

双进样液相色谱同时测定阿托伐他汀钙含量及其有关物质

LC-440

摘要： 本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了快速测定阿托伐他汀钙含量及其有关物质的方法。主成分阿托伐他汀钙在 100-2000 mg/L 浓度范围内、7 种有关物质组分在 2.0-100 mg/L 浓度范围内，其线性相关系数均大于 0.999，精确度在 92.6%~114.0% 之间，线性良好；稳定性考察中，8 种组分的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.68~2.56 % 和 0.46~2.81 % 之间，仪器精密度良好；对方法的回收率进行考察，结果显示 8 种化合物的样品加标回收率在 83.4%~106.2% 之间，满足标准测试要求。双进样液相色谱仪可实现阿伐他汀钙含量和有关物质同时分析，分析快速，耗时短。

关键词： 双进样液相色谱仪 阿托伐他汀 有关物质

技术特点：

- ❖ 该系统平行双流路设计可实现主成分与有关物质同时分析，节省分析时间。
- ❖ 保证分离度的同时缩短了分析时间。

心血管疾病是危害人类健康（特别是中老年）最常见、最严重的疾病之一，血脂异常是动脉粥样硬化、冠心病以及其他心脑血管疾病的重要因素。阿托伐他汀钙属 HMG-CoA 还原酶抑制剂，本身无活性，口服吸收后的水解产物在体内竞争性抑制胆固醇合成过程中的限速酶羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶，使胆固醇的合成减少，也使低密度脂蛋白受体合成增加，中度

降低血清三酰甘油水平和增高血高密度脂蛋白水平。

本文参考 ChP 2020 二部 <阿托伐他汀钙> 的检测方法，使用岛津双进样液相色谱仪建立了同时分析阿托伐他汀钙含量及有关物质的液相方法。在原方法的基础上进行了优化，在保证分离度的同时大大缩短了分析时间，可为相关从业人员提供参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津双进样液相色谱仪，具体配置为：

| | | | |
|-------|------------------------------|-------|--------------------------|
| 输液泵 | : LC-40B XR、LC-40D XR (LPGE) | 系统控制器 | : CBM-40 |
| 脱气机 | : DGU-405×2 | 检测器 | : SPD-40、SPD-M40 |
| 自动进样器 | : SIL-40C XR | 色谱工作站 | : LabSolutions Ver. 5.97 |
| 柱温箱 | : CTO-40C | | |

1.2 分析条件

液相色谱条件 1：（第一组：7 种有关物质分析色谱条件）

色谱柱：Shim-pack GIST C18-AQ (250 mm×4.6 mm I.D, 5.0 μm)

岛津（上海）实验器材有限公司，P/N：227-30742-08

流动相：A 相 -1.54g/L 醋酸铵溶液（冰醋酸调节 pH 值至 4.4）：乙腈（70；30）；
B 相 - 乙腈

流速：0.8 mL/min

柱温：35°C

进样体积：10 μL

波长：244 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 16%，时间程序见表 1。

表1 第一组梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|---------|---------|-------|
| 15 | Pump | B.Conc | 16 |
| 50 | Pump | B.Conc | 16 |
| 52 | Pump | B.Conc | 80 |
| 70 | Pump | B.Conc | 80 |
| 70.1 | Pump | B.Conc | 16 |
| 75 | Control | Stop | |

液相色谱条件 2: (第二组: 阿托伐他汀钙含量分析色谱条件)

色 谱 柱 : Shim-pack GIST C18 (250 mm×4.6 mm I.D, 5.0 μm)

岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-300017-08

流 动 相 : A 相 -1.54 g/L 醋酸铵溶液(冰醋酸调节 pH 值至 4.4): 乙腈(70:30);
B 相 - 乙腈

流 速 : 0.8 mL/min

柱 温 : 35°C

进 样 体 积 : 10 μL

波 长 : 244 nm

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 14%, 时间程序见表 2。

表2 第二组梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|---------|---------|-------|
| 15 | Pump | B.Conc | 14 |
| 40 | Pump | B.Conc | 20 |
| 42 | Pump | B.Conc | 80 |
| 60 | Pump | B.Conc | 80 |
| 60.1 | Pump | B.Conc | 14 |
| 65 | Control | Stop | |

1.3 校准品及样品制备

1.3.1 校准曲线制备

第一组: 参照 ChP 2020 二部 < 阿托伐他汀钙 > 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 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 使用二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液; 用二甲基甲酰胺作为稀释剂分别稀释成 2、5、10、20、50、100 mg/L 的标准工作溶液。

第二组: 精密称取阿托伐他汀钙主成分, 用二甲基甲酰胺分别稀释成 50、100、200、500、1000、2000 mg/L 的标准工作溶液。

1.3.2 样品前处理

第一组: 参照 ChP 2020 二部 < 阿托伐他汀钙 > 项下有关物质测定, 取供试品适量, 研细, 取细粉适量, 加适量二甲基甲酰胺, 超声约 5 分钟使阿托伐他汀钙溶解, 并稀释成每 1 mL 中约含阿托伐他汀 2.5 mg 的溶液, 滤过, 取续滤液。(临用新制)。

第二组：参照 ChP 2020 二部 < 阿托伐他汀钙 > 项下含量测定，取供试品适量，研细，取细粉适量，加适量二甲基甲酰胺，超声约 5 分钟使阿托伐他汀钙溶解，并稀释成每 1 mL 中约含阿托伐他汀 0.1 mg 的溶液，滤过，取续滤液。（临用新制）。

1.3.3 回收率溶液

第一组：取供试品适量，精密称定，加适量二甲基甲酰胺，超声约 5 分钟使阿托伐他汀钙溶解，加入适量杂质对照品储备液，并稀释成每 1 mL 中约含阿托伐他汀 2.5 mg 以及杂质对照品 5 mg/L 的溶液，滤过，取续滤液。

第二组：分别取供试品和阿托伐他汀钙对照品各 10 mg，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加适量二甲基甲酰胺，超声约 5 分钟使其溶解，定容至刻度，滤过，取续滤液。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

两个流路的色谱图如下所示，

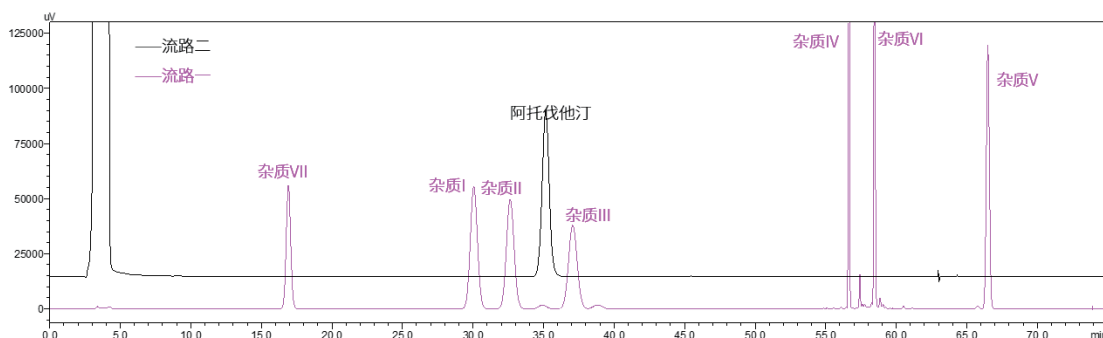
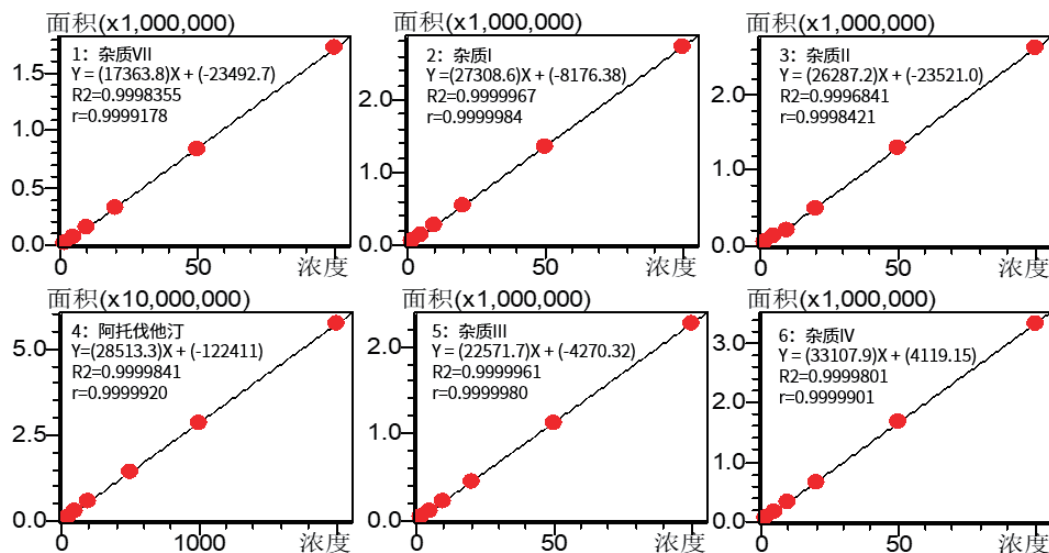


图 1 标准品溶液色谱图 (100 mg/L)

2.2 校准曲线

将不同浓度的标准品溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线，结果如图 2 所示。7 种杂质在 2.0~100.0 mg/L，主成分在 100~2000 mg/L 浓度范围内，均线性关系良好，线性相关系数均大于 0.999，准确度在 92.6~115.9%，具体结果见表 3。



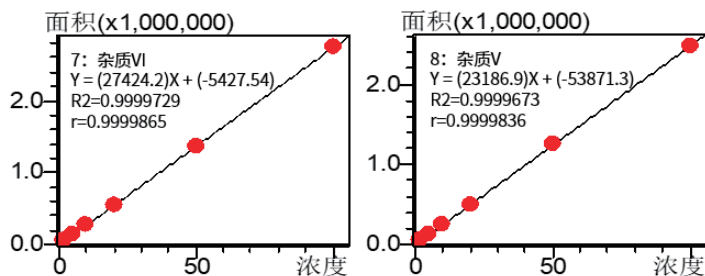


图 2 化合物的校准曲线

表 3 校准曲线结果 (按保留时间排序)

| No. | 化合物名称 | 保留时间 (min) | 线性范围 (mg/L) | 相关系数 r | 准确度 (%) |
|-----|--------|------------|-------------|--------|------------|
| 1 | 杂质 VII | 16.96 | 2-100 | 0.9999 | 97.7~112.0 |
| 2 | 杂质 I | 30.12 | 2-100 | 0.9999 | 99.0~102.1 |
| 3 | 杂质 II | 32.65 | 2-100 | 0.9998 | 95.3~115.9 |
| 4 | 阿托伐他汀 | 35.08 | 50-2000 | 0.9999 | 99.3~100.9 |
| 5 | 杂质 III | 37.04 | 2-100 | 0.9999 | 98.1~100.5 |
| 6 | 杂质 IV | 56.68 | 2-100 | 0.9999 | 93.6~101.0 |
| 7 | 杂质 VI | 58.44 | 2-100 | 0.9999 | 98.8~114.0 |
| 8 | 杂质 V | 66.52 | 2-100 | 0.9999 | 92.6~101.0 |

2.3 精密度实验

取不同浓度的标准品溶液 (第一组 5 mg/L、第二组 100 mg/L) 连续进样 6 次, 用于考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.68~2.56% 和 0.46~2.81% 之间, 仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

| No. | 化合物名称 | RSD% | |
|-----|--------|------|------|
| | | 保留时间 | 峰面积 |
| 1 | 杂质 VII | 1.54 | 1.3 |
| 2 | 杂质 I | 1.23 | 1.39 |
| 3 | 杂质 II | 1.34 | 1.41 |
| 4 | 阿托伐他汀 | 0.68 | 0.46 |
| 5 | 杂质 III | 1.75 | 1.51 |
| 6 | 杂质 IV | 1.43 | 1.59 |
| 7 | 杂质 VI | 2.56 | 2.81 |
| 8 | 杂质 V | 1.63 | 1.61 |

2.4 加标回收率测试

按照 1.3.2 和 1.3.3 中处理方法, 分别配置样品溶液和回收率溶液, 使用 1.2 中分析条件进行分析, 样品及加标回收率结果见表 5。主成分的浓度为 105.16 mg/L; 所有杂质的浓度均小于 2 mg/L (定量限), 主成分阿托伐他汀与 7 种杂质的样品加标回收率在 83.4%~106.2% 之间, 满足标准测试要求。

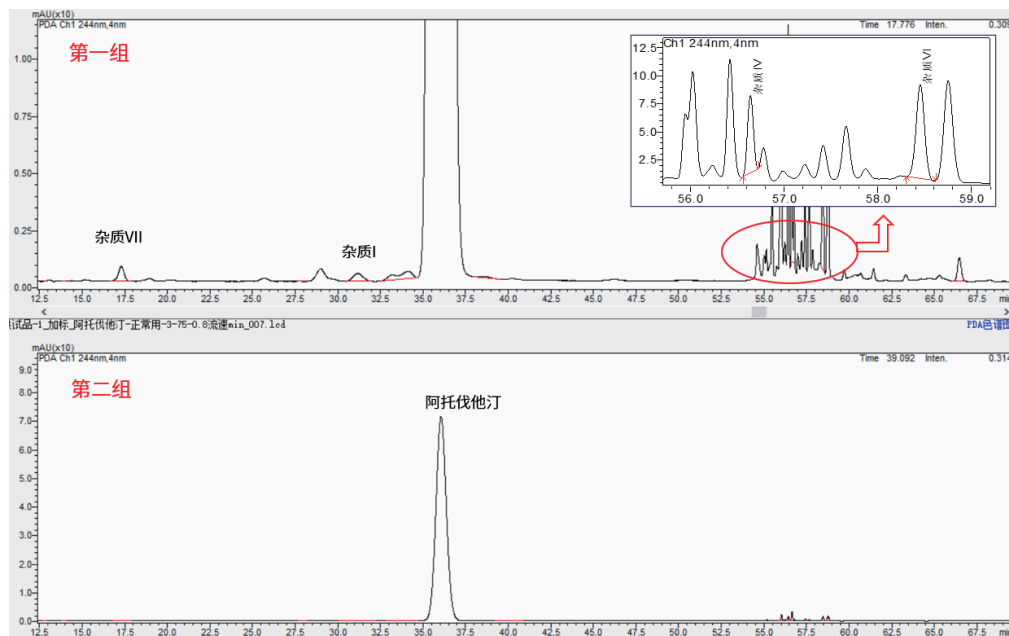


图3 实际样品测试结果（第一组：测有关物质；第二组：测含量）

表5 加标回收率结果

| No. | 化合物名称 | 样本浓度 (mg/L) | 加标浓度 (mg/L) | 检测值 (mg/L) | 回收率 (%) |
|-----|--------|-------------|-------------|------------|---------|
| 1 | 杂质 VII | <LLOQ | 5 | 4.85 | 97.0 |
| 2 | 杂质 I | <LLOQ | 5 | 5.19 | 103.8 |
| 3 | 杂质 II | <LLOQ | 5 | 4.61 | 92.2 |
| 4 | 阿托伐他汀 | 105.16 | 100 | 94.36 | 94.4 |
| 5 | 杂质 III | <LLOQ | 5 | 4.69 | 93.8 |
| 6 | 杂质 IV | <LLOQ | 5 | 5.31 | 106.2 |
| 7 | 杂质 VI | <LLOQ | 5 | 4.23 | 84.6 |
| 8 | 杂质 V | <LLOQ | 5 | 4.17 | 83.4 |

注：< LLOQ 表示低于定量下限。

■ 结论

本文使用岛津双进样液相色谱仪建立了一套液相色谱中实现同时进行阿托伐他汀钙有关物质分析及含量测定,方法学均可满足ChP 2020 二部<阿托伐他汀钙>检测需求的同时,节省一倍分析时间,实现运行降本增效。

岛津应用云

