

# 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统定性检测 阿托伐他汀药物杂质

## LCMS-IT-TOF-037

**摘要:** 本文建立了使用2D-LC-IT-TOF杂质鉴定系统定性检测阿托伐他汀药物中4个已知杂质(阿托伐他汀杂质A、阿托伐他汀杂质F、阿托伐他汀杂质G以及阿托伐他汀杂质H)和1个未知杂质(阿托伐他汀脱氢酸)的方法。该方法使用非挥发性的柠檬酸缓冲盐作为流动相对药物主成分和杂质进行了分离,并通过LCMS-IT-TOF在线对目标杂质进行MS定性分析。该系统由于无需将非挥发性缓冲盐转换为挥发性缓冲盐,因此,可以将药典的方法直接使用,大大节省了方法开发人员的时间,并且保证了杂质定性的准确度。

**关键词:** 阿托伐他汀杂质离子对试剂 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统

目前,根据药典的规定和分离的要求,很多药品都在使用磷酸盐作为缓冲液或离子对试剂。但它们作为非挥发性的盐,不能进入质谱,这在极大程度上影响了质谱作为定性工具在药品杂质鉴定上的使用。在2DLC-IT-TOF使用之前,研究机构和药厂通过方法转换(将磷酸盐转换成挥发性缓冲盐)来实现质谱鉴定,但是这

个费时费力的工程,并且有可能因为保留时间的改变而丢掉一些未知杂质。2DLC-IT-TOF系统克服了这一局面,用户即使使用磷酸盐或离子对试剂,也可以在线使用IT-TOF进行杂质鉴定。本文使用2D-LC-IT-TOF杂质鉴定系统定性检测了阿托伐他汀药物中4个已知杂质和1个未知杂质。供相关人员参考。

### 实验部分

#### 1.1 仪器

分析仪器: 2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统, 包括 LC-20AD×4 (输液泵), SIL-20AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), CBM-20A (系统控制器), DGU-20A<sub>5</sub> (在线脱气机), SPD-M20A (二极管阵列检测器), SPD-20A (UV 检测器), FCV-12AH×3 (高压流路选择阀), FCV-14AH×2 (色谱柱切换阀), LCMS-IT-TOF (离子阱-飞行时间质谱) 和 LCMSsolution Ver.3.60 (工作站)。

#### 1.2 分析条件

##### 1.2.1 液相色谱条件

<LC 1stD>

色谱柱: Shim-pack VP-ODS, 4.6mm I.D.×250mm L., 5μm

流动相 A: 柠檬酸缓冲液 / 乙腈 / 四氢呋喃 = 400/100/100 (v/v), (柠檬酸缓冲液: 10.5 g 柠檬酸单水合物溶于 900 mL 水中, 28 % 的氨水调 pH 值到 5.0, 然后加水定容到 1 L)

流动相 B: 乙腈 / 四氢呋喃 = 1/1 (v/v)

时间程序: 7 %B (0 ~ 40 min) ~ 40 %B (40 ~ 80 min) ~ 7 %B (10.01 ~ 95 min)

流速: 1.3 mL/min

柱温: 40°C

进样体积: 20 μL

检测波长: 190 ~ 350 nm (检测: 254 nm)

<LC 2ndD>

色谱柱: Shim-pack XR-ODS 2.0mm I.D.×50mm, 2.2μm

流动相 A: 0.1 % 甲酸

流动相 B: 乙腈

时间程序: 10 %B (0 min) ~ 90 %B (10 min) ~ 10 %B (10.01 ~ 20 min)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

进样体积: 5 μL (Loop 环体积)

检测波长: 254 nm

##### 1.2.2 质谱条件

分析仪器: LCMS-IT-TOF

离子源: ESI(+), ESI(-)

离子源接口电压: ESI(+), 4.5kV;

ESI(-), -3.5kV;

检测器电压: 1.7 kV

雾化气: 氮气 1.5 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 200°C

加热模块温度: 200°C

质量数范围: m/z 200 ~ 800

多级质谱检测: Auto MS<sup>n</sup>

### 1.3 系统流程图

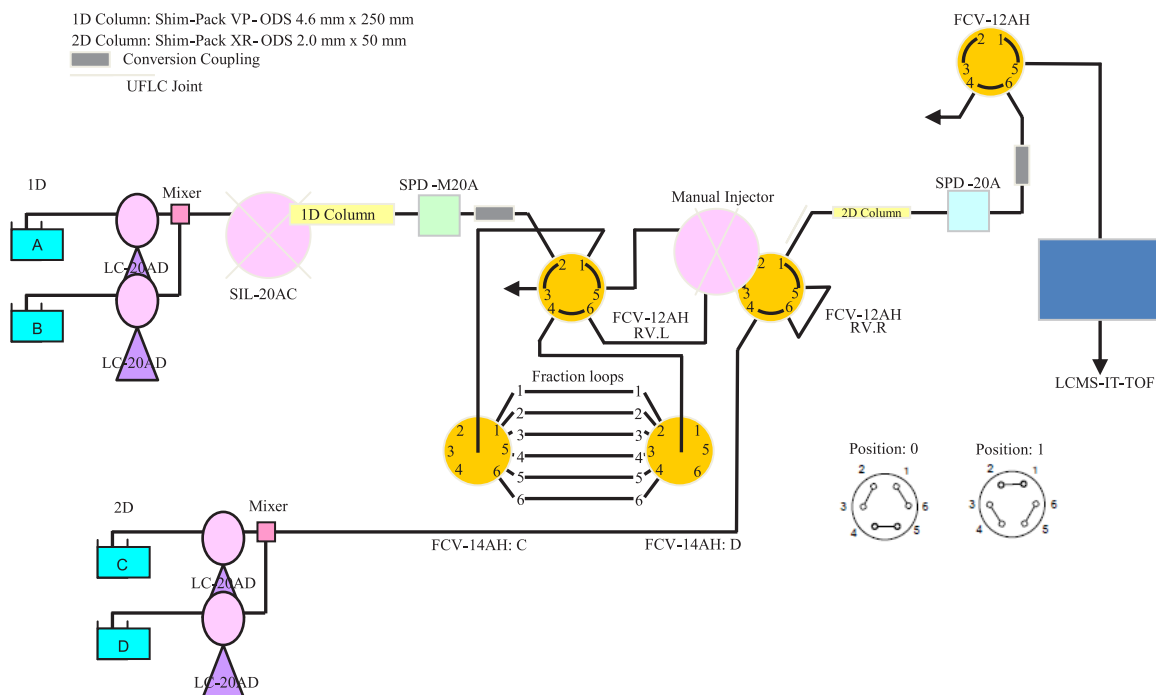
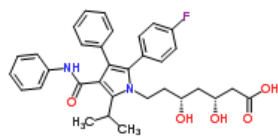
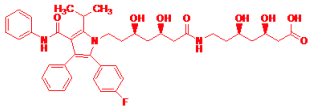
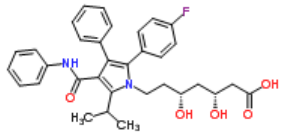
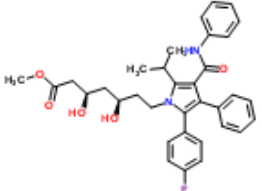
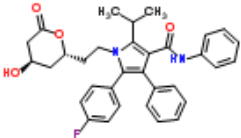


图1 2D-LC-IT-TOF 的系统流程图

### 1.4 样品制备

使用流动相配制阿托伐他汀药物，样品浓度为 1 mg/mL，过滤后进样分析。

本次实验涉及的药物主成分及已知的 4 个杂质的信息如下：

成分	中文名称	英文名称	分子式	分子量	CAS No.	结构式
主成分	阿托伐他汀	Atorvastatin	$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558.64	110862-48-1	
已知杂质 1	阿托伐他汀杂质 F	Atorvastatin Amide Acid	$C_{40}H_{48}FN_3O_8$	717.82	-	
已知杂质 2	阿托伐他汀杂质 A	Atorvastatin Desfluoro impurity	$C_{33}H_{36}FN_2O_5$	540.65	433289-83-9	
已知杂质 3	阿托伐他汀杂质 G	3-O-Methylatorvastatin Lithium Salt	$C_{34}H_{37}FN_2O_5$	572.67	887196-29-4	
已知杂质 4	阿托伐他汀杂质 H	Atorvastatin Lactone	$C_{33}H_{33}FN_2O_4$	540.63	125995-03-1	

## 结果讨论

### 2.1 LC 1stD 分析结果

1stD 分析的主要目的为确定目标杂质的保留时间，以便于捕集到 LOOP 环中，用于二维脱盐分析。本次实验 1stD 色谱图如下，主成分和 5 个杂质的出峰时间分别为：17.361 min，11.454 min，13.762 min，14.436 min，35.705 min 和 42.152 min，其中 R.T = 13.762 min 的杂质为客户关注的未知杂质，其他 4 个为药典中报道的杂质。

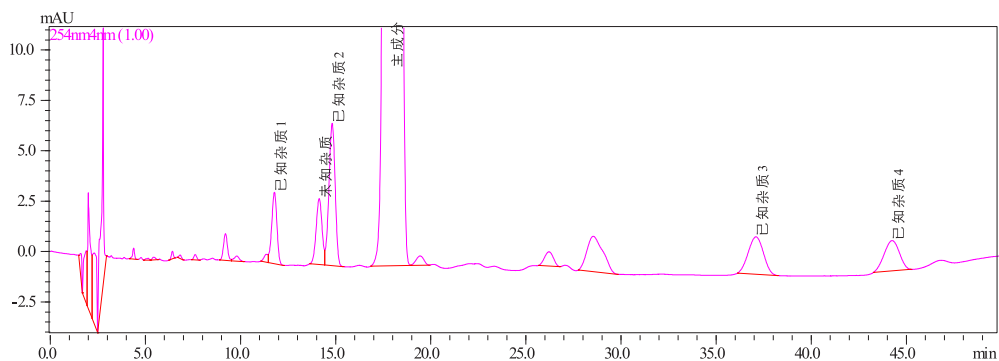
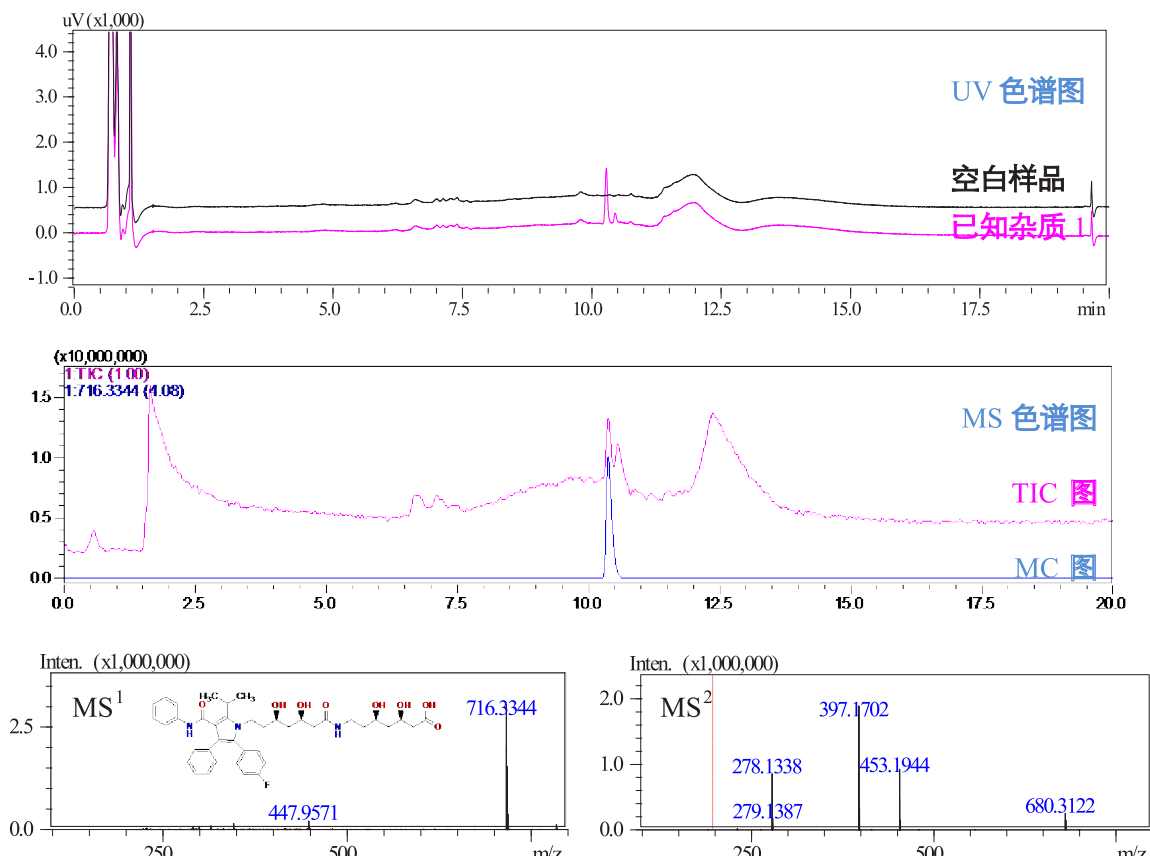


图 2 LC 1stD分析色谱图

### 2.2 LC 2stD 分析结果

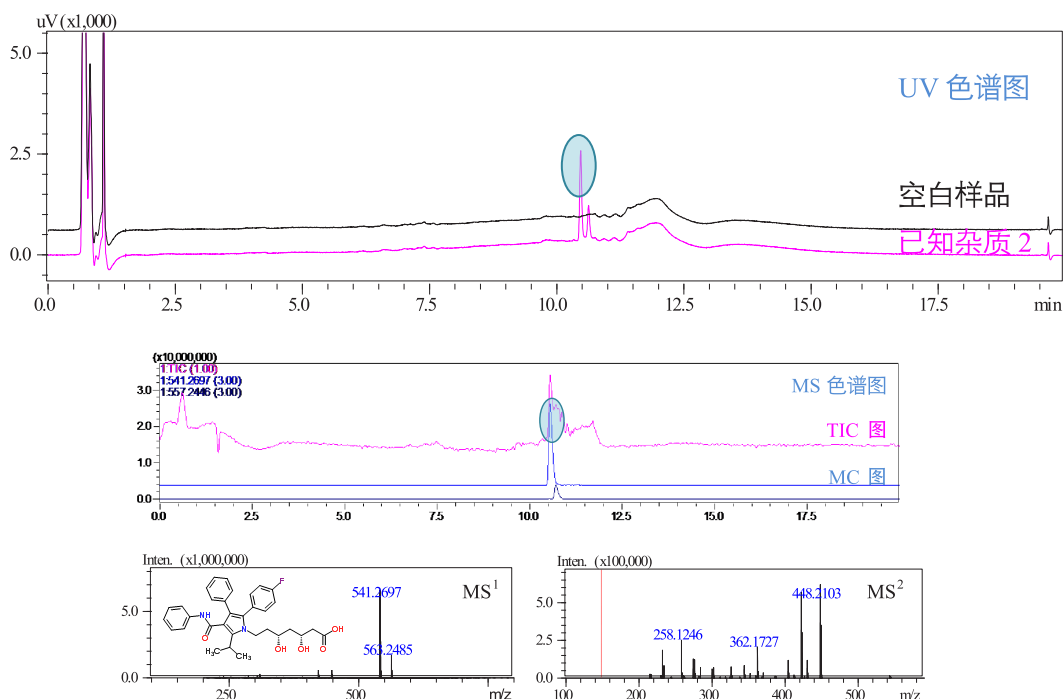
#### 2.2.1 已知杂质 1 的分析结果

已知杂质 1 (R.T. = 11.454 min) 切换到 LOOP 环 1 中，经过 2D LC 分析，得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 1 负离子模式  $m/z = 716.3344$ ，确证为阿托伐他汀杂质 F，分子式为  $C_{40}H_{48}FN_3O_8$ ，理论值  $[M-H]^- = 716.3353$ ，测试值与理论值质量数偏差为  $-1.26\text{ppm}$ 。



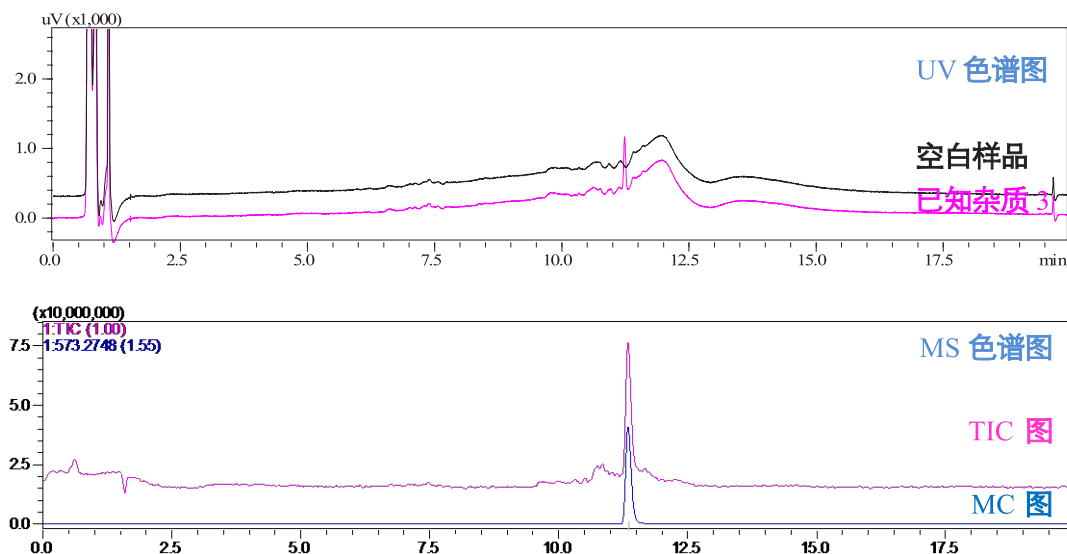
### 2.2.2 已知杂质 2 的分析结果

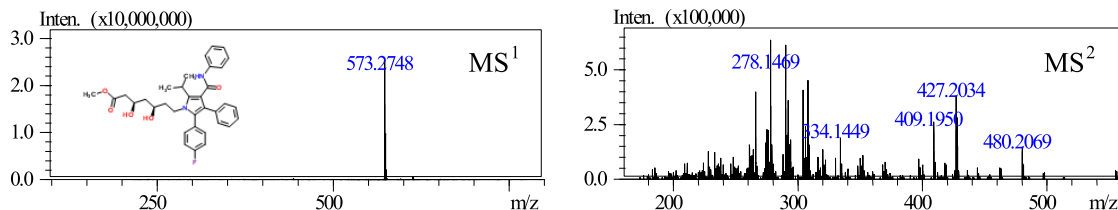
已知杂质 2 ( R.T. = 14.436 min ) 切换到 LOOP 环 3 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 2 存在两个峰, 正离子模式分别为  $m/z=541.2697$  和  $m/z = 557.2446$ , 从 LC 1stD 分析色谱图可以看到已知杂质 2 和未知杂质的保留时间差异不大, 所以, 可能有部分未知杂质切到 LOOP 3 中, 已知杂质 2 为阿托伐他汀杂质 A, 分子式为  $C_{33}H_{36}N_2O_5$ ,  $m/z = 541.2697$ , 理论值  $[M+H]^+ = 541.2697$ , 测试值与理论值质量数偏差为 0.00 ppm。



### 2.2.3 已知杂质 3 的分析结果

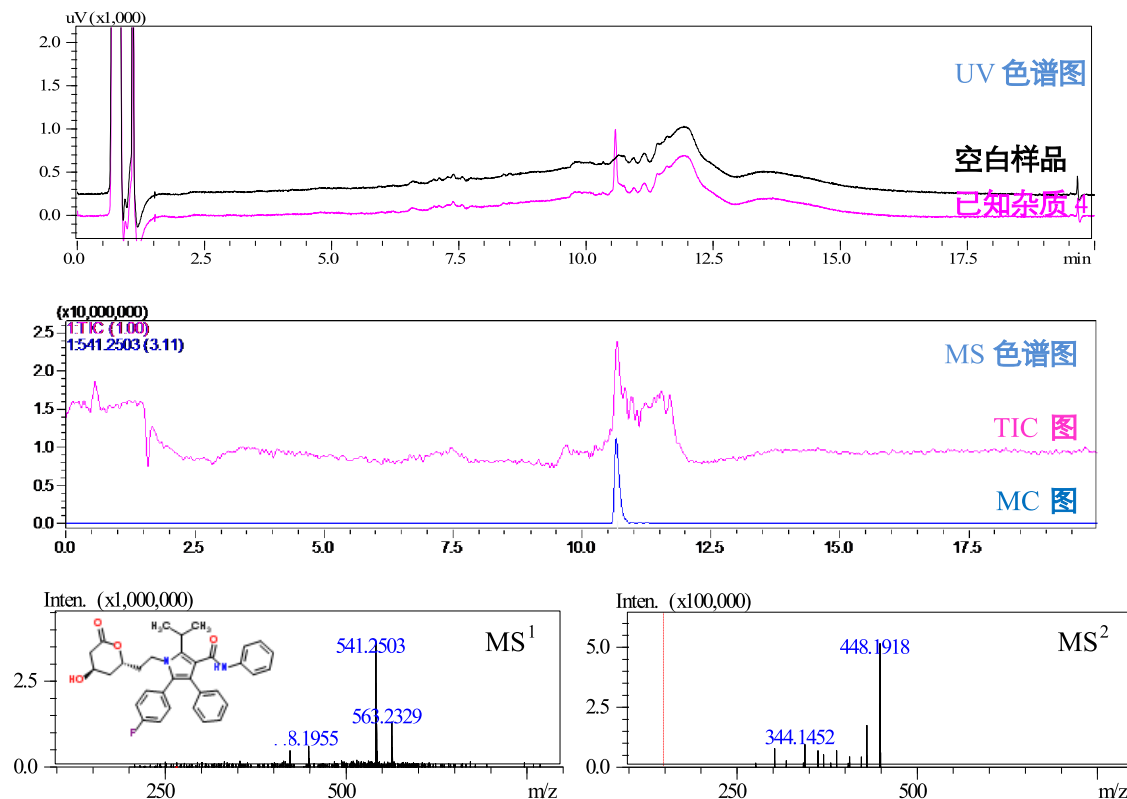
已知杂质 3( R.T. = 35.705 min ) 切换到 LOOP 环 4 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 3 正离子模式  $m/z = 573.2748$ , 为阿托伐他汀杂质 G, 分子式为  $C_{34}H_{37}FN_2O_5$ , 理论值  $[M+H]^+ = 573.2759$ , 测试值与理论值质量数偏差为 -1.92 ppm。





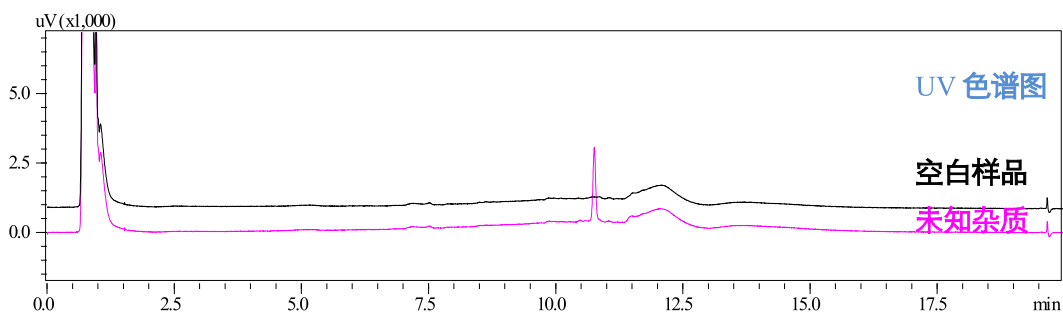
### 2.2.4 已知杂质 4 的分析结果

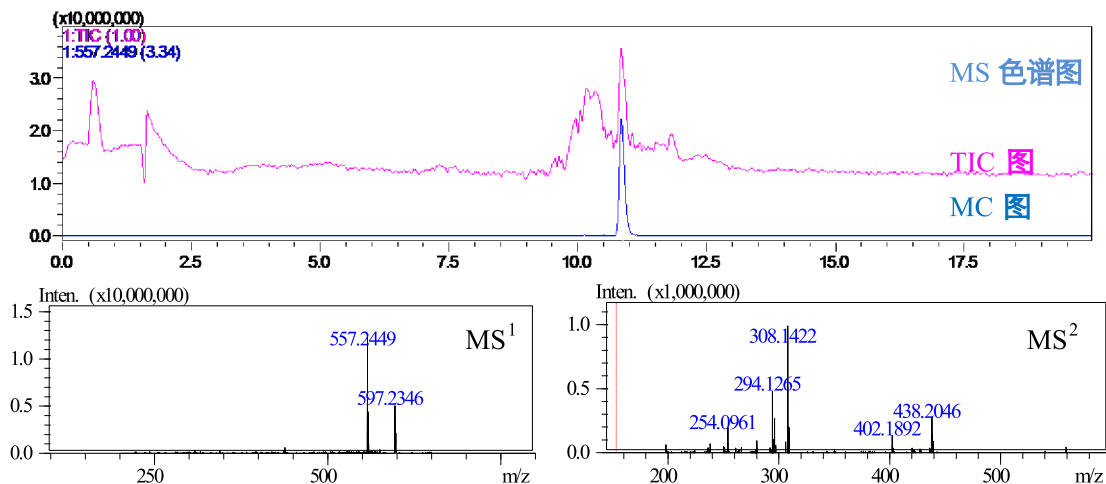
已知杂质 4 (R.T. = 42.152 min) 切换到 LOOP 环 5 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。从 MS 质谱图可以看出已知杂质 4 正离子模式 m/z = 541.2503, 为阿托伐他汀杂质 H, 分子式为 C<sub>33</sub>H<sub>33</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 理论值 [M+H]<sup>+</sup> = 541.2497, 测试值与理论值质量数偏差为 1.11 ppm。



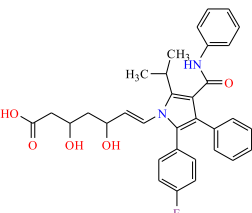
### 2.2.5 未知杂质的分析结果

未知杂质 (R.T. = 13.762 min) 切换到 LOOP 环 2 中, 经过 2D LC 分析, 得到 UV 色谱图、MS 色谱图和质谱图如下。

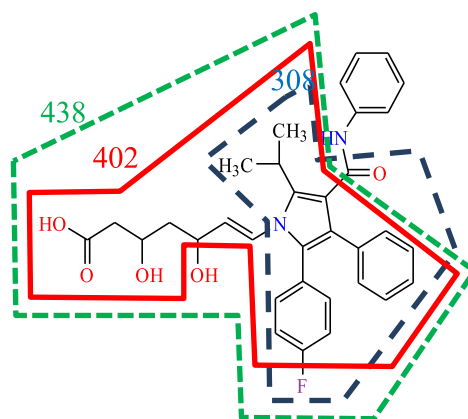




从 MS 质谱图可以看出未知正离子模式  $m/z = 557.2449$ ，相对于主成分阿托伐他汀（分子式  $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ ，正离子模式  $m/z = 559.2603$ ）少了 2 个质量数，可能是脱氢产物。经文献检索，未知杂质可能为阿托伐他汀脱氢酸，分子式为  $C_{33}H_{33}FN_2O_5$ ，详细信息列于下表。

中文名称	英文名称	分子式	结构式	测试值 [M+H] <sup>+</sup>	理论值 [M+H] <sup>+</sup>	质量数偏差 (ppm)
阿托伐他汀 脱氢酸	Atorvastatin Dehydro Acid	$C_{33}H_{33}FN_2O_5$		557.2449	557.2446	0.54

根据 MS<sup>2</sup> 的碎片信息，推测其裂解规律为：



## 结论

本文建立了一种使用非挥发性缓冲液作为流动相，2D-LC-IT-TOF 杂质鉴定系统在线定性检测阿托伐他汀药物中 4 个已知杂质和 1 个未知杂质的方法。该方法由于保留了药典分析所用的流动相，即保证了杂质定性的准确性，又大大节省了方法开发人员的时间。