

doi: 10.12452/j.fxcxb.26072904

超临界流体色谱法分离氟比洛芬手性化合物

程超^{1,2}, 池江浩^{1,2}, 郭秀英^{1,2}, 李慧杰^{1,2}, 肖观连^{1,2}, 刘洁^{2,3},
高家乐^{2,3}, 李月婷^{1,2*}, 肖红斌^{2,3*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学 中药分析与转化研究中心, 北京 100029; 3. 北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029)

摘要: 建立一种快速、高效的氟比洛芬超临界流体色谱手性分离方法, 探讨不同手性固定相的分离机制。考察了氟比洛芬对映体在3种多糖基手性固定相(DAICEL CHIRALPAK IC, IC柱; DAICEL CHIRALPAK AS-H, AS-H柱和DAICEL CHIRALPAK IB, IB柱)上的分离情况, 发现氟比洛芬对映体在IC柱可于6 min内实现氟比洛芬对映体的完全分离($R_s=1.83$), 另外两个色谱柱分离效果较差(AS-H柱 $R_s=0.81$, IB柱 $R_s=0.65$); 相同流动相条件下, 氟比洛芬对映体在3种固定相上的洗脱顺序为IC柱>AS-H柱>IB柱, 且出峰顺序均为R型先出峰。分子对接计算结果表明: 氟比洛芬对映体与3种固定相平均结合能大小分别为 -6.40 ± 0.10 kcal mol⁻¹ (R型, IC柱)、 -6.77 ± 0.06 kcal mol⁻¹ (S型, IC柱)、 -6.83 ± 0.06 kcal mol⁻¹ (R型, AS-H柱)、 -7.03 ± 0.12 kcal mol⁻¹ (S型, AS-H柱)、 -7.43 ± 0.06 kcal mol⁻¹ (R型, IB柱)、 -7.57 ± 0.12 kcal mol⁻¹ (S型, IB柱), 结合能高的保留时间更短; 同一固定相与R/S对映体的平均结合能差值分别为0.37 kcal mol⁻¹ (IC柱)、0.20 kcal mol⁻¹ (AS-H柱)、0.13 kcal mol⁻¹ (IB柱), 结合能差值大的分离效果更好, 其中决定R/S对映体结合能大小差异的主要分子间作用力为 $\pi-\pi$ 堆积及氢键作用力。进一步采用优化后的手性分离方法对市售氟比洛芬样品进行对映体拆分及含量测定, 其中氟比洛芬的含量范围为39.24~41.72 mg/片, 与HPLC方法的含量测定结果具有一致性, 符合规定。本研究建立的氟比洛芬超临界流体色谱手性分离方法及其分离机制的探讨为其进一步质量控制提供了技术支撑。

关键词: 超临界流体色谱法; 氟比洛芬; 对映体分离; 分子对接; 手性分离机制; 含量测定

中图分类号: O657.7; R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-12

Separation of Flurbiprofen Chiral Compounds by Supercritical Fluid Chromatography

CHENG Chao^{1,2}, CHI Jiang-hao^{1,2}, GUO Xiu-ying^{1,2}, LI Hui-jie^{1,2}, XIAO Guan-lian^{1,2}, LIU Jie^{2,3}, GAO Jia-le^{2,3}, LI Yue-ting^{1,2*}, XIAO Hong-bin^{2,3}

(1. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Research Center for Chinese Medicine Analysis and Transformation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: A rapid and efficient chiral separation method for flurbiprofen using supercritical fluid chromatography (SFC) was established, and the separation mechanisms of different chiral stationary phases were investigated. The separation of flurbiprofen enantiomers on three polysaccharide-based chiral stationary phases (DAICEL CHIRALPAK IC, IC column; DAICEL CHIRALPAK AS-H, AS-H column; and DAICEL CHIRALPAK IB, IB column) was investigated. It was found that the flurbiprofen enantiomers could be completely separated within 6 minutes on the IC column ($R_s = 1.83$), while the separation performance on the other two columns was poorer ($R_s = 0.81$ for AS-H column and $R_s = 0.65$ for IB column). Under identical mobile phase conditions, the elution order of flurbiprofen enantiomers on the three stationary phases followed: IC > AS-H > IB, with the R-enantiomer always eluting first. Molecular docking calculations revealed that the

收稿日期: 2026-07-29; 修回日期: 2026-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(82173957, 82204599); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023265)

* 通讯作者: 李月婷, 博士, 讲师, 研究方向: 中药药效物质、中药新药研发, E-mail: yuetingli1111@163.com;

肖红斌, 博士, 教授, 研究方向: 药物分析、中药新药研发, E-mail: hbxiao69@163.com

网络首发日期: XXXX-XX-XX

mean binding energies of flurbiprofen enantiomers to three stationary phases were -6.40 ± 0.10 kcal mol⁻¹ (R-type, IC column), -6.77 ± 0.06 kcal mol⁻¹ (S-type, IC column), -6.83 ± 0.06 kcal mol⁻¹ (R-type, AS-H column), -7.03 ± 0.12 kcal mol⁻¹ (S-type, AS-H column), -7.43 ± 0.06 kcal mol⁻¹ (R-type, IB column), and -7.57 ± 0.12 kcal mol⁻¹ (S-type, IB column). Higher binding energy corresponds to shorter retention times. The differences in mean binding energy between the R and S enantiomers for the same stationary phase were 0.37 kcal mol⁻¹ (IC column), 0.20 kcal mol⁻¹ (AS-H column), and 0.13 kcal mol⁻¹ (IB column), respectively. A larger difference in binding energy leads to better separation efficiency. The primary intermolecular forces responsible for the differences in binding energy between R and S-enantiomers are π - π stacking and hydrogen bonding. Further, the optimized chiral separation method was employed to perform enantiomeric separation and content determination on the commercially available flurbiprofen samples. The content range of flurbiprofen was 39.24–41.72 mg per tablet, which was consistent with the results obtained by the HPLC method and in compliance with the regulations. The supercritical fluid chromatography chiral separation method for flurbiprofen established in this study and the exploration of its separation mechanism provided technical support for its further quality control.

Key words: supercritical fluid chromatography; flurbiprofen; enantiomeric separation; molecular docking; chiral separation mechanism; content determination

随着药物化学及生命科学的快速发展,具有手性中心的药物在心血管^[1]、抗炎镇痛^[2]、中枢神经系统^[3]、抗感染^{[4][5]}以及抗肿瘤^[6]等诸多治疗领域得到了广泛应用。非甾体抗炎药(Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAIDs)是一类不含甾体母核结构的抗炎镇痛药物,通过抑制炎症介质合成从而发挥作用,与甾体抗炎药相比,其无免疫抑制、激素依赖等严重不良反应,是目前临床应用最广泛的手性药物之一^{[7][8]}。氟比洛芬(图1)作为典型代表,其不同对映体在受体结合能力、药理活性、毒性反应、体内吸收与代谢过程等方面常表现出显著差异^{[9][10]},其中S构型往往被认为是主要的活性构型,而R构型的活性相对较弱,如S-氟比洛芬具有镇痛消炎的功效,而R-氟比洛芬在镇痛消炎方面几乎没有疗效^{[11][12]}。因此,建立氟比洛芬对映体手性分离方法对该药物质量控制和药理活性研究等方面具有重要意义。目前,拆分氟比洛芬对映体的方法主要有高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)^{[13][14]}、柱前衍生法(Pre-Column Derivatization, PCD)^[15]、毛细管电泳法(Capillary Electrophoresis, CE)^{[16][17]}等,其中HPLC由于技术成熟、操作简易等优点,目前仍是药物手性分离的最常用手段。然而,传统HPLC法常常存在分析时间较长、溶剂消耗量较大的劣势,与绿色分析化学强调的溶剂减量化、低环境负荷目标存在一定矛盾;同时,在使用手性衍生试剂时,柱前衍生化反应速率慢,消耗大量试剂和溶剂,且耗时较长,使得常规HPLC手性拆分成本高昂,因此需要寻找更加快捷及节省溶剂的绿色分析方法。

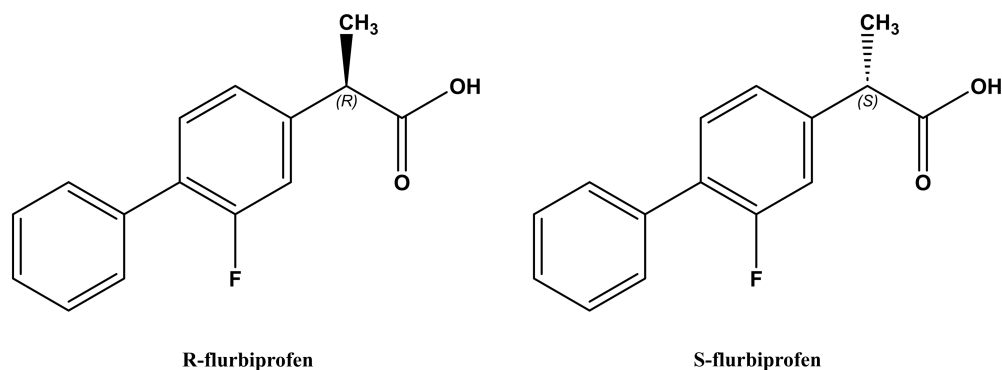


图1 氟比洛芬对映体化学结构式

Fig. 1 The chemical structures of flurbiprofen enantiomers

超临界流体色谱法(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)是一种以CO₂超临界流体为主要流动相的分离技术,目前已纳入2025年版《中国药典》^[18]。超临界CO₂具有密度大、黏度低、扩散系数大

的特点,可在较高的流速下保持较低柱压与较高的柱效,从而实现更短的分析时间^[19];同时其有机改性剂的使用量相对较少,更符合绿色分析化学的发展趋势^{[20][21]}。近年来,随着商用SFC仪器的日益成熟与研究的不断深入,SFC在手性药物^{[22][23]}、天然产物^{[24][25][26]}、药品^[27]、食品^[28]等方面的分离分析已广泛应用,尤其是在手性药物拆分方面,SFC展现了巨大的优势与应用潜力。在手性分离中,多糖基手性固定相因适用范围广、稳定性好,在其中占据了主要地位^{[29][30]},但目前多数研究对于手性分离机制探讨严重不足,不同固定相取代基对相互作用的调控规律、对映体与固定相的关键识别位点及作用力差异来源尚不明确,导致固定相的选择缺乏理论指导,仍存在较大盲目性。分子对接是研究配体与受体之间相互作用的重要工具,广泛应用于分析蛋白质与小分子、蛋白质与蛋白质及小分子与小分子之间的相互作用^{[31][32]},该方法有助于预测对映体与固定相之间形成稳定复合物的最佳构象,从而深入理解特定的对映体分离机制^{[33][34]}。

基于此,本研究以氟比洛芬为研究对象,系统考察不同多糖基手性固定相、改性剂等对两种对映体分离情况的影响,同时结合分子对接技术对氟比洛芬对映体与3种多糖基手性固定相的相互作用差异进行表征,从分子水平揭示其手性识别机制。最终构建适用于氟比洛芬对映体的SFC手性分离方法并应用于市售凝胶贴膏的含量测定,同时与HPLC法的含量测定结果进行对比,本研究以期为氟比洛芬及同类手性药物的分离测定提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器、材料和试药

Agilent 1290 Infinity 超临界流体色谱仪、Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);DAICEL CHIRALPAK IC (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、DAICEL CHIRALPAK IB (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、DAICEL CHIRALPAK AS-H (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、DAICEL CHIRALPAK AD-RH (250 mm×4.6 mm, 5 μm)手性色谱柱(大赛璐药物手性技术有限公司);Quintix65-1CN型十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器系统有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司)。

甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、甲酸、乙酸、三氟乙酸均为色谱纯(批号:F25P9M210、F25P3S205、F25PBI202、F25P8P202、2494941、253846、2562245,美国赛默飞世尔科技公司);超纯水由实验室Milli-Q超纯水仪制备;高纯CO₂(批号:SQ96516,北京双泉天缘工业气体有限公司)。

氟比洛芬外消旋对照品(批号:LH70S48,CAS号:5104-49-4,北京百灵威科技有限公司);R-氟比洛芬对照品(批号:E2317651,CAS号:51543-40-9,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);氟比洛芬凝胶贴膏3批(批号:601061、601141、601291,北京泰德制药股份有限公司)。

1.2 溶液的制备

1.2.1 系统适用性溶液 取氟比洛芬外消旋对照品适量,精密称定,加甲醇使溶解,配制成浓度为1 mg·mL⁻¹的外消旋对照品溶液,并于-4℃下避光保存,备用。

1.2.2 R-氟比洛芬对照品储备液 取R-氟比洛芬对照品适量,精密称定,加甲醇使溶解,配制成浓度为0.5 mg·mL⁻¹的溶液,并于-4℃下避光保存,备用。

1.2.3 线性对照品储备液 精密称取氟比洛芬外消旋对照品适量,加甲醇使溶解,配制成浓度均为0.4 mg·mL⁻¹的R-氟比洛芬、S-氟比洛芬的线性对照品储备液,并于-4℃下避光保存,备用。

1.2.4 供试品溶液 取氟比洛芬凝胶贴膏半片,剪碎,置具塞锥形瓶中,加入甲醇100 mL,称定重量,超声提取30 min,冷却至室温后再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.3 色谱条件

1.3.1 SFC条件 采用DAICEL CHIRALPAK IC (250 mm×4.6 mm, 5 μm)手性色谱柱,以超临界CO₂-甲醇(含0.1%乙酸)(90:10)为流动相,柱温35℃,背压130 bar,流速1.5 mL min⁻¹,进样量5 μL,检测波长230 nm。

1.3.2 HPLC条件 采用DAICEL CHIRALPAK AD-RH (250 mm×4.6 mm, 5 μm)手性色谱柱,以乙

腈-水(均含0.1%乙酸)(45:55)为流动相,柱温35℃,流速0.8 mL min⁻¹,进样量10 μL,检测波长230 nm。

2 结果与讨论

2.1 固定相的选择

2.1.1 氟比洛芬对映体在不同多糖基手性固定相上的保留行为 在SFC手性分离中,固定相往往决定了对映体识别的上限。目前,多糖基手性固定相是SFC手性分离中最常用的固定相,其通过多糖基衍生物与手性药物之间相互作用的稳定性差异以及手性药物在流动相与固定相之间的分配差异从而实现了对映体的分离。取“1.2.1”、“1.2.2”项下系统适用性溶液及R-氟比洛芬对照品储备液,考察氟比洛芬对映体在3种不同填料规格的手性色谱柱DAICEL CHIRALPAK IC、DAICEL CHIRALPAK IB、DAICEL CHIRALPAK AS-H中的分离效果及出峰顺序,实验除固定相外其余色谱条件一致(参照“1.3.1”项),结果见图2。结果显示,氟比洛芬对映体在3种色谱柱手性分离中均为R型先出峰,且采用DAICEL CHIRALPAK IC色谱柱为固定相时,出峰快、峰形良好且分离度符合要求,因此选择DAICEL CHIRALPAK IC色谱柱作为固定相。

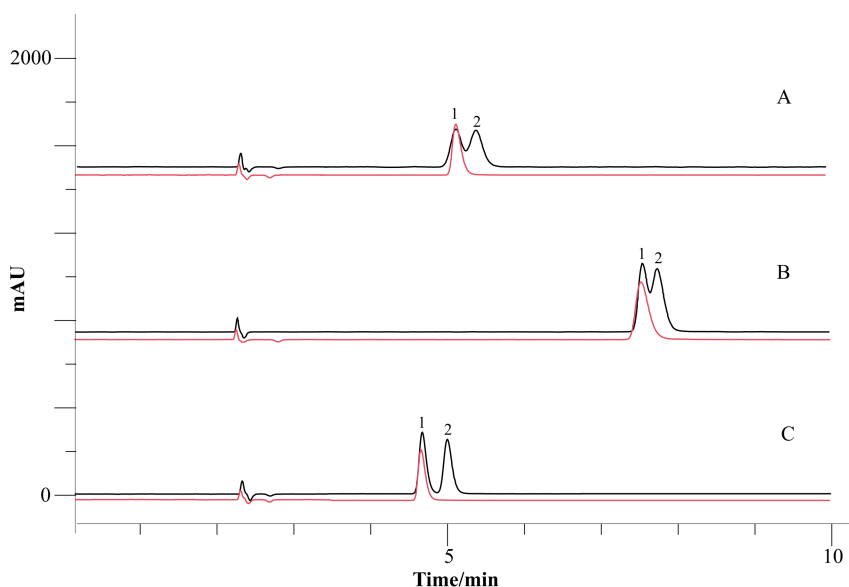


图2 氟比洛芬对映体在3种色谱柱(A: AS-H柱、B: IB柱、C: IC柱)上的色谱图(黑色色谱图: 氟比洛芬外消旋对照品、红色色谱图: R-氟比洛芬对照品)

Fig. 2 Chromatograms of flurbiprofen enantiomers on three different chromatographic columns (A: AS-H column、B: IB column、C: IC column) (black chromatogram: racemic flurbiprofen reference standard、red chromatogram: R-flurbiprofen reference standard)

1: R-氟比洛芬; 2: S-氟比洛芬

2.1.2 基于分子对接对不同多糖基手性固定相的分离机制探讨 多糖基手性固定相对手性药物的分离是基于两个对映体在固定相上形成了瞬时的“非对映体复合物”,由于多点间相互作用叠加的差异与稳定性的不同,进而导致了保留的差异^[35],这一过程是通过将对映体嵌入至固定相聚合物的沟槽内实现的。在色谱柱的选择过程中,氟比洛芬在3种手性固定相(结构式见图3)上展现出了不同的分离效果,这种差异可能是由于3种固定相苯基氨基甲酸酯上取代基种类和位置的不同而导致的:IC柱与IB柱分别在苯环的3号位与5号位取代了两个氯原子和两个甲基;AS-H柱则在氨基甲酸酯的α位取代了1个甲基。供电子基可以增强羰基氧原子的亲核性,同时减弱酰胺氢原子的亲电性,而吸电子基则正好相反^[33]。在基于多糖衍生物的手性固定相中,苯基氨基甲酸酯的3个关键区域对映体的保留及选择性起重要作用,即亲核的羰基氧、亲电的酰胺氢及苯环上的π电子云。

为深入探究氟比洛芬对映体在3种手性固定相中的分离差异及手性识别机制,本研究采用分子对接的方法以模拟氟比洛芬对映体与手性固定相之间的相互作用。首先构建了3种手性固定相的3D模型,并基于MMFF94力场对其进行能量最小化处理以获得合理的初始几何构型,然后利用AutoDock

Vina 软件对对映体分子及固定相分子进行分子对接, 每组平行独立对接 3 次, 使用 Discovery Studio 2019 对最佳构象进行相互作用力分析, 最后通过 PyMOL 软件对其进行可视化分析, 结果见图 4 与表 1。

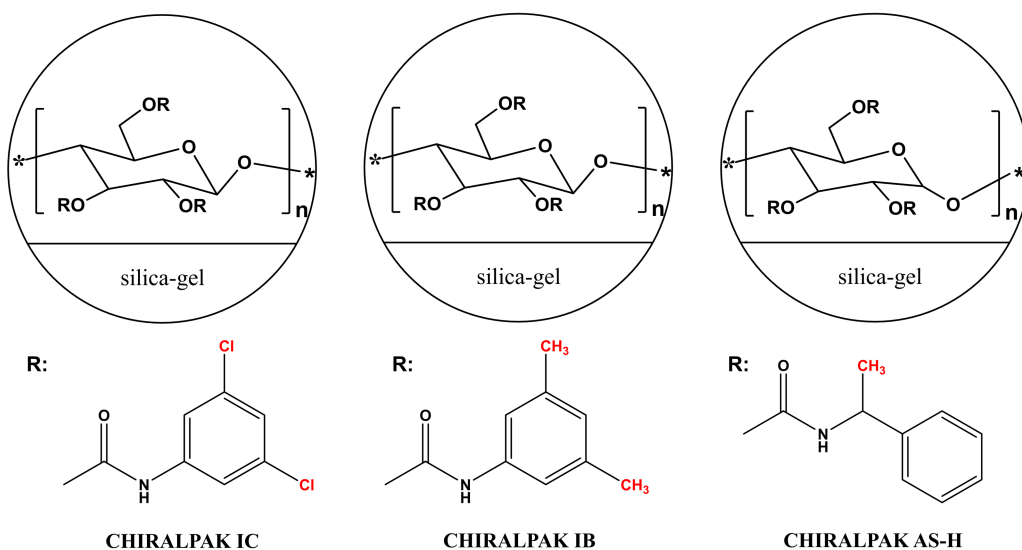


图 3 3 种手性固定相化学结构式

Fig. 3 The chemical structures of three chiral stationary phases

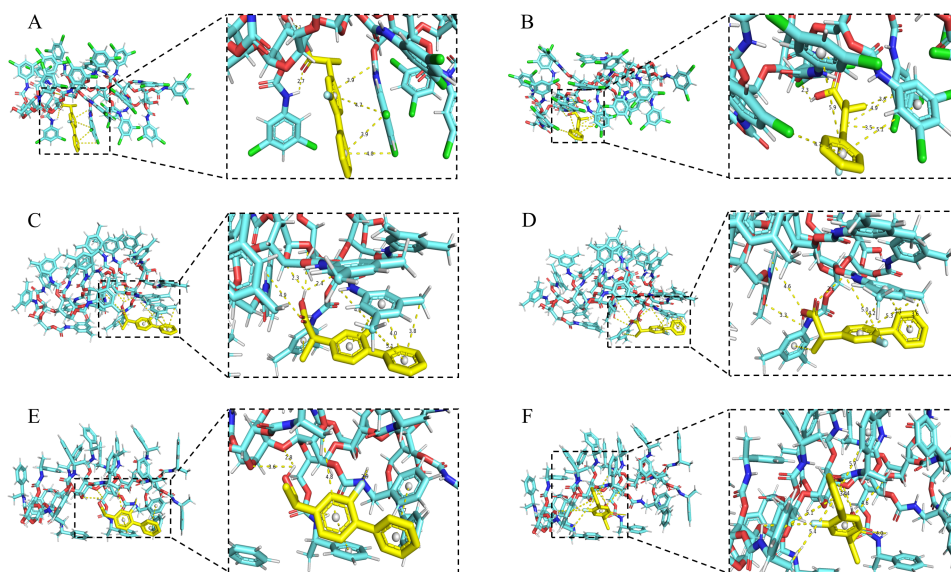


图 4 氟比洛芬对映体与 3 种固定相的分子对接结果图 (A: IC-R、B: IC-S、C: IB-R、D: IB-S、E: AS-H-R、F: AS-H-S)

Fig. 4 Molecular docking results of flurbiprofen enantiomers with three stationary phases (A: IC-R、B: IC-S、C: IB-R、D: IB-S、E: AS-H-R、F: AS-H-S)

结果显示, 氟比洛芬对映体与 3 种手性固定相之间表现出了不同的结合亲和力, 所有对接结合能均为负值, 说明该结合过程是由焓驱动的自发反应^[34], 6 组对接平均结合能 ($\bar{E}_{\text{bind}}$, kcal mol⁻¹) 排序如下: -6.40 ± 0.10 kcal mol⁻¹ (R 型, IC 柱) $> -6.77 \pm 0.06$ kcal mol⁻¹ (S 型, IC 柱) $> -6.83 \pm 0.06$ kcal mol⁻¹ (R 型, AS-H 柱) $> -7.03 \pm 0.12$ kcal mol⁻¹ (S 型, AS-H 柱) $> -7.43 \pm 0.06$ kcal mol⁻¹ (R 型, IB 柱) $> -7.57 \pm 0.12$ kcal mol⁻¹ (S 型, IB 柱), 各组标准差范围在 0.06~0.12 kcal mol⁻¹, 表明对接结果具有一定的重复性。在除色谱柱外其他色谱条件相同的情况下, 将上述平均结合能顺序与实验实际得到的氟比洛芬对映体洗脱趋势进行比较, 发现二者具有一致性: 氟比洛芬对映体在 3 种色谱柱上的洗脱顺序为: IC 柱 $>$ AS-H 柱 $>$ IB 柱, 同时在 3 种色谱柱上均为 R-氟比洛芬先被洗脱。进一步对

同一固定相与R/S对映体的平均结合能差值($\Delta\bar{E}$, kcal mol⁻¹)分析发现, $\Delta\bar{E}$ 与两种对映体在色谱柱上的选择性也有一定关联, 两种对映体在IC柱上的 $\Delta\bar{E}$ 最大, 为0.37 kcal mol⁻¹, 因此在相同的色谱条件下表现出了最好的分离效果($R_s=1.83$); 而它们在AS-H柱与IB柱上的 $\Delta\bar{E}$ 分别为0.20 kcal mol⁻¹、0.13 kcal mol⁻¹, 分离效果不佳(AS-H柱 $R_s=0.81$, IB柱 $R_s=0.65$)。

通过进一步分析固定相与对映体之间的相互作用发现, R-氟比洛芬与IC柱之间形成了6个主要的相互作用, S-氟比洛芬与IC柱之间形成了8个主要的相互作用, 主要包括 $\pi-\pi$ 堆积、氢键、 π -卤素、 π -烷基作用。两个对映体的苯环均可以与固定相中苯基氨基甲酸酯上的苯环及氯原子产生 $\pi-\pi$ 堆积与 π -卤素相互作用, 并且它们的羧基均可以与糖基链上的氧原子及氨基甲酸酯上的氨基产生氢键作用, 它们手性区分过程中的差异在于S-氟比洛芬上的甲基、苯环与苯基氨基甲酸酯上的苯环、氯原子额外产生了 π -烷基、 $\pi-\pi$ 堆积、 π -卤素相互作用, 而R-氟比洛芬只额外产生了氟原子与氨基甲酸酯上氨基的氢键作用, 使得固定相与S-氟比洛芬的结合能力更强, 更难被洗脱, 这可能是IC柱能将氟比洛芬对映体分离的原因所在。对于AS-H柱与IB柱而言, 与IC柱类似, 它们与氟比洛芬对映体之间主要存在 $\pi-\pi$ 堆积、氢键及 π -烷基作用, 尽管AS-H柱和IB柱与R/S氟比洛芬对映体形成的相互作用数量比IC柱多(IC柱与R/S对映体的相互作用数量为6/8, AS-H柱与R/S对映体的相互作用数量为7/8, IB柱与R/S对映体的相互作用数量为10/10), 但AS-H柱和IB柱与R/S对映体之间的作用差异较小。其中, AS-H柱与S-氟比洛芬相较于R型仅额外产生了1个 π -烷基作用; 而IB柱与R/S对映体的作用类型与数量一致, 仅作用位点略有差异。因此, AS-H柱对氟比洛芬对映体的分离能力较IC柱弱, IB柱的分离效果最差。

综上, 氟比洛芬对映体主要通过其苯环与苯基氨基甲酸酯之间的 $\pi-\pi$ 堆积作用被嵌入至纤维素或直链淀粉的内部沟槽中从而进行相互作用, 它们之间作用的稳定性差异受多种作用力调控, 其中 $\pi-\pi$ 堆积及氢键作用是主要的贡献因素, 同时, π -烷基、 π -卤素等作用力在对映体分离中也发挥着重要作用。

2.2 改性剂种类的选择

在SFC的体系当中, 超临界CO₂作为主要的流动相, 整体的极性偏低, 若对其单独使用则难以满足大多数药物分子的溶剂化与洗脱要求。因此, 极性改性剂的加入不仅有利于提高流动相的溶解能力与洗脱强度, 也可通过改变流动相的极性参与氢键作用从而改变固定相与溶质之间的相互作用, 进而影响手性分离中的选择性。保持其余色谱条件一致(参照“1.3.1”项), 考察了4种有机改性剂(甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈)(均含0.1%乙酸)对氟比洛芬手性分离效果的影响, 结果见图5。结果显示, 采用甲醇为改性剂时, 保留时间最短且分离效果最佳, 可能原因是甲醇分子小且极性大, 最容易进入固定相微孔与手性识别口袋, 其既是良好的氢键供体也是氢键受体, 对氢键位点的竞争能力最强^[36]; 乙醇、异丙醇随着分子体积和空间位阻的增大, 对这些位点的作用能力随之下降; 而乙腈为非质子型溶剂, 虽然有着较大的偶极矩, 但无法提供氢键供体, 对羧酸类溶质的溶剂化效率明显低于醇类。因此选择甲醇作为优选改性剂。

2.3 添加剂种类与浓度的选择

前期实验结果显示当流动相中不加入酸性添加剂时, 氟比洛芬对映体的分离效果不佳且峰形拖尾, 酸性添加剂可通过抑制酸性基团的电离、减弱非特异性吸附并调节其与手性固定相之间的氢键作用从而改善峰形与分离效果。保持其余色谱条件一致(参照“1.3.1”项), 考察了不同添加剂种类(0.1%三氟乙酸、0.1%甲酸、0.1%乙酸)和不同添加剂浓度(0%乙酸、0.05%乙酸、0.1%乙酸、0.2%乙酸)对氟比洛芬对映体分离效果的影响, 结果见图6。结果显示, 相比于乙酸而言, 三氟乙酸与甲酸对色谱峰峰形与分离度均有所改善, 但无法实现基线分离, 因此优选乙酸为添加剂。在添加剂浓度方面, 0.05%乙酸难以充分抑制非特异作用, 而浓度增至0.2%时, 过量乙酸会竞争固定相的氢键位点, 削弱对映体与固定相之间的差异性作用, 这些都会导致分离度的下降; 而0.1%乙酸可使离子化抑制与手性识别达到较好平衡, 因此选择0.1%乙酸为优选浓度。

2.4 改性剂比例、柱温、背压和流速的优化

在确定了固定相与改性剂的种类后, 本研究进一步对改性剂的比例、柱温、背压和流速进行了优

化,因为它们在不同参数下,会对对映体的保留时间与分离度产生一定影响。保持其余色谱条件一致(参照“1.3.1”项),分别考察了不同改性剂比例(6%、8%、10%、12%)、不同柱温(25℃、30℃、35℃、40℃)、不同背压(110 bar、120 bar、130 bar、140 bar)、不同流速(0.8 mL min⁻¹、1.2 mL min⁻¹、1.5 mL min⁻¹、2.0 mL min⁻¹)对氟比洛芬对映体分离效果的影响,结果见图7。结果显示,随着改性剂比例、背压、流速的增加以及柱温的降低,氟比洛芬对映体的保留时间缩短,分离度减小;虽然通过减小改性剂的比例及背压与流速可以提高分离度,但同时分析时间延长,色谱峰也出现了较严重的峰展宽现象,在保证分离度的前提下,综合考虑分析时间与峰形,最终选择改性剂比例10%、柱温35℃、背压130 bar、流速1.5 mL min⁻¹为优选色谱条件。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“1.2.3”项下线性对照品储备液适量,加入甲醇定量稀释成浓度均为12.5、25、50、100、200、400 μg mL⁻¹的R-氟比洛芬、S-氟比洛芬线性对照品溶液。将各系列浓度线性对照品溶液分别注入超临界流体色谱仪,按“1.3.1”项下色谱条件进样测定,以各对映体质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。结果见表2,可知各对映体在12.5~400 μg mL⁻¹浓度范围内线性关系良好。

2.5.2 检测限与定量限 精密吸取“1.2.3”项下线性对照品储备液适量,并加入甲醇进行逐级稀释,将各系列浓度对照品溶液分别注入超临界流体色谱仪,按“1.3.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3和10时分别计算各对映体的检测限与定量限。R-氟比洛芬与S-氟比洛芬的检测限均为1.56 μg mL⁻¹,定量限均为4.67 μg mL⁻¹。

2.5.3 精密度试验 精密吸取R-氟比洛芬与S-氟比洛芬浓度均为25、50、100 μg mL⁻¹的低、中、高3个浓度的线性对照品溶液,按“1.3.1”项下色谱条件进样检测,进行日内精密度(24 h, n=6)与日间精密度(72 h, n=9)考察。日内精密度结果显示R-氟比洛芬峰面积RSD分别为2.21%、1.06%、0.55%,S-氟比洛芬峰面积RSD分别为2.17%、1.29%、0.75%;日间精密度结果显示R-氟比洛芬峰面积RSD分别为2.70%、2.10%、0.69%,S-氟比洛芬峰面积RSD分别为3.05%、2.78%、0.85%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、16、24 h (n=7)按“1.3.1”项下色谱条件进样检测,计算得出R-氟比洛芬与S-氟比洛芬峰面积RSD分别为0.75%、0.50%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取同一批次氟比洛芬凝胶贴膏6份(n=6),按“1.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“1.3.1”项下色谱条件进样检测,计算峰面积,结果显示R-氟比洛芬与S-氟比洛芬峰面积RSD分别为1.25%、0.64%,表明该方法重复性良好。

2.5.6 回收率试验 精密剪取同一批号贴膏(批号601061)9份,每份约相当于含R-氟比洛芬与S-氟比洛芬各10 mg,剪碎分别置于具塞锥形瓶中,分别加入相当于已知含量50%、100%、150%的对照品溶液,并按“1.2.4”项下方法制备低、中、高3个不同浓度水平的加标供试品溶液(n=9),按“1.3.1”项下色谱条件进样检测,结果见表3,表明该方法准确性良好。

2.6 样品含量测定

取3批次贴膏适量,按“1.2.4”项下方法制备供试品溶液,每批次平行制备3份(n=9),分别采用“1.3.1”项下SFC色谱条件和“1.3.2”项下HPLC色谱条件进样检测,供试品色谱图见图8,测定结果见表4,可知SFC和HPLC测定的3批次贴膏样品含量均符合要求,且两种测定方法的测定结果相对偏差较小,分别为0.30%、0.53%、0.39%,表明两种方法具有较好的一致性。

进一步对比两种测定方法,首先从分析时间可知,采用SFC在6 min内即可实现氟比洛芬对映体达到基线分离,HPLC则需要20 min,因此SFC能够大幅缩短分离分析时间,提升分析效率,满足工业生产和科研工作中快速分析的要求。此外,超临界流体和液体相比具有较低的粘度,传质阻力较小,因此传质速度高,能够获得较窄的峰宽^[19],本实验中SFC法的色谱峰峰宽约为HPLC法的一半,具有更高的分离效能。在流动相使用方面,SFC以超临界CO₂-甲醇(含0.1%乙酸)(90:10)为流动相,HPLC以乙腈-水(均含0.1%乙酸)(45:55)为流动相,SFC有机溶剂消耗较HPLC少,更加绿色环保。

保。综上,本研究建立的氟比洛芬超临界流体色谱手性分离方法快速高效、绿色环保,可作为该类药物手性分离的替代方法。

表1 氟比洛芬对映体与3种固定相的分子对接实验结果

Table 1 Molecular docking results of flurbiprofen enantiomers with three stationary phases

Stationary phases	Flurbiprofen	$\bar{E}_{\text{bind}}/$ (kcal ■ mol ⁻¹)	$\Delta\bar{E}/$ (kcal ■ mol ⁻¹)	Interaction types	Interaction sites	
					Enantiomers	Stationary phases
IC	R	-6.40±0.10	0.37	H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- C=O	Carbamate NH
				H bond	- F	Carbamate NH
				π - π	Phenyl ring 1	Carbamate Phe
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - Cl	Phenyl ring 2	Carbamate Cl
				H bond	- OH	Glucose O
	S	-6.77±0.06		H bond	- C=O	Carbamate NH
				π - π	Phenyl ring 1	Carbamate Phe
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - Cl	Phenyl ring 1	Carbamate Cl
				π - Cl	Phenyl ring 2	Carbamate Cl
				π - Alkyl	- CH ₃	Carbamate Phe
AS-H	R	-6.83±0.06	0.20	H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- C=O	Carbamate NH
				H bond	- F	Carbamate NH
				π - π	Phenyl ring 1	Carbamate Phe
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - Alkyl	Phenyl ring 1	Carbamate CH ₃
Stationary phases	Flurbiprofen	$\bar{E}_{\text{bind}}/$ (kcal ■ mol ⁻¹)	$\Delta\bar{E}/$ (kcal ■ mol ⁻¹)	Interaction types	Interaction sites	
					Enantiomers	Stationary phases
	S	-7.03±0.12		H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- OH	Carbamate C=O
				H bond	- C=O	Carbamate NH
				H bond	- F	Carbamate NH
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - Alkyl	Phenyl ring 1	Carbamate CH ₃
	R	-7.43±0.06		π - Alkyl	Phenyl ring 2	Carbamate CH ₃
				H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- OH	Glucose O
				H bond	- C=O	Carbamate NH
				H bond	- F	Carbamate NH
				π - π	Phenyl ring 1	Carbamate Phe
IB			0.13	π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - Alkyl	Phenyl ring 2	Carbamate CH ₃
				π - Alkyl	Phenyl ring 2	Carbamate CH ₃
				π - Alkyl	Phenyl ring 2	Carbamate CH ₃
				π - Alkyl	- CH ₃	Carbamate Phe
				H bond	- OH	Carbamate NH
				H bond	- OH	Carbamate NH
	S	-7.57±0.12		H bond	- OH	Carbamate C=O
				H bond	- C=O	Carbamate NH
				H bond	- F	Carbamate NH
				π - π	Phenyl ring 1	Carbamate Phe
				π - π	Phenyl ring 2	Carbamate Phe
				π - Alkyl	Phenyl ring 1	Carbamate CH ₃
				π - Alkyl	Phenyl ring 2	Carbamate CH ₃

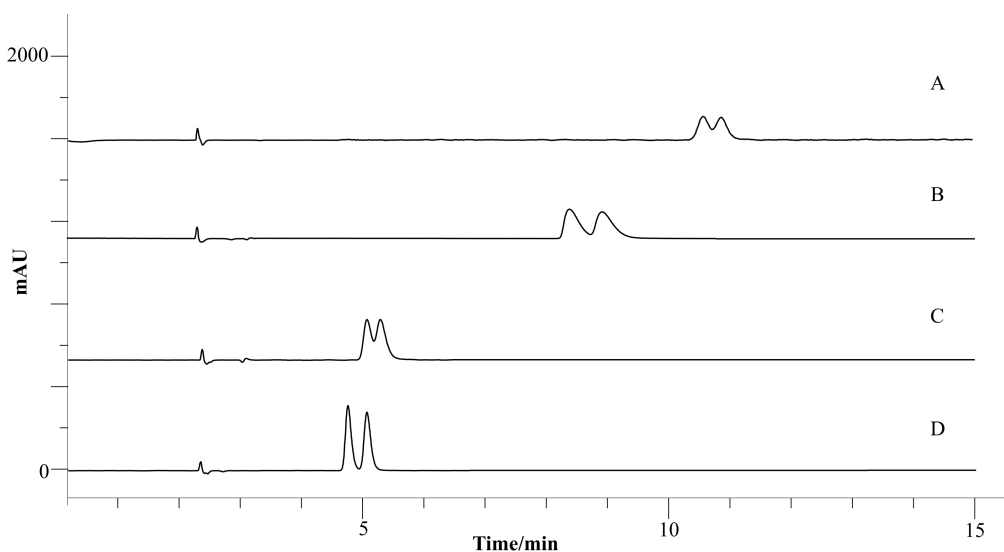


图5 氟比洛芬对映体在不同改性剂下 (A: 乙腈、B: 异丙醇、C: 乙醇、D: 甲醇) 的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of flurbiprofen enantiomers with different modifiers (A: acetonitrile, B: isopropanol, C: ethanol, D: methanol)

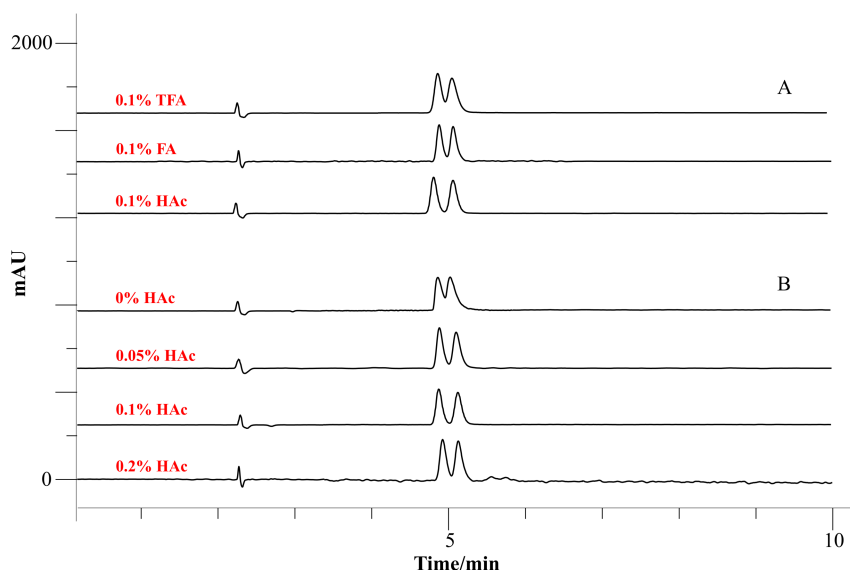


图6 氟比洛芬对映体在不同添加剂种类 (A)、不同添加剂浓度 (B) 下的色谱图

Fig. 6 Chromatograms of flurbiprofen enantiomers with different additive types (A) and different additive concentrations (B)

3 结 论

本研究考察了不同手性固定相、改性剂种类及比例等色谱操作参数对氟比洛芬对映体分离的影响, 并采用分子对接阐明了不同多糖基手性固定相的识别机制, 发现固定相与对映体结合能的差异是高效分离的关键, 其中 $\pi-\pi$ 堆积及氢键作用为手性分离的主要驱动力。在此基础上建立了氟比洛芬对映体 SFC 手性分离方法, 实现了两种对映体的基线分离, 同时采用该方法完成了市售氟比洛芬凝胶贴膏中氟比洛芬对映体的含量测定, 克服了传统 HPLC 分析时间长、溶剂消耗量大的弊端, 契合当今绿色分析化学的发展趋势。综上, 本研究建立的 SFC 手性分离方法具有高效、灵敏、绿色、稳定的特点, 可为氟比洛芬对映体的质量控制及临床用药安全提供可靠的技术支持, 也为其他手性药物的快速拆分提供了借鉴与参考。

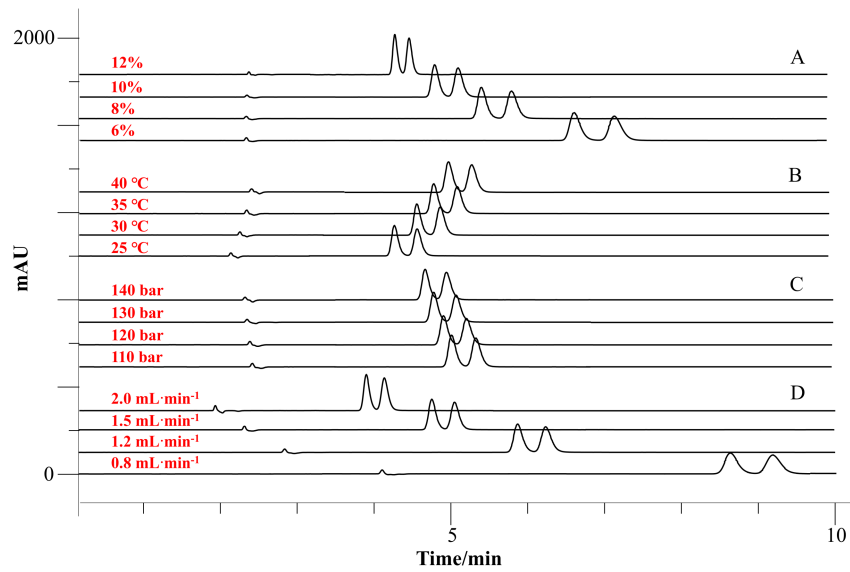


图7 氟比洛芬对映体在不同改性剂比例 (A)、柱温 (B)、背压 (C)、流速 (D) 下的色谱图
Fig. 7 Chromatograms of flurbiprofen enantiomers with different modifier ratios (A), column temperatures (B), back pressures (C), and flow rates (D)

表2 各对映体线性关系

Tab. 2 Linear relationships for each enantiomer

Enantiomers	Regression equation	Correlation coefficient (<i>r</i>)	Linear range/ (μg ■ mL ⁻¹)
R-flurbiprofen	$Y=6.6021X-5.1080$	0.9999	12.5~400
S-flurbiprofen	$Y=6.8071X-7.1647$	0.9999	12.5~400

表3 回收率试验结果

Tab. 3 Results of recovery tests

Enantiomers	Number	Original/mg	Added/mg	Measured/mg	Recovery/%	Average/%
R-flurbiprofen	1	10	5	15.14	102.85	100.98
	2	10	5	14.95	99.09	
	3	10	5	15.05	101.00	
	4	10	10	19.99	99.92	
S-flurbiprofen	5	10	10	19.41	94.12	97.75
	6	10	10	19.59	95.85	
	7	10	15	24.82	98.79	
	8	10	15	24.40	96.01	
	9	10	15	24.77	98.46	
	1	10	5	14.98	99.66	99.21
	2	10	5	14.91	98.13	
	3	10	5	14.99	99.84	
	4	10	10	19.84	98.41	97.04
	5	10	10	19.62	96.17	
	6	10	10	19.65	96.54	
	7	10	15	24.57	97.14	
	8	10	15	24.12	94.12	
	9	10	15	24.52	96.81	

表4 3批次样品含量测定结果
Table 4 Content determination results of three batches of samples

Batch number	Number	Chromatography mode	R-flurbiprofen/ (mg/tablet)	S-flurbiprofen/ (mg/tablet)	Total quantity/ (mg/tablet)	Average quantity/ (mg/tablet)	RD/%
601061	1	SFC	20.44	19.97	40.41	40.04	0.30
	2		19.65	19.59	39.24		
	3		20.34	20.14	40.48		
	1	HPLC	20.13	20.06	40.19	40.16	
	2		19.98	19.92	39.90		
	3		20.20	20.18	40.38		
601141	1	SFC	20.85	20.50	41.35	41.50	0.53
	2		21.01	20.71	41.72		
	3		20.89	20.55	41.44		
	1	HPLC	20.84	20.77	41.61	41.28	
	2		21.00	20.85	41.85		
	3		20.28	20.11	40.39		
601291	1	SFC	20.64	20.32	40.96	41.07	0.39
	2		20.68	20.28	40.96		
	3		20.87	20.43	41.30		
	1	HPLC	20.58	20.42	41.00	41.23	
	2		20.68	20.53	41.21		
	3		20.85	20.63	41.48		

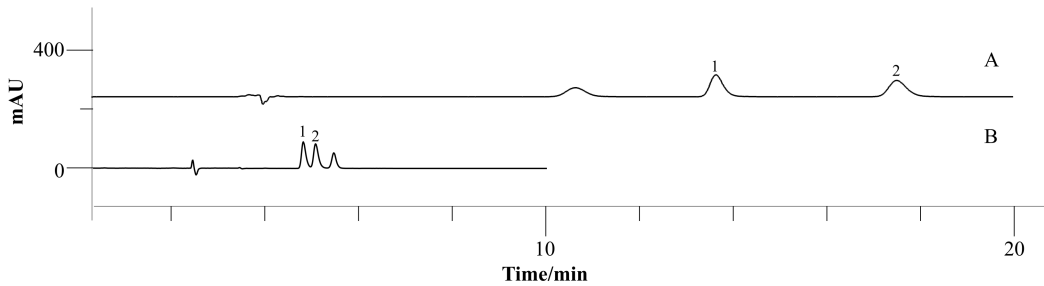


图8 供试品色谱图 (A: HPLC、B: SFC)
Fig. 8 Chromatograms of test samples (A: HPLC、B: SFC)
1: R-flurbiprofen; 2: S-flurbiprofen1: R-氟比洛芬; 2: S-氟比洛芬

参考文献:

[1] Kaddoura R, Madurasinghe V, Chapra A, Abushanab D, Al-Badriyeh D, Patel A. *Curr Probl Cardiol*, **2024**, 49 (3): 102376.

[2] LaForge J M, Urso K, Day J M, Bourgeois C W, Ross M M, Ahmadzadeh S, Shekoohi S, Cornett E M, Kaye A M, Kaye A D. *Adv Ther*, **2023**, 40 (5): 2082–2096.

[3] Ni T R, Tian F, Wang S L, Xu H, Dong J T. *Chin. J. Contemp. Neurol. Neurosurg.* (倪天润, 田凤, 王世龙, 许晖, 董江涛. 中国现代神经疾病杂志), **2026**, 26 (5): 482–491

[4] Hesseling A C, Purchase S E, Martinson N A, Fairlie L, Schaaf H S, Brigden J, Staples S, Gibb D M, Garcia-Prats A, Conradie F, McGowan C, Layton C, Batist E, Demers A M, Nyamathe S, Frigati L, Turner R, Duong T, Seddon J A. *N Engl J Med*, **2024**, 391 (24): 2315–2326.

[5] Bhatt S, Chatterjee S. *Environ Pollut*, **2022**, 315: 120440.

[6] Miranda-Galvis M, Wilson J, Reategui-Almonacid Y, Johnston L, Taylor A O, Sadek R, Tjioe K, Cortes J E. *Blood Cancer J*, **2026**, 16 (1): 38.

[7] Arfeen M, Srivastava A, Srivastava N, Khan R A, Almahmoud S A, Mohammed H A. *Bioorg Med Chem*, **2024**, 112: 117899.

[8] Qiang N, Wang J, Yu J, Xu J F, Wang M X, Dong C H, Li S S, Zhao J, Li C B. *Liberation Army Med. J.* (强宁, 王瑾, 于健, 许金芳, 王明新, 董晨辉, 李慎松, 赵晋, 李春宝. 解放军医学杂志), **2025**, 50 (3): 341–350.

[9] Xiang J, Yu Q, Liang M Z, Qin Y P, Nan F. *Chin. J. New Drugs*. (向瑾, 余勤, 梁茂植, 秦永平, 南峰. 中国新药杂志), **2008**, 17 (13): 1093–1096.

[10] Liu S Y, Liu J M, Huang J S, He X Y. *Strait Pharmaceutical Journal*. (刘思蕴, 刘金梅, 黄景胜, 何杏仪. 海峡药学), **2021**, 33 (3): 131–134.

[11] Davies N M. *Clin Pharmacokinet*, **1995**, 28 (2): 100–114.

- [12] Wechter W J, Bigornia A E, Murray ED Jr, Levine B H, Young J W. *Chirality*, **1993**, 5 (7): 492-494.
- [13] Zuo Y, Ma R X, Yu Z L, Lin B G, Yu Y J, Liu S. *Chin. J. Anal. Lab.* (左优, 马瑞雪, 于紫玲, 林必桂, 于云江, 刘珊. 分析实验室), **2019**, 38 (4): 465-469.
- [14] Huang H W, Feng Y F, He L. *J. Beijing Norm. Univ., Nat. Sci.* (黄海伟, 冯玉飞, 何兰. 北京师范大学学报: 自然科学版), **2014**, 50 (3): 290-292.
- [15] Wu W, Huang B Y, Yuan M, Zhu L, Ji H. *J. Instrum. Anal.* (吴薇, 黄碧云, 袁牧, 朱柳, 季红. 分析测试学报), **2008**, 27 (10): 1091-1094.
- [16] Sun G, Tang W, Lu Y, Row K H. *J Chromatogr A*, **2022**, 1666: 462856.
- [17] Hamoudová R, Pospíšilová M. *J Pharm Biomed Anal.* **2006**, 41 (4): 1463-1467.
- [18] National Pharmacopoeia Commission. *China Pharmacopoeia: Part IV*. Beijing: China Medical Science and Technology Press (中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典: 四部. 北京: 中国医学科技出版社), **2025**: 114-115.
- [19] Dispas A, Jambo H, André S, Tyteca E, Hubert P. *Bioanalysis*, **2018**, 10 (2): 107-124.
- [20] Yamamoto K, Machida K, Kotani A, Hakamata H. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **2021**, 69 (10): 970-975.
- [21] West C. *Anal Bioanal Chem*, **2018**, 410 (25): 6441-6457.
- [22] Speybrouck D, Lipka E. *J Chromatogr A*, **2016**, 1467: 33-55.
- [23] Kalíková K, Slechtová T, Vozka J, Tesařová E. *Anal Chim Acta*, **2014**, 821: 1-33.
- [24] Gibitz Eisath N, Sturm S, Stuppner H. *Planta Med*, **2018**, 84 (6-7): 361-371.
- [25] Lesellier E, West C. *J Sep Sci*, **2022**, 45 (1): 382-393.
- [26] Zhao S J, Dong J J, Liu J, Jia Z X, Yan X N, Yu Y T, Chen Y J, Li Y T, Xiao H B. *J. Instrum. Anal.* (赵淑军, 董姣姣, 刘洁, 贾志鑫, 闫晓宁, 郁映婷, 陈奕君, 李月婷, 肖红斌. 分析测试学报), **2021**, 40 (9): 1311-1317.
- [27] Desfontaine V, Guillaume D, Francotte E, Nováková L. *J Pharm Biomed Anal*, **2015**, 113: 56-71.
- [28] Liu L X, Zhang Y, Zhou Y, Li G H, Yang G J, Feng X S. *Crit Rev Anal Chem*, **2020**, 50 (2): 136-160.
- [29] Chankvetadze B. *Methods Mol Biol*, **2026**, 2994: 99-117.
- [30] Chankvetadze B. *J Chromatogr A*, **2012**, 1269: 26-51.
- [31] Paggi J M, Pandit A, Dror R O. *Annu Rev Biochem*, **2024**, 93 (1): 389-410.
- [32] Aguiar C, Camps I. *Curr Med Chem*, **2025**, 32 (28): 5924-5938.
- [33] Dallochio R, Dessì A, Sechi B, Peluso P. *Molecules*, **2023**, 28 (21): 7419.
- [34] Saleh O A, Badawey A M, Aboul-Enein H Y, Fouad M A. *BMC Chem*, **2023**, 17 (1): 22.
- [35] Yu L S, Wang S J, Zeng S. *Methods Mol Biol*, **2019**, 1985: 81-91.
- [36] Ding J W. *Enantiomeric Separation of β -blocker Enantiomers by Supercritical Fluid Chromatography with Liquid-phase Microextraction*. Zhejiang: Zhejiang University of Technology (丁佳炜. 液相微萃取—超临界流体色谱拆分 β -受体阻断剂的研究. 浙江: 浙江工业大学), **2019**.

(责任编辑: 丁 岩)