98	0,64	98,0	0,2260	0,0046	4,38	63,3	0,2750	0,4744

Таблица 2
Результаты препаративного разделения рацемического напроксена по схеме 2*

Объем пробы, мкл	фракция (<i>R</i>)-напроксена**			
	объем, мл	(<i>R</i>), %	масса <i>S</i> , мг	масса <i>R</i> , мг
5	1,43	96,2	0,0009	0,0229
10	1,58	100,0	0,0000	0,0366
30	2,57	94,5	0,0071	0,1227
50	3,05	84,3	0,0404	0,2169
100	4,32	70,6	0,1924	0,4620

* Состав фракции (*S*)-напроксена идентичен приведенному в табл. 1.

** От максимума второго пика до конца пика.

скую чистоту, свидетельствует об остром фронте индивидуальной кривой элюирования (*R*)-изомера, который соприкасается, но практически не перекрывается с зоной первого элюируемого компонента. В [6] с использованием метода численного моделирования было доказано, что подобная ситуация наблюдается при разделении энантиомеров кетопрофена на аналогичной хиральной колонке. Причем хвост первого компонента на хроматограмме смеси размыт значительно сильнее, чем при элюировании чистого энантиомера, и существенно перекрывается с пиком второго энантиомера. Следствием этого и является низкая чистота второй элюируемой фракции. Смещение точки начала сбора этой фракции, очевидно, приведет к уменьшению доли оптического антипода в элюате. Это демонстрируют результаты экспериментов, выполненных по схеме 2 (табл. 2). При загрузке 0,294 мг (объем пробы 30 мкл) на данной колонке удается выделить 0,13 мг продукта с содержанием (*R*)-напроксена 94,5 %.

Таким образом, аналитическая хиральная колонка Chiralcel OJ-H может быть использована для микро-препаративного получения энантиомеров напроксена из рацемической смеси. Производительность по (*S*)-энантиомеру выше, чем по (*R*)-форме за счет боль-

шей допустимой загрузки. Кроме напроксена на указанной ХНФ возможно разделение кетопрофена, ибупрофена и большого числа других хиральных соединений [12]. Универсальность колонки является привлекательным качеством в лабораторной практике, поскольку позволяет решать большое число исследовательских задач, имея ограниченный набор колонок, что было продемонстрировано на примере получения энантиомерно чистых веществ для доклинических испытаний с помощью набора из 11 колонок, включающего Chiralcel OJ [14].

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (06-03-32515) и Президента РФ (МК-6357.2006.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. F. Jamali, R. Mehvar, and F. M. Pasutto, *J. Pharm. Sci.*, **78**(9), 695 – 715 (1989).
2. R. Mullangi, M. Yao, N. R. Srinivas, *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 423 – 434 (2003).
3. P. A. Todd, S. P. Clissold, *Drugs*, **40**, 91 – 137 (1990).
4. A. M. Krsutlovic, *Chiral separation by HPLC: Applications to pharmaceutical compounds*, John Wiley & Sons, New York (1989).
5. S. Andersson, S. G. Allenmark, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **54**, 11 – 23 (2002).
6. F. Charton, M. Bailly, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **687**, 13 – 31 (1994).
7. F. James, M. Sepulveda, F. Charton, et al., *Chem. Eng. Sci.*, **54**, 1677 – 1696 (1999).
8. S. Alcaro, I. D'Acquarica, F. Gasparri, et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, **13**, 69 – 75 (2002).
9. J. M. Maitre, G. Boss, B. Testa, and K. Hostettmann, *J. Chromatogr.*, **356**, 341 – 345 (1986).
10. S. Peper, M. Lübbert, M. Johannsen, and G. Brunner, *Sep. Sci. Technol.*, **37**, 2545 – 2566 (2002).
11. Ch. J. Welch, *Chem. New Zealand*, **57**, 9 – 10 (1993).
12. Y. Tang, *Chirality*, **8**, 136 – 142 (1996).
13. F. Charton, S. C. Jacobson, G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **630**, 21 – 35 (1993).
14. T. D. Nelson, Ch. J. Welch, J. D. Rosen, et al., *Chirality*, **16**, 609 – 613 (2004).

Поступила 18.12.06

MICRO-PREPARATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF NAPROXEN ENANTIOMERS

L. D. Asnin

Institute of Technical Chemistry, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Chromatographic micro-preparative separation of a racemic mixture of naproxen enantiomers using a chiral stationary phase of Chiralcel OJ-H has been studied. Optimum conditions for the separation have been found. It is shown that a special fraction collection scheme involving an intermediate region between the minimum between peaks and the maximum of the second peak should be used for the simultaneous recovery of both enantiomers. In this case, 0.12 mg of *S*- and 0.12 mg of *R*-naproxen with a purity of up to 99.4 and 94.5%, respectively, can be isolated in one run using the standard analytical column.