

## 制备型高效液相色谱法在药物杂质研究中的应用

刘小琳<sup>1</sup>, 宋丽明<sup>2</sup>, 雷勇胜<sup>2</sup>, 蒋庆峰<sup>2\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 分析测试中心, 天津 300193

**摘要:** 制备型高效液相色谱法是一种使用高压、大流量液体输送系统在高分辨率、大内径、高载量分离柱上进行样品高纯度分离的液相色谱制备方法。应用该方法分离的产品在纯度、回收率、分离效率等方面远远优于传统的制备方法, 因此在药物研究、生产领域得到广泛应用。介绍制备型高效液相色谱法的研究概况, 特点, 影响制备型高效液相色谱分离纯化的因素, 以及在药物杂质研究中的实际应用, 并对制备型高效液相色谱技术存在的问题与发展方向进行总结。

**关键词:** 制备型 HPLC; 方法开发; 杂质研究; 应用; 综述

**中图分类号:** R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2012) 03 - 0233 - 04

## Application of preparative high performance liquid chromatography in the study on impurities of drugs

LIU Xiao-lin<sup>1</sup>, SONG Li-ming<sup>2</sup>, LEI Yong-sheng<sup>2</sup>, JIANG Qing-feng<sup>2</sup>

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

2. Center for Instrumentation Analysis, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract:** Preparative high performance liquid chromatography (HPLC) is a way to use high-pressure, large flow of liquid delivery system for high-purity separation of the sample on high-resolution, large internal diameter, high capacity separation column. Application of the method for the separation of products in terms of purity, recovery, separation efficiency is far superior to the traditional method of preparation, and it is widely used in drug research and production fields. The efficient preparative HPLC steps, the preparative HPLC research and development direction, and the research on drug impurities in practical applications have been summarized. This article describes the research profile, characteristics of preparative HPLC, and factors that influence the process of separation and purification, steps to develop and establish the method, as well as the application of preparative HPLC in the study on impurities of drugs. Finally, the existing problems of the present preparative HPLC and the developing trend have also been discussed.

**Key words:** preparative high performance liquid chromatography (HPLC); methods development; study on impurities; application; review

药品与人类的健康息息相关, 其质量控制极为重要。药物安全性评价的一个重要内容是药物中杂质的含量控制<sup>[1]</sup>。我国药典对杂质含量标准作了明确的规定:“在药物临床使用前必须确证药物中含量在 0.1%及其以上的杂质和表观含量在 0.1%以下但具强生物作用的杂质或毒性物质的结构<sup>[2]</sup>, 在稳定性试验中生成的降解产物, 也要按上述要求进行定性和定量研究”。

在对杂质的分离与纯化技术的探索中, 将研究的重点转向了色谱法。近十几年来, 制备型液相色谱 (high performance preparative chromatography,

HPPC) 已成为当代高效分离与纯化技术的研究前沿<sup>[3]</sup>。本文将就制备型高效液相色谱技术及其在药物杂质研究中的应用作一综述。

### 1 制备型高效液相色谱与分析型高效液相色谱的比较

制备型液相色谱结构与分析型一样, 但泵流量大、进样量大、采用制备柱、在检测器后增加自动馏分收集器; 具有高柱效、高流速、分离时间短的特点。

制备型 HPLC 是在分析型 HPLC 的基础上发展起来的一种高效分离纯化技术, 但制备型色谱不是

收稿日期: 2012-02-26

作者简介: 刘小琳 (1986—), 女, 硕士生, 主要研究方向为药物质量控制与研究。

\*通讯作者 蒋庆峰 (1964—), 男, 研究员, 主要从事于药物质量控制与研究。

分析色谱的简单放大, 制备型色谱与分析型色谱在操作参数的优化上有很大不同。两者的比较见表 1。

表 1 制备型 HPLC 与分析型 HPLC 比较

Table 1 Comparison between preparative HPLC and analytical HPLC

	制备型 HPLC	分析型 HPLC
目的	分离、富集或纯化样品中特定成分	获得样品的定量定性信息
进样量	尽可能大、生产多的纯品	仅够检测用即可
柱内径	1~10 cm 或更大	1~5 mm
柱填料	7 μm 或更大	5 μm 或更小
体积流量	>10 mL/min	最多 10 mL/min
理论基础	非线性色谱	线性色谱

在进行制备型 HPLC 之前, 常先进行分析型 HPLC 实验, 对分析方法进行优化、放大应用到制备 HPLC 中。通常, 从分析方法到制备方法的放大和方法的优化需要以下 3 三个步骤: ①优化分析方法的选择性; ②在分析柱上进行超量载样; ③放大到制备柱。目前, 主要通过线性放大的原理优化从分析到制备过程的操作参数<sup>[3]</sup>。

## 2 制备型高效液相色谱方法的研究概况

### 2.1 制备色谱柱的选择

**2.1.1 填料** 王志祥等<sup>[4]</sup>考察了填料尺寸对柱效和分离度的影响, 认为采用小粒径的色谱填料可以明显提高柱效和分离度, 但填料粒径越小, 柱压越大。因此, 在制备分离过程中, 可以采用较小粒径的填料, 以提高难分离物质的分离效率。但在满足分离要求的前提下, 使用较大粒径的填料, 可以提高制备量。在制备色谱中常用的填料颗粒尺寸为 7、10、12 μm。

**2.1.2 柱尺寸** 目前高效制备柱的柱长一般为 20~50 cm, 内径为 10~1 000 mm, 王志祥等<sup>[5]</sup>考察了柱尺寸对柱效和分离度的影响, 认为增加柱长可以提高制备分离效果, 但会显著提高柱压。因此, 在制备型 HPLC 分离过程中, 为了提高分离效率, 可以采用增加柱长的办法。但在满足分离度的前提下, 应尽量使用较短的制备柱, 同时可以采用增加柱内径的方法提高制备量。

### 2.2 流动相的选择

在选择制备色谱流动相时要考虑以下几个因素: ①流动相有利于分析物达到最佳的选择性; ②流动相的光谱特征 (UV/荧光/质谱) 对检测灵敏度的影响; ③容易从最后馏分中除去; ④黏度低以降

低柱压; ⑤流动相中难挥发性杂质对馏分纯度的影响; ⑥对样品有好的溶解性; ⑦溶剂的成本。

正相色谱所使用的溶剂是符合上述要求的, 但在反相制备色谱中, 则需采用挥发性的缓冲溶液来调节 pH 值, 而不使用分析色谱中的盐缓冲溶液体系。

### 2.3 上样量

王志祥等<sup>[6]</sup>认为在满足分离要求的前提下, 可以采用柱超载方式操作, 以提高制备量。当一次操作所要处理的样品量较小时, 宜采用质量超载方式 (维持较小的进样体积, 增加进样浓度); 当一次操作所要处理的样品量较大时, 宜采用体积超载方式 (保持较小的进样浓度, 增加进样体积)。

### 2.4 样品前处理

制备色谱柱由于处理的样品多, 比分析柱子更容易受污染, 所以必要的前处理显得非常必要。萃取、过滤、结晶、固相萃取等可以用以去掉杂质。

### 2.5 馏分收集

根据仪器设计的馏分收集器进行馏分收集, 主要有按时间进行馏分收集、按色谱峰进行馏分收集和按质量进行馏分收集 3 种模式。

将收集到的相同馏分合并后, 在分析型的设备上检测纯度, 确定是否需要进一步纯化或调整分离条件。

### 2.6 纯化与后处理

**2.6.1 脱盐** 一般采用离子吸附的方法去除。如 G25 脱盐, 为安马西亚公司推出的葡聚糖凝胶, 交联度大, 孔径小, 对小分子的无机盐保留较大, 而对相对分子质量较大的有机物没有保留从而可以将盐份脱除。

**2.6.2 去除流动相** 一般采用减压旋蒸除去其中的有机溶剂, 然后用萃取的方法 (如乙醚、氯仿萃取等) 把样品萃取出来, 再低温再旋蒸, 以得到产品。

## 3 制备型高效液相色谱在药物杂质研究中的应用

目前, 制备型 HPLC 在药物中杂质的纯化与制备方面得到广泛的应用。所用仪器多为 Shimadzu LC-8A、Waters 2525、Waters 600 系列。高效制备液相色谱柱具有柱短、内径大、呈圆饼状的特征。目前高效制备柱的柱长与常规分析柱相仿, 一般为 20~50 cm, 而内径为 10~1 000 mm, 因此可以在较大的流速下不致产生很高的柱压, 从而获得较高的产率。高效制备填料一般具有机械强度高, 负载量高, 粒度分布范围窄, 填料各批量之间重现性好等特点。通常制备型 HPLC 每米的塔板数在 20 000

以上<sup>[3]</sup>, 所用填料粒径一般为 5、7、10  $\mu\text{m}$ 。制备型 HPLC 所采用的洗脱方式主要有两种。一种是维持流动相的热力学参数不变的等度洗脱法; 一种是改变流动相的一种或几种热力学参数的梯度洗脱法。进行制备型液相色谱分离时, 所用溶剂的纯度很重要。即使含纯化化合物的流动相溶剂中含有微量的不挥发性杂质, 当大量溶剂经蒸发后, 其杂质浓度就会增高。制备型液相色谱往往需消耗大量溶剂,

因此应在溶剂纯度与所用数量之间进行权衡。所用流动相盐溶液多为醋酸铵、磷酸盐缓冲液。在制备型 HPLC 分离中, 可以采用一个进样阀(如六通进样阀)将较大的样品方便的注入柱子而不影响流动相流动。通过更换样品环可以方便的改变进样量, 最大可达 10 mL。现代高效制备液相色谱法具有流动相流速高的特点。流动相的线速一般在 5~10 cm/min。应用实例见表 2。

表 2 制备型高效液相色谱法在药物杂质中的应用

Table 2 Application of preparative HPLC in study on impurities of drugs

杂质来源	制备色谱条件					纯度/%
	仪器型号	色谱柱	流动相	进样量	体积流量	
曲格列酮 <sup>[7]</sup>	Shimadzu LC—8A	Hypersil prep.ODS (250 mm×10 mm, 8 $\mu\text{m}$ )	0.025 mol/L 醋酸铵-乙腈-甲醇 (35:55:12), pH4.5	2 mL	2 mL/min	—
表阿霉素盐酸盐 <sup>[8]</sup>	Shimadzu LC—8A	Symmetry C <sub>18</sub> (250 mm×19 mm, 7 $\mu\text{m}$ )	0.1 mol/L 醋酸铵-甲醇-乙腈(70:30) 梯度洗脱	10 mL	20 mL/min	—
依地普仑 <sup>[9]</sup>	Waters 2525	Xterra Prep MS C <sub>18</sub> OBD (250 mm×19 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	0.1%氢氧化铵溶液(三氟乙酸调 pH 3.3)-乙腈(75:25)	—	100 mL/min	97.5, 98
头孢地尼 <sup>[10]</sup>	Shimadzu LC—8A	Hyper Prep.HS C <sub>18</sub> (250 mm×21.2 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	A 1%醋酸铵 B 乙腈 梯度洗脱	—	30 mL/min	97.2, 99.1, 98.7
扎鲁司特 <sup>[11]</sup>	Waters W600	Develosil ODS MG-10 (250 mm×20 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	A 0.01 mol/L 醋酸铵 B 乙腈-水(8:2)	—	20 mL/min	—
多奈哌齐 <sup>[12]</sup>	Shimadzu LC—8A	Hichrom-C <sub>18</sub> (250 mm×10 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	0.01 mol/L 磷酸二氢钾-乙腈 (50:50), pH 3.5	2 mL	3 mL/min	93.5, 97.2, 98.5, 95.1, 96.3
比阿培南 <sup>[13]</sup>	Waters W600	Waters Sunfire C <sub>18</sub> (10 mm×150 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	0.01 mol/L 醋酸铵-乙腈(93:7)	0.7 mL	5 mL/min	—
氯吡格雷 <sup>[14]</sup>	Waters W600	Xterra MS C <sub>18</sub> ODB (100 mm×30 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	A 乙腈-10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 2.3)(20:80) B 乙腈-10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 2.3)(80:20) 梯度	—	20 mL/min	99
氟康唑 <sup>[15]</sup>	Waters 2525	Waters Symmetry C <sub>18</sub> (100 mm×30 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	0.01 mol/L 醋酸铵-乙腈(85:15)	—	25 mL/min	97, 99
双氯西林 <sup>[16]</sup>	Shimadzu LC-8A	Inertsil ODS (250 mm×20 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	A 0.2 mol/L 醋酸铵溶液 (冰醋酸调 pH 5.0) B 乙腈 梯度	—	40 mL/min	99.0, 99.6, 97.0
三氯苯达唑 <sup>[17]</sup>	Waters Delta 600	Symmetry C <sub>18</sub> (100 mm×7.8 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	甲醇-水(75:25)	5.0 mL	4 mL/min	—
雷奈酸锶 <sup>[18]</sup>	Lumtech 半制备液相色谱仪	VenusilXBP-C <sub>18</sub> (21.5 mm×250 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	乙腈-10 mol/L 乙酸铵溶液(7:93) 冰乙酸调 pH 4.0	400 $\mu\text{L}$	8 mL/min	—
氯喹羟氯喹 <sup>[19]</sup>	Waters 2525	Waters symmetry C <sub>18</sub> (150 mm×30 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	0.06%三氟乙酸水溶液-乙腈-异丙醇(87:12:1)	1 mL	40 mL/min	97.3, 98.8, 96.3, 98.0
苯甲酸利扎曲坦 <sup>[20]</sup>	Shimadzu LC—8A	Inertsil ODS (250 mm×20 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	A 0.2%冰醋酸 B 乙腈 梯度	—	30 mL/min	94.0, 95.0
头孢唑肟钠 <sup>[21]</sup>	Shimadzu LC—8A	YMC Pack ODS AQ (250 mm×21.2 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	A 0.1 mol/L 醋酸铵溶液 (冰醋酸调 pH 5.0) B 乙腈 梯度	—	20 mL/min	96, 90, 98
克林霉素 <sup>[22]</sup>	Waters Delta 600	SymmetryC <sub>18</sub> (100 mm×7.8 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	甲醇: pH 7.5 磷酸缓冲液(60:40)	5 mL	4 mL/min	—

#### 4 结语

制备型 HPLC 是制备纯化杂质的一种很有效的手段, 具有产品纯度高、产率高、分离速度快等优点。然而, 由分析型色谱到制备型色谱过渡的理论方面还不完善、色谱法的定性能力较差, 填料的用量大且价格贵, 着眼于此类问题的深入研究, 相信制备高效液相色谱法会在药物杂质研究中显示出更加广阔的发展前景。

#### 参考文献

- [1] Ravindra K Y, Prasad Raju V V N K V, Rajesh Kumar R, *et al.* Structural identification and characterization of impurities in moxifloxacin [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2004, 34(5): 1125-1129.
- [2] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [3] 李瑞萍, 黄骏雄. 高效制备液相色谱柱技术的研究进展 [J]. *化学进展*, 2004, 16(3): 273-283.
- [4] 王志祥, 张志炳, 何志敏, 等. 制备型高效液相色谱分离过程的放大研究 (I) 填料尺寸 [J]. *化工时刊*, 2001, 15(1): 28-31.
- [5] 王志祥, 张志炳, 何志敏, 等. 制备型高效液相色谱分离过程的放大研究 (II) 柱尺寸 [J]. *化工时刊*, 2001, 15(2): 22-24.
- [6] 王志祥, 张志炳, 何志敏, 等. 制备型高效液相色谱分离过程的放大研究 (III) 操作方式 [J]. *化工时刊*, 2001, 15(3): 21-24.
- [7] Moses Babu J, Nageshwar D, Ravindra Kumar Y, *et al.* Structural studies on the impurities of troglitazone [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2003, 31(2): 271-281.
- [8] Kumar D, Tomar R S, Deolia S K, *et al.* Isolation and characterization of degradation impurities in epirubicin hydrochloride injection [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 869(1-2): 45-53.
- [9] Raman B, Sharma B A, Ghugare P D, *et al.* Structural elucidation of process-related impurities in escitalopram by LC/ESI-MS and NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(4): 895-901.
- [10] Prasada Rao K V V, Rani A, Raghava Reddy A V, *et al.* Isolation, structural elucidation and characterization of impurities in Cefdinir [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2007, 43(4): 1476-1482.
- [11] Goverdhan G, Reddy A R, Srinivas K, *et al.* Identification, characterization and synthesis of impurities of zafirlukast [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49(4): 895-900.
- [12] Krishna Reddy K V, Moses Babu J, Anil Kumar P, *et al.* Identification and characterization of potential impurities of donepezil [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2004, 35(5): 1047-1058.
- [13] Xia M, Hang T J, Zhang F, *et al.* The stability of biapenem and structural identification of impurities in aqueous solution [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49(4): 937-944.
- [14] Mohan A, Hariharan M, Vikraman E, *et al.* Identification and characterization of a principal oxidation impurity in clopidogrel drug substance and drug product [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2008, 47(1): 183-189.
- [15] Dongre V G, Karmuse P P, Ghugre P D, *et al.* Preparative isolation and structural elucidation of impurities in fluconazole by LC/MS/MS [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2006, 42(3): 334-340.
- [16] Joseph Sunder Raj T, Bharati C H, Ranga Rao K, *et al.* Identification and characterization of degradation products of dicloxacillin in bulk drug and pharmaceutical dosage forms [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2007, 43(4): 1470-1475.
- [17] Zhou H, Tai Y P, Sun C R, *et al.* Separation and characterization of synthetic impurities of triclofenazole by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2005, 37(1): 97-107.
- [18] 于海英, 程秀民, 周永妍, 等. 雷奈酸锶中一种杂质的分离制备及结构确证 [J]. *中国医药工业杂志* 2009, 40(2): 33-145.
- [19] Dongre V G, Ghugare P D, Karmuse P, *et al.* Identification and characterization of process related impurities in chloroquine and hydroxychloroquine by LC/IT/MS, LC/TOF/MS and NMR [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49(4): 873-879.
- [20] Joseph Sunder Raj T, Bharathi C, Saravana Kumar M, *et al.* Identification, isolation and characterization of process-related impurities in Rizatriptan benzoate [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49(1): 156-162.
- [21] Bharathi C, Prasad C S, Bharathi D V, *et al.* Structural identification and characterization of impurities in ceftizoxime sodium [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2007, 43(2): 733-740.
- [22] 周 慧. 电喷雾质谱及其联用技术在药物分析中的应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004.