

# Studie over kolomklassificatie

**E. Haghedooren**

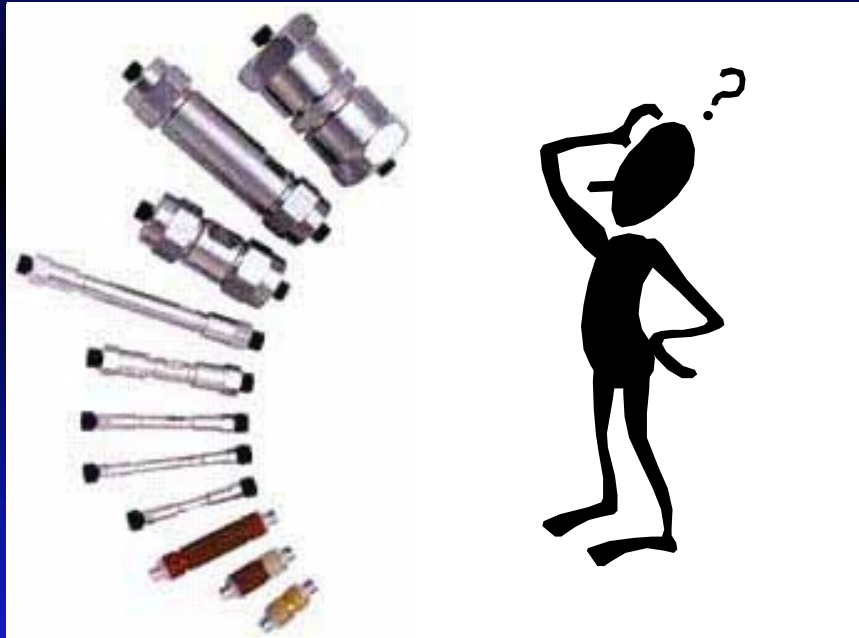
Labo voor Farmaceutische Analyse  
K.U.Leuven, België

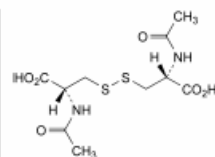
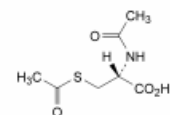
Nieuwe Stationaire Fasen en Kolomtypes in HPLC,  
*“Een praktische roadmap voor elke gebruiker”*, KVVCV, 12-10-06.

# Inleiding

---

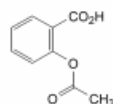
- **Probleem:**  
De selectie van een stationaire fase met de juiste selectiviteit in RP-LC analyses is niet eenvoudig



C. *N,N'*-diacetyl-L-cystine,D. *N,S*-diacetyl-L-cysteine.

## ACETYLSALICYLIC

Acidum acetylsalicy

 $C_9H_8O_4$  $M_r$  180.2

## DEFINITION

Acetylsalicylic acid contains not less than 99.5 per cent and not more than the equivalent of 101.0 per cent of 2-(acetoxy)benzoic acid, calculated with reference to the dried substance.

## CHARACTERS

A white, crystalline powder or colourless crystals, slightly soluble in water, freely soluble in alcohol.

It melts at about 143 °C (instantaneous method).

## IDENTIFICATION

*First identification:* A, B.

*Second identification:* B, C, D.

- A. Examine by infrared absorption spectrophotometry (2.2.24), comparing with the spectrum obtained with acetylsalicylic acid CRS.
- B. To 0.2 g add 4 ml of dilute sodium hydroxide solution R and boil for 3 min. Cool and add 5 ml of dilute sulphuric acid R. A crystalline precipitate is formed. Filter, wash the precipitate and dry at 100 °C to 105 °C. The melting point (2.2.14) is 156 °C to 161 °C.
- C. In a test tube mix 0.1 g with 0.5 g of calcium hydroxide R. Heat the mixture and expose to the fumes produced a piece of filter paper impregnated with 0.05 ml of nitrobenzaldehyde solution R. A greenish-blue or greenish-yellow colour develops on the paper. Moisten the paper with dilute hydrochloric acid R. The colour becomes blue.
- D. Dissolve with heating about 20 mg of the precipitate obtained in identification test B in 10 ml of water R and cool. The solution gives reaction (a) of salicylates (2.3.1).

## TESTS

**Appearance of solution.** Dissolve 1.0 g in 9 ml of alcohol R. The solution is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

**Related substances.** Examine by liquid chromatography (2.2.29). Prepare the solutions immediately before use.

**Test solution.** Dissolve 0.10 g of the substance to be examined in acetonitrile for chromatography R and dilute to 10.0 ml with the same solvent.

**Reference solution (a).** Dissolve 50.0 mg of salicylic acid R in the mobile phase and dilute to 50.0 ml with the mobile phase. Dilute 1.0 ml of this solution to 100.0 ml with the mobile phase.

**Reference solution (b).** Dissolve 10.0 mg of salicylic acid R in the mobile phase and dilute to 10.0 ml with the mobile

The chromatographic procedure may be carried out using:

- a stainless steel column 0.25 m long and 4.6 mm in internal diameter packed with octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm),
- as mobile phase at a flow rate of 1 ml/min a mixture of 2 volumes of phosphoric acid R, 400 volumes of acetonitrile for chromatography R and 600 volumes of water R,

or acetylsalicylic acid. The test is not valid unless in the chromatogram obtained with reference solution (b), the resolution between the two principal peaks is at least 6.0.

In the chromatogram obtained with the test solution the area of any peak, apart from the principal peak, is not greater than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.1 per cent); the sum of the areas of all the peaks is not greater than 2.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.25 per cent). Disregard any peak with an area less than 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a).

**Heavy metals (2.4.8).** Dissolve 1.0 g in 12 ml of acetone R and dilute to 20 ml with water R. 12 ml of this solution complies with limit test B for heavy metals (20 ppm). Prepare the standard using lead standard solution (1 ppm Pb) obtained by diluting lead standard solution (100 ppm Pb) R with a mixture of 6 volumes of water R and 9 volumes of acetone R.

**Loss on drying (2.2.32).** Not more than 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying *in vacuo*.

**Sulphated ash (2.4.14).** Not more than 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

## ASSAY

In a flask with a ground-glass stopper, dissolve 1.000 g in 10 ml of alcohol R. Add 50.0 ml of 0.5 M sodium hydroxide. Close the flask and allow to stand for 1 h. Using 0.2 ml of phenolphthalein solution R as indicator, titrate with 0.5 M hydrochloric acid. Carry out a blank titration.

1 ml of 0.5 M sodium hydroxide is equivalent to 45.04 mg of  $C_9H_8O_4$ .

## STORAGE

Store in an airtight container.

# Inleiding

---

- **Probleem:**  
De selectie van een stationaire fase met de juiste selectiviteit in RP-LC analyses is niet eenvoudig
- **Waarom?**
  - Officiële compendia (Ph. Eur., USP) geven slechts zeer algemene informatie over de te gebruiken stationaire fase
  - > 600 merken RP LC C18 kolommen op de markt
  - Kolomleveranciers geven slechts beperkte informatie over hun stationaire fase

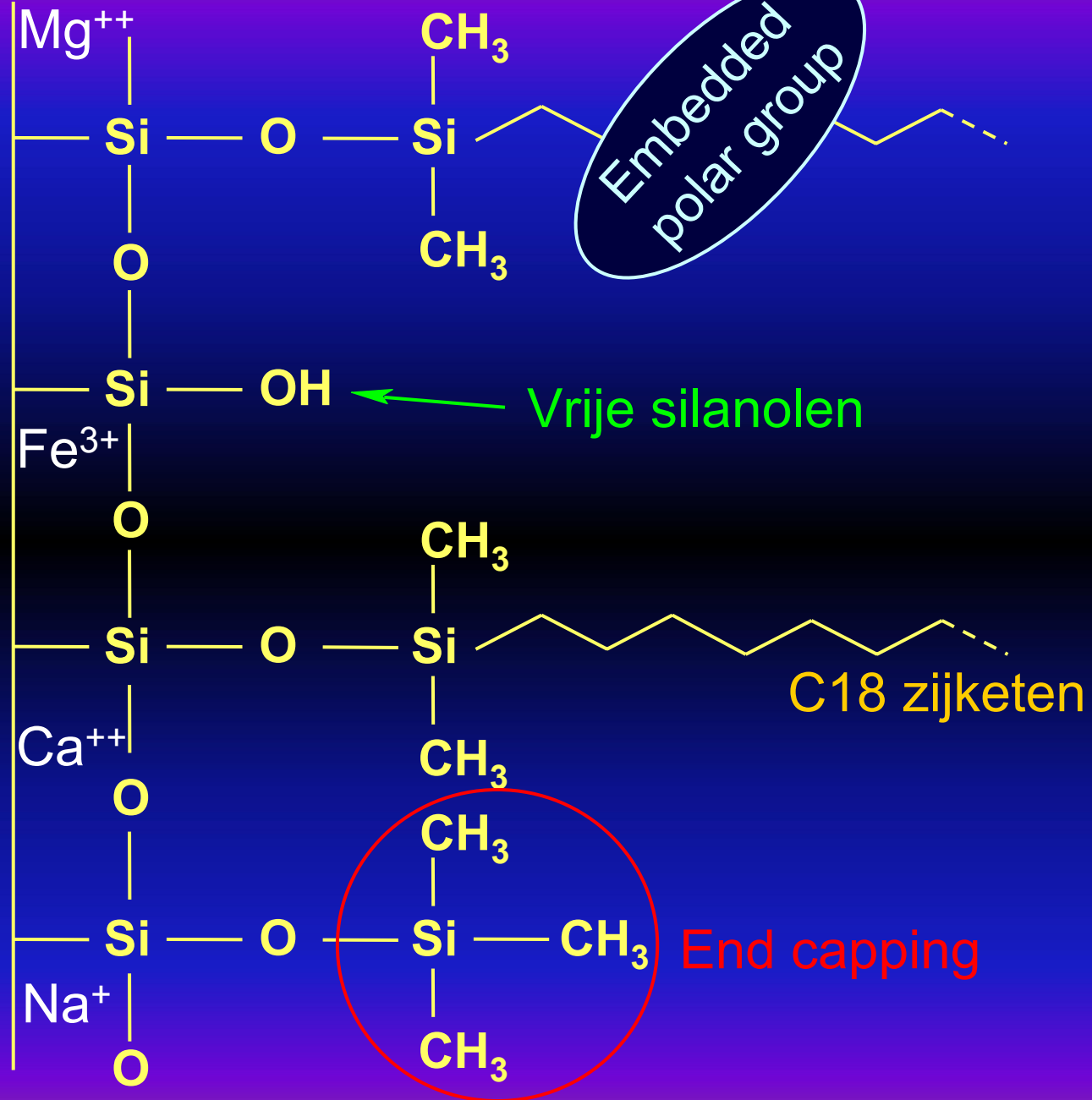
# Inleiding

---

- **Probleem:**  
De selectie van een stationaire fase met de juiste selectiviteit in RP-LC analyses is niet eenvoudig
- **Waarom?**
  - Officiële compendia (Ph. Eur., USP) geven slechts zeer algemene informatie over de te gebruiken stationaire fase
  - > 600 merken RP LC C18 kolommen op de markt
  - Kolomleveranciers geven slechts beperkte informatie over hun stationaire fase
- **Gevolg:**
  - Ongeschikte stationaire fase → onvoldoende selectiviteit  
=> Verspilling van tijd & geld

Metaal  
sporen

Silica oppervlakte



Partikelvorm  
Distributie partikelgrootte  
Kolompakking



Partikeldiameter  
Poriëngrootte  
Kolomdimensies

# Hoe een kolom karakteriseren?

---

- Verschillende chromatografische testen zijn beschikbaar in literatuur:
  - efficiëntie
  - hydrofobiciteit
  - silanolactiviteit
  - ion-uitwisselingscapaciteit
  - sterische selectiviteit
  - metaalozuiverheden
- Geen enkele methode is echter algemeen aanvaard
  - herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid niet aangetoond
  - relatie met selectiviteit in reële scheidingen ontbreekt

Doel van deze studie : Ontwikkeling van een algemene chromatografische procedure voor de karakterisering & klassificatie van RP-LC C18 kolommen



# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd

# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd



36 parameters

# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd



36 parameters



herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid getest in 3 labo's

# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd



36 parameters



herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid getest in 3 labo's



24 parameters

# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd



36 parameters



herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid getest in 3 labo's



24 parameters



bepaald op 69 RP-LC kolommen

# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd



36 parameters



herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid getest in 3 labo's



24 parameters



bepaald op 69 RP-LC kolommen



matrix (69 x 24)

# Overzicht

---

selectie van chromatografische testprocedures uit literatuur



8 testmethoden geselecteerd



36 parameters



herhaalbaarheid / reproduceerbaarheid getest in 3 labo's



24 parameters



bepaald op 69 RP-LC kolommen



matrix (69 x 24)



Principal Component Analysis (PCA)



## PCA

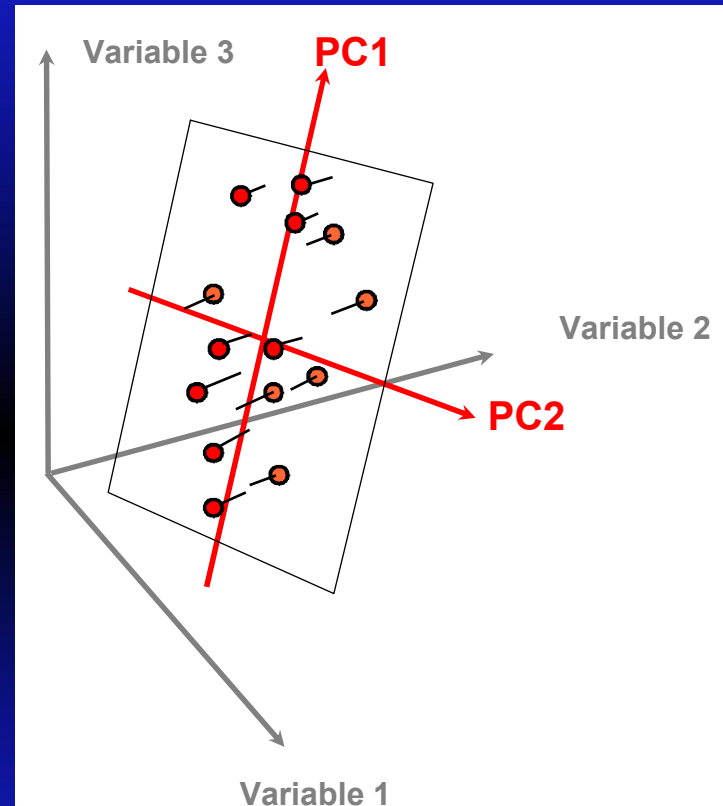
- Datamatrix (69 kolommen x 24 parameters)
  - Visualisatie
  - Datareductie

## PCA

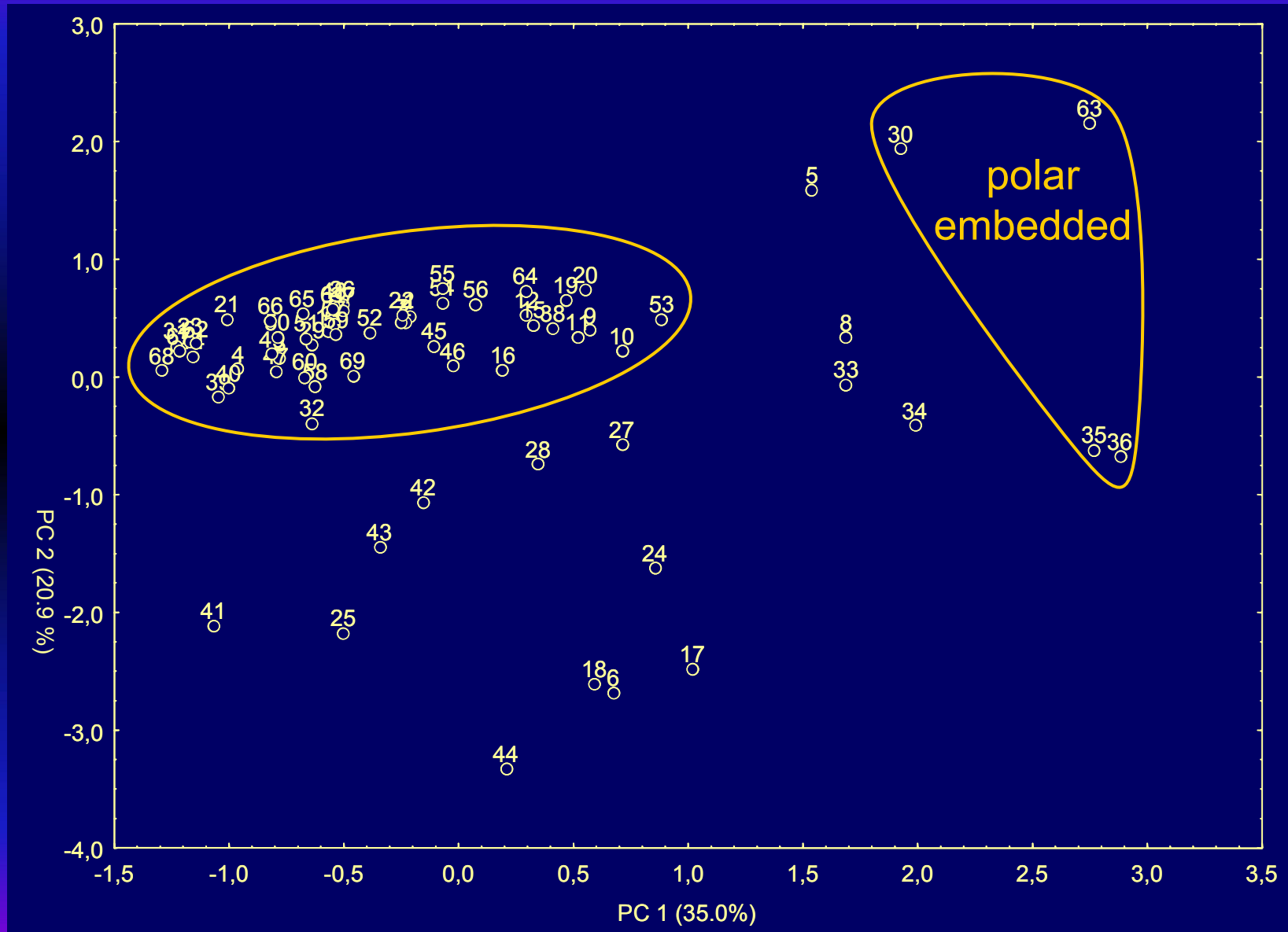
- Datamatrix (69 kolommen x 24 parameters)
  - Visualisatie
  - Datareductie
  - Scoresplot
  - Loadingsplot

# PCA

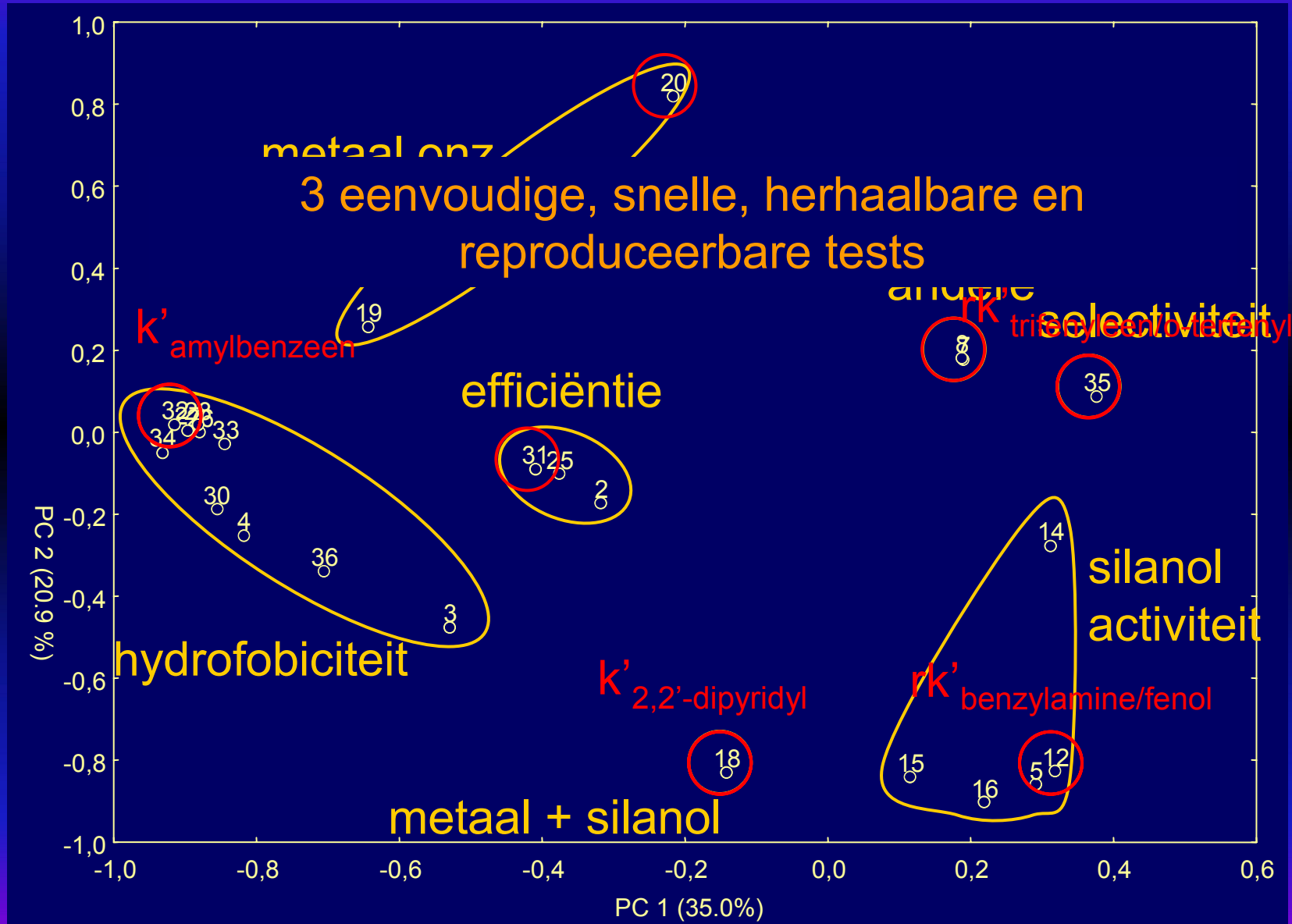
- Datamatrix (69 kolommen x 24 parameters)
  - Visualisatie
  - Datareductie
  - Scoresplot
  - Loadingsplot



# PCA scores plot



# PCA loadings plot



# Test procedure

mobiele fase	staal	parameter	kolomeigenschap
MeOH – water – 0.2 M fosfaatbuffer pH 2.7 (34:90:10 m/m)	benzylamine fenol	$rk'_{\text{benzylamine/fenol}}$	silanolactiviteit
MeOH – water – 0.2 M fosfaatbuffer pH 6.5 (34:90:10 m/m)	2,2'-dipyridyl	$k'_{\text{2,2'-dipyridyl}}$	silanolactiviteit metaalozuiverheden
MeOH – water (317:100 m/m)	uracil amylbenzeen o-terfenyl trifenyleen	$rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl}}$ $k'_{\text{amylbenzeen}}$	hydrofobiciteit sterische selectiviteit

40 °C, 1 ml/min, 20 µl, 254 nm

# Correlatie met reële scheidingen

---

- Geven kolommen met gelijkaardige parameters ook gelijkaardige scheidingen?

# Correlatie met reële scheidingen

---

- Geven kolommen met gelijkaardige parameters ook gelijkaardige scheidingen?
- Scheiding van tien geneesmiddelen van hun respectievelijke verwante verbindingen:
  - Acetylsalicylzuur (aspirine)
  - Nimesulide
  - Fenoxymethylpenicilline (pen V)
  - Buflomedil hydrochloride
  - Clindamycine hydrochloride
  - Chloramfenicol natrium succinaat
  - Dihydrostreptomycine sulfaat
  - Vancomycine
  - Erythromycine
  - Fluoxetine



# Acetylsalicylzuur (aspirine)

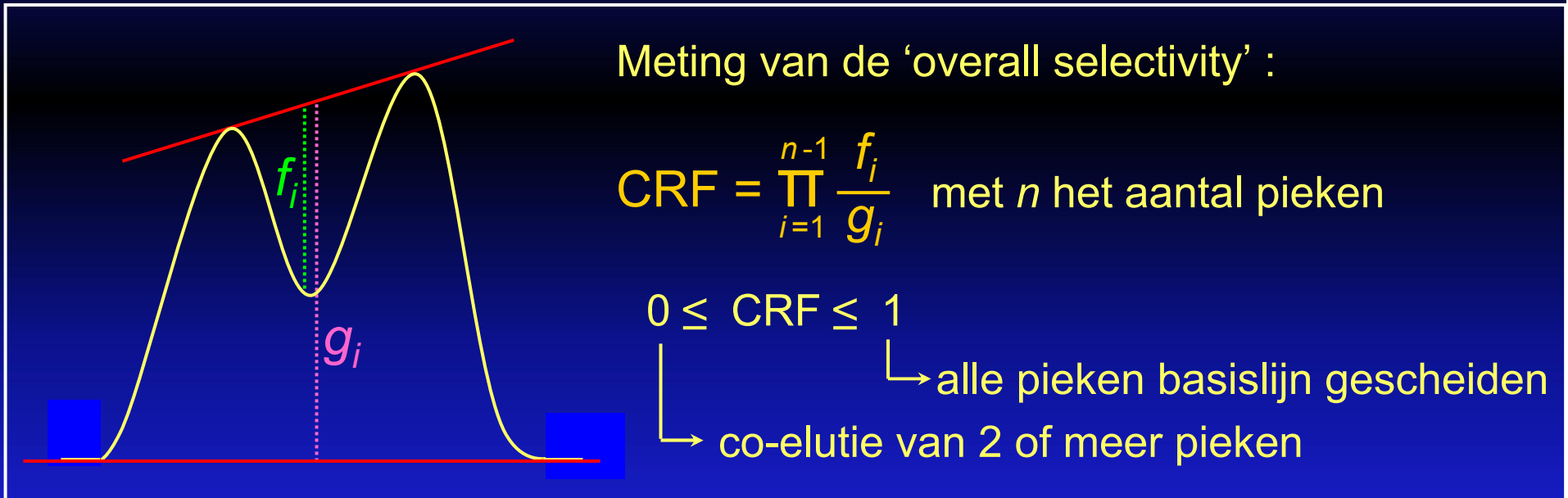
---

- Scheiding werd uitgevoerd volgens monografie uit Ph. Eur.
  - Mobilele fase : acetonitril / water / fosforzuur (400:600:2, v/v)
  - Voorgeschreven kolom :
    - Octadecylsilyl silicagel for chromatography
    - 5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm ID
  - Toegelaten aanpassingen:
 

kolomlengte met $\pm$ 70 %	75 – 425 mm
interne diameter met $\pm$ 25 %	3.45 – 5.75 mm
reductie partikelgrootte met 50 %	2.5 – 5 $\mu$ m
  - Scheiding uitgevoerd op 56 kolommen

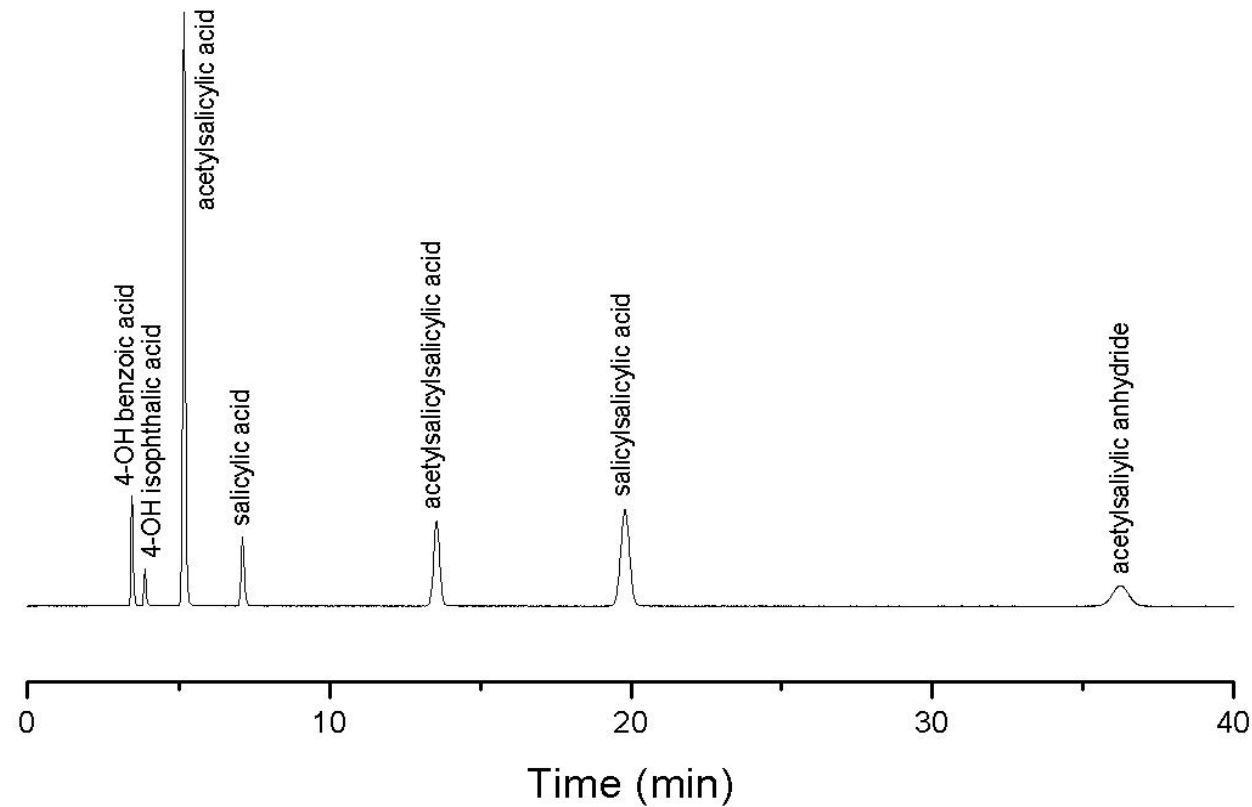
# Acetylsalicylzuur (aspirine)

- Kwaliteit van de scheiding werd geëvalueerd met CRF

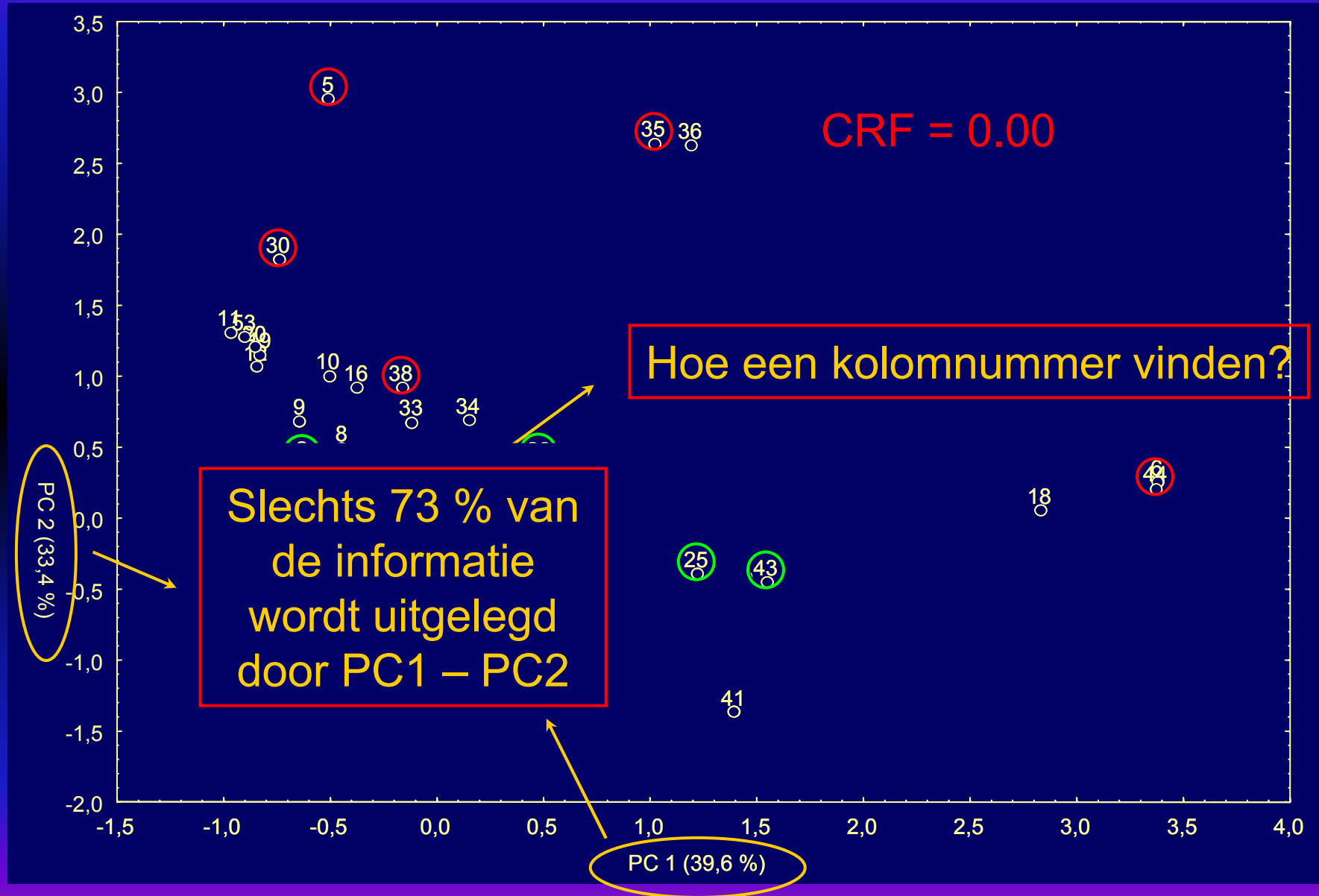


# Acetylsalicylzuur (aspirine)

Kolom: Tracerexcel 5 (No 51)



# PCA scores plot



# Meer praktisch classificatiesysteem

---

- Selectie van een referentiekolom
- Andere kolommen worden geklasseerd op basis van gelijkenis van hun 4 kolomparameters met deze van de referentiekolom

*F*-waarde

$$\begin{aligned}
 F = & (k'_{\text{amylbenzeen, ref}} - k'_{\text{amylbenzeen, } i})^2 + \\
 & (rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, ref}} - rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, } i})^2 + \\
 & (k'_{\text{2,2'-dipyridyl, ref}} - k'_{\text{2,2'-dipyridyl, } i})^2 + \\
 & (rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, ref}} - rk'_{\text{trifenylene/o-terfenyl, } i})^2
 \end{aligned}$$

autoscaling:  $\frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$

# Meer praktisch classificatiesysteem

- Selectie van een referentiekolom
- Andere kolommen worden geklasseerd op basis van gelijkenis van hun 4 kolomparameters met deze van de referentiekolom

## *F*-waarde

$$\begin{aligned}
 F = & (k'_{\text{amylbenzeen, ref}} - k'_{\text{amylbenzeen, } i})^2 + \\
 & (rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, ref}} - rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, } i})^2 + \\
 & (k'_{\text{2,2'-dipyridyl, ref}} - k'_{\text{2,2'-dipyridyl, } i})^2 + \\
 & (rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, ref}} - rk'_{\text{trifenylene/o-terfenyl, } i})^2
 \end{aligned}$$

Hoe kleiner de *F* waarde, hoe meer een kolom *i* op de referentiekolom lijkt

# Meer praktisch classificatiesysteem

- Selectie van een referentiekolom
- Andere kolommen worden geklasseerd op basis van gelijkenis van hun 4 kolomparameters met deze van de referentiekolom

**F-waarde**

$$F = (k'_{\text{amylbenzeen, ref}} - k'_{\text{amylbenzeen, i}}) / (k'_{\text{amylbenzeen, ref}} + k'_{\text{amylbenzeen, i}})$$

$$rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, ref}} - rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, i}}$$

$$(k'_{\text{2,2'-dipyridyl, ref}} - k'_{\text{2,2'-dipyridyl, i}}) / (k'_{\text{2,2'-dipyridyl, ref}} + k'_{\text{2,2'-dipyridyl, i}})$$

$$(rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, ref}} - rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, i}}) / (rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, ref}} + rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, i}})$$

- Voordelen :

- Elk beschikbare info is benut
- Iedere kolom  $i \rightarrow F\text{-waarde} \rightarrow$  rangschikking  $\rightarrow$  website





# Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

## Column Classification System



- Home
- Staff
- Research
- Publications
- Students Corner
- Interesting Links
- Search
- Search matrix

[ [instruction manual](#) ] [ [print](#) ]

Enter parameters name  k'amb  / rk'ba/pH2.7  rk'tri/ter  k'2,2'-d

Optional 2nd set name  k'amb  / rk'ba/pH2.7  rk'tri/ter  k'2,2'-d

or select a column

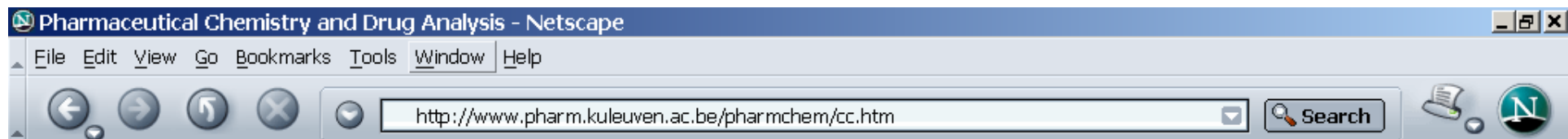
- Tracerexcel, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Teknokroma [6; 0.066; 1.37; 8.83]
- Prevail C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech [4.84; 0.067; 1.92; 20.71]
- Prodigy 3, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Phenomenex [5.92; 0.055; 1.2; 8.6]
- Prontosil 120-5-C18-H, 250 x 4.6 mm ID, Bischoff [4.76; 0.072; 1.43; 8.76]
- Prontosil 120-5-C18-SH, 250 x 4.6 mm ID, Bischoff [5.81; 0.08; 1.43; 9.98]
- Purospher endcapped, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Merck [7.75; 0.058; 1.71; 14.1]
- Purospher Star, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Merck [6.92; 0.06; 1.54; 12.3]
- Purospher, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Merck [4.5; 0.001; 1.9; 11.3]
- Spheri-5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, PerkinElmer [7.1; 0.23; 1.42; 18]
- Spherisorb ODS2, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Waters [5.53; 0.252; 1.55; 18]
- Supelcosil LC-18 DB, 150 x 4.6 mm, 3 µm, Supelco [4.1; 0.155; 1.4; 6.36]
- Supelcosil LC-18 DB, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Supelco [3.98; 0.164; 1.37; 6.51]
- Supelcosil LC18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Supelco [4.16; 0.76; 1.43; 18]
- Superspher, 250 x 4.6 mm ID, 4 µm, Merck [6.4; 0.103; 1.59; 9.21]
- Symmetry, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Waters [6.5; 0.041; 1.56; 8.94]
- Tracerexcel, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Teknokroma [6.4; 0.071; 1.35; 9.25]
- Tracerexcel, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Teknokroma [6; 0.066; 1.37; 8.83]
- TSKgel ODS-80TS, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, TosoHaas [5.66; 0.059; 1.28; 9.06]
- TSKgel Super ODS, 100 x 4.6 mm, 2 µm, TosoHaas [2.28; 0.067; 1.46; 4.24]
- Uptispher HDO, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Interchrom [5.53; 0.062; 1.28; 9.14]
- Uptispher HDO, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Interchrom [5.76; 0.08; 1.3; 6.87]

Option

Classify

Selecteer een referentiekolom uit lijst





Column	F	CRF <sub>asp.</sub>
Tracerexcel, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Teknokroma	0	1.00
Uptispher ODB, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Interchrom	0.042	1.00
Genesis C18, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Jones Chrom.	0.057	0.74
Tracerexcel, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Teknokroma	0.077	1.00
Validated C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, PerkinElmer	0.133	1.00
YMC-Pack-Pro C18, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, YMC	0.137	1.00
Zorbax Eclipse XDB, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Agilent	0.152	1.00
Nucleosil HD, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel	0.16	1.00
Prontosil 120-5-C18-SH, 250 x 4.6 mm ID, Bischoff	0.179	
TSKgel ODS-80TS, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, TosohHaas	0.22	0.84
Uptispher ODB, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Interchrom	0.233	0.94
Uptispher HDO, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Interchrom	0.258	1.00

Column	F	k'amb	rk'ba/pH2.7	rk'bu/ter	k'2,2'-d
Tracerecel, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Teknokroma	0.000	6.00	0.066	1.37	8.83
Uptisphere ODB, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Interchrom	0.032	6.31	0.068	1.37	9.18
Genesis C18, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Jones Chrom.	0.047	6.37	0.079	1.37	9.00
Tracerecel, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Teknokroma	0.060	6.40	0.071	1.35	9.25
Validated C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, PerkinElmer	0.102	5.69	0.067	1.41	9.86
YMC-Pack-Pro C18, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, YMC	0.108	5.71	0.048	1.32	8.03
Zorbax Eclipse XDB, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Agilent	0.113	6.02	0.069	1.30	7.96
Nucleosil HD, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel	0.121	6.03	0.081	1.45	8.38
Protonal 120-5-C18-SH, 250 x 4.6 mm ID, Bischoff	0.138	5.81	0.080	1.43	9.98
YMC-Pack Pro C18, 250 x 4.0 mm ID, 3 µm, YMC	0.150	6.19	0.038	1.29	8.68
TSKgel ODS-80TS, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, TosohHaas	0.163	5.66	0.059	1.28	9.06
Capcell Pak C18 MG, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Shiseido	0.184	6.42	0.076	1.29	9.64
Uptisphere HDO, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Interchrom	0.193	5.53	0.062	1.28	9.14
Uptisphere ODB, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Interchrom	0.196	5.39	0.099	1.42	8.95
YMC-Pack Pro C18, 250 x 4.0 mm ID, 5 µm, YMC	0.196	5.62	0.038	1.30	7.90
Wakosil HG, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, SGE	0.205	5.34	0.069	1.41	7.70
Aqua 5, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, Phenomenex	0.220	5.71	0.063	1.26	9.22
YMC-Pack-Pro C18, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, YMC	0.222	5.96	0.034	1.27	8.29
Zorbax Extend C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Agilent	0.247	6.16	0.065	1.48	7.80
Wakosil HG, 100 x 4.6 mm ID, 5 µm, SGE	0.266	5.31	0.057	1.41	7.33
Discovery H8 C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Supelco	0.274	6.32	0.079	1.49	8.32
Uptisphere HDO, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Interchrom	0.284	5.76	0.080	1.30	6.87
Wakosil RS, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, SGE	0.375	6.65	0.049	1.27	10.20
Wakosil II SC18RS, 250 x 4.6 mm, 5 µm, SGE	0.397	5.70	0.050	1.22	9.24
Prodigy 3, 100 x 4.6 mm ID, 3 µm, Phenomenex	0.462	5.92	0.055	1.20	8.60
Protonal 120-5-C18-H, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Bischoff	0.479	4.76	0.072	1.43	8.76
Protonal 120-5-C18-AQ, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Bischoff	0.531	4.72	0.082	1.32	8.03
Capcell Pak C18 ACR, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Shiseido	0.533	5.57	0.065	1.54	8.03
Zorbax SB-C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Agilent	0.601	5.06	0.065	1.22	9.22
Symmetry, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Waters	0.665	6.50	0.041	1.56	8.94
Capcell Pak C18 UG120, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Shiseido	0.783	4.73	0.060	1.31	6.38
ACE C18-3, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Achrom	0.811	4.88	0.079	1.50	6.80
Luna 5, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, Phenomenex	0.841	5.72	0.031	1.15	8.65
Superspher, 250 x 4.6 mm ID, 4 µm, Merck	0.876	6.40	0.103	1.59	9.21
Alltima 3, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Alltech	0.938	7.04	0.056	1.45	12.20
Alltima 5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	1.022	7.28	0.071	1.46	11.90
Hydrospher C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, YMC	1.054	4.61	0.030	1.20	8.40
Kromasil NM, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel	1.083	6.20	0.063	1.63	9.37
Kromasil EKA, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Akzo Nobel	1.167	7.46	0.074	1.56	9.40
ACE C18-5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Achrom	1.185	4.56	0.082	1.51	6.32
Purospher Star, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Merck	1.255	6.92	0.060	1.54	12.30
YMC Hydrospher C18, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, YMC	1.488	4.20	0.032	1.19	7.95
Pecosphere C18, 83 x 4.6 mm ID, 3 µm, PerkinElmer	1.593	6.21	0.125	1.33	14.24
Supelco LCI-18 DB, 150 x 4.6 mm, 3 µm, Supelco	1.685	4.10	0.155	1.40	6.36
Capcell Pak C18 AQ, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Shiseido	1.837	3.71	0.028	1.33	11.37
Supelco LCI-18 DB, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Supelco	1.849	3.98	0.164	1.37	6.51
Pursuil C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Varian	1.884	3.75	0.093	1.36	5.71
Omnispher, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Varian	2.106	7.56	0.078	1.67	9.55
MP-Gel ODS-5, 250 x 4.0 mm, YMC/Omnichrom	2.239	5.82	0.038	1.73	10.69
Hyperasil HDS, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, ThermoQuest	2.642	3.56	0.131	1.56	6.59
Brava BDS 3, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Alltech	2.719	3.10	0.086	1.37	5.93
Protonal 120-5-C18-AQ PLUS, 250 x 4.6 mm, 5 µm	2.822	5.66	0.022	1.68	13.85
Nucleosil NM, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel	3.135	4.40	0.111	1.66	13.47
Brava BDS 5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	3.194	3.01	0.114	1.50	6.04
HyPurity C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm, ThermoQuest	3.437	3.16	0.084	1.51	4.45
Discovery C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Supelco	3.621	3.04	0.083	1.50	4.36
HyPurity Elite, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, ThermoQuest	3.722	3.11	0.083	1.55	4.43
Bondapak, 250 x 4.6 mm ID, 10 µm, Waters	3.823	2.50	0.087	1.22	7.41
HyPurity Elite, 150 x 4.6 mm ID, 5 µm, ThermoQuest	3.855	3.16	0.079	1.58	4.35
Purospher endcapped, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Merck	3.963	7.75	0.058	1.71	14.10
Protonal 120 5 C18 oae EPS, 250 x 4.6 mm, 5 µm	4.863	4.99	0.020	1.89	6.54
TSKgel Super ODS, 100 x 4.6 mm, 2 µm, TosohHaas	4.910	2.28	0.067	1.46	4.24
Platinum 3, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Alltech	5.014	2.18	0.174	1.22	7.47
Polaris C18-A, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Varian	5.064	2.92	0.078	1.69	4.57
YMC-Pack Pro C18 RS, 250 x 4.0 mm ID, 5 µm, YMC	5.164	10.19	0.039	1.37	11.44
Chromolith, 100 x 4.6 mm ID, Merck	5.215	2.28	0.073	1.46	3.59
Platinum 5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	5.452	2.00	0.190	1.23	8.98
Purospher, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Merck	5.510	4.50	0.001	1.90	11.30
Spheri-5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, PerkinElmer	5.681	7.10	0.230	1.42	18.00
Spherisorb ODS2, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Waters	6.261	5.53	0.252	1.55	18.00
LiChrospher, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Merck	6.942	6.44	0.157	1.77	18.00
Protonal 60-5-C18-H, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Bischoff	7.008	10.53	0.038	1.34	14.15
Brava ODS, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	7.197	2.96	0.184	1.36	18.00
Nucleosil Nautilus, 250 x 4.6 mm, 5 µm, Macherey-N	7.798	3.22	0.014	1.95	6.38
Zorbax SB-Aq, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Agilent	7.922	0.82	0.035	1.19	8.14
LiChrosorb, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Merck	10.581	4.36	0.344	1.73	18.00
Preval C18, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	11.771	4.84	0.067	1.92	20.71
Alltima AQ, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	14.571	4.87	0.066	1.93	22.87
Preval Amide, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	14.576	1.47	-0.112	1.99	3.45
HyPurity Aquastar, 250 x 4.6 mm, 5 µm, ThermoQuest	14.655	1.58	0.097	2.12	11.94
Platinum EPS 3, 150 x 4.6 mm ID, 3 µm, Alltech	15.777	0.95	0.379	1.87	9.33
Platinum EPS 5, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	16.642	0.97	0.401	1.88	10.00
Preval Select, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Alltech	17.049	2.88	-0.057	2.27	4.33
Apex Basic, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Jones Chrom.	18.454	2.15	0.001	2.32	7.66
Exsil ODS, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, SGE	19.434	5.01	0.149	1.63	28.22
Hyperasil ODS, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, ThermoQuest	20.216	3.56	0.607	1.31	18.00
HyPurity Advance, 250 x 4.6 mm, 5 µm, ThermoQuest	24.975	0.42	-0.263	2.09	0.92
Supelco LCI8, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Supelco	28.910	4.16	0.760	1.43	18.00
Apex ODS II, 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Jones Chrom.	29.160	3.89	0.760	1.40	18.00

Kolommen met  
 $CRF_{asp} = 1$   
 (enkel 250 mm kolommen) :

$F < 2$  16 op 16

$2 < F < 6$  4 op 7

$F > 6$  2 op 10

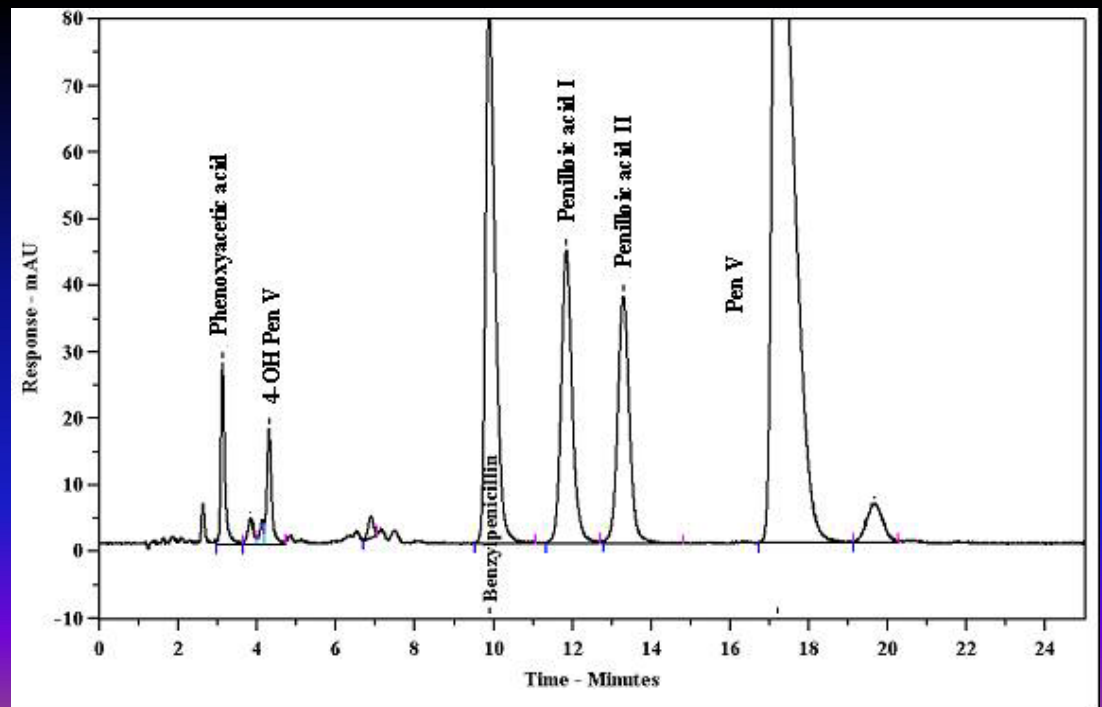
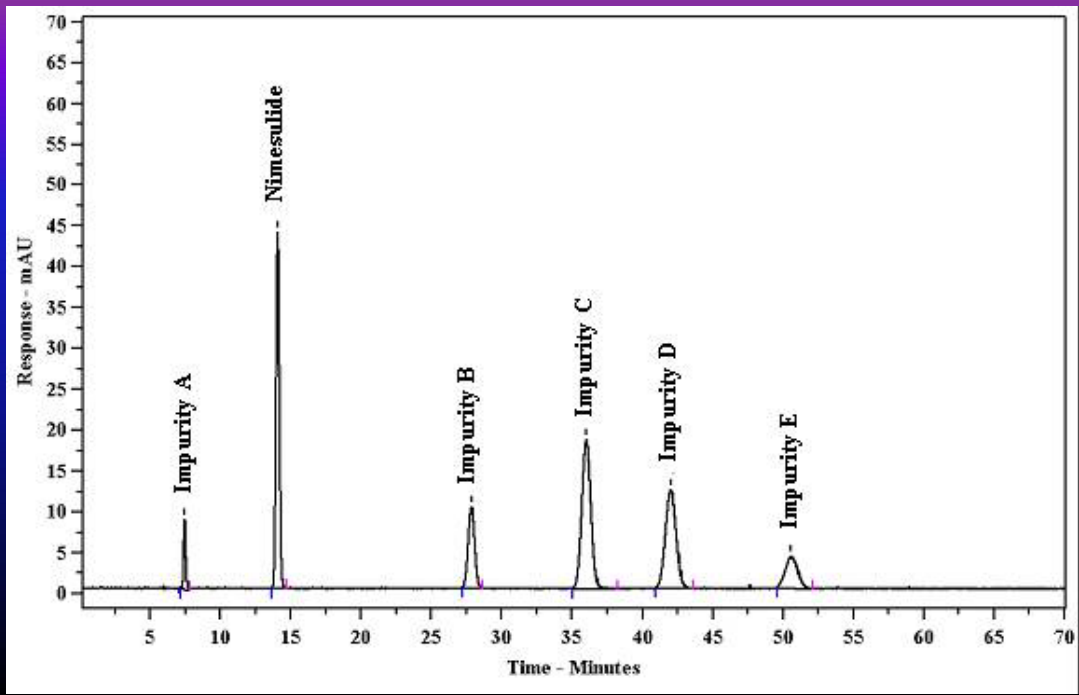
# gelijkaardige scheidingen

Kolommen met CRF = 1 :

*clindamycine \**   
 *buflomedil*   
 *chloramfenicol*   
 *nimesulide \*\**   
 *dihydrostreptomycine*   
 *phenoxymethylpenicilline*   
 *vancomycine*

F < 2	16/16	30/30	30/30	14/14	30/30	27/30	19/19
2 < F < 6	5/7	13/13	13/13	6/6	13/13	11/13	6/10
F > 6	4/11	7/13	9/13	1/2	7/13	3/13	1/3

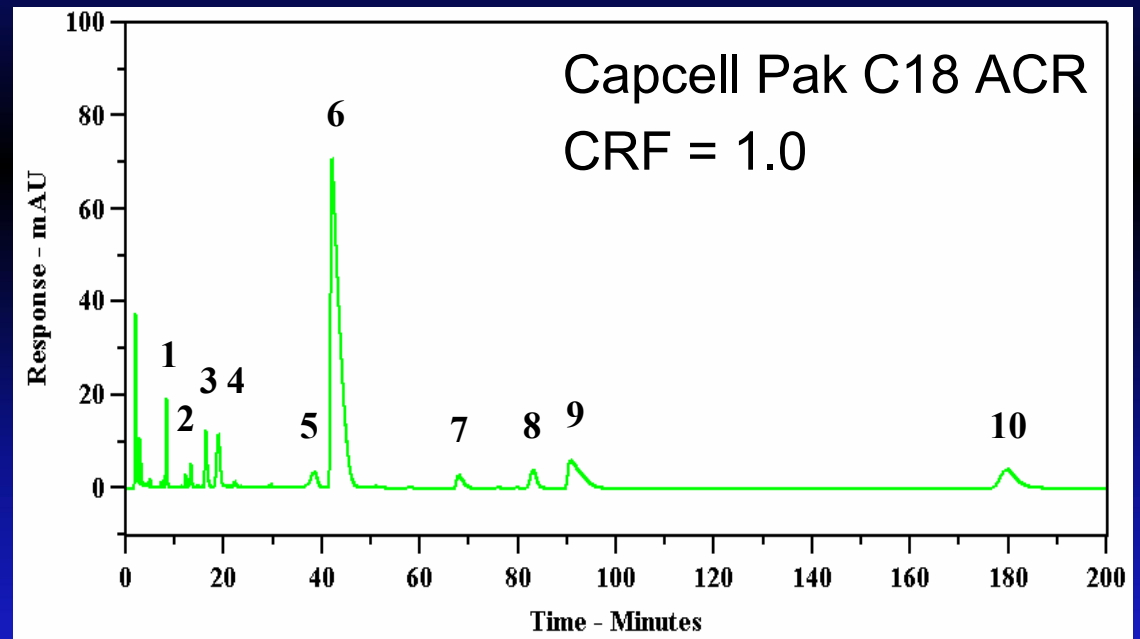
\* enkel 250 mm kolommen, \*\* enkel korte kolommen



# Andere scheidingen

Kolommen met CRF > 0.80:

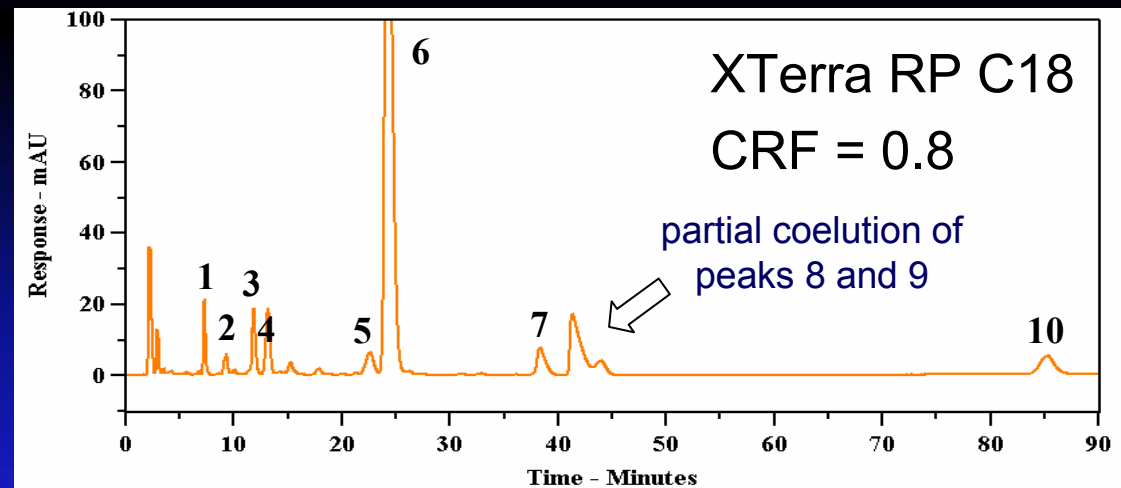
*erythromycine*



# Andere scheidingen

Kolommen met CRF > 0.80:

*erythromycine*

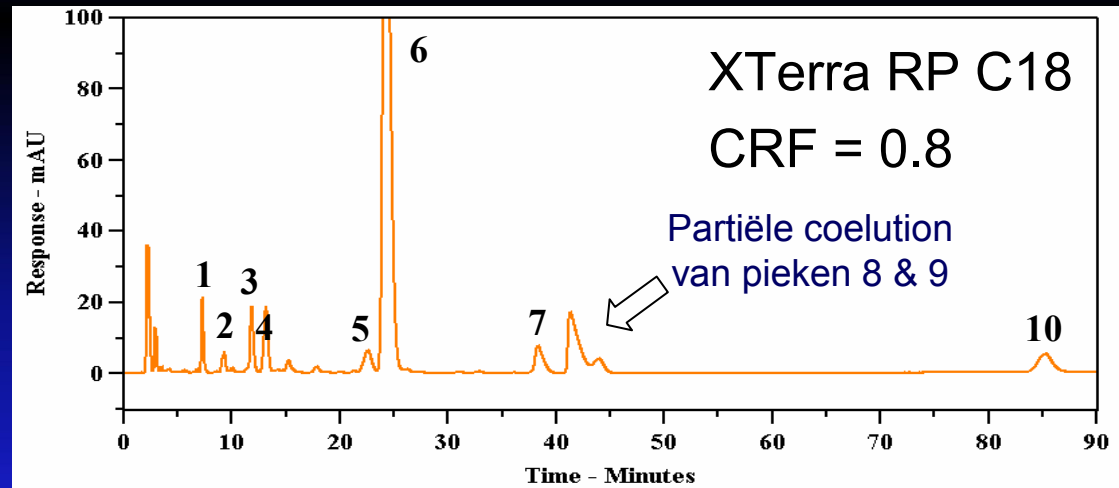


# Andere scheidingen

Kolommen met CRF > 0.80:

*erythromycine*

$F < 2$	23/40
$2 < F < 6$	5/16
$F > 6$	0/9

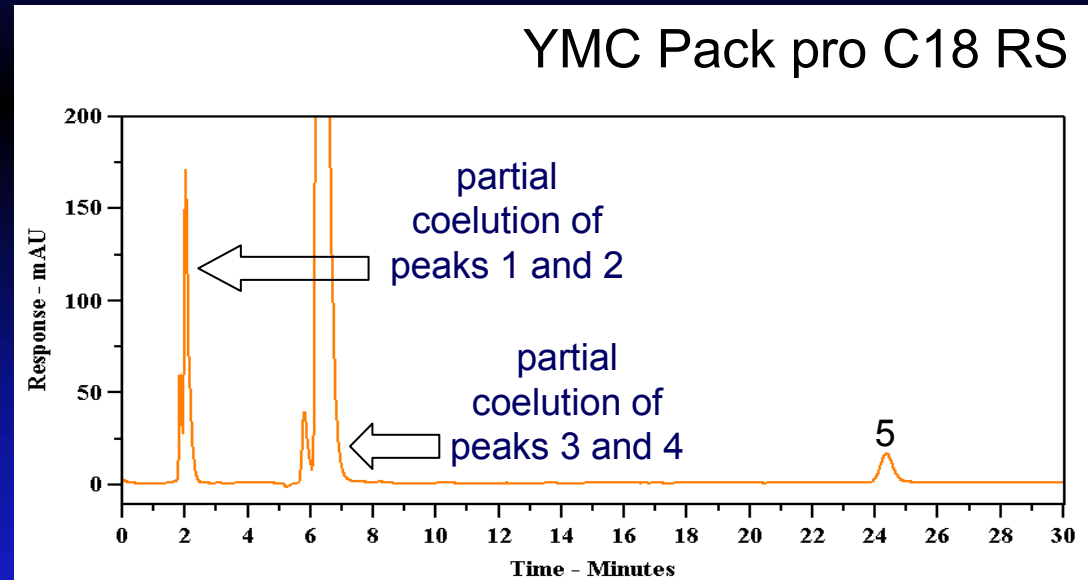


# Andere scheidingen

Kolommen met CRF > 0.80:

*erythromycine*  
*fluoxetine*

F < 2	23/40	37/41
2 < F < 6	5/16	7/14
F > 6	0/9	5/10





# Evolutie F-waarde

---

$$F = (k'_{\text{amylbenzeen, ref}} - k'_{\text{amylbenzeen, i}})^2 +$$
$$(rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, ref}} - rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, i}})^2 +$$
$$(k'_{\text{2,2'-dipyridyl, ref}} - k'_{\text{2,2'-dipyridyl, i}})^2 +$$
$$(rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, ref}} - rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, i}})^2$$

# Evolutie F-waarde

---

$$F = (k'_{\text{amylbenzeen, ref}} - k'_{\text{amylbenzeen, i}})^2 + (rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, ref}} - rk'_{\text{benzylamine/fenol pH 2.7, i}})^2 + (k'_{\text{2,2'-dipyridyl, ref}} - k'_{\text{2,2'-dipyridyl, i}})^2 + (rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, ref}} - rk'_{\text{trifenyleen/o-terfenyl, i}})^2$$

## F-waarden

---

intra-batch deviatie	elk < 0.6
inter-batch deviatie	elk < 1.8, 80 % < 0.7
na bewaring ( $\pm$ 18 maand)	elk < 0.6
na analyses (4 scheidingen)	elk < 3.4, 98 % < 1.0

# Blik op de toekomst

---

- testen op andere reële scheidingen

# Blik op de toekomst

---

- testen op andere reële scheidingen
- incorporeren van speciale C18 en andere (bv. C8) kolommen

# Blik op de toekomst

---

- testen op andere reële scheidingen
- incorporeren van speciale C18 en andere (bv. C8) kolommen
- voorstel aan farmacopees om de 4 kolomparameters in hun monografieën op te nemen

# Blik op de toekomst

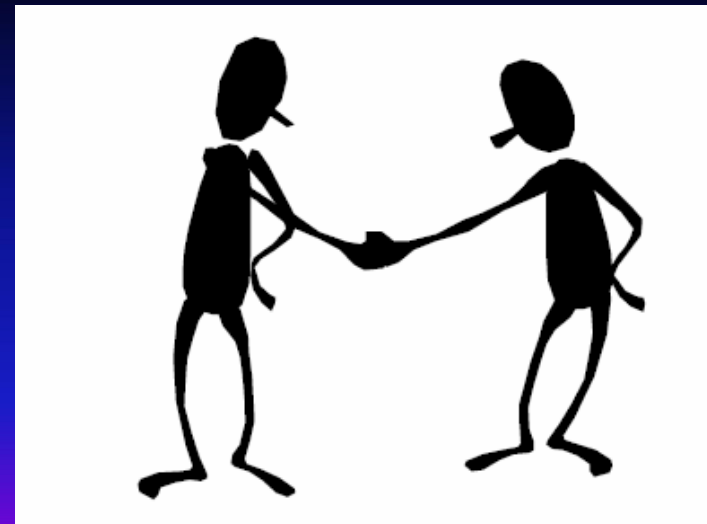
---

- testen op andere reële scheidingen
- incorporeren van speciale C18 en andere (bv. C8) kolommen
- voorstel aan farmacopees om de 4 kolomparameters in hun monografieën op te nemen
- voorstel aan kolomfabrikanten om de 4 kolomparameters in hun catalogi op te nemen

# Dank aan...

---

- Alle kolomfabrikanten die kolommen ter beschikking hebben gesteld
- E. Lilly en de Ph. Eur. voor de donatie van referentiestoffen
- KULeuven (P. Dehouck, D. Visky, Zs. Kovács, A. Kerner, T. Nemeth, E. Farkas, F. Asselman, S. Huang, G. Van den Bergh, E. Roets, E. Adams, J. Hoogmartens)
- V.U.B (Y. Vander Heyden, T. Ivanyi, D.L. Massart)
- WIV (P. Baten, J. De Beer)
- Semmelweis University, Hongarije (K. Kóczyán, B. Noszál)



[www.pharm.kuleuven.be/pharmchem/columnclassification](http://www.pharm.kuleuven.be/pharmchem/columnclassification)

Pharmeuropa 14.2 (2002) 288-297  
J. Chromatogr. A, 977 (2002) 39-58  
J. Chromatogr. A, 1012 (2003) 11-29  
LC-GC Europe, 16 (2003) 764-771  
J. Chromatogr. A, 1025 (2004) 189-200  
LC-GC Europe, 17 (2004) 592-598  
J. Chromatogr. A, 1101 (2006) 103-114  
Talanta, (2006) in press  
JPBA, (2006) in press  
LC-GC Europe, (2006) in press