

浅析疏水减法模型理论在中药配方颗粒及中药饮片方法开发中的应用

胡金胜 彭倩 金琦芸

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

反相色谱柱，疏水减法模型，HSM，中药配方颗粒，中药饮片，方法开发，高效液相色谱

摘要

由于中药配方颗粒和中药饮片的生产工艺特殊，目标组分众多且样品基质复杂，在特征图谱及含量测定的液相色谱方法开发过程中，会存在较为繁复的色谱柱筛选工作，延缓了项目进度，增加了研发成本。本文基于骨碎补配方颗粒、燿苦杏仁（西伯利亚杏）配方颗粒及木瓜饮片实验数据，结合疏水减法模型理论和色谱柱理化性质参数，探讨了黄酮、皂苷及萜类等反相色谱柱上的分离和保留规律，在符合标准要求的前提下，进行色谱柱的快速筛选，为中药色谱分析提供了借鉴和参考。

1.引言

L.R. Snyder和J.W. Dolan于2004年发表了题为“The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity^[1]（反相色谱柱选择性的疏水减法模型）”的论文，文中详细阐述了色谱柱参数H、S*、A、B、C和溶质参数 η' 、 σ' 、 β' 、 α' 、 κ' 对色谱柱选择性的影响，并在反相保留与色谱柱选择性的经验性线性自由能方程（方程 I）的基础上，通过简化溶质参数，增加权重系数和校正因子，建立了全新色谱柱相似选择性的数学模型（方程 II）^[4]。

方程 I：

$$\log \alpha \equiv \log \left(\frac{k}{k_{EB}} \right) = \underbrace{\eta' H}_{(i)} - \underbrace{\sigma' S^*}_{(ii)} + \underbrace{\beta' A}_{(iii)} + \underbrace{\alpha' B}_{(iv)} + \underbrace{\kappa' C}_{(v)}$$

在方程 I 中，k为测定溶质的保留因子，k_{EB}为乙基苯的保留因子，色谱柱参数H、S*、A、B、C中，H为色谱柱疏水性(hydrophobicity)、S*为色谱柱立体选择性(steric hindrance to retention)、A为色谱柱氢键酸度(hydrogen-bond acidity)、B为色谱柱氢键碱度(hydrogen-bond basicity)和C色谱柱为离子交换活性(cation-exchange activity)，其中H、S*、A、B不受流动相pH和柱温的影响，而C则需要分别在pH=2.8和pH=7.0流动相下进行测定。 η' 、 σ' 、 β' 、 α' 、 κ' 分别代表溶质的疏水性、立体选择性、氢键酸度、氢键碱度和离子交换活性参数。 η' 、 σ' 、 β' 、 α' 、 κ' 五种溶质-色谱柱参数相互作用的机理，如图1所示。

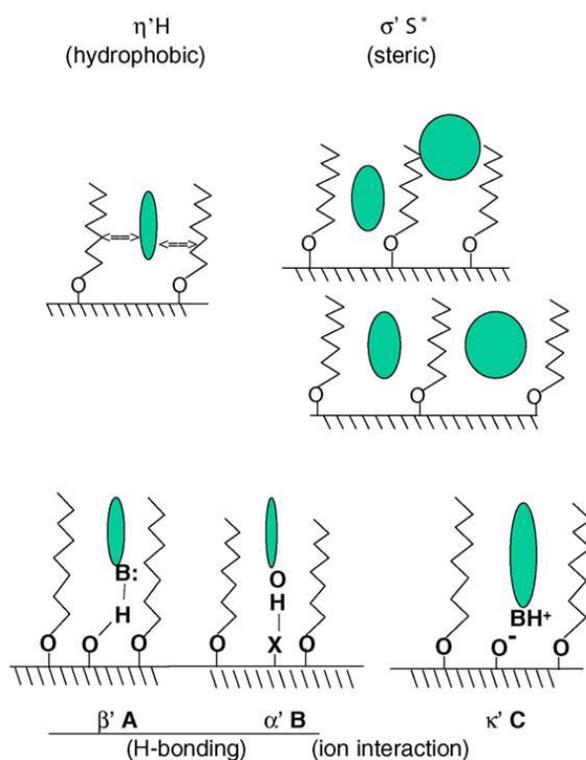


图 1 五种溶质-色谱柱参数作用的示意图

疏水性反应了键合相、封端基团与溶质分子之间的疏水作用力；立体选择性与色谱柱填料孔径、比表面积、键合相类型、键合密度、碳载量及溶质分子的空间位阻有关；氢键酸度主要来自裸露硅醇基与碱性化合物形成氢键作用，Si-OH -- NH₂-R；氢键碱度主要是极性封端或嵌入极性基团，硅胶残留的金属离子，以及裸露硅醇基与酸性化合物形成氢键作用，Si-OH -- O=RCOH；离子交换活性主要受流动相pH (2.8/7.0)影响，裸露硅醇基以及极性封端或嵌入极性基团电离，Si-O⁻ --⁺NH₃-R。

方程 II :

$$F_s = \sqrt{(w_H(H_1 - H_2))^2 + (w_S(S_1^* - S_2^*))^2 + (w_A(A_1 - A_2))^2 + (w_B(B_1 - B_2))^2 + (w_{C_{2.8}}(C_{2.8,1} - C_{2.8,2}))^2}$$

在方程 II 中, H、S*、A、B、C与方程 I 一样, 均为色谱柱参数。当两根色谱柱的Fs ≤ 3时, 可认为两色谱柱具相似的选择性, 可进行平行替代。Fs 越大, 两色谱柱选择性差异越大, 如果当前使用的色谱柱不能满足分离要求, 可以选择与所用色谱柱Fs值差异较大的色谱柱, 以获得不同的分离效果。

Snyder-Dolan的疏水减法模型主要是基于定量结构-保留关系, 即QSRR (quantitative structure-retention relationship)^[6], 论文中收录了超过300支色谱柱的选择性参数, 庞大的样本数构成一个相对较完整数据库, 但随着色谱行业的发展, 新旧色谱柱产品的迭代, 需要

不断的对数据库进行更新。目前HPLC Columns^[2]数据库和美国药典官网U.S. Pharmacopeial Convention^[3]中PQRI Database数据库, 都是在Snyder-Dolan的疏水减法模型理论上构建的, 并且在不断录入新款色谱柱的参数。HPLC Columns网站的Compare Columns页面, 使用起来会相对便捷, 并且数据库中收录了色谱柱的乙苯保留因子 (EB retention factor)。在日常分析工作中, 通过乙苯保留因子数值的大小, 来判断不同C18柱保留能力的强弱, 比疏水性或碳载量数值更加准确。

表1和表2分别汇总了HPLC Columns数据库中赛默飞反相色谱柱疏水减法模型参数和理化性质参数。本次试验选取了2个中药配方颗粒和1个中药饮片, 通过比较色谱柱参数的差异性, 来验证疏水减法模型理论在实际样品分析中的可行性。

表1 HPLC Columns数据库中赛默飞反相色谱柱疏水减法模型参数汇总

Column	Silica Type	H	S*	A	B	C(2.8)	C(7.0)	EB retention factor	USP Type	Phase Type
Accucore C18	B	1.090	0.054	0.055	-0.040	0.072	0.095	6.50	L1	C18
Accucore aQ	EP	1.070	0.050	0.002	-0.059	0.060	0.508	5.46	L1	C18
Accucore XL C18	B	1.090	0.059	0.051	-0.038	0.086	0.384	5.22	L1	C18
Accucore 150-C18	B	1.030	0.046	-0.037	-0.009	0.200	0.171	4.45	L1	C18
Hypersil GOLD	B	0.880	0.000	-0.010	0.030	0.160	0.470	3.90	L1	C18
Hypersil GOLD aQ	EP	0.910	-0.010	-0.060	-0.010	0.370	0.630	4.10	L1	C18
Acclaim 120 C18	B	1.030	0.010	-0.140	-0.020	0.080	0.000	10.10	L1	C18
Acclaim 300 C18	B	0.950	-0.010	-0.170	0.010	0.260	0.220	2.90	L1	C18
Synchronis C18	B	1.040	-0.003	-0.086	-0.019	-0.026	0.038	13.00	L1	C18
Synchronis aQ	EP	0.984	-0.004	-0.100	-0.038	0.066	1.080	10.20	L1	C18
Hypersil BDS C18	B	0.990	0.010	-0.090	0.000	0.330	0.280	5.60	L1	C18
BetaBasic 18	B	0.990	0.030	-0.090	0.000	0.160	0.120	6.40	L1	C18
BetaSil C18	B	1.060	0.033	0.034	-0.014	0.095	0.099	12.30	L1	C18
BetaMax Neutral	B	1.090	0.030	0.060	-0.030	-0.030	0.010	17.00	L1	C18
Hypurity C18	B	0.980	0.020	-0.090	0.000	0.190	0.160	5.60	L1	C18
Aquasil C18	EP	0.800	0.110	0.260	0.010	0.230	1.190	7.40	L1	C18
Hypersil ODS	A	0.970	-0.020	-0.120	0.020	0.910	0.970	5.50	L1	C18
Hypersil ODS-2	A	0.980	0.010	0.130	-0.010	0.250	0.370	5.60	L1	C18
Hypersil Green PAH	A	0.940	-0.050	0.230	-0.010	1.430	1.720	5.30	L1	C18

* 硅胶类型中, A-A类硅胶, B-B类硅胶, EP-内嵌极性基团或极性基团封端

表2 赛默飞反相色谱柱理化性质参数汇总

Column	Pore Size (Å)	Surface Area (m ² /g)	Maximum Operating Temperature(°C)	pH Range	Endcapped	Carbon Load (%)	Functionality
Accucore C18	80	130	70	2-8	YES	9	RP
Accucore aQ	80	130	70	2-8	YES(Polar)	9	RP
Accucore XL C18	80	90	60	2-8	YES	7	RP
Accucore 150-C18	150	80	60	2-8	YES	7	RP
Hypersil GOLD	175	220	60	2-8	YES	10	RP
Hypersil GOLD aQ	175	220	60	2-8	YES(Polar)	12	RP
Acclaim 120 C18	120	300	60	2-8	YES(Double)	18	RP
Acclaim 300 C18	300	100	60	2.5-7.5	YES	8	RP
Synchronis C18	100	320	60	2-8	YES(Double)	16	RP
Synchronis aQ	100	320	60	2-8	YES(Polar)	19	RP
Hypersil BDS C18	130	170	60	2-8	YES	11	RP
BetaBasic 18	150	200	60	2-8	YES	13	RP
BetaSil C18	100	310	60	2-8	YES	20	RP
BetaMax Neutral	60	540	60	2-8	YES	29	RP
Hypurity C18	190	200	60	2-8	YES	13	RP
Aquasil C18	100	310	60	2-8	YES(Polar)	12	RP
Hypersil ODS	120	170	60	2-8	YES	10	RP
Hypersil ODS-2	80	220	60	2-8	YES	11	RP
Hypersil Green PAH	120	170	60	2-8	YES	13.5	RP

2. 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

2.1.1 Thermo Scientific™ Vanquish™ Core高效液相色谱仪，配置：泵VC-P21-A，自动进样器VC-A13-A，柱温箱VC-C10-A，检测器DAD VC-D11-A，CAD VF-D20-A；数据处理Chromeleo™ 7.3；

2.1.2 超声波清洗仪（Fisherbrand™ FB15065）；

2.1.3 高速冷冻离心机（Thermo Scientific™ Hera-eus™ Multifuge™ X3R）；

2.1.4 超纯水仪（Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ Pro UV-TOC）；

2.1.5 分析天平，十万分之一（Mettler Toledo）；

2.1.6 pH计（Mettler Toledo FiveEasy Plus FE28）；

2.1.7 甲醇，乙腈，色谱纯（Thermo Fisher）；

2.1.8 试验用水为超纯水，18.2 MΩ·cm；

2.1.9 磷酸，冰醋酸，三乙胺，色谱纯（CNW）；

2.1.10 对照品：苦杏仁苷，10mg，纯度98.5%；柚皮苷，100μg/mL；齐墩果酸，10mg，纯度96.1%；熊果酸，10mg，纯度98.2%（天津阿尔塔）；

2.1.11 骨碎补配方颗粒、燂苦杏仁配方颗粒、木瓜饮片均由客户提供；

2.1.12 微孔滤膜（Titan3™ 亲水性PTFE，17 mm，0.2 μm，P/N: 42213-NPL）；

2.1.13 色谱柱

Acclaim 120 C18, 250×4.6mm, 5μm (P/N: 059149)

Synchronis C18, 250×4.6mm, 5μm (P/N: 97105-254630)

Synchronis aQ, 250×4.6mm, 5μm (P/N: 97305-254630)

BetaSil C18, 250×4.6mm, 5μm (P/N: 70105-254630)

BetaMax Neutral, 250×4.6mm, 5μm (P/N: 95005-254630)

2.2 参照物溶液、对照品溶液、供试品溶液的制备

2.2.1 骨碎补配方颗粒、燂苦杏仁配方颗粒：参照物溶液、对照品溶液、供试品溶液的制备，参照中药配方颗粒国家药品标准^[6]；

2.2.2 木瓜饮片：对照品溶液、供试品溶液的制备，参照 中国药典 2020版 一部 药材和饮片^[7]；

2.2.3 骨碎补配方颗粒、燂苦杏仁配方颗粒及木瓜饮片色的谱参数均参照参照标准和药典方法，在方法开发过程如有对柱温或流速进行优化，会在色谱柱最终推荐时加以注明，欲了解Vanquish系列液相详细参数，可下载相关应用报告。

3. 实验结果与讨论

3.1 骨碎补配方颗粒-特征图谱

骨碎补配方颗粒国家药品标准【特征图谱】推荐色谱柱Megres C18, 250×4.6mm, 5μm，由于无法查询到该色谱柱填料的理化性质参数（试验中涉及四款色谱柱参数汇总，见表3），且HSM数据库中未收录。实验室优先尝试了通用性较高的Acclaim 120 C18色谱柱，在 30℃ 柱温下参照标准洗脱程序进行预实验，结果显示特征峰1和2在Acclaim 120 C18上未能有效分离。

实验室进一步选取了**碳载量**和**乙苯保留**因子相对较高的三款色谱柱进行对照试验，分离谱图如图2所示。特征峰1和2指示的目标物为未知化合物，填料孔径和比表面积相近的Synchronis C18、BetaSil C18有分离趋势，而碳载量高达29%的BetaMax Neutral没有显著改善，推测原因是该填料孔径较小，键合密度较高，导致填料的空间位阻较大，目标物未能与键合相充分接触，使得保留和分离能力减弱。

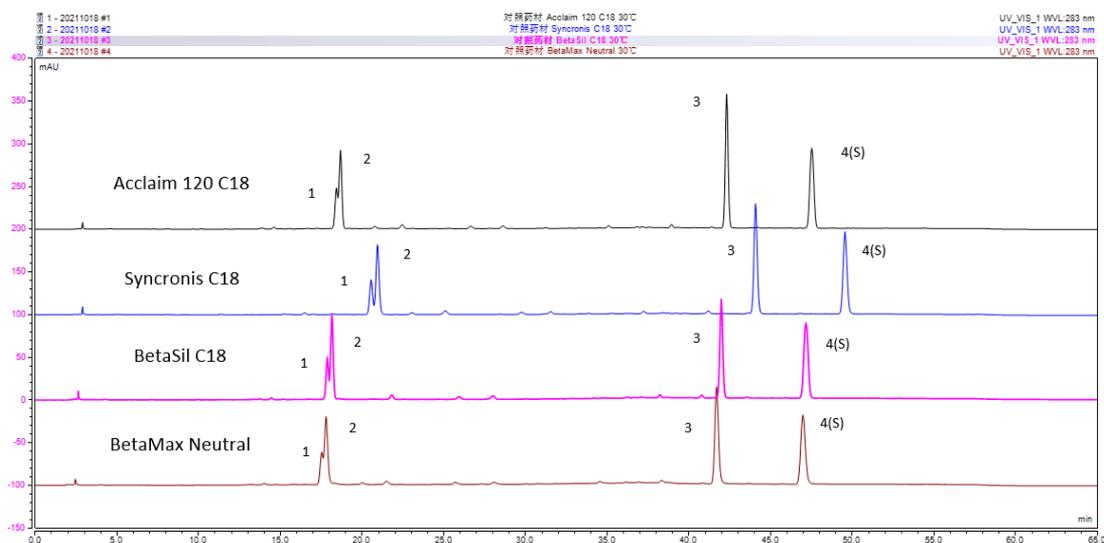


图2 骨碎补对照药材在Acclaim 120 C18、Synchronis C18、BetaSil C18和BetaMax Neutral 上的分离叠加谱图

表3 Acclaim 120 C18、Synchronis C18、BetaSil C18和BetaMax Neutral四款色谱柱参数汇总

Column	Hydrophobicity	EB retention Factor	Pore Size (Å)	Surface Area (m ² /g)	Carbon Load (%)	Endcapped
Acclaim 120C18	1.030	10.10	120	300	18	YES
Synchronis C18	1.040	13.00	100	320	16	YES
BetaSil C18	1.060	12.30	100	310	20	YES
BetaMax Neutral	1.090	17.00	60	540	29	YES

参照 中国药典 2020 年版 0512 通则，为改善分离效果可适当调整柱温度，针对梯度洗脱可在 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 范围内调整。经预实验筛选出Synchronis C18、BetaSil C18两款色谱柱，在 25°C 柱温下进行分离度优化试验，分离叠加谱图见图 3。特征峰1和2在BetaSil C18色谱柱上的分离为1.25，在乙苯保留因子更高的Synchronis C18色谱柱上的分离为1.56，并且4个特征峰的相对保留时间符合系统适应性要求。因此，骨碎补配方颗粒【特征图谱】推荐Synchronis C18色谱柱，柱温 25°C 。

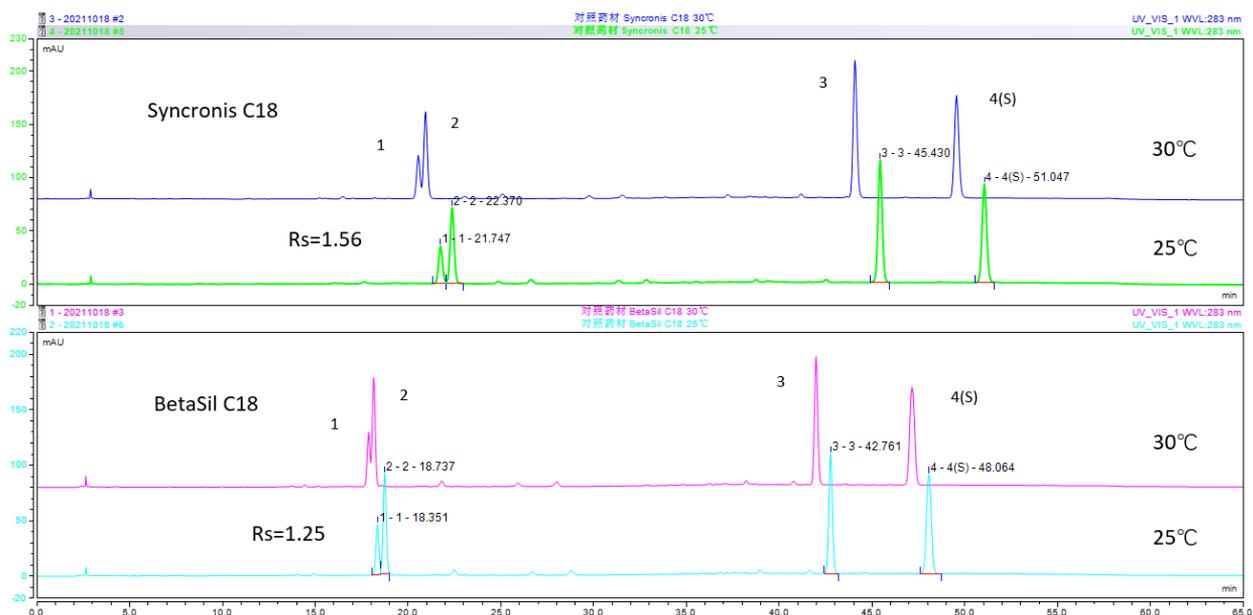


图3 骨碎补对照药材在Synchronis C18、BetaSil C18上的分离叠加谱图（柱温 30°C 和 25°C ）

3.2 燂苦杏仁（西伯利亚杏）配方颗粒-特征图谱

燂苦杏仁（西伯利亚杏）配方颗粒国家药品标准【特征图谱】推荐色谱柱JADE-PAK ODS-AQ C18, $250 \times 4.6\text{mm}$, $5\mu\text{m}$ ，官方资料显示该色谱柱填料孔径为 120 \AA ，比表面积为 $300 \text{ m}^2/\text{g}$ ，碳载量为15%，采用极性基团封端，但没有被HSM数据库收录（试验中涉及三款色谱柱参数汇总，见表 4）。实验室优先选取了孔径、比表面积、碳载量相近，且采用了极性基团封端的Synchronis aQ色谱柱进行预实验。目标组分L-苦杏仁苷和苦杏仁苷为差向异构体，在 25°C 和 20°C 柱温下，分离度分别为1.37和1.59，与标准提供的谱图分离度相当，有优化的空间。

虽然同属于Synchronis系列，硅胶基质的孔径和粒径一致，但极性基团封端引入碳的量要多于传统三甲基氯硅烷，因而Synchronis aQ的碳载量（19%）高于Synchronis C18（16%）。采用Synchronis C18进一步实验时，目标组分L-苦杏仁苷和苦杏仁苷在 25°C 和 20°C 柱温下，分离度分别为1.68和1.94，优于Synchronis aQ，分离叠加谱图见图4。Synchronis C18的疏水性和乙苯保留因子均高于Synchronis aQ，疏水性较强的苦杏仁苷和L-苦杏仁苷在Synchronis C18上有更好的分离与更强的保留。因此初筛选定Synchronis C18色谱柱和 20°C 柱温，进入色谱条件优化环节。

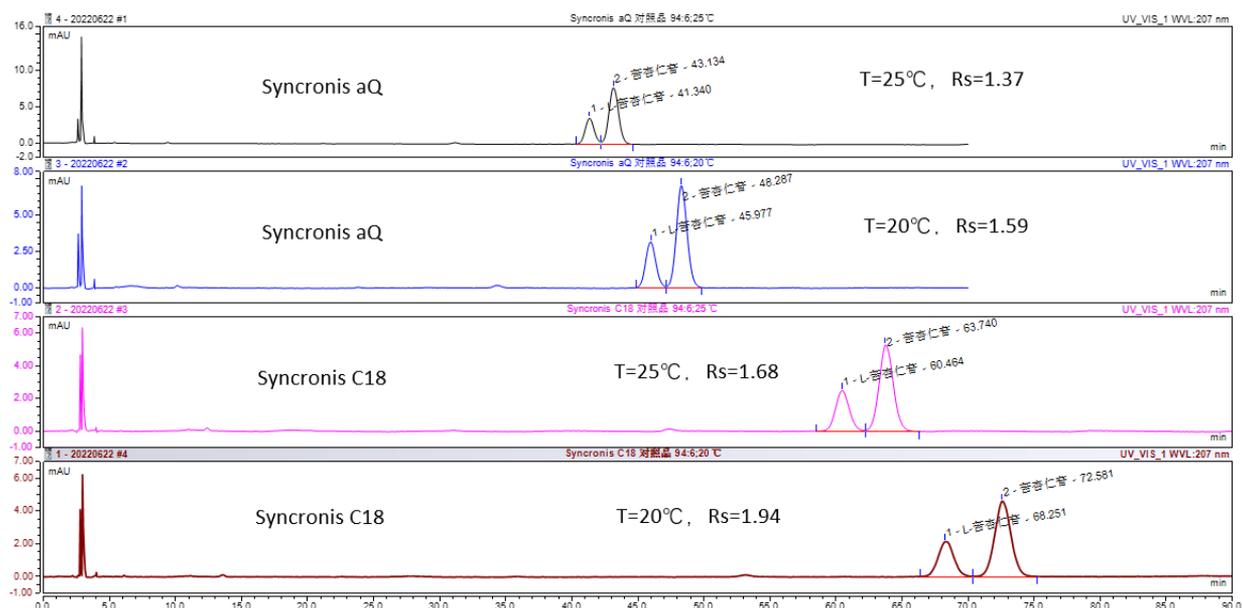


图4 苦杏仁苷和L-苦杏仁苷对照品溶液在Synchronis aQ、Synchronis C18上的分离叠加谱图（柱温 25°C 和 20°C ）

表4 JADE-PAK ODS-AQ C18、Synchronis aQ和Synchronis C18三款色谱柱参数汇总

Column	Hydrophobicity	EB retention Factor	Pore Size (Å)	Surface Area (m ² /g)	Carbon Load (%)	Endcapped
JADE-PAK ODS-AQ C18	—	—	120	300	15	YES(Polar)
Synchronis aQ	0.984	10.20	100	320	19	YES(Polar)
Synchronis C18	1.040	13.00	100	320	16	YES

Synchronis C18保留较强，流速为1.0 mL/min时，单针采集时间约80min，标准色谱条件未规定流速，实验室尝试通过提高流速来缩短采集时间，图5展示了在1.0、1.2和1.5 mL/min流速下供试品溶液的分离谱图，目标组分的分离度分别为1.80、1.86和1.93。综合考虑溶剂消耗、色谱柱耐压等，最终选定流速为1.2 mL/min，并且5个特征峰的相对保留时间符合系统适应性要求。另外供试品溶液在S峰之后会有一对连峰被洗脱下来，标准对照特征图谱中没有标识，应该是还没有出峰，如果不将它们洗脱下来，则会在下一针进样时对其他特征峰造成干扰。

因此，焯苦杏仁（西伯利亚杏）配方颗粒【特征图谱】推荐Synchronis C18色谱柱，柱温20℃，流速1.2 mL/min。

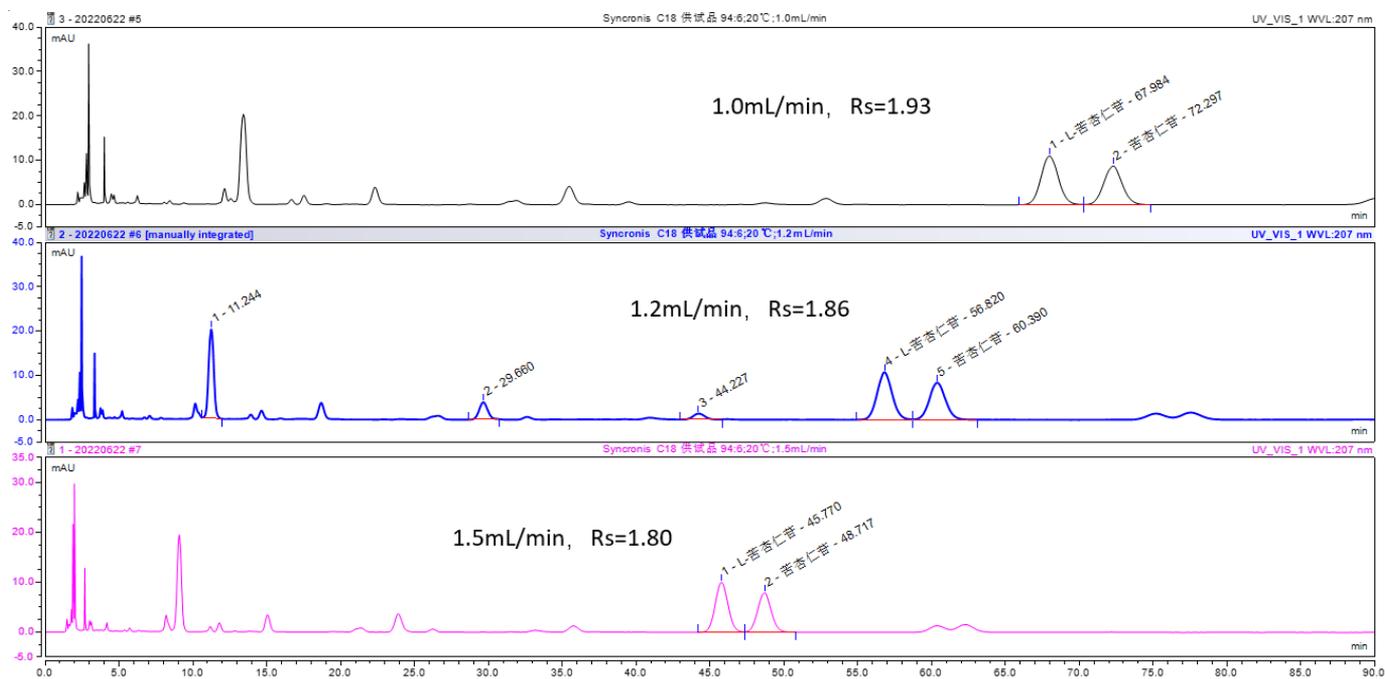


图5 焯苦杏仁（西伯利亚杏）配方颗粒供试品溶液在不同流速下的分离叠加谱图（1.0/1.2/1.5 mL/min）

3.3 木瓜-含量测定（齐墩果酸和熊果酸）

参照中国药典 2020 版一部 药材和饮片 木瓜【含量测定】，色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-水-冰醋酸-三乙胺（265：35：0.1：0.05）为流动相；检测波长为210nm；柱温16~18℃。理论板数按齐墩果酸峰计应不低于5000。

熊果酸和齐墩果酸是同属五环三萜酸类的同分异构体，反相分离极性相近的非极性化合物时，对C18色谱柱的分离能力有着较高的要求。实验室参照药典流动相条件，柱温设定为16℃，选取了Synchronis C18、BetaSil C18和BetaMax Neutral三款色谱柱进行试验，对照品溶液分离谱图如图6所示，熊果酸和齐墩果酸的分离度分别为1.41、1.60和1.85。Synchronis C18和BetaSil C18具有相同的孔径和相近的比表面积，乙苯保留因子相当，但前者碳载量只有16%，而后者碳载量却高达20%，据此推测BetaSil C18有更高的键合密度，疏水性参数相对较高，在分离极性相近的齐墩果酸和熊果酸时更具优势。Synchronis C18具有最强的保留能力，齐墩果酸理论塔板数为12203，但齐墩果酸和熊果酸未能达到基线分离，只有1.41；BetaMax Neutral因为孔径、比表面积和碳载量的原因，分离和保留效果均居中，虽然分离度达到1.60，但峰形略有拖尾，使得理齐墩果酸论塔板数只有8037；BetaSil C18的分离效果最好，分离度为1.85，并且齐墩果酸理论塔板数为11643，出峰最快，单针采集时间可控制在30min以内，是三款色谱柱中分离效果最好的。

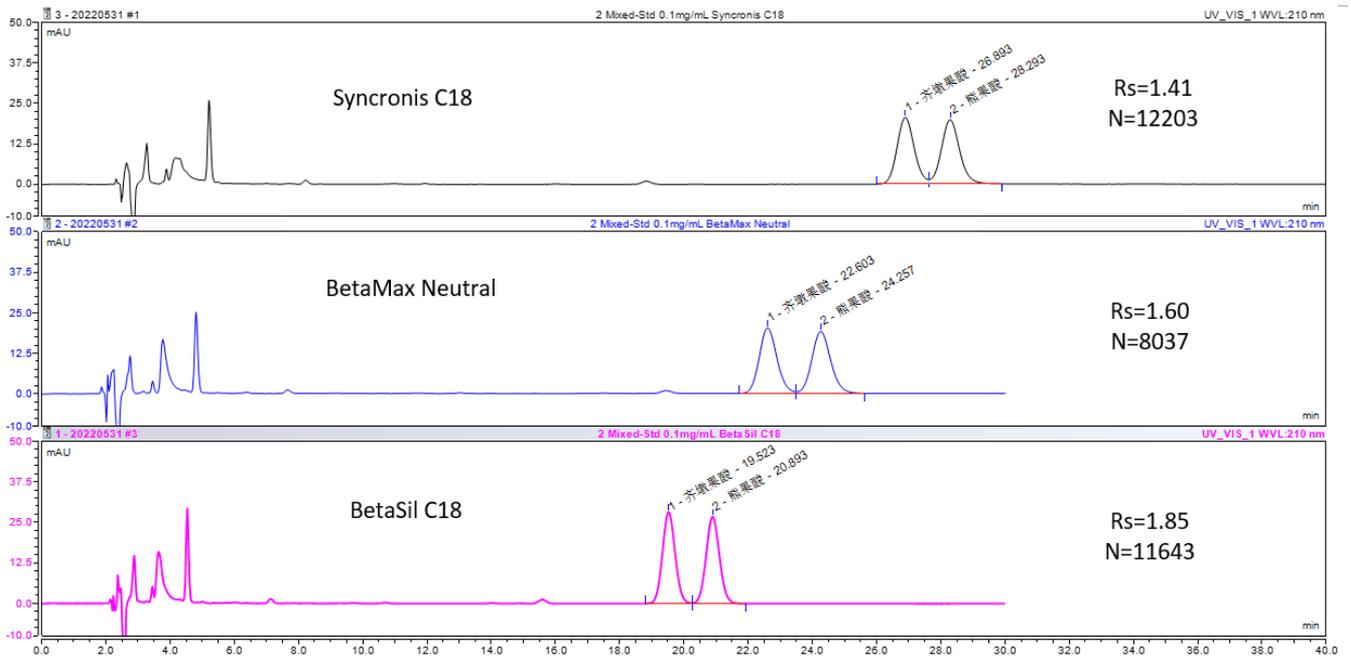


图6 齐墩果酸和熊果酸对照品溶液在Synchris C18、BetaMax Neutral和BetaSil C18上的分离叠加谱图

在木瓜供试品溶液分析中，供试品1和供试品2中齐墩果酸和熊果酸分离度分别为1.83和1.83，齐墩果酸理论塔板数分别为11509和11492，均满足药典要求。木瓜对照品溶液和供试品溶液在BetaSil C18上的分离谱图，如图7所示。

因此，木瓜【含量测定】推荐BetaSil C18色谱柱，柱温16℃。

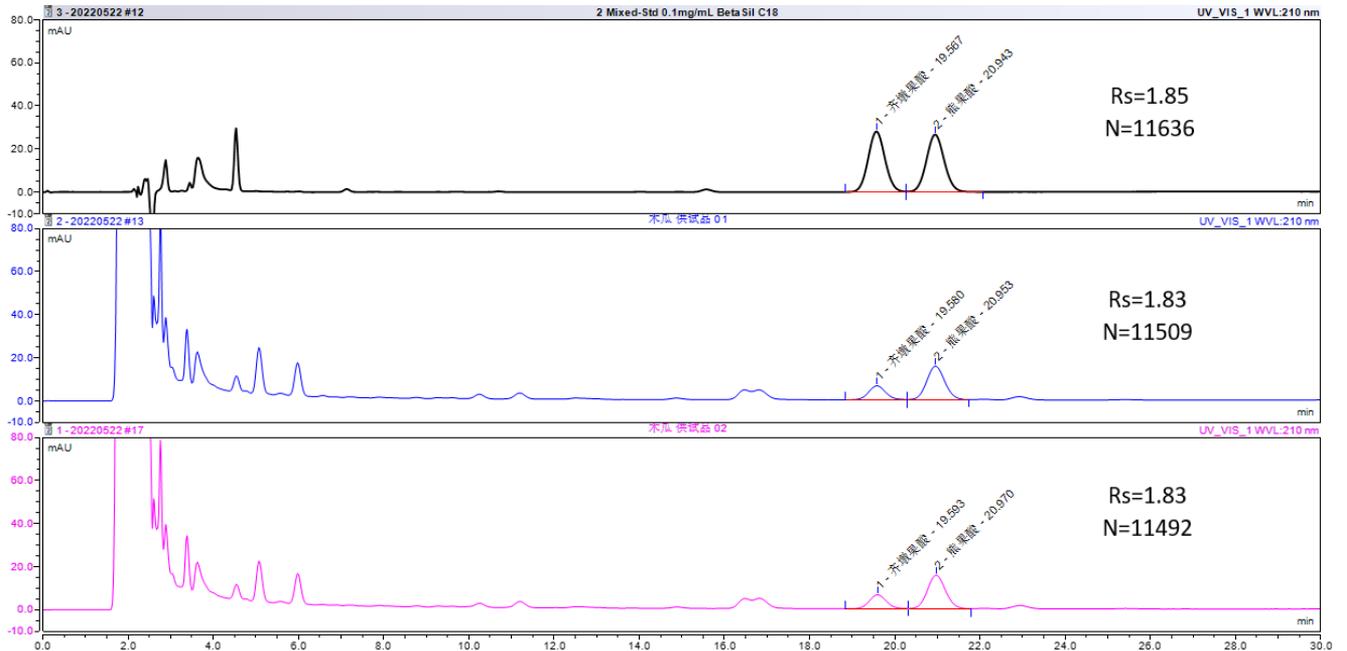


图7 木瓜对照品溶液和供试品溶液在BetaSil C18上的分离叠加谱图

4. 结论

在中药配方颗粒和中药饮片的日常分析中，可以参考以下思路来选择反相色谱柱：

- 1) 药典或标准方法有推荐色谱柱的，且该色谱柱有被数据库收录，可以通过计算色谱柱间 F_s 值，从实验室已有的色谱柱中筛选一款或几款选择性接近的色谱柱，进行预试验；
- 2) 药典或标准方法推荐的色谱柱没有录入数据库中，可优先选择一款填料孔径、比表面积接近，键合相和封端相同，碳载量相当，且有录入数据库的色谱柱，进行预试验；
- 3) 药典或标准没有明确推荐色谱柱，可以酌情参考期刊文献，选取一款实验室通用性较高的色谱柱进行预试验；
- 4) 在1)、2)、3)分离效果不满足的情况下，参考预实验分离谱图数据，综合考虑乙苯保留因子、疏水性、碳载量、孔径和比表面积等参数，选择合适色谱柱，并结合0512通则优化色谱柱条件，最终选定满足系统适应性要求的色谱柱；

赛默飞反相色谱柱Hypersil GOLD C18、Acclaim 120 C18、Synchronis C18、BetaSil C18、Accucore XL C18等，具有不同的孔径、比表面积、碳载量及乙苯保留因子，在HPLC方法开发过程中可提供不同的选择性，可满足不同的分离需求。

液相色谱是一门实验学科，在很多时候理论与实际会存在偏差，我们需要充分考虑对照品和供试品中溶剂与溶质的理化性质，色谱条件中流动相与固定相的属性，基于实验数据分析，通过总结归纳来优化参数，尽量避免盲目尝试，以便更快更好地完成色谱方法的开发。

参考文献

- [1] Snyder L R , Dolan J W , Carr P W . The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1060(1-2):77-116.
- [2] HPLC Columns <http://www.hplccolumns.org/database/compare.php>
- [3] U.S. Pharmacopeial Convention <https://apps.usp.org/app/USPNF/columnsDB.html>.
- [4] 张伟清,胡昌勤.反相C18液相色谱柱选择性理论及其应用[J].药学学报,2010,45(05):555-559.DOI:10.16438/j.0513-4870.2010.05.018.
- [5] 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(02):343-348.DOI:10.16155/j.0254-1793.2013.02.002.
- [6] 关于执行中药配方颗粒国家药品标准有关事项的通知[EB/OL] <https://www.chp.org.cn/gjyjw/tz/15980.jhtml>
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
S C I E N T I F I C