

反相 C₁₈ 液相色谱柱选择性理论及其应用

张伟清, 胡昌勤*

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 反相 HPLC 分析中色谱柱的选择性受到了越来越多的关注, 在这些色谱柱中, C₁₈ 柱是目前最常用的色谱柱, 然而各种 C₁₈ 色谱柱在分离效果上也存在着较大差异, 因此能否找到合适的 C₁₈ 柱关系到整个实验的成败。经过近年来的研究, 已形成了一些色谱柱分类、选择方法, 如色谱柱参数 (*H, S, A, B, C*) 法、相似系数 (*F* 值) 法等, 减少了色谱柱选择的盲目性。本文结合近年来的研究, 归纳了这些方法的优点及其在应用过程中的局限性, 并基于前人的理论, 结合实际工作, 为药品分析中合理选择色谱柱提出了建议和方法。

关键词: 反相 HPLC; C₁₈ 柱; 选择性; 相似度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 05-0555-05

Theory of selectivity of RP-LC C₁₈ column and its application

ZHANG Wei-qing, HU Chang-qin*

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: In recent years, more and more researchers focus on the selectivity of RP-HPLC columns. Among these columns, C₁₈ column is the most commonly used the column. Yet even the same filler can not give us the same separation effect with the columns of different brands and different types, therefore, it is important to choose the suitable HPLC column for carrying out an experiment. After study in recent years, some column classification, selection methods (*e.g.*: column parameter method, *F* value method) have been achieved and contributed to the finding of suitable columns and reducing the blindness of column selection. This paper summarizes the advantages of these methods and their limitations in the application process, and gives some advices and expectations to pharmaceutical analysis works based on the works of other researchers.

Key words: RP-HPLC; C₁₈ column; selectivity; similarity

高效液相色谱法 (HPLC) 作为各国药典收录的常规分析方法以其高效、灵敏和选择性好等特点广泛用于药物原料及其制剂的含量和杂质分析。在实际工作中, 对高效液相色谱法, 尤其是反相高效液相色谱法来说, 色谱柱的选择是一项十分重要的工作, 能否找到合适的色谱柱, 关系到整个分析工作的成败。C₁₈ 柱是目前最常用的色谱柱, 市场上有 600 多种 C₁₈ 色谱柱, 且不断有新的色谱柱出现。采用不同的色谱柱分析具体样品时, 由于色谱柱选择性的差异, 溶质的保留值、色谱峰之间的分离度甚至色谱峰顺序都可能

出现较大的差异^[1, 2]。各国药典目前仅给出 C₁₈ 色谱柱的简单信息, 如中国药典中的“用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂”; 美国药典 (USP) 中的“L1 填料 (octadecylsilane bonded silica gel)”等未对 C₁₈ 色谱柱的具体型号等进行规定和推荐。欧洲药典 (EP) 中虽然有时还给出色谱柱孔径、颗粒大小、比表面积等信息, 但这些物理参数与色谱柱的选择性之间也仅有中度关联或缺乏关联^[3]。因此, 在实际工作中选择色谱柱时存在一定的盲目性, 也给药典方法的执行带来一定难度。在新药研发过程中建立 HPLC 分析方法时, 虽然从药物的相对分子质量及 p*K*_a 入手, 已经有一些经验性的色谱柱选择方法可以参考^[4-6], 但在针对难分离物质时, 仍需要经过对色谱柱和流动

收稿日期: 2009-09-24.

*通讯作者 Tel: 86-10-67095308, E-mail: hucq@nicpbp.org.cn

相的大量筛选才能完成。

目前对色谱柱的性能测试主要有非色谱法 (non-chromatographic methods) 和色谱法 (chromatographic methods) 两类: 非色谱法采用红外光谱和核磁分析等直接分析色谱柱填料的特征; 而色谱法则致力于通过将色谱柱对溶质保留值的影响量化, 以期直观地反映色谱柱的性能差异。色谱法又可分为经验法 (empirical based evaluation method)、热动力学法 (thermodynamically based methods) 和保留机制法 (evaluation method based on a retention model)^[7, 8], 其中保留机制法已成为近年来的研究热点。本文主要对基于保留机制法的反相色谱柱选择理论及其应用的进展情况进行介绍。

1 色谱柱选择性参数及其应用

1.1 基本原理

将色谱柱中影响溶质保留值的特征进行量化分类, 建立色谱柱参数与色谱柱的选择性之间的联系, 进而解决色谱柱的选择问题。

Wilson 等^[9-11]采用 67 种分子特征差异较大的溶质在 10 根反相色谱柱上进行保留值测试, 结合前人的实验结果 (86 种溶质, 5 根 C₁₈ 和 C₈ 色谱柱) 并进行大量的数学推导变换, 得出在形式上和溶剂化方程十分相似的经验性线性自由能方程, 用来讨论色谱柱和其他条件对化合物容量因子 (k) 的影响。

$$\log(k/k_{\text{ref}}) \equiv \log \alpha = \eta'H + \sigma'S + \beta'A + \alpha'B + k'C \quad (1)$$

方程中 k 和 k_{ref} 分别代表相同色谱条件下待测溶质和参比溶质 (常用乙苯) 的容量因子; H 、 S 、 A 、 B 、 C 分别代表色谱中当流动相、温度均恒定时色谱柱的疏水性 (hydrophobicity)、立体选择性 (steric hindrance to retention)、氢键的酸 (hydrogen-bond acidity)、碱性 (hydrogen-bond basicity) 和离子交换性参数 (cation-exchange/ion interaction behavior); η' 、 σ' 、 β' 、 α' 、 κ' 分别代表溶质的疏水性、立体选择性、氢键的酸、碱性和离子交换性参数。

从方程 (1) 中可以看出, 溶质在硅胶色谱柱的 k 由 H 、 S 、 A 、 B 和 C 等 5 个色谱参数所决定。如果利用上述色谱理论对色谱柱进行分类, 应用中即可实现快速选择色谱柱的目的。

1.2 应用

Jonathan 等^[12-14]经过大量实验, 得到了 158 根不同型号色谱柱的色谱柱参数 (H , S , A , B , C), 并依据色谱柱的发展简史将硅胶色谱柱分为 3 大类: A 型色谱柱 (即旧型色谱柱, old-type columns)、B 型色谱柱

(即新型色谱柱, new-type columns) 和 E 型色谱柱 (即内嵌极性基团或极性基团封尾的色谱柱, embedded-polar-group columns, EPG)。在实践中逐渐总结出各类色谱柱的特点: ① A 型色谱柱的金属含量较高, 硅胶纯度较低。 H (疏水性) 和 S (立体位阻) 值较低。而 A (氢键酸性)、 C (阳离子交换活性) 和 B (氢键碱性) 值相对较高; 在低 pH 缓冲液流动相中加入三乙胺会导致 C 的增加, 而其他色谱柱参数没有本质上的变化, 很显然, 离子化的三乙胺与离子化的硅醇基作用, 使色谱柱上的负电荷减少。② 在低 pH 条件下, E 型色谱柱的 A 、 C 、 H 值较低, B 值较高。因此, E 型色谱柱优先保留苯酚类和羧酸类化合物, 而对氢键受体、质子化溶剂如质子化胺以及疏水性强的化合物保留较弱。③ 在 B 型色谱柱中很容易找到相似的色谱柱, 而在 A 型色谱柱中, 这项工作却很难实现。E 型色谱柱在用来分析限定范围内的样品 (如自由酸、碱溶质) 时具有相似的选择性, 而其他情况下相似度较低。

目前, 与中国药典 2005 版配套的《中国药品检验标准操作规范》中已应用此分类方法对国内常用的 C₁₈ 柱进行总结, 便于实验人员根据被测化合物的特性选择不同类型的色谱柱, 从而达到预期的分离分析效果。在实际工作中也已经证明选择相同类型的色谱柱有利于不同实验室间的数据交换^[15]。

1.3 方法局限性

上述分类方法虽然建立了 5 个色谱柱参数与色谱柱选择性之间的初步联系, 并根据色谱柱发展简史对色谱柱进行了分类。但该分类方法并没有一个十分明确的指标来衡量色谱柱的选择性, 在使用中仍需要使用者依据各自的经验, 来判断决定选择哪类色谱柱。Dehouck 等^[16]曾以欧洲药典中乙酰水杨酸的有关物质分析为例, 验证色谱柱分类的必要性和重要性。在所考察的 69 根 C₁₈ 柱中: ① 所有 250 mm 的 I-a 类色谱柱 (I-a 类色谱柱多数属于 B 型色谱柱, 平均孔径在 80~120 Å, 1 Å = 0.1 nm)、部分 I-b 类短色谱柱 (I-b 类色谱柱包括部分 A 型色谱柱和孔径大于 120 Å 的 B 型色谱柱等) 和所有 II-b 类色谱柱 (属于 A 型色谱柱) 均能将乙酰水杨酸和其已知的杂质完全分离 (药典中要求色谱柱的柱长为 250 mm), 而其他类的色谱柱则均不能将上述物质完全分离 (分类方法见文献[8, 17]); ② 有 5 根色谱柱能满足系统适用性实验要求 (乙酰水杨酸与水杨酸的分离度应不低于 6.0), 但并不能将乙酰水杨酸与其已知的 6 个杂质完全分离; 相反有 7 根色谱柱并不能满足系统适用性实验要求, 却能将乙酰水杨酸与上述杂质完全分离。充

分说明了色谱柱分类系统的重要性和复杂性。此外, 当用统计学方法利用 Jonathan 等^[12-14]得到的色谱柱参数对色谱柱进行聚类分析时(图 1), 发现 A、B 和 E 型色谱柱分散在图 1 中的各个类中, 得不到 A、B 和 E 型色谱柱的分类结果。可见, 上述分类方法虽然能够对色谱柱的选择提供一定的指导, 但仍然需要进一步改进。

2 利用色谱柱参数的相似度选择色谱柱

在方法 1 的理论基础之上, 前人又将相似度的理念引入色谱柱选择, 给实验带来了便捷。

2.1 基本原理

在色谱柱参数的基础上, 经过大量的实验和数学推导得出了相似度 (F_s) 公式:

$$F_s = [(H_2 - H_1)^2 + (S_2^* - S_1^*)^2 + (A_2 - A_1)^2 + (B_2 - B_1)^2 + (C_2 - C_1)^2]^{1/2} \quad (2)$$

这里的 H 、 S 、 A 、 B 、 C 与方程 (1) 中的意义相同, F_s 越小, 说明两根色谱柱的选择性越相似, F_s 越大, 则说明两根色谱柱之间的选择性差异越大。目前, 可以利用一些公开发表的文献^[18]和数据库^[19]中数据, 或利用 USP 网站及一些色谱柱选择软件(如“column selector for acd/chemsketch”)查询到多支色谱柱的相似系数。

2.2 应用

2.2.1 选择相似的色谱柱 不同型号的 C₁₈ 柱在选择性上会存在差异, 如果在实验室中想要重现文献或其他实验室的实验结果, 除了寻找与文献或其他实验室相同厂家, 相同的色谱柱进行实验外, 还可以选择与其选择性相似的色谱柱进行实验。方程 (2) 中的 F_s 值可以解决这个问题。

经过大量实验证明, F_s 值越小, 说明两根色谱柱之间的选择性越相近。通常当 $F_s < 3$ 时, 就可以认为它们有相似的选择性。图 2 是一个含有 9 种酸、碱和中性化合物的混合物分离分析实例^[20, 21], 从图中可以看出, 当 $F_s = 1, 2$ 时, 出峰的顺序和位置差别不大, 而当 $F_s = 10$ 时, 出峰的位置, 特别是在 35 min 以后的出峰顺序都有较大的差别。因此当要寻找选择性相似的色谱柱时, 要选择 $F_s < 3$ 的两根色谱柱。

2.2.2 选择不同的色谱柱 在药物分离研究中, 经常会遇到两个特定的组分分离不理想的情况, 或希望特定的色谱峰有更好的分离。这时, 可能需要通过改变流动相、柱温或是更换色谱柱来加以实现。其中选用选择性差异较大的色谱柱通常可很方便地解决这一问题。

从图 2 中可以看出, 当 $F_s = 10$ 时, 色谱柱的选择性已经发生了明显的变化; 当 $F_s = 196$ 时, 从图 3^[20, 22] 中可以看出 3 号峰和 6 号峰在新色谱柱上得到了良好的分离, 而对 1 号和 2 号峰的分离也有所改善, 在更换色谱柱的同时, 也可结合流动相及温度的变化, 从而达到更好的效果。

2.3 方法局限性

方法 2 中相似度的引入给实验带来了极大的方便。但由于化合物的种类和性质不同, 该方法也只能解决部分问题。在实际工作中, 色谱系统中的最难分离物质对往往只和 1 个或 2 个色谱柱选择性参数关系密切, 与其他色谱柱参数无明显关联, 而方程 (2) 给出的 F_s 值却是 5 个色谱柱参数的综合差异之和; 相关参数的差异并不能通过其他不相关参数的相似

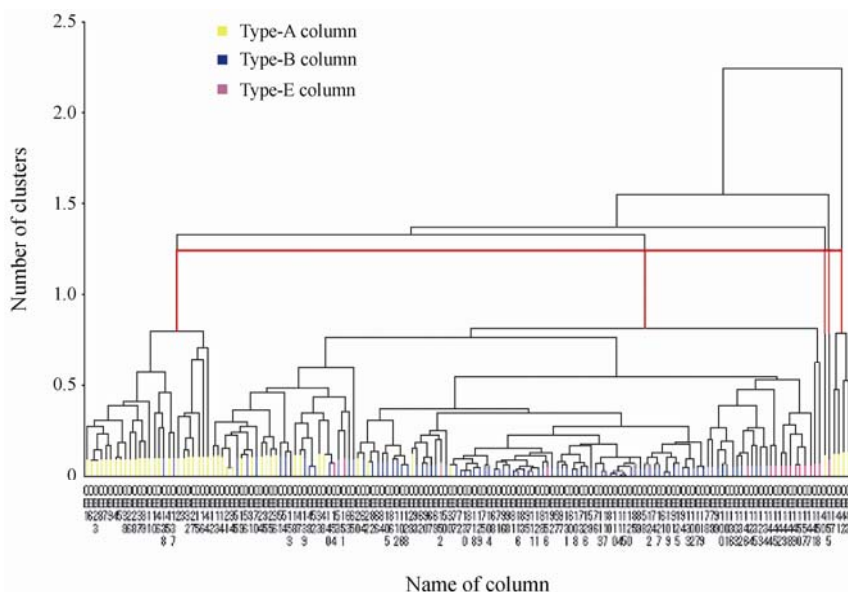


Figure 1 The clustering analysis of 158 columns

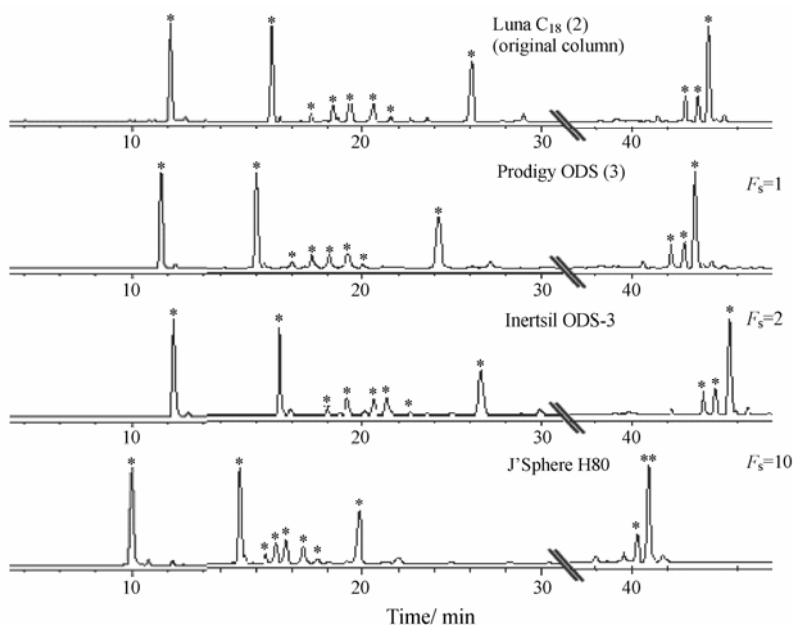


Figure 2 An example of the separation analysis of a mixture of 9 kinds of compounds (9 kinds of acid, basic and neutral compounds are *N,N*-diethyl-acetamide, nortryptiline, phenytoin sodium, phenyl cyanide, anisol, toluene, *cis*-chalcone, *trans*-chalcone, mefenamic acid) using different columns

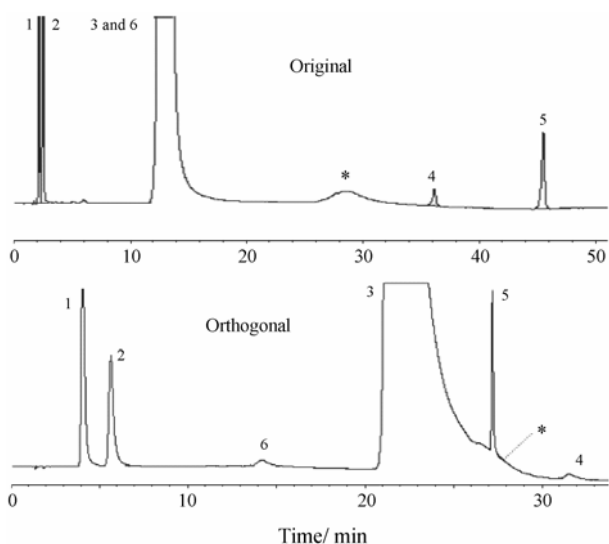


Figure 3 An example of the separation analysis of a compound, its impurities and metabolites (among them, peak 3 is the compound, peaks 1, 2, 4, 5 and 6 are its impurities and metabolites) using different columns

来弥补，这是利用方程 (2) 选择色谱柱的局限。例如作者复核 2010 版中国药典阿莫西林有关物质分析方法时发现，阿莫西林与杂质阿莫西林酸、4-羟基苯甘氨酸的分离度只取决于参数 $C(7.0)$ ，而受其他 4 个色谱柱参数的影响不大，如果在实验中使用的两根色谱柱其他参数差别不大，而在 $C(7.0)$ 参数上有一些差别，即使两根色谱柱的 F_s 值并不是很大，也会使分析结果有较大的差别。在这种情况下，用相似度的方法来选择色谱柱就显得有些力不从心。因此建立具体

品种的色谱柱选择性数据库就成了当务之急。

3 展望

虽然在 USP 等网站上已经将方法 2 作为推荐的色谱柱选择方法，但作者发现，当重现文献或是其他实验室的实验结果时，如果首先确定文献中应用的色谱柱属于 A、B 或 E 中的哪一种，再按照公式 (2) 在同类的色谱柱中选择相似的色谱柱，即将上述的方法 1 和方法 2 相结合，比直接利用单独的方法 1 或方法 2 易取得成功。

对部分较挑剔色谱柱的抗生素品种进行了色谱柱选择和方法优化研究，其相关研究结果已经以网络数据库的形式公布，即“中国药典 2005 版抗生素品种色谱柱推荐系统”，该数据库收录了多种色谱柱对较挑剔色谱柱的抗生素品种的色谱图，实验人员可以很方便地查找到与各抗生素品种相适应的色谱柱。

目前以 UPLC 为代表的各类快速液相分析技术已经成为 HPLC 分析的主流，但制约 UPLC 应用的一个重要因素就是目前应用于 UPLC 的色谱填料与常规 HPLC 色谱柱填料相比较为单一，虽然在对活性成分的分析时这一矛盾通常并不突出，但经过简单的方法转换，将常规的 HPLC 方法变为 UPLC 方法时，通常难以胜任对药物复杂体系如有关物质的分析^[23]。如果能够 在色谱系统中，根据最难分离物质找出其分离度和色谱柱选择性参数之间的关系，并进行量化表征，即能较理想地解决色谱柱的快速选择问

题, 进而加速 UPLC 的应用。

References

- [1] Rosa B, Victoria SN, Jose B. Modeling retention in liquid chromatography as a function of solvent composition and pH of the mobile phase [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 869: 27–39.
- [2] Vervoort RJM, Debets AJJ, Claessens HA, et al. Optimization and characterization of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 897: 1–22.
- [3] Timea I, Yvander H, Dora V, et al. Minimal number of chromatographic test parameters for the characterization of reversed-phase liquid chromatographic stationary phases [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 954: 99–114.
- [4] Lu PZ, Zhang YK, Liang XM. High Performance Liquid Chromatography Methods and Expert System (高效液相色谱法及其专家系统) [M]. Liaoning: Science and Technology Press, 1992.
- [5] Liu GQ, Yu ZL. Technology of Column, (色谱柱技术) [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [6] Whelan TJ, Gray MJ, Slonecker PJ, et al. Study of the selectivity of reversed-phase columns for the separation of polycarboxylic acids and polyphenol compounds [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1907: 148–156.
- [7] Tomasz B, Roman K, Katerina N, et al. Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure-retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1075: 109–115.
- [8] Visky D, Heyden YV, Ivayi T, et al. Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 977: 39–58.
- [9] Wilson NS, Nelson MD, Dolan JW, et al. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography I. A general quantitative relationship [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 961: 171–193.
- [10] Wilson NS, Nelson MD, Dolan JW, et al. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in conditions [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 961: 195–215.
- [11] Wilson NS, Dolan JW, Snyder LR, et al. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography III. The physico-chemical basis of selectivity [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 961: 217–236.
- [12] Jonathan J, Gilroy B, John WD, et al. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography V. Higher metal content (type-A) alkyl-silica columns [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1026: 77–89.
- [13] Gilroy JJ, Dolan JW, Snyder LR. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography IV. Type-B alkyl-silica columns [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1000: 757–778.
- [14] Wilson NS, Gilroy J, Dolan JW, et al. Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VI. Columns with embedded or end-capping polar groups [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1026: 91–100.
- [15] Wang MJ, Li YP, Yang YI, et al. A primary study of standardizing HPLC retention indices of pharmaceutical related substances [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2006, 26: 102–106.
- [16] Dehouck P, Visky D, Heyden V, et al. Characterization of reversed-phase liquid-chromatographic columns by chromatographic tests — Comparing column classification based on chromatographic parameters and column performance for the separation of acetylsalicylic acid and related compounds [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1025: 189–200.
- [17] Visky D, Vander Y, Heyden V, et al. Characterization of reversed-phase liquid chromatographic tests rational column classification by a minimal number of column test parameters [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1012: 11–29.
- [18] Steffek RJ. A comparison of silica-based C₁₈ and C₈ HPLC columns to aid column selection [J]. *LC-GC*, 1995, 13: 720.
- [19] Euerby MR, Petersson P. Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 994: 13.
- [20] Snyder LR. A new look at the selectivity of RPC columns [J]. *Anal Chem*, 2009, 79: 3254–3262.
- [21] Dolan JW, Maule A, Bingley D, et al. Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1057: 59–74.
- [22] Jackson P, Patrick L, Yun M, et al. “Orthogonal” separations for reversed-phase liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1101: 122–135.
- [23] Zhang DS, Li J, Xu MZ, et al. Comparison of the ultrafast liquid chromatography with normal high-performance liquid chromatography for determination of clindamycin phosphate and its related substances [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2008, 33: 347–351.