·实验研究·

双柱串联超临界流体色谱法拆分盐酸帕洛诺司琼及3个光学异构体

孟祥慧[1],孙葭北[1],王　渔[2],姚尚辰[1*]

(1 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室,中国食品药品检定研究院化学药品检定所,北京 102629; 2 北京石油化工学院,北京 102617)

[摘要] **目的:**建立双柱串联方式测定盐酸帕洛诺司琼手性纯度的超临界流体色谱方法(SFC),同时测定原料及注射液中光学异构体的含量。**方法:**采用2根手性色谱柱DAICEL CHIRALPAK AD-3色谱柱(150 mm×3.0 mm SFC,3 μm)和DAICEL CHIRALPAK IG-3色谱柱(150 mm×3.0 mm SFC,3 μm)串联的方式,柱温为37 ℃,以超临界CO_2-[无水乙醇:乙腈:二乙胺(70∶30∶1)]混合溶液(55∶45)作为流动相,背压为12 MPa,进样量为20 μL,流速为1.2 mL·min^{-1},检测波长为240 nm。**结果:** *R*,*S*异构体、*R*,*R*对映异构体、*S*,*R*异构体和帕洛诺司琼可在10 min内依次洗脱并完全分离,各峰之间的分离度分别为1.7、2.3和1.5;各组分在0.20~10.0 μg·mL^{-1}浓度范围内线性良好,*r*均大于0.999 5。3个异构体的检测限均为0.10 μg·mL^{-1}(*S*/*N*=3),定量限均为0.20 μg·mL^{-1}(*S*/*N*=10);盐酸帕洛诺司琼原料及注射液中3个光学异构体的平均加样回收率范围为97.8%~101.3%,RSD范围为0.3%~1.5%(*n*=9)。除1批原料中未检出手性杂质外,其余5批样品中均检出了*R*,*S*异构体,含量范围为0.03%~0.12%。**结论:**利用SFC法可显著缩短帕洛诺司琼手性拆分的分析时间,采用双柱串联后,可改善分离效果,尤其是*S*,*R*异构体与帕洛诺司琼之间的分离度得到有效提高。本方法准确可靠,可作为盐酸帕洛诺司琼原料及相关制剂中手性纯度测定和质量控制的有效手段。

[关键词] 超临界流体色谱法;盐酸帕洛诺司琼;光学异构体;手性拆分

[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2026)09-0969-08

Chiral separation and detection of three optical isomers in palonosetron hydrochloride by supercritical fluid chromatography with two columns in series

MENG Xiang-hui[1], SUN Jia-bei[1], WANG Yu[2], YAO Shang-chen[1*]

(1 *NMPA Key Lab for Research and Evaluation of Chemical Drug Quality, National Institutes for Food and Drug Control, Institutes for Chemical Drug Control, Beijing* 102629, *China*; 2 *Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing* 102617, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a supercritical fluid chromatography (SFC) method for the determination of chiral purity of palonosetron hydrochloride using two columns in series, and to determine the isomers in palonosetron hydrochloride bulk drug and injections. **Methods**: Two columns, DAICEL CHIRALPAK AD-3 (150 mm×3.0 mm, SFC, 3 μm) and DAICEL CHIRALPAK IG-3 (150 mm×3.0 mm, SFC, 3 μm), were in series. The column temperature was at 37 ℃, the mobile phase was composed of CO_2 and a mixture of anhydrous ethanol, acetonitrile, and diethylamine at a ratio of 55∶45, the back pressure was at 12 MPa, the flow rate was 1.2 mL·min^{-1}, the injection volume was 20 μL, and the detection wavelength was at 240 nm. **Results**: The *R*,*S* isomer, *R*,*R* enantiomer, *S*,*R* isomer, and palonosetron were eluted sequentially within 10 min with resolutions of 1.7, 2.3, and 1.5, respectively. All four compounds exhibited good linearity between peak area and concentration in the range from 0.20 to 10.0 μg·mL^{-1}, with *r* all greater than 0.999 5. The detection limits (*S*/*N*=3) of the three isomers were all 0.10 μg·mL^{-1}; and the quantitation limits (*S*/*N*=10) were all 0.20 μg·mL^{-1}. The average recoveries of the three isomers in the bulk drug and injections ranged from 97.8% to 101.3%, with relative standard deviations (RSDs)

[作者简介] 孟祥慧,女,博士研究生,主要从事化学药品质量控制、药效及毒理学评价研究。E-mail: mengxianghui@nifdc.org.cn。

[通讯作者] *姚尚辰,女,主任药师,主要从事药物质量分析控制研究。E-mail: yaoshangchen@nifdc.org.cn。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.09.010

ranged from 0.3% to 1.5% (n=9). Except for one batch of bulk drug in which no chiral impurity was detected, the R,S isomer was detected in all the other five batches, with contents ranging from 0.03% to 0.12%. **Conclusion**: The developed SFC method can separate palonosetron and its three isomers in a short analysis time, and the use of two columns in series improves the separation efficiency, especially the resolution between the S,R isomer and palonosetron. The method is accurate, reliable, and can be used as an effective means for chiral purity determination and quality control of palonosetron hydrochloride bulk drug and related preparations.

[**Key words**] supercritical fluid chromatography; palonosetron hydrochloride; optical isomers; chiral separation

帕洛诺司琼是第 2 代 5-羟色胺 3（5-hydroxytryptamine 3,5-HT_3）受体拮抗剂，于 2003 年获美国 FDA 批准上市，可强效止吐，被美国国家癌症综合网（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）推荐用于预防化疗引起的急性和延迟性恶心、呕吐[1]。盐酸帕洛诺司琼的化学名称为 2-[1-氮杂双环(2.2.2)辛-3*S*-基]-2,3,3a*S*,4,5,6-六氢-1*H*-苯并[de]异喹啉-1-酮盐酸盐[2]，分子结构中含有 2 个手性中心，故存在 4 个光学异构体，分别为活性成分 *S*,*S* 构型以及无活性的 *R*,*R* 构型、*S*,*R* 构型和 *R*,*S* 构型[3]，见图 1。目前，仅《美国药典》（USP）和《马丁代尔氏大药典》中收载了该品种，我国药典未收载[4-5]。针对盐酸帕洛诺司琼中光学异构体的拆分，USP 及多篇文献中均采用正相高效液相色谱法进行分离，这些方法普遍存在流动相组成复杂、分析时间长、有机溶剂消耗多、无法同时分离 4 个组分、分离效果差等问题，亟须改进优化[6-9]。

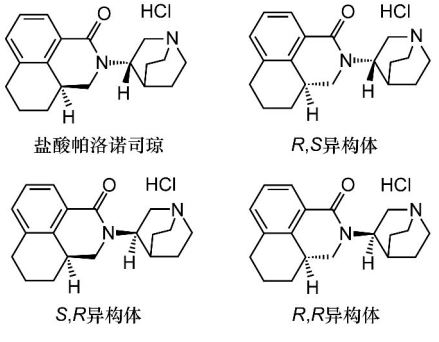


图 1 盐酸帕洛诺司琼及其光学异构体结构

超临界流体色谱（supercritical fluid chromatography，SFC）技术发展于 20 世纪 80 年代，利用超临界流体黏度低、扩散系数高、溶解能力强、传质效率快等优势，可实现比 LC 法更加快速高效的分离，以及比 GC 法更便利的操作条件和更高的分离选择性，目前已广泛应用于食品科学、石油化工、环境监测、药物分析及医学等领域[10-11]。CO_2 的临界温度为 31.2 ℃，临界压力为 7.38 MPa，在实验室环境下相对容易达到超临界状态，且安全无毒、对环境友好、易于获取，目前已成为超临界流体色谱技术中最常用的流动相[12]。超临界状态的 CO_2 极性接近于正己烷，对极性化合物的洗脱能力较差，分离范围较窄；通过加入适量的甲醇、乙醇、四氢呋喃等改性剂，可增强其溶解能力，拓宽其分离及应用范围，再结合酸或碱，最终实现理想的分离选择性和效果[13-14]。目前，国内尚未有采用 SFC 技术对盐酸帕洛诺司琼进行手性拆分的相关研究报道。本研究根据盐酸帕洛诺司琼及其 3 个光学异构体的理化性质，结合超临界流体色谱法的技术特点，建立盐酸帕洛诺司琼手性拆分的超临界流体色谱方法，为盐酸帕洛诺司琼原料药及制剂的质量控制提供便捷、准确的新方法。

材　料

1　仪器

Xp260DR 型精密电子天平（德国 METTLER TOLEDO 公司）；Nexera UC 超临界流体色谱仪（日本 SHIMADZU 公司）；光电二极管阵列检测器（日本 SHIMADZU 公司）；超纯水仪（Millipore 公司）；旋转蒸发仪（BUCHI 公司）。

2　试药与试剂

盐酸帕洛诺司琼对照品（批号：101030-202305，CAS 号：135729-62-3，含量：99.7%，中国食品药品检定研究院提供）；盐酸帕洛诺司琼 *R*,*R* 异构体（批号：420082-201901，CAS 号：135729-75-8，含量：99.5%，中国食品药品检定研究院提供）；盐酸帕洛诺司琼 *S*,*R* 异构体对照品（批号：1492244-R18890，CAS 号：135729-76-9，USP，中国食品药品检定研究院提供）；盐酸帕洛诺司琼 *R*,*S* 异构体对照品（批号：1492255-R185Q0，CAS 号：135755-51-0，USP，中国食品药品检定研究院提供）；盐酸帕洛诺司琼原料（厂家 A，批号：A；厂家 B，批号：B）；盐酸帕洛诺司琼注射液（厂家 C，批号：C；厂家 D，批号：D1、D2、D3），规格均为 5 mL∶0.25 mg；无水乙醇（HPLC 级，含量≥99.9%，DiKMA 公司）；乙腈（ACS/HPLC 级，含量为 99.999%，

Honeywell 公司);二乙胺(HPLC 级,含量≥99.5%,Sigma-Aldrich 公司);二氯甲烷(HPLC 级,TEDIA 公司);酚酞(指示剂)、氢氧化钠(分析纯)均购自国药集团;CO_2(高纯级别,含量≥99.999%,涿州市北温工业气体销售有限公司)。

方法与结果

1 色谱条件

采用 DAICEL CHIRALPAK AD-H(150 mm × 3.0 mm SFC,3 μm)色谱柱串联 DAICEL CHIRALPAK IG-3 (150 mm × 3.0 mm SFC,3 μm)色谱柱,流动相为 CO_2(A)-无水乙醇-乙腈-二乙胺(70∶30∶1)(B)(55∶45),等度洗脱,流速 1.2 mL·min^{-1},柱温 37 ℃,样品室温度 15 ℃,背压 12 MPa,检测波长 240 nm,进样量 20 μL。

2 溶液的制备

2.1 系统适用性溶液

分别精密称取 *R*,*R* 异构体、*R*,*S* 异构体和 *S*,*R* 异构体对照品各 5 mg,置同一 250 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为杂质贮备液;精密称取盐酸帕洛诺司琼对照品 10 mg,置 10 mL 量瓶中,精密量取杂质贮备液 1 mL,置同一 10 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成杂质质量浓度约为 2 μg·mL^{-1}、盐酸帕洛诺司琼质量浓度约为 1 mg·mL^{-1}的混合系统适用性溶液。

2.2 混合对照品贮备液

分别称取盐酸帕洛诺司琼、*R*,*R* 异构体、*R*,*S* 异构体和 *S*,*R* 异构体对照品各约 12.5 mg,置同一 50 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度约为 250 μg·mL^{-1}的混合对照品贮备液。

2.3 定位溶液

分别称取盐酸帕洛诺司琼、*R*,*R* 异构体、*R*,*S* 异构体和 *S*,*R* 异构体对照品各约 1 mg,分别置 50 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别制成质量浓度约为 20 μg·mL^{-1}的盐酸帕洛诺司琼、*R*,*R* 异构体、*R*,*S* 异构体和 *S*,*R* 异构体定位溶液。

2.4 供试品溶液

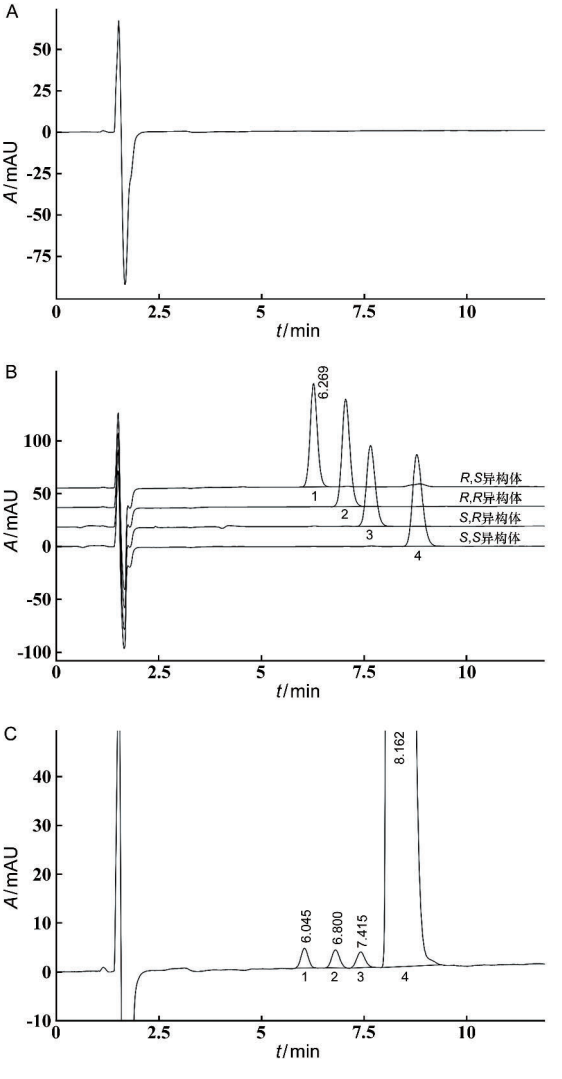
精密称取盐酸帕洛诺司琼原料药约 10 mg,置 20 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

取盐酸帕洛诺司琼注射液 100 mL,置 250 mL 分液漏斗中,加酚酞指示液 2 滴,加氢氧化钠试液至显中性,摇匀,静置 10 min,加 40 mL 二氯甲烷萃取,重复萃取 3 次,合并二氯甲烷层,旋蒸至干,加无水乙醇适量,振摇使溶解,移至 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得[15-16]。

3 方法学考察

3.1 专属性考察

分别取空白溶液、定位溶液和系统适用性溶液进样检测,结果见图 2。系统适用性溶液中,*R*,*S* 异构体、*R*,*R* 异构体、*S*,*R* 异构体和盐酸帕洛诺司琼依次出峰,各色谱峰之间的分离度分别为 2.1、1.6 和 1.5,空白溶剂不干扰上述 4 个组分的测定,见图 2。



1:*R*,*S* 异构体;2:*R*,*R* 异构体;3:*S*,*R* 异构体;4:盐酸帕洛诺司琼

图 2 空白溶液(A)、各组分定位溶液(B)和系统适用性溶液(C)的 SFC-PDA 色谱图

3.2 线性范围、检测限和定量限

精密量取“**2.2**”项下混合对照品贮备液，用无水乙醇定量稀释成 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、2.5、5.0、10.0 μg·mL^{-1}的线性溶液，按“**1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，以峰面积（Y）为纵坐标，质量浓度（X，μg·mL^{-1}）为横坐标，进行线性回归分析，结果显示盐酸帕洛诺司琼及 3 个光学异构体均表现出了良好的线性关系，其线性方程、检测限和定量限见表 1。

表 1 帕洛诺司琼及 3 个光学异构体的线性范围、检测限和定量限

化合物	线性范围/μg·mL^{-1}	线性方程	r	检测限/μg·mL^{-1}	定量限/μg·mL^{-1}
帕洛诺司琼	0.20～10.0	Y=28 922X－1 002.1	0.999 7	—	—
R,R 异构体	0.20～10.0	Y=28 254X－2 609.7	0.999 6	0.10	0.20
R,S 异构体	0.20～10.0	Y=27 491X－716.71	0.999 6	0.10	0.20
S,R 异构体	0.20～10.0	Y=25 183X－271.67	0.999 5	0.10	0.20

3.3 精密度试验

取“**2.1**”项下系统适用性溶液，按“**1**”项下色谱条件连续进样 6 针，记录色谱图。R,S 异构体、R,R 异构体、S,R 异构体及盐酸帕洛诺司琼峰面积的 RSD 分别为 0.62%、0.82%、0.64% 和 0.61%，保留时间的 RSD 分别为 0.20%、0.19%、0.21% 和 0.19%。结果表明仪器进样精密度良好。

3.4 重复性试验

取同一批注射液（批号：D1）按“**2.4**”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“**1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。R,S 异构体和帕洛诺司琼的平均含量分别为 0.082% 和 99.918%，RSD 分别为 1.040% 和 0.001%，结果表明该方法重复性良好。

3.5 加样回收率试验

精密称取盐酸帕洛诺司琼原料（批号：A）约 250 mg，置 250 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为盐酸帕洛诺司琼溶液（质量浓度约为 1.0 mg·mL^{-1}）。分别精密称取 R,S 异构体、R,R 异构体、S,R 异构体对照品约 10 mg，置 200 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 5 mL，置 50 mL 量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，摇匀，作为异构体混合溶液（质量浓度约为 5 μg·mL^{-1}）。分别量取混合异构体溶液 3、3、5 mL，分别置 20、10、10 mL 量瓶中，用盐酸帕洛诺司琼溶液稀释至刻度，摇匀，作为异构体浓度分别为 0.75、1.5 和 2.5 μg·mL^{-1}的低、中、高浓度回收率样品溶液。每个浓度溶液平行制备 3 份。按“**1**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图的峰面积进行计算，结果见表 2。R,S 异构体、R,R 异构体、S,R 异构体回收率分别为 100.1%、101.0% 和 97.8%，表明该方法准确度良好。

表 2 盐酸帕洛诺司琼原料异构体加样回收率测定结果 %

成分	浓度水平	回收率（n=3）	RSD	平均回收率（n=9）
R,S 异构体	低	100.03	0.64	100.1
	中	99.84	1.36	
	高	100.36	0.08	
R,R 异构体	低	99.63	1.05	101.0
	中	102.02	0.80	
	高	101.25	1.25	
S,R 异构体	低	97.10	1.42	97.8
	中	98.40	0.57	
	高	97.61	1.49	

分别精密称取 R,S 异构体、R,R 异构体和 S,R 异构体对照品约 10 mg，置 200 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取 5 mL，置 50 mL 量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，摇匀，作为异构体混合溶液（质量浓度约为 5 μg·mL^{-1}）。精密量取“**2.4**”项下供试品溶液 5 mL（同一批号：D1），置 10 mL 量瓶中，平行取样 9 份，平均分成 3 组，每组各加入异构体混合溶液 1、2.5 和 5 mL，用无水乙醇稀释至刻度，摇匀，作为异构体浓度分别为 0.5、1.25 和 2.5 μg·mL^{-1}的低、中、高浓度回收率样品溶液。按“**1**”项下色谱条件进行测定，记录色谱图以峰面积进行计算，结果见表 3。R,S 异构体、R,R 异构体和 S,R 异构体的回收率分别为 100.6%、101.3% 和 98.2%，表明该方法准确度良好。

表 3 盐酸帕洛诺司琼注射液异构体加样回收率测定结果 %

成分	浓度水平	回收率（n=3）	RSD	平均回收率（n=9）
R,*S* 异构体	低	99.55	0.86	100.6
	中	101.82	0.47	
	高	100.53	0.85	
R,*R* 异构体	低	100.62	1.64	101.3
	中	102.13	0.74	
	高	101.04	0.82	
S,*R* 异构体	低	97.36	1.65	98.2
	中	98.51	1.05	
	高	98.73	0.52	

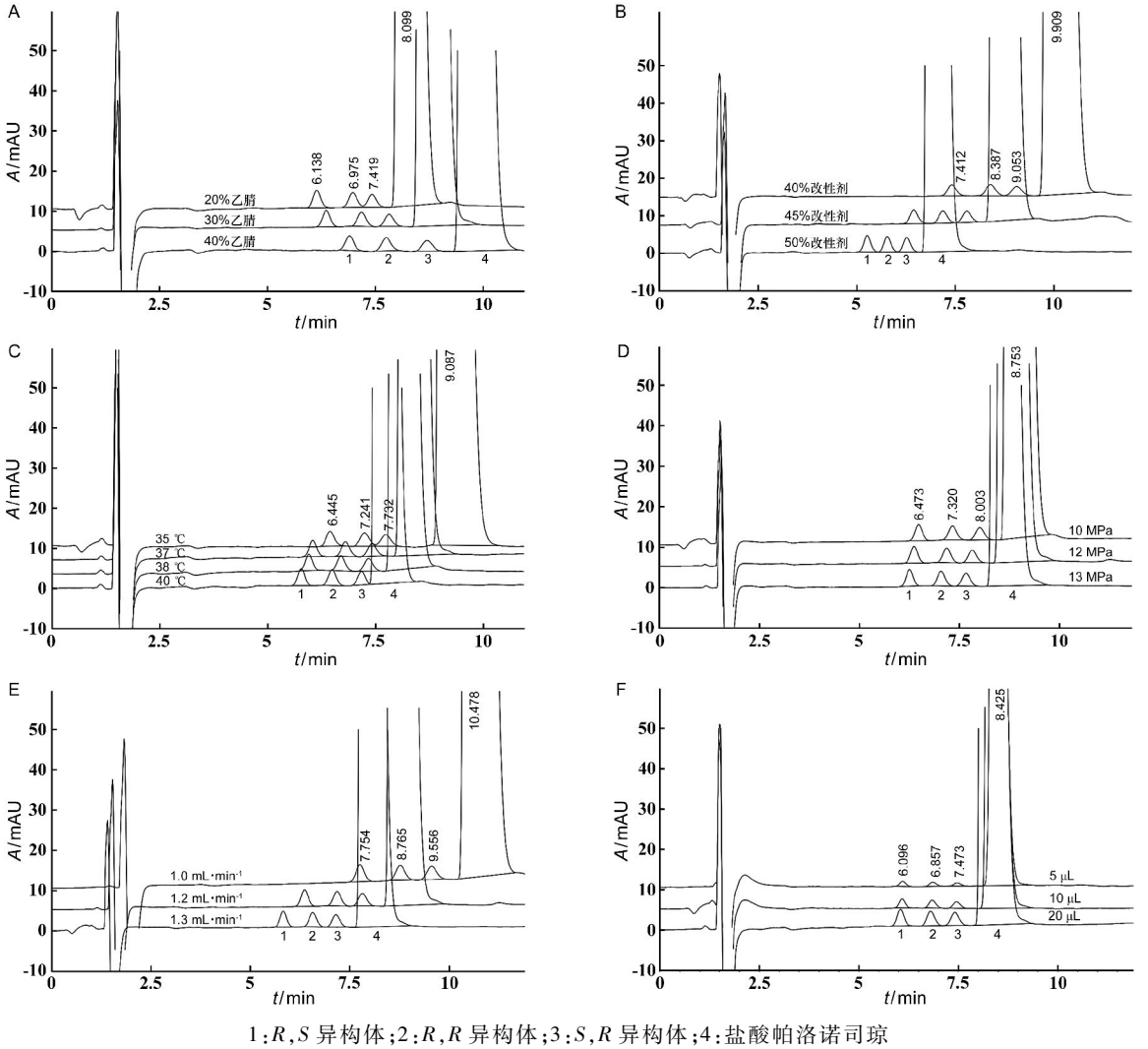
3.6 稳定性考察

取系统适用性溶液分别于配制后 0、2、4、6、12、24 h 测定，记录色谱图。结果显示，*R*,*S* 异构体、*R*,*R* 异构体、*S*,*R* 异构体和盐酸帕洛诺司琼峰面积的 RSD 分别为 1.71%、1.05%、1.65% 和 0.55%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.7 耐用性试验

分别考察了改性剂的组成及比例、流速、进样量、背压和柱温等试验参数的变动，对盐酸帕洛诺司琼及 3 个光学异构体包括保留时间、分离度、峰形在内的色谱行为的影响。

3.7.1 改性剂的组成 结合色谱柱分离性能及化合物性质，选择无水乙醇-乙腈-二乙胺（70∶30∶1）作为改性剂，同时考察了其中不同比例的乙腈（20%、30% 和 40%）对分离效果的影响。结果显示，随着改性剂中乙腈比例的增加，系统适用性溶液各色谱峰出峰时间均延后，但 *R*,*R* 异构体和 *S*,*R* 异构体之间的分离度逐渐增加（1.2、1.7、2.2），详见图 3A。



1：*R*,*S* 异构体；2：*R*,*R* 异构体；3：*S*,*R* 异构体；4：盐酸帕洛诺司琼

图 3 系统适用性溶液在不同改性剂组成（A）、不同比例（B）、不同柱温（C）、不同背压（D）、不同流速（E）和不同进样量（F）条件下的 SFC-PDA 色谱图

3.7.2 改性剂的比例 当流动相中改性剂的比例分别为40%、45%和50%时,各组分洗脱时间明显提前,且各色谱峰之间的分离度逐渐减小,尤其*R*,*S*异构体与*R*,*R*异构体之间的分离度从2.2减小至1.5,综合洗脱时间及分离度考量,选择含45%改性剂的流动相进行目标物的分离,详见图3B。

3.7.3 柱温 分别考察了35 ℃、37 ℃、38 ℃和40 ℃柱温条件对分离效果的影响。结果表明,随着柱温升高,系统适用性溶液各色谱峰出峰时间均提前,*R*,*R*异构体和*S*,*R*异构体之间的分离度逐渐增加(1.2、1.6、1.7、2.0),但*S*,*R*异构体与盐酸帕洛诺司琼之间的分离度逐渐下降(2.3、1.5、1.3、0.9)。综合评估分离效能,选择37 ℃柱温进行试验,详见图3C。

3.7.4 背压 分别考察了10、12和13 MPa等背压条件。结果表明,背压增大,盐酸帕洛诺司琼及3个异构体的保留时间稍有提前,但各色谱峰之间分离度均良好,无明显变化。考虑到系统压力、色谱柱及仪器耐用性以及分离能力,选择12 MPa背压作为分离条件,详见图3D。

3.7.5 流速 分别考察了1.0、1.2和1.3 mL·min^{-1}等流速条件。结果表明,流速增加,各色谱峰出峰时间均提前,但各峰之间的分离度均良好,无明显变化,详见图3E。

3.7.6 进样量 分别考察了5、10、20 μL进样量条件。各进样体积下,盐酸帕洛诺司琼及3个异构体均峰形对称,分离度良好,详见图3F。

4 样品测定

分别取2批盐酸帕洛诺司琼原料和4批盐酸帕洛诺司琼注射液,按照"**2.4**"项下供试品溶液方法配制,按"**1**"项下色谱条件进行测定,结果见表4。

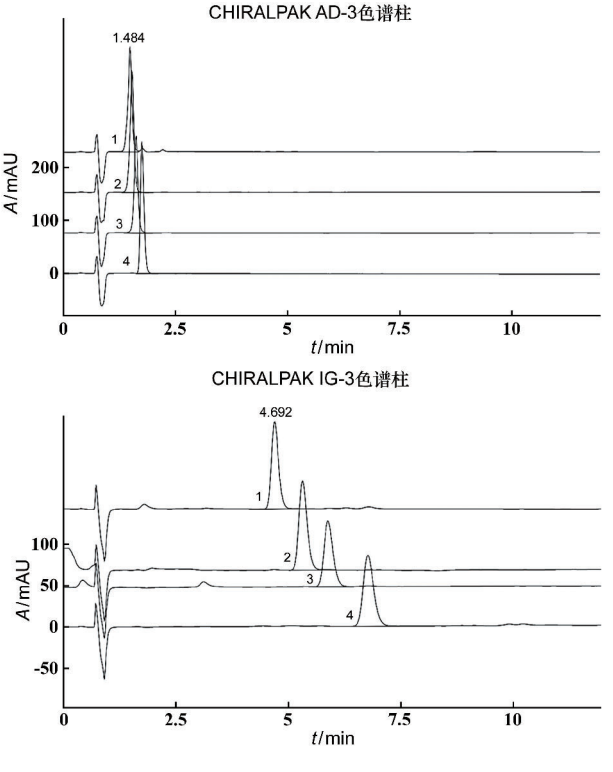
表4 盐酸帕洛诺司琼原料及注射液中异构体测定结果 %

生产厂家	批号	结果
原料		
厂家A	A	未检出
厂家B	B	0.03(*R*,*S*)
注射液		
厂家C	C	0.12(*R*,*S*)
厂家D	D1	0.10(*R*,*S*)
	D2	0.06(*R*,*S*)
	D3	0.06(*R*,*S*)

讨 论

1 固定相的选择

直链淀粉和纤维素衍生物都是具有高度有序螺旋结构的多糖衍生物,该结构特点使二者表现出了优异的手性识别能力,是目前应用较为广泛的手性固定相[17]。研究前期固定相筛选中发现,相对于纤维素衍生物填料的色谱柱,直链淀粉衍生物填料的色谱柱对盐酸帕洛诺司琼及其异构体表现出了更佳的分离能力。进一步研究发现,单独使用CHIRALPAK IG-3[硅胶表面键合有直链淀粉-三(3-氯-5-甲基苯基氨基甲酸酯)]色谱柱进行分离时,系统适用性溶液中*R*,*S*异构体、*R*,*R*异构体、*S*,*R*异构体和盐酸帕洛诺司琼在8 min内依次洗脱,但*S*,*R*异构体与盐酸帕洛诺司琼色谱峰之间分离效果较差,分离度仅为0.85;而4个组分在CHIRALPAK AD-3[硅胶表面涂敷有直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)]色谱柱上保留较弱,且无法分离;但二柱串联后,分离效率得到显著提升,4个组分可在10 min内完全洗脱,各色谱峰之间的分离度均不小于1.5,见图4和图5。



1:*R*,*S*异构体;2:*R*,*R*异构体;3:*S*,*R*异构体;4:盐酸帕洛诺司琼

图4 盐酸帕洛诺司琼和3个异构体在不同手性色谱柱上的分离效果

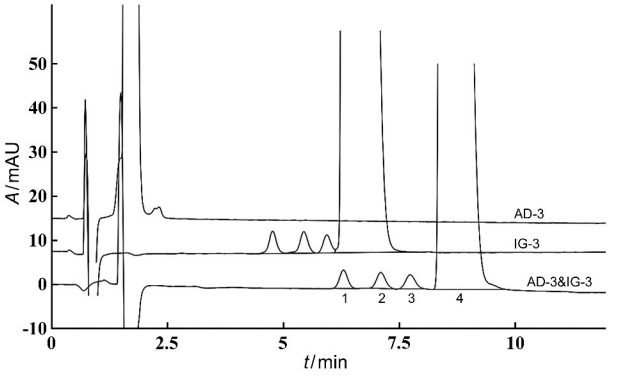
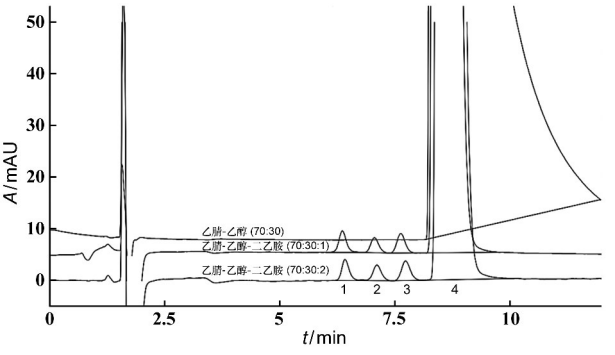


图 5 系统适用性溶液在 AD-3、IG-3 色谱柱以及双柱串联上的 SFC-PDA 色谱图

通过将 2 根或者多根不同分离性质的色谱柱串联使用,可实现不同色谱柱分离能力的优势互补,提高分离效能和灵敏度,多应用于复杂样品中目标物的分析、常规色谱条件下难以实现较好分离的物质的分析以及部分手性对映体的分离[18-20]。结合文献报道及前期研究结果,故选择 CHIRALPAK AD-3 和 CHIRALPAK IG-3 双柱串联进行盐酸帕洛诺司琼及 3 个光学异构体的拆分。

2 流动相的优化

CO_2 为非极性化合物,在分离极性化合物时需加入极性较强的改性剂以改善分离选择性和效率,也可加入酸或碱改善目标物峰型。预试验中尝试以甲醇、乙腈、乙醇等作为改性剂,但分离效果不佳。参考 DAICEL 公司 SFC 手性柱说明书中的提示,可向乙醇中加入乙腈以增强洗脱能力[21],故采用乙醇-乙腈(70∶30)作为改性剂,但因为洗脱效率低,导致峰展宽严重,分离效果不佳。帕洛诺司琼为有机碱,碱性添加剂的加入可能会优化分离效果,结合已有的相关研究报道[6-9],选择往改性剂中添加二乙胺(1%,*v*/*v*)以改善峰形,提高分离效率。结果显示,二乙胺的加入确实极大地改善了分离效果,见图 6,后续在此基础上进行了流动相的进一步优化。首先考察了改性剂中不同比例的乙腈(20%、30%、40%)对分离效果的影响,结果显示乙腈主要影响 *R*,*R* 异构体和 *S*,*R* 异构体的分离,随着改性剂中乙腈比例的增加,上述二者之间的分离度越来越大;接下来考察了不同比例改性剂(40%、45%、50%)对分离效果的影响,结果显示随着流动相中改性剂比例的增加,洗脱时间逐渐缩短,但分离效果变差。综合考虑,选择以超临界 CO_2-[无水乙醇∶乙腈∶二乙胺(70∶30∶1)]混合溶液(55∶45,*v*/*v*)作为流动相进行分离。



1:*R*,*S* 异构体;2:*R*,*R* 异构体;3:*S*,*R* 异构体;4:盐酸帕洛诺司琼

图 6 添加剂二乙胺对分离效果的影响

3 柱温及背压的考察

与常规流动相相比,超临界流体的性质决定了其更容易受包括柱温和压力在内的色谱条件的影响。当色谱条件发生改变时,超临界流体的密度和溶剂化能力也随之发生改变,进而影响其对目标物的洗脱能力和分离选择性,最终影响其分离效能。从考察结果来看,背压对本研究中流动相的洗脱能力产生了一定的影响,随着背压的升高,系统对 4 个目标物的洗脱增强,保留时间逐渐缩短,这可能与流动相密度和溶解度增加,目标物保留因子降低有关;温度对于盐酸帕洛诺司琼及 3 个异构体的分离影响较大,包括选择性和洗脱能力,随着温度的升高,*R*,*R* 异构体和 *S*,*R* 异构体的分离度逐渐增加,而 *S*,*R* 异构体和盐酸帕洛诺司琼的分离度则逐渐降低,因为温度对于保留因子的影响较为复杂,我们推测柱温降低时,系统内可用的能量及旋转现象减少,异构体的稳定性更好,因此分离效果更佳[22-24]。综合分析分离选择性和洗脱效率,最终选择 12 MPa 背压和 37 ℃柱温条件进行分离分析。

4 结论

采用双柱串联的 SFC 方法对盐酸帕洛诺司琼及其 3 个光学异构体进行拆分,结果表明,在给定的实验条件下,4 个化合物可在 10 min 内完全洗脱、分离。与文献、专利中的方法相比,本方法不仅实现了快速、完全的分离,且准确度高、精密度好,减少了实验过程中有机试剂的用量,即使双柱联用也还是大大缩短了分析时间,提高了分离效率,可适用于盐酸帕洛诺司琼原料及制剂中手性杂质的定量分析。本

研究不仅为相关品种药品的质量控制提供了方便可行的新技术和新选择，也为 SFC 技术在药物手性拆分中的应用及正相-SFC 法转换提供了应用案例和参考依据。

[参 考 文 献]

[1] 吴双，吴丹，施一翔. 帕洛诺司琼、托烷司琼、昂丹司琼预防肝动脉化疗栓塞术后所致呕吐疗效的临床观察[J]. 海军医学杂志，2024，45(8)：857－860.

[2] 王璐，田甜，曹桂红. HPLC-RID 法测定盐酸帕洛诺司琼注射液中甘露醇的含量测定[J]. 广东化工，2024，51(12)：160－162.

[3] 王嘉林，王斯坦. HP-β-CD 手性添加剂反相高效液相色谱拆分盐酸帕洛诺司琼 S，R 异构体[J]. 中国药师，2015，18(2)：237－240.

[4] United States Pharmacopeial Convention. USP 46-NF 41[S]. 2023.

[5] 马丁代尔氏大药典，39 版，2017，1910－1911.

[6] 赵慧英，李桂萍，吴敬飞，等. 盐酸帕洛诺司琼 3 个光学异构体的分离与测定[J]. 药物分析杂志，2012，32(6)：978－980.

[7] 于晓蓉，宋敏，杭太俊. 盐酸帕洛诺司琼光学异构体的手性 HPLC 检查[J]. 中国新药杂志，2008，17(10)：870－872.

[8] 潘红娟，王哲峰，时惠麟，等. 盐酸帕洛诺司琼注射液中异构体含量的 NP-HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志，2009，40(8)：610－612.

[9] 李勇，陈萍，李姿，等. 同时测定盐酸帕洛诺司琼四种光学异构体的方法：中国，201010142389.5[P]. 2011.10.05.

[10] 刘娜. 超临界流体色谱的应用进展[J]. 军事医学，2021，45(7)：558－561.

[11] 葛运程，尚宇瀚，尹磊，等. 超临界流体色谱-质谱联用技术及其应用研究进展[J]. 化学试剂，2024，46(7)：20－28.

[12] 杨学舸，陈怀义，潘星宇，等. 超临界流体色谱-质谱接口技术及应用进展[J]. 分析化学评述与进展，2024，52(10)：1465－1474.

[13] 赵敬丹，刘浩. 超临界流体色谱法测定利福昔明及其制剂的杂质谱[J]. 药物分析杂志，2021，41(10)：1806－1811.

[14] 林丽琴，汪霞，杨直，等. 超临界流体色谱法测定吲达帕胺及其对映异构体含量[J]. 中国药业，2024，33(12)：75－78.

[15] 国家药品监督管理局. 药品注册标准 YBH05542021[S].

[16] 国家药品监督管理局. 药品注册标准 YBH01222014[S].

[17] 朱丽萍，张叶，乐健，等. 超临界流体色谱法分离测定布立西坦片中立体异构体杂质[J]. 中国药学杂志，2024，59(21)：2084－2090.

[18] 司晓喜，王丹，许志刚，等. C_{18}-亲水相互作用柱串联高效液相色谱法测定咖啡因[J]. 化学世界，2023，64(5)：348－352.

[19] 谭菊英，梁秋霞，刘庄蔚，等. 双柱串联 HPLC-CAD 法测定甘露醇有关物质[J]. 药物分析杂志，2022，42(12)：2129－2135.

[20] 司晓喜，杨怡，蔡晓丽，等. 高效液相色谱双柱串联技术用于维生素 B3 的高效分离测定[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版)，2023，41(6)：85－89.

[21] DAICEL. CHIRALPAK® IA-3/IB-3/IBN-3/ID-3/IE -3/IF-3/IG -3/IJ-3/IK-3/IM-3/IN-3 3.0 mm 内径色谱柱使用手册[EB/OL]. https://www.daicelchiraltech.cn/column/sfc_9/IG_SFC.html.

[22] SI-HUNG L，BAMBA T. A review of retention mechanism studies for packed column supercritical fluid chromatography[J]. *Anal Sci Adv*，2021，2(1－2)：47－67.

[23] 朱镇星，马密茸，李翠杰，等. 柱前衍生气相色谱法测定(*R*)-(－)-4-氰基-3-羟基丁酸乙酯的对映异构体[J]. 中国现代应用药学，2025，42(15)：2658－2661.

[24] 王伟，喻承昊，谭艳云，等. 泊沙康唑新异构体杂质分离纯化及其结构表征[J]. 中国现代应用药学，2024，41(20)：2799－2805.

编辑：刘卓越/接受日期：2025－09－11