岛津 SHIMADZU
Excellence in Science

LabSolutions MD 用于阿托伐他汀钙有关物质测定的分析方法开发

LCMS-051

摘要： 本实验使用岛津方法开发系统结合 LabSolutions MD 对阿托伐他汀钙有关物质的测定进行了方法开发，展示了 LabSolutions MD 软件的在 HPLC 方法开发中自动和智能化的功能与特点。LabSolutions MD 软件是基于 AQbD 理念的方法开发软件，可根据实验设计（DoE）分析样品，并构建设计空间，开发出稳健可靠的分析方法。

关键词： LabSolutions MD　阿托伐他汀钙　方法开发

技术特点：

- 使用 LabSolutions MD 开发出阿托伐他汀钙有关物质的稳健可靠分析方法。
- 与现行《中国药典》阿托伐他汀钙片检查项下有关物质测定方法相比，液相质谱溶剂兼容性更高，分析时间也大大缩短。

阿托伐他汀钙片为高胆固醇血症和冠心病药物，能有效降低非致死性心肌梗死的风险，降低致死性和非致死性卒中的风险、降低血管重建术的风险，降低因充血性心力衰竭而住院的风险，降低心绞痛的风险。

现行《中国药典》中阿托伐他汀钙片检查项下有关物质有检定要求，其中杂质 I（去氟阿托伐他汀钙）、杂质 II（阿托伐他汀钙非对映异构体）、杂质 III（二氟阿托伐他汀钙）和阿托伐他汀钙的结构相近，色谱保留行为类似，因此本文使用 LabSolutions MD 软件结合方法开发系统，对其进行方法开发。Labsolutions MD 软件可帮助分析工作者“轻松高效”“科学系统”的实现稳健的分析方法开发，包括根据实验设计分析样品，利用分析结果构建设计空间，以及在确定最佳分析条件后评估其稳健性。使用 Labsolutions MD 开发软件，即使缺乏经验的分析人员也同样能够得到稳健的分析方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津高效液相色谱仪，具体配置为：

系统控制器	CBM-40	输液泵	LC-40D XS ×2
脱气机	DGU-403	自动进样器	SIL-40C XS
柱温箱	CTO-40C	检测器	SPD-M40
质谱检测器	LCMS-2050	色谱工作站	Labsolutions Ver.5.118 Labsolutions MD Ver.2.01

1.2 混合对照品溶液的配制

实验设计溶液制备：取阿托伐他汀钙与杂质I对照品、杂质 II 对照品、杂质III对照品各约 2.5 mg，置 50 mL 量瓶中，加二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度，摇匀。

系统适用性溶液制备：参照中国药典阿托伐他汀钙检查项下有关物质测定法，取阿托伐他汀钙与杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI、杂质 VII 对照品各约 2.5mg，置 50 mL 量瓶中，加二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀。

结果与讨论

2.1 实验设计

从色谱分离原理看，影响分离要素关键因素包含固定相类型、流动相类型、以及洗脱条件。为更加全面的研究阿托伐他汀钙有关物质的保留行为，本例在已经确定了色谱柱及流动相种类的基础上进行了后续细致研究，考察了流动相初始变化、柱温箱温度以及流速大小对阿托伐他汀钙与有关物质的分离的影响，阿托伐他汀钙有关物质的 HPLC 实验设计如表 1 所示，共 27（3 x 3 x 3）种方案。只需单击选择要考察的实验因子，LabSolutions MD 软件即可自动创建批处理表格，大大减少了手动创建时间，提高分析效率。

表 1　实验设计表

液相条件			
流动相：			
A 相	20 mM 乙酸铵溶液（冰醋酸调节 pH 值至 4.4）		
B 相	乙腈		
色谱柱	Shim-pack GIST-HP AQ（100 mm × 2.1 mm I.D.，1.9 μm）， P/N：227-30807-02，岛津（上海）实验器材有限公司		
分析条件：			
B 相起始浓度	35，40，45%（3 水平）	B 相终止浓度	95%
流速	0.3，0.4，0.5 mL/min（3 水平）	进样量	1 μL
柱温	30，40，50℃（3 水平）	检测波长	PDA（254 nm）
洗脱方式	梯度洗脱，时间程序如下， B conc 40%（0-15 min）~ 95%（18-21 min）~ 40%（21.1-26 min）		
质谱条件			
离子化模式	DUIS（±）	脱溶剂温度	500℃
雾化气流速	3 L/min	DL 温度	250℃
加热气流速	7 L/min	扫描模式	SCAN（m/z 100-800）
干燥气流速	5 L/min		

2.2 色谱峰追踪功能

LabSolutions MD 具有针对不同数据的化合物精准识别、高效追踪的峰追踪功能，大大减少手动识别的繁琐程度，进而实现设计空间的精确构建。LabSolutions MD 自动峰追踪功能支持多种专属性追踪方式，如峰洗脱顺序、UV 光谱、MS 质谱相似度、峰面积及峰面积百分比、峰高度及峰高度百分比等，大大提高工作效率。本实验采用峰洗脱顺序、MS 质谱相似度对色谱峰进行追踪，结果如图 1 所示。

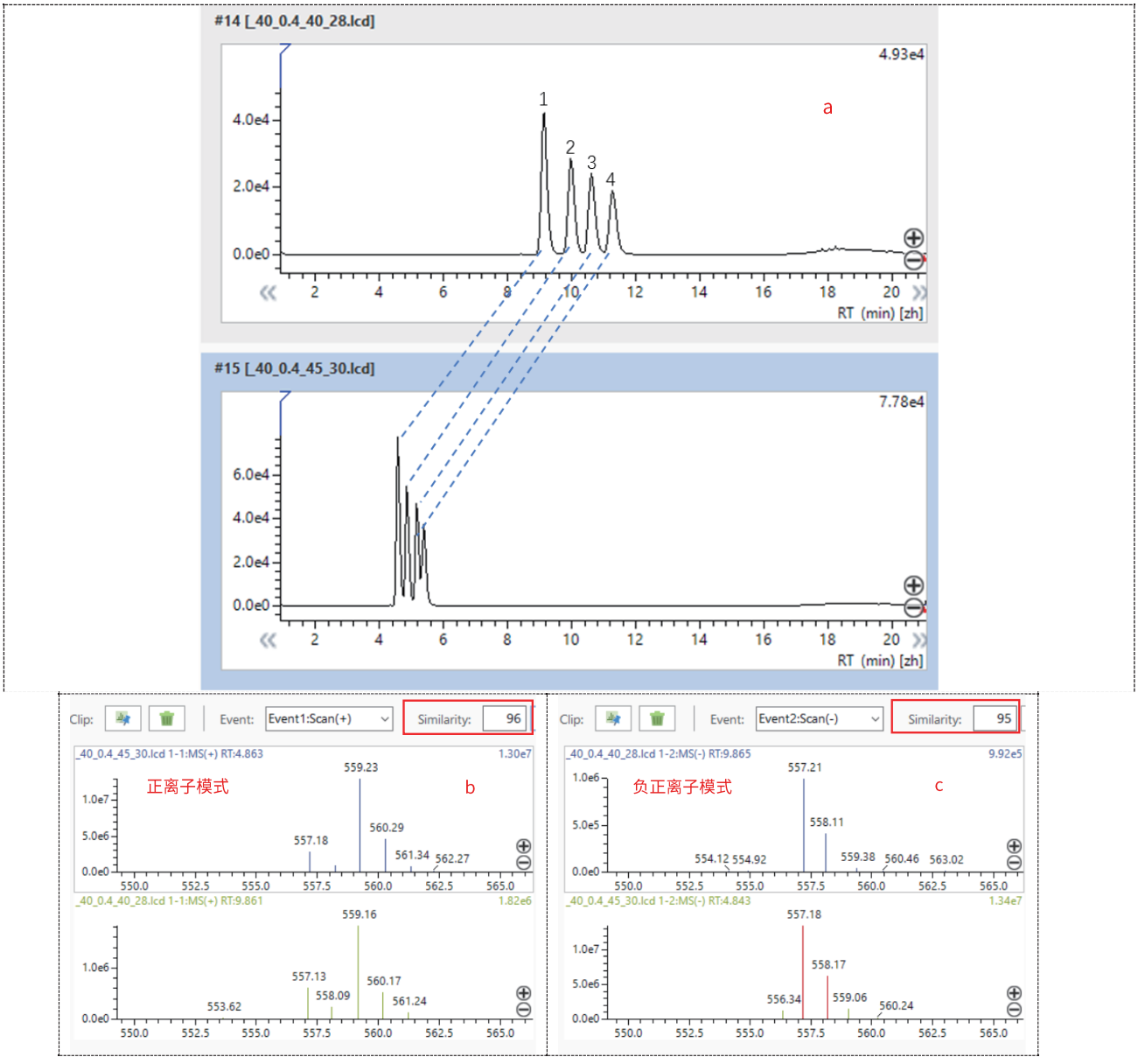


图 1　峰追踪功能（1 杂质 I、2 杂质 II、3 阿托伐他汀钙、4 杂质 III）
UV 峰追踪色谱图 (a)；阿托伐他汀正离子模式比较质谱图 (b)；阿托伐他汀负离子模式比较质谱图 (c)

2.3 设计空间——分析条件可视化

基于峰追踪的结果，使用 LabSolutions MD 软件的根据已识别化合物的保留时间回归功能［Regression using Identified RT］对分析条件和分离关系进行评价，从而创建设计空间。创建得到的模型热力图如图 2 所示，其可以同时研究流速、柱温及 B 相起始浓度对色谱峰分离度的影响，将分析条件可视化，因此可以比较直观的确认阿托伐他汀钙分离良好的分析条件。

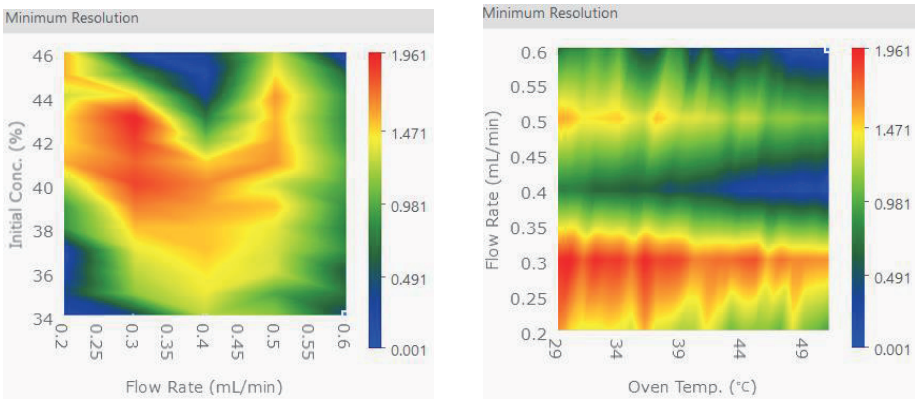


图 2　最小分离度的设计空间

（左：B 起始浓度与流速的最小分离度设计空间；右：流速与柱温的最小分离度设计空间）

2.4 计算最佳分析条件

LabSolutions MD 软件可以根据绘制的设计空间来预测出最佳的分析条件。图 3 蓝色正方形为 LabSolutions MD 给出最佳分析参数，根据 LabSolutions MD 给出的最佳分析参数上机分析，色谱图如图 4 所示，各峰分离度均大于 1.5，结果参见表 2。

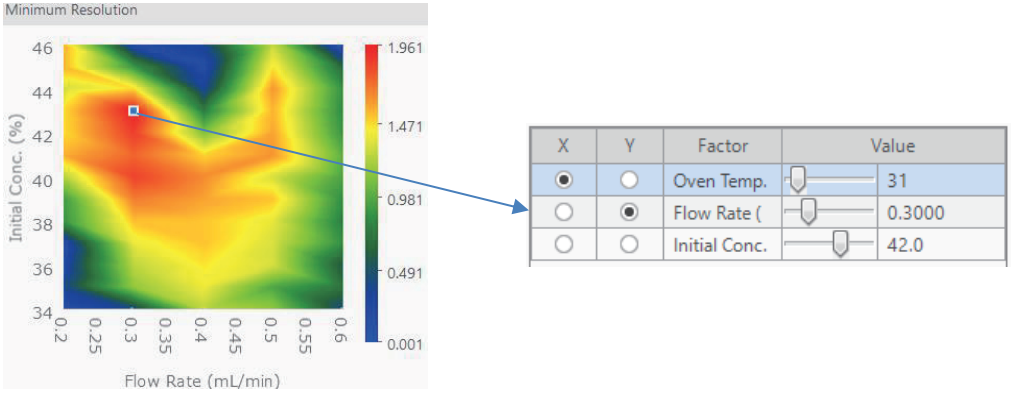
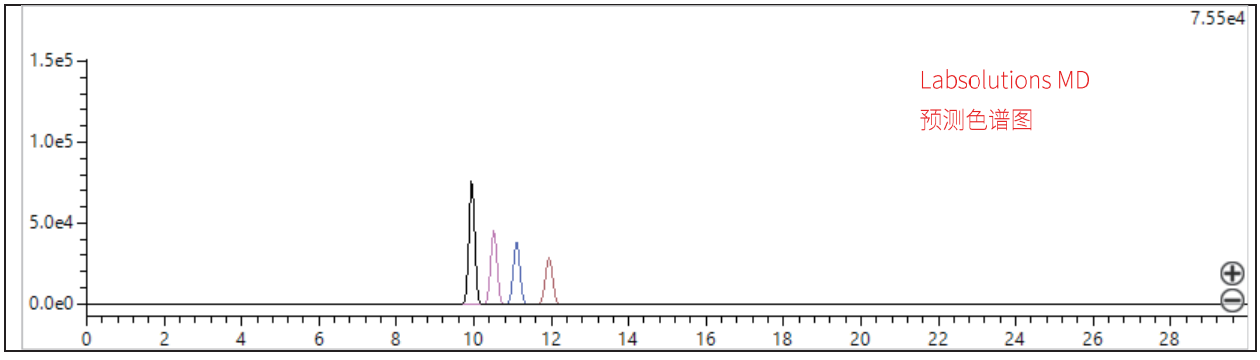


图 3　最佳分析参数



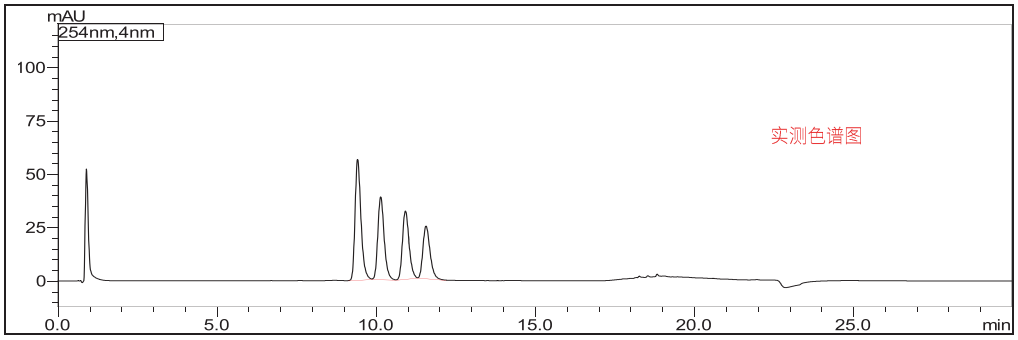


图 4　最佳分析条件的色谱图

表 2　最佳条件实测色谱图各峰分离度结果

化合物名称	杂质 I	杂质 II	阿托伐他汀钙	杂质 III
分离度	-	2.032	2.059	1.627

2.5 耐用性考察

使用 LabSolutions MD 软件进行耐用性考察，在软件中输入分析条件波动的允许范围，软件自动根据序贯设计创建批处理表，进行耐用性评估。在本例中，流速波动 0.1 mL/min、起始比例波动 1%、柱温波动 1℃，来验证对分离的影响。各响应因子的方差分析如图 5 所示，通过方差分析，柱温的 p Value 均大于 0.05，而起始浓度、流速的 p Value 均小于 0.05，说明在一定范围内各化合物的分离度与柱温的关联性较小，但起始浓度和流速对整个分离相对影响程度更大，在后续方法转移及稳定性测试的时候要严格控制。

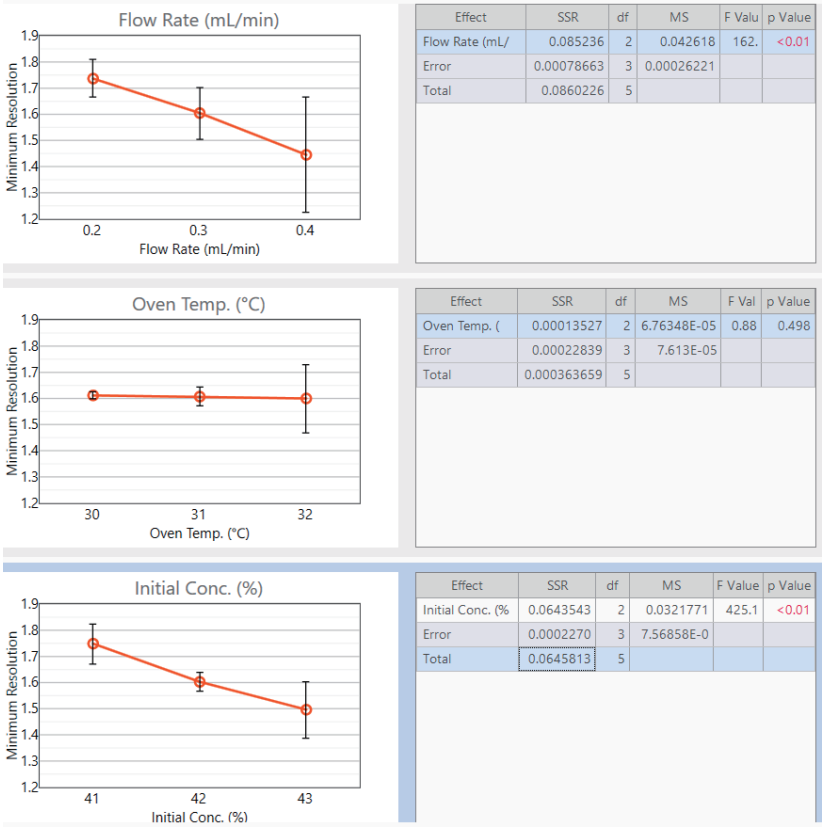


图 5　方差分析结果

2.6 阿托伐他汀钙有关物质确证

《中国药典》阿托伐他汀钙检查项下有关物质测定法共检测七种杂质，其中杂质 I、杂质 II、杂质 III 和阿托伐他汀钙的结构相近，色谱保留行为类似，实现完全分离存在挑战；而杂质 VII 极性强、反相色谱保留小，杂质 VI 和杂质 V 极性较弱，反相色谱保留强。相对而言实现杂质 VII、杂质 VI 和杂质 V 的基线分离，难度较小。因此本实验初期以四种难分离的化合物（杂质 I、杂质 II、杂质 III 和阿托伐他汀钙）建模，实现方法开发的效率最大化。为研究的充分性及方法的普适性，将《药典》中剩余四种杂质加入，验证新建方法的适用性。

按照 2.4 预测的分析条件测定系统适用性溶液，色谱图如图 6 所示。结果表明，系统适用性溶液色谱图中，出峰顺序为杂质 VII、杂质 I、杂质 II、阿托伐他汀钙、杂质 III、杂质 IV、杂质 VI、杂质 V，阿托伐他汀钙与杂质 II 之间的分离度为 2.068，以上符合系统适用性要求（《药典》项下有关物质系统适用性要求阿托伐他汀钙与杂质 II 之间的分离度应不小于 1.5），可用于阿托伐他汀钙有关物质的测定。与《药典》阿托伐他汀钙片检查项下有关物质测定方法相比，该方法流动相未使用 THF，液相及质谱溶剂兼容性更高，且分析时间与《药典》中的 130 min 相比，仅为 25 min，大大提高分析效率。

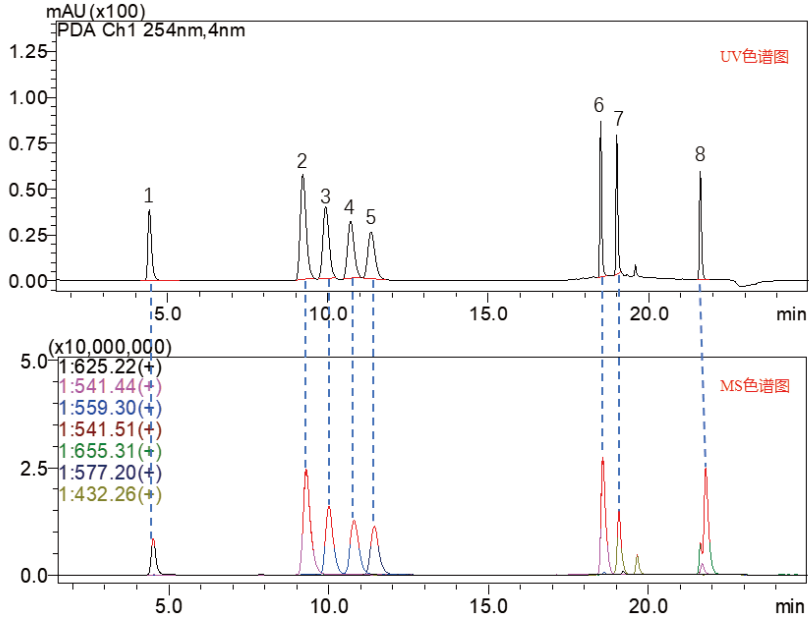


图 6　系统适用性溶液色谱图

（1 杂质 VII、2 杂质 I、3 杂质 II、4 阿托伐他汀钙、5 杂质 III、6 杂质 IV、7 杂质 VI、8 杂质 V）

结论

本文使用岛津 HPLC 方法开发系统结合 LabSolutions MD 对阿托伐他汀有关物质测定进行了方法开发。在 LabSolutions MD 软件的使用了峰追踪、设计空间构建、方差分析等功能，获得了最佳分析条件。与 2020 版《中国药典》阿托伐他汀钙片检查项下有关物质测定方法相比，液相质谱溶剂兼容性更高，分析时间也大大缩短。Labsolutions MD 软件为分析方法开发的工作流程提供支持，确保方法稳定、数据可靠。

岛津应用云

岛津企业管理（中国）有限公司 –分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center

Email: dr_jin@shimadzu.com.cn　Tel: 86(21)34193983　http://www.shimadzu.com.cn