

纤维素键合手性固定相拆分盐酸奈福泮对映体

郑旭霞, 刘培建(河南省洛阳正骨医院, 郑州 450000)

摘要: 目的 建立一种用键合纤维素手性固定相的 HPLC 拆分盐酸奈福泮对映异构体。方法 盐酸奈福泮的分离使用 Chiralpak IC 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为正己烷-异丙醇(90 : 10, 0.1% DEA), 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 267 nm, 柱温 25 °C。结果 盐酸奈福泮对映体在键合纤维素手性固定相上能够完全分离, 分离度为 6.53。结论 该方法可快速实现盐酸奈福泮对映体的分离。

关键词: 高效液相色谱法; Chiralpak IC 手性柱; 对映体分离; 盐酸奈福泮

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)03-0278-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.004

引用本文: 郑旭霞, 刘培建. 纤维素键合手性固定相拆分盐酸奈福泮对映体[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 278-280.

Separation of Nefopam Hydrochloride with a Bonded Cellulose Chiral Stationary Phase

ZHENG Xuxia, LIU Peijian(Luoyang Orthopedic Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method with a bonded cellulose chiral stationary phase for the chiral separating enantiomers of nefopam hydrochloride. **METHODS** Nefopam hydrochloride was separated by a Chiralpak IC (250 mm×4.6 mm, 5 μm) at 25 °C and detected at 267 nm, the mobile phase was *n*-hexane-isopropanol(90 : 10, 0.1% DEA) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. **RESULTS** Nefopam hydrochloride enantiomers were separated on a cellulose bonded chiral stationary phase and the resolution was 6.53. **CONCLUSION** The method can be used for quickly separating the enantiomers of nefopam hydrochloride.

KEYWORDS: HPLC; Chiralpak IC chiral column; enantiomeric separation; nefopam hydrochloride

盐酸奈福泮为一种新型的非麻醉性中枢镇痛药, 不具有非甾体抗炎药的特性, 亦非阿片受体激动药, 对中、重度疼痛有效, 其镇痛作用与吗啡相当^[1-2]。盐酸奈福泮对呼吸的抑制作用较轻, 对循环系统无抑制作用, 依赖性小, 常用于手术后、癌症、急性外伤镇痛, 亦用于急性胃炎、胆道蛔虫症、输尿管凝结物等引起的内脏平滑肌绞痛^[3-5]。该药物手性研究方面的资料较为少见, 临床研究也仅限于消旋体, 但其药动学表现出立体选择性。通过对大多数动物疼痛模型的研究发现, 盐酸奈福泮对映体的镇痛活性不同, 其活性顺序为(+)-盐酸奈福泮>(±)-盐酸奈福泮>(-)-盐酸奈福泮^[6-8]。因此, 盐酸奈福泮对映体的拆分对其质量控制和临床研究至关重要。文献[9]报道采用毛细管亲和电动色谱对盐酸奈福泮对映体进行分析, 但其分离度较低($R=1.93$)。曾琦^[10]曾用亲和毛细管整体柱对奈福泮对映体进行分离分析, 分离度也较低($R=1.44$)。未见使用 Chiralpak IC 手性柱, 在正相色谱条件下对盐酸奈福泮对映体进行手性拆

分的报道。盐酸奈福泮结构式见图 1。

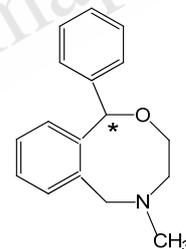


图 1 盐酸奈福泮结构式

Fig. 1 Structures of nefopam hydrochloride

Chiralpak IC 是纤维素-三(3,5-二氯苯基氨基甲酸酯)共价键合手性固定相, 是一种新型的手性柱, 具有应用范围广、手性识别能力强等优点。本实验使用 Chiralpak IC 手性柱对盐酸奈福泮对映体进行分离分析, 并考察了流动相、柱温以及流速对手性分离的影响。

1 仪器与试剂

Agilent HP 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Chiralpak IC 手性柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 日本大赛璐公司); BP 211D 电子天平(德国

作者简介: 郑旭霞, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0371) 85965137

E-mail: zhengxuxia1988@163.com

Sartorius 公司); Exceed-Cd-20 型实验室超纯水机(苏州艾科水处理设备工程有限公司)。

正己烷(批号: 20161101)、异丙醇(批号: 20161206)和无水乙醇(批号: 20170311)均为色谱纯, 购自天津市科密欧化学试剂有限公司; 二乙胺(DEA, 分析纯, 批号: 201601130, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 盐酸奈福泮(中国药品生物制品检定所, 批号: 100168-200602; 纯度: 99.9%)。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Chiralpak IC(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 手性色谱柱, 流动相以正己烷为基础溶剂, 改变流动相改性剂的种类及比例、柱温、流速、DEA 比例, 以考察其对盐酸奈福泮对映体拆分的影响。检测波长 267 nm, 进样量 10 μL。通过测定 1,3,5-叔丁基苯的出峰时间来确定 Chiralpak IC 柱的死时间。

2.2 盐酸奈福泮样品溶液的配制

精密称取盐酸奈福泮 2.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加异丙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 经过 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后即得 0.2 mg·mL⁻¹ 样品溶液, 置于 4 °C 冰箱中储存, 备用。

3 结果与讨论

3.1 流动相改性剂种类及比例的考察

在流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 流动相为正己烷-异丙醇-0.1% DEA 的条件下, 改变正己烷与异丙醇的比例, 考察盐酸奈福泮对映体的出峰时间与分离度。结果显示, 随着异丙醇比例的减小, 对映体出峰时间均延长, 手性对映体的分离能力随之提高。异丙醇量为 10% 时, 对映体分离度达到最好。但异丙醇量为 5% 时, 对映体色谱峰出现拖尾现象, 对映体未达基线分离。此外, 还考察了无水乙醇作为流动相改性剂对拆分的影响, 手性对映体均未达到基线分离。故选择异丙醇作为流动相改性剂。结果见表 1。

3.2 柱温对对映体拆分的影响

固定流速为 0.8 mL·min⁻¹, 流动相为正己烷-异丙醇(90:10, 0.1% DEA)的色谱条件, 改变柱温, 考察对映体出峰时间与分离度。结果表明, 随着温度的升高, 对映体分离度减小, 出峰时间略有提前。5 °C 下分离度较高, 但与 25 °C 的分离度相差不大, 因 25 °C 接近室温, 操作起来更方便, 故在 25 °C 下优化其他条件。结果见表 2。

表 1 异丙醇比例对盐酸奈福泮对映体分离的影响

Tab. 1 Effect of isopropanol ratio on the separation of nefopam hydrochloride

| 流动相 (正己烷: 异丙醇) | 保留时间/min | | 容量因子 | | 分离因子 α | 分离度 R |
|----------------------|----------|-------|--------|--------|------------------|------------|
| | t_1 | t_2 | k'_1 | k'_2 | | |
| 95:5 | 16.29 | 21.85 | 4.23 | 6.02 | 1.36 | 1.19 |
| 90:10 | 7.80 | 10.12 | 1.51 | 2.25 | 1.32 | 6.53 |
| 80:20 | 6.56 | 7.83 | 1.11 | 1.51 | 1.21 | 4.84 |
| 70:30 | 6.05 | 6.97 | 0.94 | 1.24 | 1.17 | 4.01 |
| 60:40 | 5.74 | 6.49 | 0.84 | 1.08 | 1.15 | 3.34 |

表 2 柱温对盐酸奈福泮对映体分离的影响

Tab. 2 Effect of temperature on the separation of nefopam hydrochloride

| 柱温/ °C | 保留时间/min | | 容量因子 | | 分离因子 α | 分离度 R |
|-----------|----------|-------|--------|--------|------------------|------------|
| | t_1 | t_2 | k'_1 | k'_2 | | |
| 5 | 10.45 | 14.55 | 2.35 | 3.67 | 1.42 | 7.48 |
| 10 | 9.50 | 13.30 | 2.05 | 3.27 | 1.41 | 7.42 |
| 15 | 8.90 | 12.10 | 1.86 | 2.88 | 1.39 | 7.35 |
| 20 | 8.24 | 11.00 | 1.64 | 2.51 | 1.36 | 7.00 |
| 25 | 7.80 | 10.12 | 1.51 | 2.25 | 1.32 | 6.53 |
| 30 | 7.49 | 9.60 | 1.41 | 2.09 | 1.27 | 6.36 |
| 35 | 7.17 | 9.06 | 1.30 | 1.91 | 1.25 | 5.73 |

3.3 流速对对映体拆分的影响

在柱温为 25 °C, 流动相为正己烷-异丙醇(90:10, 0.1% DEA)的色谱条件下, 改变流速, 考察对映体出峰时间与分离度。结果表明, 在 0.2~1.2 mL·min⁻¹ 内, 流速为 0.2 mL·min⁻¹ 时, 分离度最大, 但分析时间较长。在达到基线分离的前提下, 为了缩短分析时间, 选用 0.8 mL·min⁻¹ 为最佳流速。结果见表 3。

表 3 流速对盐酸奈福泮对映体分离的影响

Tab. 3 Effect of flow rate on the separation of nefopam hydrochloride

| 流速/ mL·min ⁻¹ | 保留时间/min | | 容量因子 | | 分离因子 α | 分离度 R |
|-----------------------------|----------|-------|--------|--------|------------------|------------|
| | t_1 | t_2 | k'_1 | k'_2 | | |
| 0.2 | 29.26 | 37.92 | 1.20 | 1.86 | 1.32 | 7.30 |
| 0.4 | 15.28 | 19.86 | 1.45 | 2.18 | 1.32 | 7.22 |
| 0.6 | 10.30 | 13.37 | 1.48 | 2.22 | 1.32 | 6.82 |
| 0.8 | 7.80 | 10.12 | 1.51 | 2.25 | 1.32 | 6.53 |
| 1.0 | 6.26 | 8.17 | 1.51 | 2.28 | 1.33 | 6.45 |
| 1.2 | 5.23 | 6.82 | 1.52 | 2.28 | 1.33 | 6.21 |

3.4 碱性调节剂对对映体拆分的影响

在柱温 25 °C、流速为 0.8 mL·min⁻¹、流动相为正己烷-异丙醇(90:10)的条件下, 加入不同百分比含量的碱性调节剂(DEA), 考察对映体出峰时间与分离度。结果表明, 不同比例的 DEA (0.1%~0.3%) 对分离度影响不大。另外, 在不加

DEA 时, 盐酸奈福泮对映体分离度较小($R < 2$), 并且有拖尾现象。故选用 0.1% DEA。结果见表 4。

表 4 DEA 对盐酸奈福泮对映体分离的影响

Tab. 4 Effect of DEA on the separation of nefopam hydrochloride

| DEA/% | 保留时间/min | | 容量因子 | | 分离因子 α | 分离度 R |
|-------|----------|-------|--------|--------|---------------|---------|
| | t_1 | t_2 | k'_1 | k'_2 | | |
| 0.1 | 7.80 | 10.12 | 1.51 | 2.25 | 1.32 | 6.53 |
| 0.2 | 7.88 | 10.22 | 1.49 | 2.20 | 1.31 | 6.49 |
| 0.3 | 7.80 | 10.12 | 1.52 | 2.27 | 1.31 | 6.51 |

综上所述, 最终确定盐酸奈福泮拆分的最佳色谱条件为流动相正己烷-异丙醇(90 : 10, 0.1% DEA), 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 紫外检测波长 267 nm 。盐酸奈福泮在最佳条件下的色谱图见图 2。

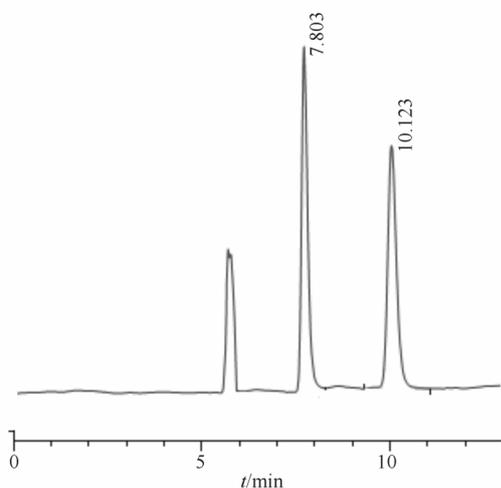


图 2 盐酸奈福泮拆分色谱图

Fig. 2 Chromatogram of enantiomers of nefopam hydrochloride

4 结论

本实验采用 Chiralpak IC 手性柱在正相色谱条件下直接拆分了盐酸奈福泮对映体, 并且系统

地考察了流动相组成与配比、流速以及柱温对盐酸奈福泮对映体分离的影响。优化得到: 最佳的流动相组成为正己烷-异丙醇(90 : 10; 0.1% DEA); 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 分离度 R 为 6.53。该方法准确快速、操作简单、基线分离较好。

REFERENCES

- [1] CHENG H B. Content determination of nefopam hydrochloride and naproxen in nefopam hydrochloride Naproxen capsules by HPLC [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2012, 26(7): 740-746.
- [2] CHENG J X, LI L. The curative effect of drotaverine hydrochloride combined with Nefopam in treating renal colic [J]. Harbin Med J(哈尔滨医药), 2013, 33(2): 86-87.
- [3] FENG S H, ZHANG Q W, PANG S W. Determination of nefopam hydrochloride sustained-release tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2006, 23(9): 904-905.
- [4] 陈新谦. 新编药理学[M]. 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 176-177.
- [5] GUILLAUME H, ANNE G, JEAN M. Specific and sensitive analysis of nefopam and its main metabolite desmethyl-nefopam in human plasma by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 42(5): 593-600.
- [6] FASMER O B, BERGE O G, JORGENSEN H A, et al. Antinociceptive effects of \pm , (+)- and (-) nefopam in mice [J]. J Pharm Pharmacol, 1987, 39(7): 508-511.
- [7] AYMAR D, WAROT D, DEMOLIS P. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral nefopam in healthy volunteers [J]. Pharmacol Toxicol, 2003, 6(92): 279-286.
- [8] MATHER G G, LABROO R, GUERN M E, et al. Nefopam enantiomers: preclinical pharmacology/toxicology and pharmacokinetic characteristics in healthy subjects after intravenous administration [J]. Chirality, 2000, 12(3): 153-159.
- [9] YANG F, DU Y X, CHEN B. Enantiomeric separation of nefopam hydrochloride by affinity electrokinetic chromatography using chondroitin sulfate as a chiral selector and its chiral recognition mechanism [J]. Chromatographia, 2010, 72(5/6): 489-493.
- [10] ZENG Y, JI Y B. Study of interaction between bovine serum albumin and nefopam enantiomers with affinity capillary monolith [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2016, 47(1): 66-72.

收稿日期: 2018-03-15

(本文责编: 曹粤锋)