

质谱引导型制备液相用于药物中多组分鉴别及分离

LCMS-041

摘要：本文建立了一种使用岛津质谱引导型高效液相制备色谱用于药物中多组分的制备分离的方法。以分离制备阿托伐他汀钙片中的有关物质为例，采用反向液相色谱，分别以紫外，质谱以及紫外和质谱同时触发馏分收集，详细说明了不同触发方式的参数设置以及 LH-40 的制备模拟功能，使用不同的触发方式都可以对目标组分进行准确的收集。多种触发收集模式，满足不同性质的化合物制备需求。

关键词：LH-40 质谱 制备分离 阿托伐他汀钙

技术特点：

- ❖ 详细说明了 LH-40 馏分收集的参数设置。
- ❖ 分别演示了各种触发馏分收集方式，均能实现准确收集。

色谱是根据混合物中各组分的化学特性差异对其进行分离的一种分离方法。制备型色谱则是指利用色谱方法分离出一定量达到足够纯度的化合物用于后续实验或处理的过程。按样品的分离目的和规模可以分为分析型、半制备型和制备型。

紫外检测器对于大多化合物有良好的响应，已成为高效液相色谱仪中常用的检测器，同时在制备液相中也被广泛的使用。但是在实际的馏分收集，目标峰紫外信号响应较弱时使用紫外触发制备会显著降低样品的回收率；对于样品中多个色谱峰中目标峰的定

性确认需要花费大量时间；对于无紫外吸收的样品，则无法使用紫外触发馏分收集，以上都是紫外检测器对制备分离应用的制约。质谱检测器的加入可以很好的弥补紫外检测器的短板，可以更快的对多个色谱峰进行定性确认；可以在目标组分没有紫外响应或者响应较弱时使用质谱触发馏分收集，得到的结果更加准确。

本文采用岛津新型液体处理器 LH-40 作为进样器和馏分收集器，同时采集紫外和质谱两路信号，提供紫外和质谱两种检测模式的多种触发馏分收集方式，为相关仪器提供一种高效、灵敏、可靠的液相制备分离手段。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验中仪器具体配置为：

系 统 控 制 器：	SCL-40	检 测 器：	SPD-40
输 液 泵：	LC-40D XS	质 谱 仪：	LCMS-2020
柱 温 箱：	CTO-40C	色 谱 工 作 站：	LabSolutions Ver. 5.114
进样器和馏分收集器：	LH-40		

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱：	InertSustain™ C18 200 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm		
输 液 泵：	A 相 - 20 mmol/L 乙酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸)，B 相 - 乙腈		
流 速：	1.0 mL/min	柱 温：	40°C
进样体积：	20 μL	检测波长：	254 nm
洗脱方式：	梯度洗脱，初始浓度为 B 相 45%，洗脱程序见表 1		

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	45
25.00	Pumps	Pump B Conc.	50
30.00	Pumps	Pump B Conc.	95
37.00	Pumps	Pump B Conc.	95
37.10	Pumps	Pump B Conc.	45
45.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI+/-	接口温度：350°C
雾化气流速：1.5 L/min	DL 温度：250°C
加热块温度：400°C	干燥气流量：15 L/min
Scan 参数：SCAN (m/z 350 ~ 800)	质谱监测类型：质量数色谱图 (MC)

1.3 样品前处理

样品溶液配制：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 2.5 mg，置 50 mL 量瓶中，加二甲基甲酰胺稀释至刻度，摇匀。

■ 结果讨论

2.1 分离条件探索

将上述样品溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，色谱图如图 1 所示。阿托伐他汀钙及部分杂质的色谱峰信息见表 2。

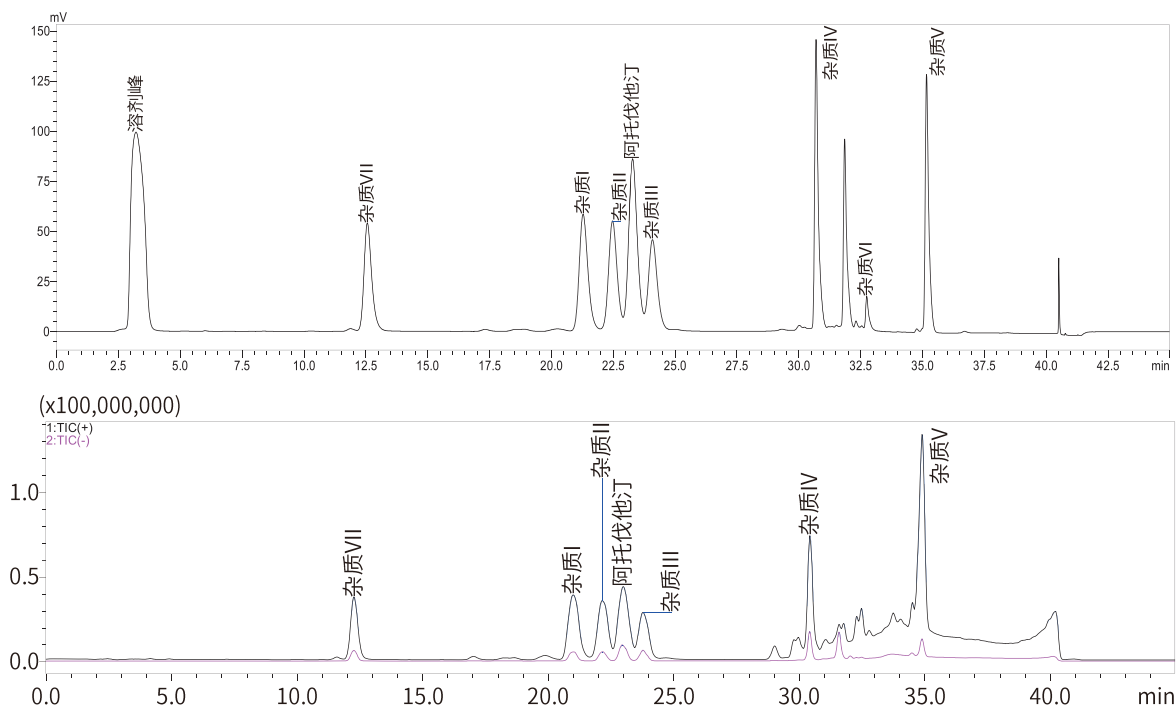


图 1 样品 UV 色谱图和离子流色谱图

表 2 色谱峰信息表

No.	名称	保留时间	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	杂质 VII	12.3	718.30	716.25
2	杂质 I	21.0	541.45	539.25
3	杂质 II	22.1	559.60	557.15
4	阿托伐他汀	23.0	559.40	557.25
5	杂质 III	23.8	577.30	575.20
6	杂质 IV	30.4	541.40	539.20
7	杂质 VI	32.8	432.05	430.05
8	杂质 V	34.9	655.50	653.25

2.2 馏分收集

2.2.1 馏分收集的参数设置流程如下：

步骤 1. 选择合适的触发馏分收集的方式，若需要使用 MS 触发收集，需要在“模拟输出”项下选择 MS 对应的通道，以及需要监控的质量数。

仪器参数视图 常规 | 高级 结束时间：45.00 min

MS 接口 模拟输出 数据采集时间 时间程序 泵 检测器 A 柱温箱 控制器 自动排气 进样器 馏分收集器

使用通道1(1) 编辑通道1(1)

使用通道2(2) 编辑通道2(2)

输出强度最大值(M) 10000000 1计数 = 0.1uV

	输出	分析时间 (min)	类型	m/z(1)	m/z(2)	m/z(3)	m/z(4)
1	<input checked="" type="checkbox"/>	0.000 - 45.000	MC	718.20	577.20	541.20	
2	<input type="checkbox"/>	0.000 - 45.000	TIC				

如下图所示，勾选“启用馏分收集器”，根据触发模式在“制备触发器”的开始和结束选项中选择对应的通道和命令，可根据需要选择：满足单独通道的参数或者同时满足两个通道的参数。

仪器参数视图 常规 | 高级 结束时间：45.00 min

MS 接口 模拟输出 数据采集时间 时间程序 泵 检测器 A

制备参数

启用馏分收集器 (V)

制备时间(c): 45.00 min

制备触发器(T):

开始: Ch2 .

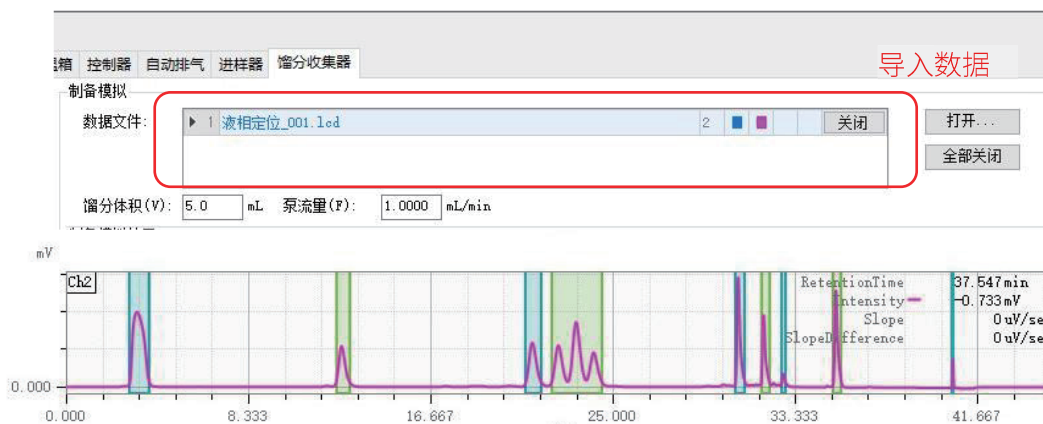
结束: Ch2 .

MS UV 时间程序 其他

步骤 2. 编辑馏分收集开始和结束的命令，如下图所示，可以选择根据色谱峰的级别或者斜率触发馏分收集开始和结束的命令。



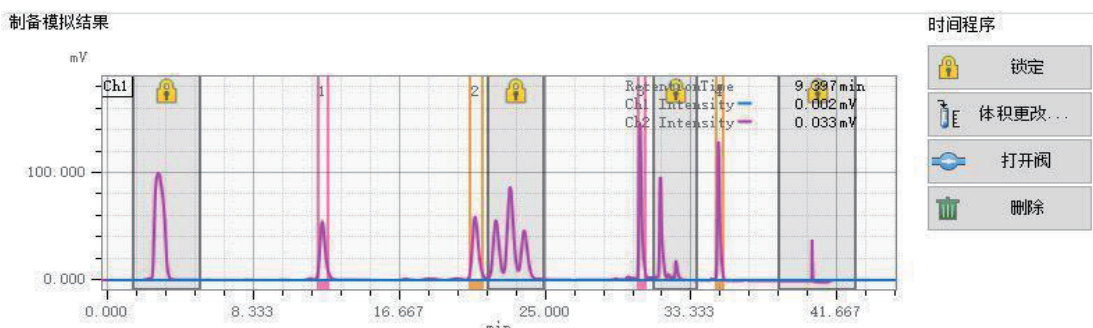
步骤 3. 如下图所示，可将最终确定的液相条件时采集的色谱峰导入，点击步骤 2 示意图中“模拟”按钮，会在制备模拟结果显示当前条件下的收集结果。其中颜色区域是会进行馏分收集的区域。



步骤 4. 可根据需要添加其它条件，以添加锁定区域为例说明。如下图所示，可在时间程序列表中添加处理命令，包括锁定时间段，更改参数值等命令；

时间	处理命令	参数
1	Lock	
2	Unlock	
3	Lock	
4	Unlock	
5	Lock	
6	Unlock	
7	Lock	
8	Unlock	
9		
10		
11		

也可以直接在模拟制备结果右侧的时间程序中添加命令，添加后点击步骤 2 示意图中“应用”按钮，即可自动生成时间程序列表。



设置完所有的参数后，点击步骤 2 示意图中“模拟”按钮，在制备模拟结果中显示的就是所有命令下的模拟收集结果。

2.2.2 UV 触发馏分收集

选择 Ch2，使用 UV 触发馏分收集，“制备触发器”的开始和结束均选择 Ch2。按照级别进行收集，级别参数设置为 7000 μV ，添加了 4 个锁定的时间段，此处锁定对该时间段内色谱峰不进行收集，模拟收集结果如步骤 4 中所示。按照上述馏分收集参数进行馏分收集，结果如图 2 所示。实际的馏分收集结果与模拟馏分收集结果一致。

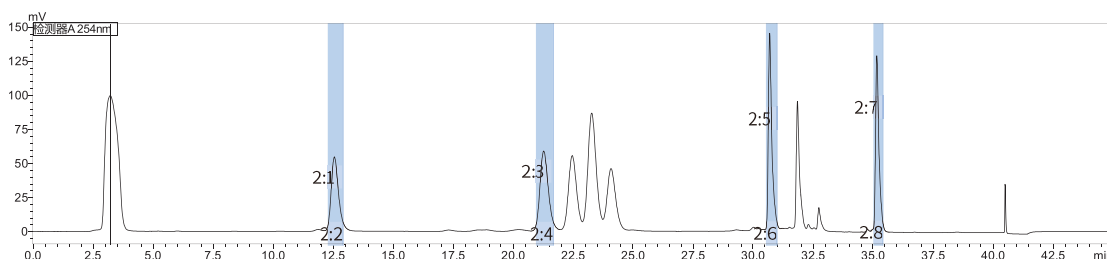


图 2 UV 触发馏分收集结果

2.2.3 MS 触发馏分收集

选择 Ch1，使用 MS 触发馏分收集，选择 MS 模拟信号输出 m/z 分别为 718.20、577.20 和 541.20。“制备触发器”的开始和结束均选择 Ch1。按照级别进行收集，级别参数设置为 50000 μV ，添加了 4 个锁定的时间段。

按照上述馏分收集参数进行馏分收集，结果如图 3 所示。杂质 III 的模拟信号满足级别要求，但由于保留时间在锁定区间内，因而未收集该馏分；根据图 4 所示，杂质 V 在的质谱图中也能提取到 m/z 541，因而也对该杂质进行了馏分收集。



图 3 MS 触发馏分收集结果

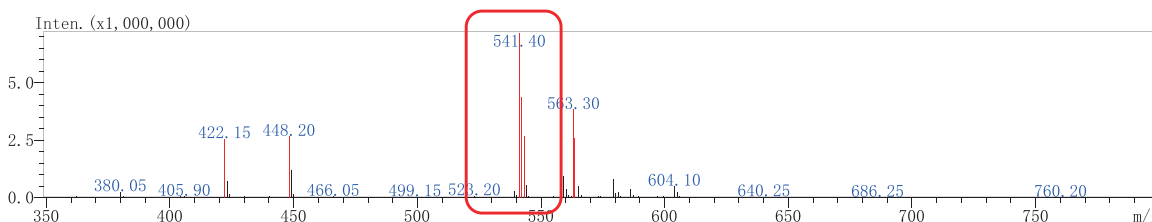


图 4 杂质 V 质谱图

2.2.4 UV 和 MS 共同触发馏分收集

选择 Ch1 和 Ch2，使用 MS 和 UV 联合触发馏分收集，选择 MS 模拟信号输出 m/z 分别为 718.20、577.20 和 655.20。“制备触发器”的开始选择 Ch1 AND Ch2（需要同时满足 MS 和 UV 条件），制备触发器结束选择 Ch1 OR Ch2（MS 和 UV 满足其中一个条件）。按照级别进行收集，Ch1 级别参数设置为 50000 μ V，Ch2 级别参数设置为 7000 μ V。添加了 4 个锁定的时间段。

按照上述馏分收集参数进行馏分收集，结果如图 5 所示。杂质 III 的模拟信号满足级别要求，但由于保留时间在锁定区间内，因而未收集该馏分；其余馏分正常收集。

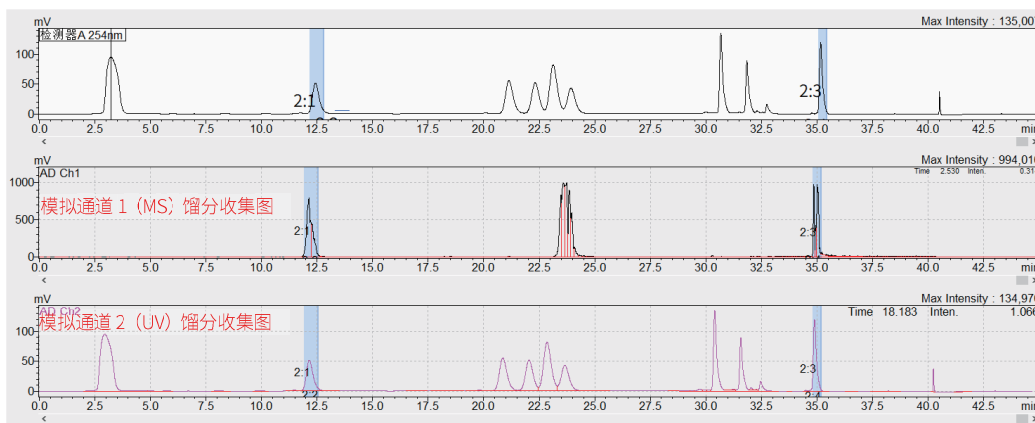


图 5 UV 和 MS 共同触发馏分收集结果

结论

本文采用岛津新型液体处理器 LH-40 作为进样器和馏分收集器，单四极杆质谱 LCMS-2020 作为质谱检测单元，以分离制备阿托伐他汀钙片中的有关物质为例，分别以紫外，质谱以及紫外和质谱同时触发馏分收集，详细说明了不同触发方式的参数设置以及 LH-40 的制备模拟功能，并且对不同参数设定得到的不同结果进行了说明。相对于紫外检测器引导的制备色谱而言，质谱的加入可以很好的弥补紫外检测器不足，两者相辅相成，可以使得收集结果更加的准确、收集方式更加多样化，以适用于不同性质的化合物制备需求。

岛津应用云

