

药物分析中 C18 色谱柱的差异与选择

商国举¹, 尹文龙¹, 蔡振华², 蒋庆峰^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 在药物分析中高效液相色谱法用得非常普遍, 而色谱柱的选择直接影响实验结果与药物的质量控制。不同 C18 色谱柱的保留行为千差万别, 选择适宜的色谱柱对分析样品至关重要。以 C18 色谱柱的内部化学键合相为切入点, 介绍 C18 色谱柱的差异, 并综述在不同的 pH 环境、流动相极性、药物极性条件下以及根据色谱柱的分类系统选择合适的键合相, 为如何正确快速的选择 C18 色谱柱提供参考。

关键词: C18 色谱柱; 质量控制; 色谱柱分类系统; 药物分析

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)03-0341-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.024

The difference and selection of C18 column in drug analysis

SHANG Guo-ju¹, YIN Wen-long¹, CAI Zhen-hua², JIANG Qing-feng²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: HPLC is very popular in the analysis of drugs. while the column selection affects the experimental results. The retention behavior of different C18 chromatographic column differ in thousands of ways, choose the appropriate column is essential to analysis of samples. From the internal chemical bonds combination with C18 chromatographic column, introduce different C18 column. Overview how to select bonded phase in different pH environment, different mobile phase polarity, different drug polarity conditions. And according to the classification system of chromatographic column select bonded phase. Provides the reference for the C18 column selection.

Key words: C18 column; quality control; column classification system; drug analysis

高效液相色谱 (HPLC) 法选择性高、灵敏度高、分析速度快, 而且大部分可以溶解的药物能用该法分析, 所以该技术已经成为药物分析的首选^[1-2]。色谱柱是高效液相分离系统的最重要的环节, 业内常把色谱柱比喻为液相色谱的心脏, 因为色谱柱的类型决定了色谱系统的性质, 色谱柱的粒径和长度影响了分析时间和分析效率^[3]。氨基柱、苯基柱、氰基柱等正相色谱柱和 C18、C8 等反相色谱柱是药物分析与评价工作中最常见的两类色谱柱。

以碳十八硅烷化学键合硅胶固定相 (C18 或 ODS) 的反相色谱出色地完成了液相色谱分析任务, 而且与其他色谱相比, C18 反相色谱有明显的优势, 它可直接进样分析水溶性样品, 因而适用范围广, 被誉为“标准固定相分离模式”^[4]。各国药典

涉及使用液相色谱法进行检测的品种当中, C18 色谱柱作为固定相应用最为广泛。目前市场上有 600 多种 C18 色谱柱, 且不断有新的色谱柱出现。采用不同的 C18 色谱柱分析具体样品时, 保留时间、溶质之间的分离情况、出峰顺序等色谱柱的保留行为都可能出现较大的差异^[5]。《美国药典》(USP)、《欧洲药典》和《日本药局方》对色谱柱的规定比较详细, 除注明填料所属的大类别外, 通常还给出色谱柱的内径、长度、粒径、比表面积等信息, 有些品种还会直接注明色谱柱的厂家。在美国药典委员会网站可查询到 USP 推荐的色谱柱品牌与型号。而《中国药典》仅指明色谱柱的填料大类, 如十八烷基硅烷键合硅胶。由于《中国药典》缺少选择色谱柱方面的详细指导, 使得药典推荐方法的执行遇到困

收稿日期: 2014-11-18

作者简介: 商国举 (1989—), 在读硕士研究生, 研究方向为药物的质量研究。E-mail: 317802962@qq.com

*通信作者 蒋庆峰, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物的质量研究。Tel: (022)23006881 E-mail: qingfeng-jiang@263.net

难。在参考文献执行某一 HPLC 方法时,当无法获得文献中所用色谱柱时,需要寻求选择性相似的色谱柱代替。

1 C18 色谱柱的差异

十八烷基硅烷(常被称为 ODS 或 C18)是最早的键合固定相之一,C18 是具有烷基链的硅烷化剂与硅胶表面的硅醇基反应制得的键合相。因为使用了共价键和的方式将烷基链紧紧固定在硅胶表面,所以烷基链不会被流动相冲洗掉,作为色谱固定相稳定发挥作用。C18 色谱柱因键合方式的不同、粒径的不同、长度的不同,内径的差异等多方面因素,呈现出不同选择性^[6]。这样,在市场上就出现了数百种具有不同分离选择特性的 C18 色谱柱。

2010 年版《中国药典》增加了麦白霉素 A 有关物质及其组分的检查,但并未指定 C18 色谱柱的型号和品牌。吴群等^[7]考察了 8 种 C18 色谱柱对麦白霉素片 A 组分和有关物质的分析效果。其中只有 5 种 C18 色谱柱能对麦白霉素 A 中各组分能达到较好分离。不同 C18 色谱柱之间的分离度差别较大,影响药物有关物质和组分的测定。

相同规格的 C18 色谱柱由于生产厂家的不同也会产生较大的分析差异。孟钢等^[8]用 5 种相同规格、不同生产厂家的 C18 色谱柱测定胸腺法新有关物质,结果 5 种 C18 色谱柱表现的分离度和保留时间差异很大。有的色谱柱表现的分离效果甚至不符合药典的要求。张莹等^[9]用 3 种同规格不同品牌的 C18 色谱柱考察了不同厂家色谱柱对注射用氢化可的松琥珀酸钠与相关物质分离的效果。其中两种 C18 色谱柱出峰顺序不符合《中国药典》规定。可见氢化可的松琥珀酸钠对于色谱柱固定相的选择性很强。C18 色谱柱内部填料的粒度、孔径、键合量及填充的工艺、技术等差异是上述现象的主要原因。

2 C18 色谱柱的选择

分析化学中可以根据 pH 环境、流动相极性、色谱柱的分类系统、药物极性 etc 来选择合适的 C18 色谱柱。因为在药物分析中,药物的极性一般是无法改变的,所以下文主要介绍根据 pH 环境、流动相极性、色谱柱的分类系统来选择 C18 色谱柱。

2.1 pH 环境

对于传统的 C18 色谱柱,pH 值使用范围通常为 2~7,因为 pH 值高于 8 时 C18 固定相会受到限制^[10]。由于残余硅羟基的存在,易对碱性化合物造成不可逆吸附,造成峰拖尾,影响分离与分析^[11]。

pH 值太低则会使键合的烷基脱落^[12],而且对成分的分离达不到要求。

2.1.1 酸性条件下 C18 的选择 为了改善 C18 色谱柱在低 pH 值时的稳定性,有人提出了空间位阻方法。空间位阻作用是指连接较大基团,立体阻碍溶质基团进攻硅醇基,使硅氧烷能够再生,提高了化学键合固定相抗水解的能力^[13]。还有人制备了侧链中含有异丙基或异丁基的 C18 化学键合固定相^[10]。该固定相由于引入了较大的侧链基团,立体阻碍了残留硅醇基与溶质之间的相互作用,在低 pH 值条件下能够保持稳定,这种化学键合固定相更适合酸性物质的分离。Zorbax Stable Bond C18 色谱柱就使用了空间位阻技术,其使用单官能团硅烷,具有较大的二异丁基(SB-C18)侧链基团,空间位阻关键的硅氧烷键合到硅胶表面,以避免在低 pH 值条件下水解破坏,在酸性流动相条件下提供良好的稳定性和重现性。因此,Stable Bond 色谱柱成为低 pH 值方法开发的首选。在方法开发初期,若选定流动相为酸性,可将此类色谱柱作为首选。

2.1.2 碱性条件下 C18 的选择 制造快速分离碱性化合物的化学键合相一直是研究热点。双齿键合固定相的每个硅烷化分子中含有两个硅原子,两个硅原子之间以-O-或-CH₂-CH₂等基团连接,每个硅原子含有 1 个 C18 官能团。它的环状结构无论在低 pH 值条件下,还是高 pH 值条件下均显示了较高的稳定性和满意的柱效。与传统的单齿化学键合相相比,这种化学键合固定相最突出的优点是在低、中、高 pH 值时都有很好的稳定性^[14]。使用 C18 双齿化学键合固定相的商品柱有 Zorbax Extend-C18 色谱柱,其耐受 pH 值达 11.5,特别适合在高 pH 值的流动相条件下对强碱性化合物进行有效的色谱分离^[14]。Janina 等^[15]在开发普鲁卡因有关物质的药物分析方法中,对比 8 种 C18 色谱柱,最终选择了耐受 pH 值范围较大的 Zorbax Extend C18 色谱柱。分析样品与杂质均为碱性,使用 Zorbax Extend C18 使各杂质与组分间分离最佳。若碱性物质间的分离效果不佳,可以考虑使用上述键合相填料的 C18 色谱柱。

2.2 流动相极性

极性基团嵌入化学键合相技术是分离极性较大物质的一个方法,这种键合相可以在强极性流动相条件下长期使用^[16]。Symmetry Shield TM RP C18 色谱柱是嵌入了氨基甲酸酯基团的反相色谱柱,Sunil 等^[17]用该固定相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5

μm)对盐酸小檗碱进行HPLC分析。实验中流动相为强极性水,盐酸小檗碱为碱性化合物。通过对比其他色谱柱,上述色谱柱的理论塔板数最高,没有拖尾现象。嵌入了氨基甲酸酯基团的键合相不但阻止了残留硅醇基与碱性化合物之间的作用,而且提高了水润湿性,特别适合在使用极性流动相情况下分离碱性物质。

张海娟^[18]等采用Zorbax Bonus-RP C18色谱柱同时测定暗紫贝母药材中5个核苷类活性成分及5个游离的碱基。实验中流动相极性较大,所分离组分酸碱程度相差较大。使用其他的C18色谱柱造成了峰型对称性差、使用寿命短、拖尾等现象。Zorbax Bonus-RP C18色谱柱有极性酰胺基团,侧链还有二异丙基,可以提供空间保护作用,避免酸水解^[13]。其极性流动相条件下既可以分离碱性化合物,也可以分离酸性化合物。

中草药成分较为复杂,含有较多极性非极性等组分。林辉等^[19]研究血畅宁组方中总皂苷的HPLC法分析,采用Fusion-RP C18色谱柱,在强极性流动相条件下,各类极性不同的皂苷组分间达到最佳分离。Fusion-RP C18色谱柱由于键入了极性基团,而且拥有疏水链,其可以在100%的水相流动相条件下长时间运转,特别适合于在强极性条件下分析含有极性和非极性化合物的混合物^[20]。

2.3 色谱柱分类系统

重复某一方法,但由于某种原因无法获得目标色谱柱时,需要选择与目标色谱柱有相似保留行为的色谱柱来开展实验。通过对色谱柱的保留行为进行表征,可以快速选择出相似色谱柱。表征反相色谱柱的方法从20世纪70年代开始就一直被广泛研究。胡秋馨等^[20]统计,Snyder使用5个参数表征色谱柱,Hoogmartens等使用4个参数,Euerby等使用6个参数,USP使用5个参数,分别对色谱柱的保留行为进行了量化的参数表征。表征两个色谱柱的参数越接近,代表它们的选择性越相似,表明可以替换使用。鲁汉大学所建的色谱柱分类系统用4种参数表征色谱柱。可以通过该色谱柱选择系统对比100多种色谱柱(多为C18色谱柱)的相似程度,这就为C18色谱柱的选择提供了极大便利。

中国药典品种项下规定乙酰螺旋霉素用十八烷基硅烷作为固定相,未给出品牌和规格等详尽信息。Wang等^[21]通过运用鲁汉大学所建的色谱柱分类系统,选择出了合适的色谱柱,并通过实际实验验证

了鲁汉大学所建的色谱柱分类系统的科学性和实用性。Szulfer等^[22]通过分析阿夫唑嗪有关物质来评价鲁汉大学所建的色谱柱分类系统。实验对比了36种色谱柱的分离情况,后将36种色谱柱通过色谱柱分类系统进行判断。结果显示该色谱柱分类系统可以表征色谱柱的保留行为,进而可以进行色谱柱的选择和对比。

3 结语

不同C18色谱柱之间的保留行为差别很大,选择合适的C18是药物分析工作的重点。需要一种科学的方法对色谱柱进行表征和分类,然后才可以进行快速的选择。目前,各类新型的C18键合相层出不穷,从键合相类型方面对其分类较为困难。而且,色谱柱的选择行为与键合相的类型关系不大。所以本文只是论述了在酸碱情况下如何选择分离效果较好的C18键合相及强极性条件下如何选择耐用的C18键合相,并未就此进行色谱柱的分类归纳。

近年来,表征色谱柱的方法成为研究的热点,通过一组参数对每个色谱柱进行量化,建立各类色谱柱分类系统,极大便利了色谱柱的比较和选择。在选择色谱柱时,可以应用以上提到的鲁汉大学所建的色谱柱分类系统或者登陆USP网站查询到各类色谱柱参数,以及找到相似色谱柱。

目前使用的2010版《中国药典》未能对各品种项下的色谱柱进行品牌和规格方面的规定。在药物分析工作中,我们要注意到色谱柱之间的差异,并挑选合适的色谱柱来开展实验。希望新版《中国药典》对色谱柱能进行更为详尽的规定,以方便药物分析与评价工作者。

参考文献

- [1] 沈爱平. 高效液相色谱法在药物分析中的应用[J]. 科技传播, 2014(7): 181-182.
- [2] 刘小琳, 宋丽明, 雷勇胜, 等. 制备型高效液相色谱法在药物杂质研究中的应用[J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 233-236.
- [3] 林 兰, 程奇蕾, 宁保明, 等. 浅谈分析实验室高效液相色谱柱的管理[J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1972-1973.
- [4] Qiu H D, Liang X J, Sun M, *et al.* Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(10): 3307-3322.
- [5] 张伟清, 胡昌勤. 反相 C18 液相色谱柱选择性理论及

- 其应用 [J]. 药学报, 2010(5): 555-559.
- [6] 刘 钊, 高丹玲. 抗生素质控分析中HPLC色谱柱的选择 [J]. 海峡药学, 2011, 23(1): 33-37.
- [7] 吴 群, 刘映倩, 沈丹丹, 等. 不同色谱柱对麦白霉素片 A 系列组分及有关物质测定结果比较 [J]. 医药导报, 2014, 33(1): 103-105.
- [8] 孟 钢, 孙艳艳. 同规格不同生产厂家的色谱柱对胸腺法新有关物质测定结果的影响 [J]. 生物技术世界, 2013(2): 75-76.
- [9] 张 莹, 李海生. 不同厂家色谱柱对注射用氢化可的松琥珀酸钠与相关物质分离效果的考察 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 163-166.
- [10] 俞 晖. 硅胶基质高效液相色谱填料及硅胶表面修饰的研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- [11] 方奕珊, 李来生. 高效液相色谱硅胶素键合硅胶固定相分离极性化合物 [J]. 应用化学, 2013, 30(1): 79-86.
- [12] 张 杰, 胡家峰, 郭 远, 等. HPLC 测定大豆异黄酮适宜试验条件的分析 [J]. 北京农学院学报, 2014, 29(4): 12-15.
- [13] 田彩华. 硅胶及 C18 反相硅胶键合相的制备与表征 [D]. 南京: 南京理工大学, 2010.
- [14] 佟 巍, 张养君. 高效硅胶化学键合固定相的研究进展 [J]. 色谱, 2010, 28(10): 915-922.
- [15] Janina S M, Linda J, Magnus B O, *et al.* Development of an HPLC method for determination of related impurities in prilocaine substance [J]. *Chromatographia*, 2012, 75(8): 329-336.
- [16] Liu X D, Bordunov A M T, Slingsby R, *et al.* development of a polar-embedded stationary phase with unique properties [J]. *J Chromatogra A*, 2006, 1119(1/2): 120-127.
- [17] Sunil K B, Michael A, Repka S M, *et al.* . Physicochemical characterization of berberine chloride: A perspective in the development of a solution dosage form for oral delivery [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2010, 11(3): 1467-1474.
- [18] 张海娟, 马世震, 肖远灿, 等. RP-HPLC 同时测定暗紫贝母中 10 个核苷及碱基类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6): 986-989.
- [19] 林 辉, 饶剑花, 潘 毅, 等. 血畅宁组方有效部位总皂苷 HPLC 特征图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 127-130.
- [20] 胡秋馨, 胡昌勤. 反相色谱柱的表征与选择 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 343-348.
- [21] Wang M J, Zheng C, Hu C Q, *et al.* Facilitated column selection in the separation of acetylspiramycin components using a simple column classification system [J]. *J Chin Pharmace Sci*, 2011, 20(11): 572-577.
- [22] Szulfer J, Alina P, Tomasz B. Evaluation of a column classification method using the separation of alfuzosin from its related substances [J]. *J Chromatogra A*, 2012, 1229(4): 198-207.