

应用纪要

使用系统性筛选策略和MaxPeak™ HPS技术开发去铁胺及其强制降解产物的UHPLC分析方法

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Thomas H. Walter, Kim Haynes

Waters Corporation

摘要

方法开发活动通常是在紧迫的时间内“动态”进行的，目的是快速开发出稳定耐用的方法。不幸的是，在该过程中，方法开发策略往往遭到忽视。依托“分析方法质量源于设计(AQbD)”策略的方法开发软件虽然可以开发出稳定耐用的方法，但耗时可能较长，借助软件之余还需要经过培训后才能正确使用。而其他策略则需要更多的人工干预，不仅要选择正确的条件，还要解析结果并根据数据做出决策。系统性筛选策略采用结构化决策过程，减轻了分析人员选择理想条件组合的压力，并简化了方法开发过程。

本文所述研究使用系统性筛选策略开发出一种在酸性和碱性条件下强制降解后分析甲磺酸去铁胺的方法。通过该策略，只用了两天时间进行方法开发和优化就确定了最终方法条件：使用XSelect™ Premier HSS PFP色谱柱和含0.1%甲酸的甲醇梯度。该方法对已知的目标分析物和未知的降解产物实现了良好的分离和检测。

优势

- 使用XSelect Premier HSS PFP色谱柱使8种分析物实现了基线分离
- 在两天内完成强制降解样品的方法开发
- 系统性筛选策略通过简化流程减少决策制定

简介

方法开发可能是一项艰巨的任务，即使对于专家级色谱工作者也是如此。分析人员必须要找到合适的方法条件来分离分析物，这本身就具有挑战性，此外通常还需要追踪这些条件的确定和选择过程，以供将来参考和记录。在大型实验室，由于多项方法开发活动同时进行，不同的分析人员所开发的方法可能不同，这导致追踪活动更加困难。对于这种情况，在所有新的方法开发工作中实施标准化方案可能有所助益，包括筛选某些色谱柱填料以及某些流动相条件。实验室采用标准化方法开发策略有助于更好地理解 and 更轻松地记录产生最终方法条件的过程。此外，使用标准化方案，经验不足的用户也可以进行方法开发，让专家腾出时间来处理更具挑战性的分离工作。

目前有多种方法开发策略，例如软件辅助AQbD和全因子筛选。全因子筛选旨在测试HPLC方法中三个关键参数的各种组合：固定相填料、强溶剂和流动相pH。全因子筛选是一种全面策略，但这种策略不仅要制备所有不同的流动相，还会用到大量的分析人员和仪器时间。给定一组四个固定相时，全因子策略至少需要运行16次测试，还不包括每种条件的重复测试。收集数据后的分析和解释工作也需要大量时间。AQbD策略只测试一些关键参数，因此通常比全因子策略更快。我们通常采用DOE（实验设计）和软件辅助AQbD策略对关键分离参数进行建模，并指出稳定的方法开发区域。虽然这种策略可能有利于稳定性测试或验证，但AQbD不考虑不同的固定相，并且通常需要经过专门的培训才能运行软件。

还有一种更为简便的策略：系统性筛选策略。与全因子策略不同，系统性筛选策略首先评估流动相pH对分析物保留性的影响。运行至少两次分析后，分析人员即可轻松确定使分析物获得理想保留的pH，然后再来筛选色谱柱和强溶剂。对于四种固定相的典型组合，系统性筛选策略可以在10次进样（不包括重复样）后找出理想方法条件，比全因子策略节省时间。本应用在高温下通过酸水解和碱水解对铁螯合药物甲磺酸去铁胺进行强制降解。降解

后，采用系统性筛选策略来开发一种分离已知的目标峰和任何未知降解物的方法。最终方法使所有8种成分实现了基线分离，包括去铁胺和抗衡离子甲磺酸盐，使用QDa质谱检测器可以充分检测出来。此分析还采用了MaxPeak Premier HPS技术，以大幅减少任何分析物吸附，因为去铁胺会吸附到LC系统和色谱柱上¹。

实验

样品描述

使用Milli-Q水配制1 mg/mL的甲磺酸去铁胺储备液。另取两份1 mL储备液放入单独的样品瓶中。向其中一个样品瓶中加入100 μ L 0.1 N NaOH，向另一个样品瓶中加入100 μ L 0.1 N HCl。两个样品瓶在70 °C下加热1小时。加热后将两瓶内容物合并以终止降解。然后将合并的样品用Milli-Q水按1:10稀释，放入系统以供分析。稀释后甲磺酸去铁胺的终浓度为0.1 mg/mL，未考虑降解引起的浓度变化。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ Premier四元溶剂管理器(QSM)系统，配备流通针式样品管理器(SM-FTN)、色谱柱管理器、辅助色谱柱管理器和QDa质谱检测器
检测：	降解产物和API的SIR（表1）
色谱柱：	所有色谱柱的尺寸均为2.1 × 50 mm（粒径2.5 μ m） XBridge™ Premier BEH C18 (P/N: 186009827) XSelect Premier CSH苯己基柱(P/N: 186009879) XSelect Premier HSS PFP (P/N: 186010043) Atlantis™ Premier BEH C18 AX (P/N: 186009390)
柱温：	30°C

样品温度:	10°C
进样体积:	1.0 µL
流速:	0.7 mL/min
流动相A:	Milli-Q水
流动相B:	乙腈
流动相C:	甲醇
流动相D:	0.1%甲酸(D1)或200 mM氢氧化铵(D2)
梯度条件:	恒定保持5% D，确保在整个梯度中保持一致的添加剂浓度。线性梯度，B/C在4.90 min内从5%增加至95%95% B/C保持0.82分钟。返回到5% B/C的起始条件并保持1.6分钟。总运行时间为7.37分钟。

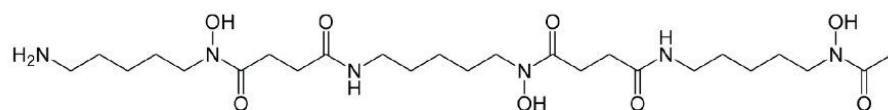
化合物标识符	单同位素质 量数(<i>m/z</i>)	ESI模式
去铁胺	561.29	正
甲磺酸盐	94.96	负
160	160.12	正
161	161.07	正
219	219.14	正
260	260.24	正
361	361.27	正
259	259.24	负

表1.在方法开发过程中追踪检测到的甲磺酸去铁胺降解产物的SIR检测条件和化合物标识符

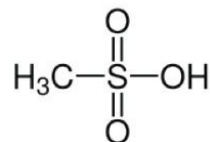
数据管理

色谱软件：

Empower™ 3 Feature Release 4



去铁胺
(560.69 Da)



甲磺酸 (甲磺酸盐)
(96.10 Da)

图1. 样品已知成分的化学结构。通过电喷雾电离质谱法监测活性成分去铁胺和抗衡离子甲磺酸盐以及未知物。

结果与讨论

使用系统性筛选策略进行方法开发时，首先要设置最终方法的最低允许标准并定义将使用的系统。此标准可以很宽泛，也可以很具体，取决于实验室的要求。常用标准是USP分离度或拖尾因子，但某些分析可能还需要满足其他参数。这些标准不仅充当方法的目标，也是一个“停止点”，让分析人员知道是何时创建出满足分析需要的方法。当已经有足够的方法时，过度开发方法可能会浪费时间。更加糟糕的是，如果没有特定的标准，可能会发生方法开发数周后却发现最终版本产生的结果与前几次的结果相似的情况。在本文所述研究中，所有化合物的USP分离度值必须 >1.5 ，USP拖尾因子必须介于0.8和1.2之间。本研究使用ACQUITY Premier四元系统，以尽可能减少分析物与HPLC系统流路中存在的金属组分之间的潜在相互作用。

鉴于这些标准，我们采用了之前的应用中所说的系统性筛选策略²⁻³。需要注意的是，与之前发布的应用相比，本研究选择了不同的色谱柱。在为方法开发项目选择色谱柱时，要求所选色谱柱在涵盖一系列选择性的同时还要顾及到目标分析物。良好的起点是选择不同颗粒技术（例如有机/无机杂化技术vs硅胶技术）以及不同键合填料的色谱柱。因此，本研究所选择的色谱柱包括三种不同的颗粒技术和四种不同的键合填料。

XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱采用C₁₈固定相键合有机/无机杂化颗粒而成，性能稳定，经久耐用⁴。对于方法开发而言，这是一个良好的起点，因为该色谱柱适用于高pH和低pH流动相添加剂。接下来选择XSelect Premier CSH苯己基柱。该色谱柱也使用杂化颗粒，由于在制造过程中施加了少量正电荷，因此具有较弱的阴离子交换功

能⁵⁻⁶。这种基质颗粒与苯己基键合相偶联时可以提供特有的选择性，尤其是在使用甲醇作为有机流动相时。选择的第三种色谱柱是XSelect Premier HSS PFP色谱柱，与高纯度硅胶颗粒键合。PFP（五氟苯基）键合相不仅可以提供 π - π 相互作用，还可以提供偶极-偶极和氢键相互作用。选择的最后一种色谱柱是Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱，用于解决抗衡离子甲磺酸盐的保留问题。混合模式反相/阴离子交换键合填料连接了之前所述的BEH颗粒，采用中等覆盖率的C₁₈键合和专有的阴离子交换官能团，非常适合保留酸性物质⁷⁻⁸。本应用纪要中使用的四种固定相如图2所示。

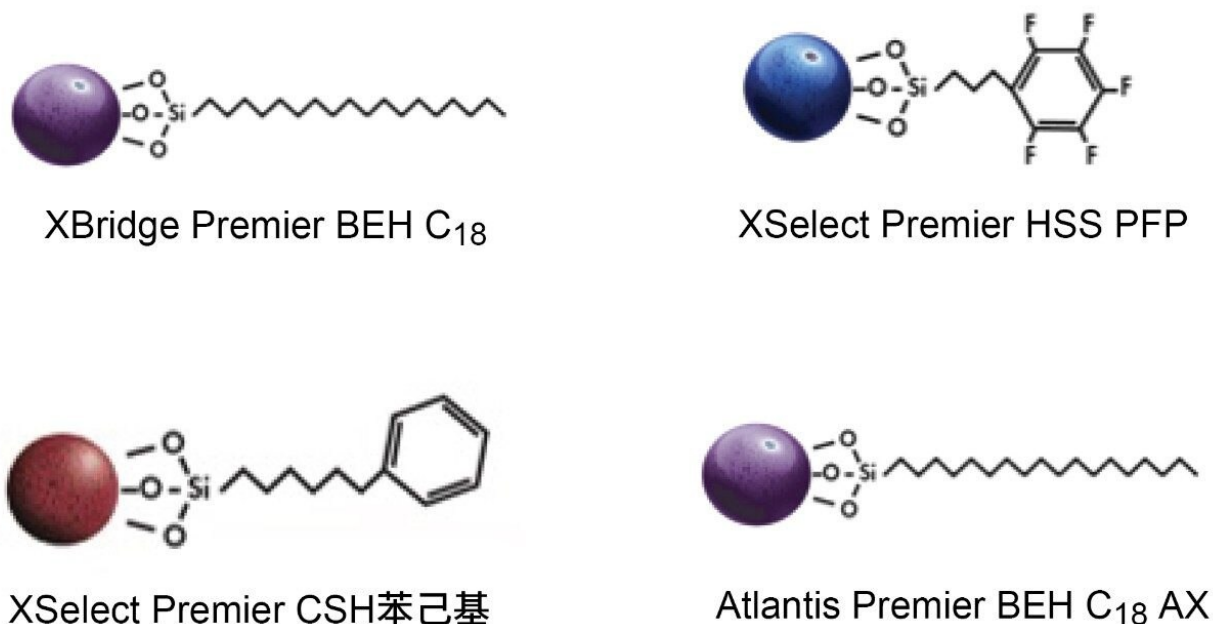


图2.所选色谱柱的键合相化学结构。图中所示基质颗粒为：全多孔杂化BEH/CSH或纯硅胶HSS。

此外，要确保方法发挥理想性能，还需要使用合适的色谱柱和系统硬件。如前所述，有些化合物（如核苷酸和小分子酸性化合物）会与许多LC色谱柱和系统中使用的金属硬件相互作用。ACQUITY Premier LC系统和许多色谱柱中使用的MaxPeak Premier HPS硬件通过在金属表面采用有机/无机杂化表层来减轻这些相互作用⁹⁻¹⁰。虽然本研究中分析的某些化合物可能对金属不敏感，但API去铁胺已被证明会受到不锈钢色谱柱的影响¹。因此，本研究选择的所有色谱柱和系统都采用MaxPeak HPS技术来减少潜在的分析物损失，不仅是API，还有对金属敏感的降解物。

系统性筛选策略的第一步是评估分析物在高pH和低pH条件下的保留性，并确定获得理想保留的条件。这一步的重要目的是选择一款在高pH条件下性能稳定的色谱柱，例如XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱。与之前设置的最终

方法要求不同，这一步仅评估保留性，为下一步选择使目标化合物的总体保留获得理想结果的条件。图3所示为pH探索实验的色谱图。

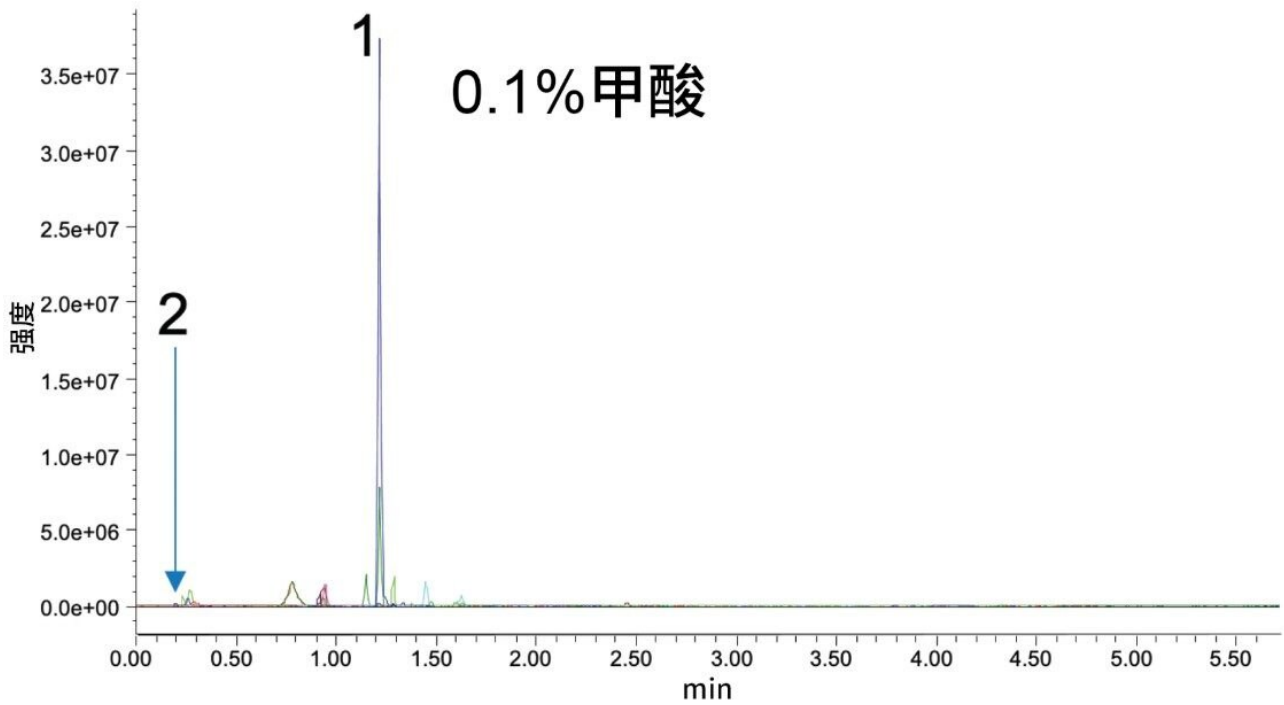
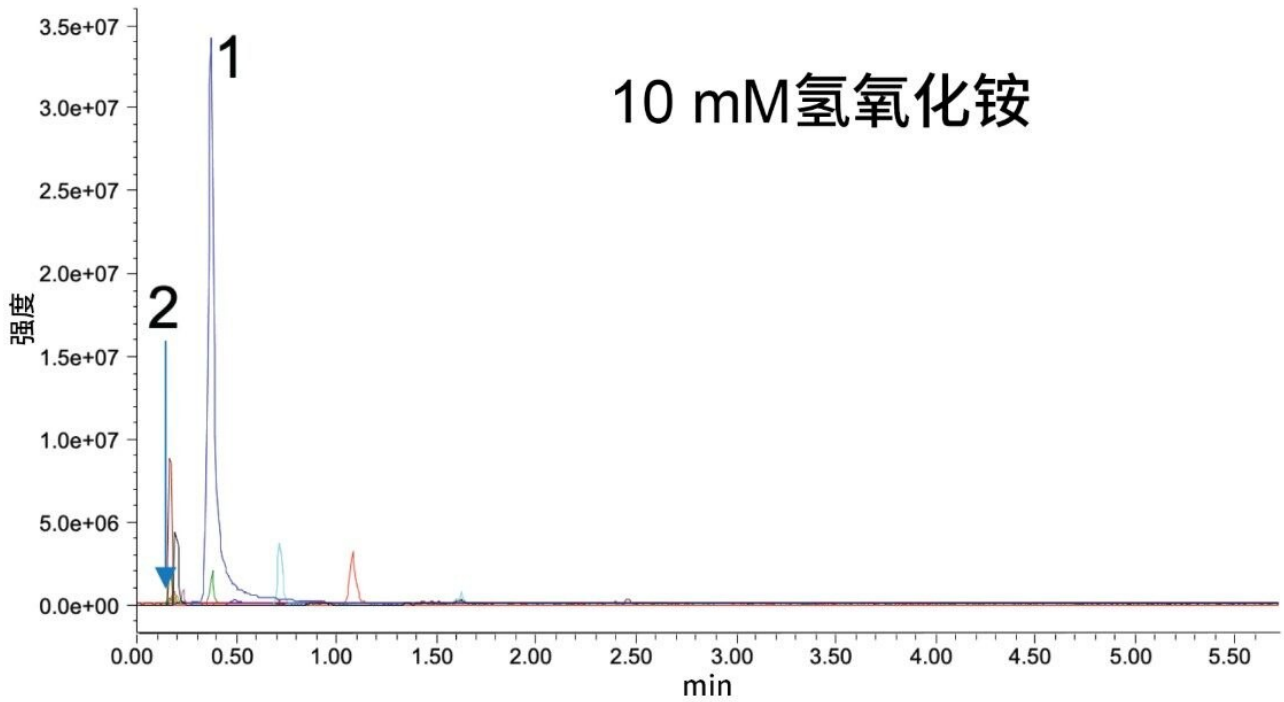


图3.使用XBridge Premier BEH C_{18} 色谱柱快速探索pH的结果。1) 去铁胺, 2) 甲磺酸盐。其他分析物未标记, 但通过SIR进行追踪。

使用氢氧化铵流动相添加剂时，分析物的保留减少。与低pH条件相比，去铁胺(1)和甲磺酸盐(2)在高pH条件下保留较少。此外，更多的降解物在低pH条件下得到保留，在高pH条件下，大部分降解物在死体积中共洗脱。这种情况下很容易就能做出使用低pH条件的决定，后续步骤将仅使用低pH流动相。这在色谱柱选择性方面开辟了一些可能性，如果选择高pH流动相，选择性将受到阻碍。

系统性筛选策略的第二步是筛选色谱柱和流动相。这一步是在选定的pH下，使用乙腈和甲醇作为强溶剂，筛选之前选择的四种色谱柱。这一步的目的是确定分离所用流动相和固定相的理想组合。所有方法开发标准都会在这一步发挥作用，必要时选择和优化理想条件。图4所示为使用乙腈流动相时，四种色谱柱分离样品的结果。

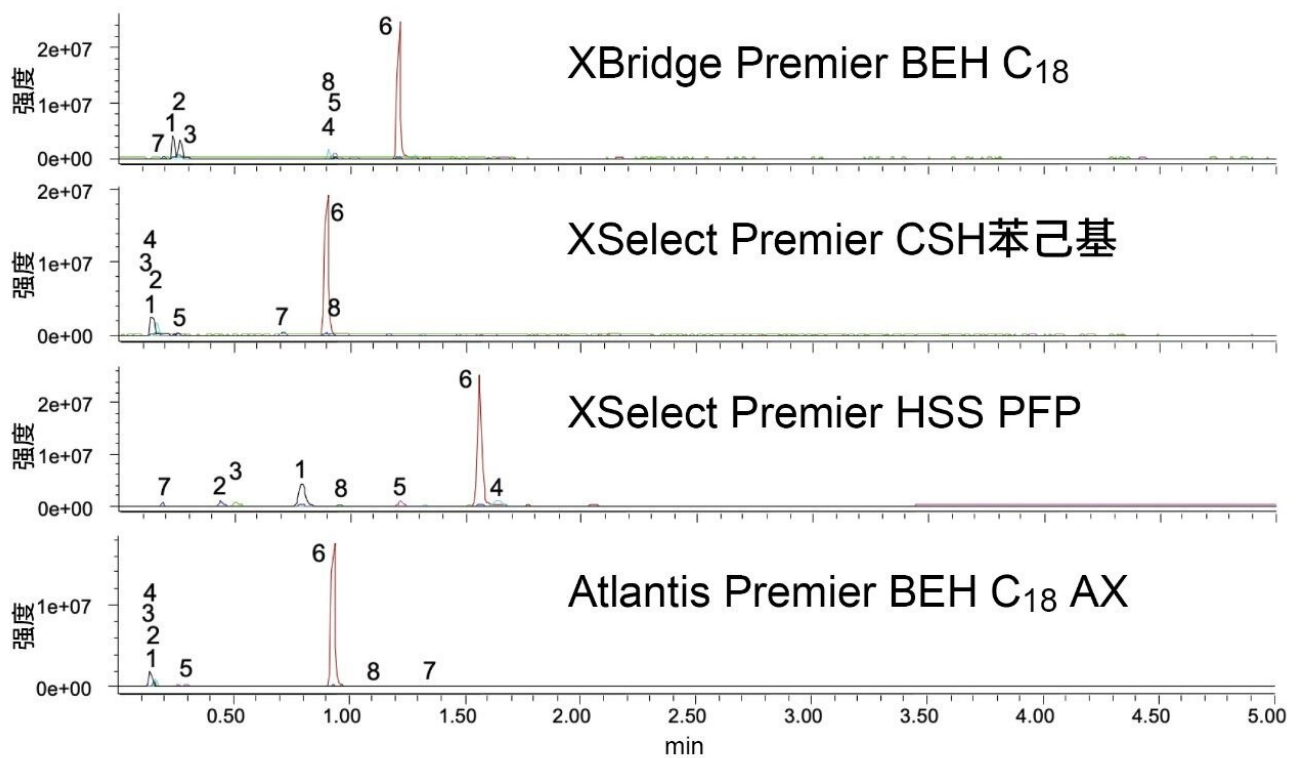


图4.使用乙腈作为强溶剂时，选择的四种色谱柱分离强制降解样品的结果。1) m/z 160、2) m/z 161、3) m/z 219、4) m/z 260、5) m/z 361、6) 去铁胺、7) 甲磺酸盐、8) m/z 259。图中可能没有显示出低强度分析物；但用数字指示了分析物的洗脱位置。

对于大多数色谱柱/流动相组合，都至少有两种分析物同时洗脱。组分1、2、3、4在XSelect Premier CSH苯己基柱和Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱上共洗脱。组分1-3在XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱上也发生共洗脱。XSelect Premier HSS PFP色谱柱分离出所有组分，并且只有两对关键峰。需要注意的是，组分7（甲磺酸盐

) 在XSelect Premier CSH苯己基柱和Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱上都获得了良好的保留, 这归因于这两种色谱柱的阴离子交换功能。CSH颗粒的阴离子交换保留性能较弱, 而Atlantis Premier BEH C₁₈ AX色谱柱的阴离子交换特性更强。甲磺酸盐在后一种色谱柱上相比在前一种色谱柱上得到更好的保留证实了这一点。在测试的四个条件中, 只有HSS PFP色谱柱基本满足所有设定标准。但有两对关键化合物 (2/3和6/4) 的分离度不佳, USP分离度分别为1.3和1.4。图5所示为使用甲醇作为强流动相时, 四种色谱柱分离样品的结果。

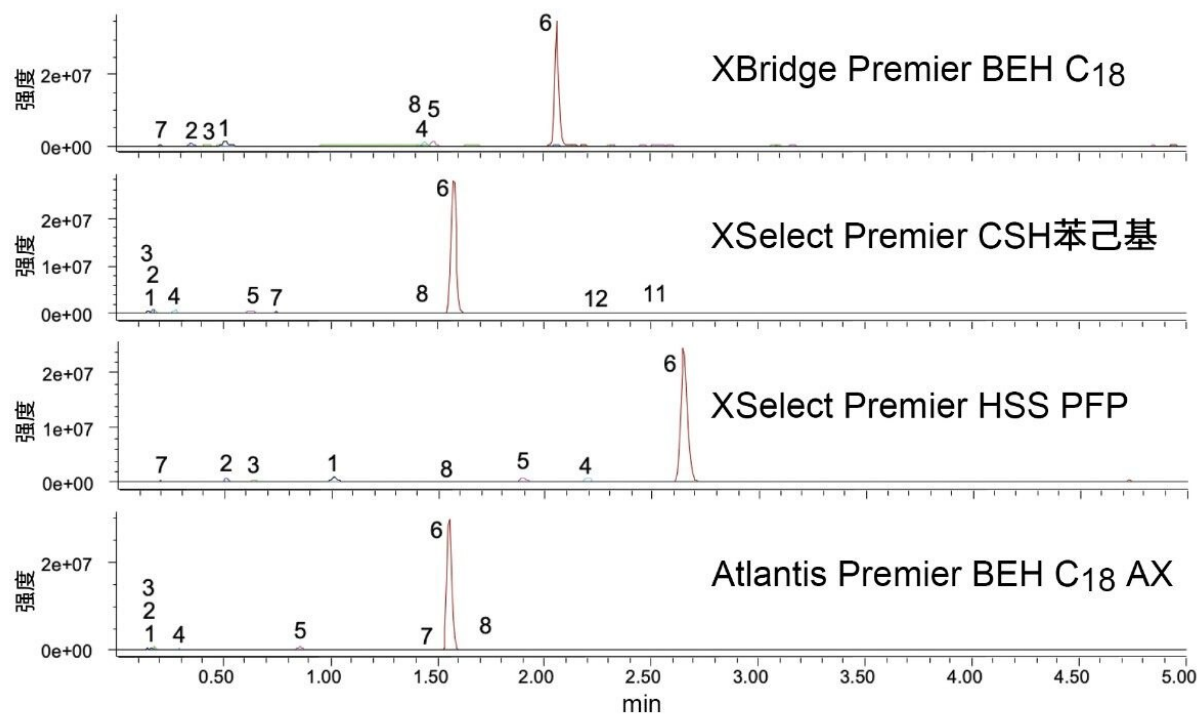


图5.使用甲醇作为强溶剂时, 选择的四种色谱柱分离强制降解样品的结果。1) m/z 160、2) m/z 161、3) m/z 219、4) m/z 260、5) m/z 361、6) 去铁胺、7) 甲磺酸盐、8) m/z 259。图中可能没有显示出低强度分析物; 但用数字指示了分析物的洗脱位置。

与乙腈条件相比, 使用甲醇流动相可提供更多选择性。例如, 在XBridge Premier BEH C₁₈色谱柱上, 与使用乙腈相比, 使用甲醇时先洗脱的组分7、1-3的分离效果更好。需要注意的一点是, 甲磺酸盐7的保留几乎完全取决于固定相的阴离子交换功能, 与乙腈相比, 使用甲醇对其保留的影响很小。只有XSelect Premier HSS PFP色谱柱分离出所有组分。与乙腈相比, 甲醇作为强流动相可以更好地分离这些组分。使用甲醇时, 所有组分的USP分离度 >1.5, 拖尾值也更好。使用XSelect Premier HSS PFP色谱柱和甲醇流动相可以满足所有要求的标准, 但在保留甲磺酸盐方面不如其他色谱柱成功。不过, 甲磺酸盐不会在色谱柱的死体积中洗脱, 如果需要, 可以进行定量测定

。

虽然该样品不需要优化，但调整了梯度斜率以缩短分析运行时间。图6所示为该分离的最终方法条件，在ACQUITY QDa质谱检测器上使用设定的SIR以缩短运行时间并提高灵敏度。y轴经过归一化处理，以更好地显示低强度峰并确认可接受的峰对称性。

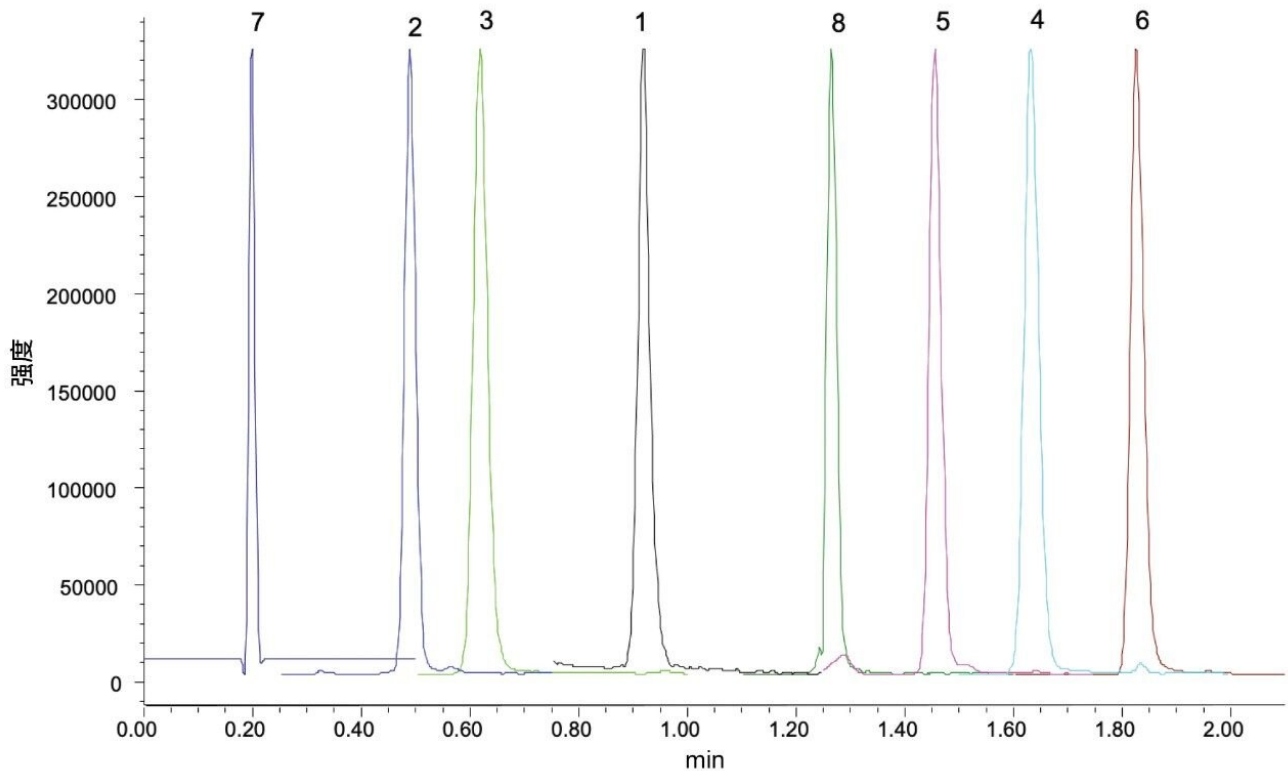


图6.使用XSelect Premier HSS PFP, 2.1 x 50 mm 2.5 μ m色谱柱的最终方法条件。使用含0.1%甲酸的甲醇流动相梯度，梯度斜率为6.0%/V_c。通过Empower软件设定SIR以提高QDa的灵敏度。1) m/z 160、2) m/z 161、3) m/z 219、4) m/z 260、5) m/z 361、6) 去铁胺、7) 甲磺酸盐、8) m/z 259。

对于所有分析物，USP拖尾因子均在0.8–1.2范围内，USP分离度均大于1.5，满足我们所要求的分离标准。通过实施系统性筛选策略，不到两天时间即可开发出去铁胺强制降解样品的分析方法，包括优化方法以减少运行时间（可选）。本文所示的结构化方法开发策略消除了不同分析人员开发方法可能产生的不确定性。如果实验室采用标准化方法开发策略，则无论分析人员是谁，都能够以系统性、可追溯且易于证明的方式开发出最终方法。

结论

逐步策略可能是方法开发活动的重要资产。标准化方案不仅可以确保所有分析人员以相同的方式开发方法，只要设计得当，还可以减少总体方法开发时间。虽然有些方法开发策略（如AQbD）在统计建模方面具有明显优势，但人工干预更多的策略（如系统性筛选策略）更简单，并且不需要专门的软件或培训。系统性筛选策略首先检查pH对保留性的影响，然后再筛选色谱柱和强溶剂。通过首先评估pH，可以锁定所选的属性，避免在后续活动中再出现。这也有助于指导在筛选过程中选择哪些色谱柱，因为并非所有色谱柱都适合高pH条件。如果需要，还可以进行额外的色谱柱和流动相筛选优化。

我们使用系统性筛选策略开发出一种分析铁螯合药物甲磺酸去铁胺强制降解样品的方法。在研究中追踪了活性成分去铁胺、抗衡离子甲磺酸盐以及6种降解物。使用该系统性筛选策略，我们在运行系统仅两天后就开发出一种使用甲醇、甲酸和XSelect Premier HSS PFP色谱柱的最终方法。不过仍然需要执行稳定性测试和验证等进一步的活动，但这些活动超出了本研究的范围。在色谱柱硬件和系统中使用MaxPeak Premier HPS技术可以对金属敏感性化合物去铁胺进行可靠分析，并且不会影响到样品中其他化合物的色谱分析性能。

参考资料

1. Boissel C, Walter TH, Shiner SJ. ACQUITY Premier解决方案改善去铁胺（一种铁螯合药物）的UPLC-MS分析. 沃特世应用纪要. [720007239ZH](#).
2. Maziarz M, McCarthy S, Wrona M. 使用系统性筛选策略提高方法开发效率. 沃特世应用纪要. [720005026ZH](#).
3. Berthelette KD, Nguyen JM, Turner, J. 在配备UV和QDa检测器的ACQUITY Arc上使用系统性筛选策略对10种抗生素化合物进行方法开发. 沃特世应用纪要. [720007352ZH](#).
4. Wyndham KD, Walter TH, Iraneta PC, Neue UD, McDonald PD, Morrison D, Baynham M. 沃特世杂化颗粒技术概论：亚乙基桥[BEH Technology]杂化颗粒及其在液相色谱中的应用. 沃特世白皮书 [720001159ZH](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf>> .
5. Iraneta PC, Wyndham KD, McCabe DR, Walter TH. 沃特世杂化颗粒技术概论. 第3部分. 表面带电杂化颗粒(CSH)技术及其在液相色谱中的应用. 沃特世白皮书 [720003929ZH](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003929en.pdf>> .

6. Smith K, Rainville P. 使用ACQUITY Premier系统解决方案改善人血浆中三羧酸(TCA)循环分析物定量分析的灵敏度和色谱峰形.沃特世应用纪要.720007107ZH.
7. Kadlecova Z, Kalikova K, Folprechtova D, Tesarova E, Gilar M. Method for evaluation of ionic interactions in liquid chromatography.*J. Chromatogr.A.* 1625 (2020) 461301.
8. Walter TH, Alden BA, Field J, Lawrence N, Osterman D, Patel AV, DeLoffi M. Characterization of a Highly Stable Mixed-Mode Reversed-Phase/Weak Anion-Exchange Stationary Phase Based on Hybrid Organic/Inorganic Particles.*J. Sep. Sci.* 44 (2021) 1005–1014.
9. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC.*Anal.Chem.* 93 (2021) 5773-5781.
10. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette KD, Boissel C, Delano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner S. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects.*LCGC Supplement*, June (2022) 28–34.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007834ZH, 2022年12月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号