

ACQUITY Premier解决方案改善去铁胺（一种铁螯合药物）的UPLC-MS分析

Cheryl Boissel, Thomas H. Walter, Stephen J. Shiner

Waters Corporation

摘要

已知金属敏感分析物的HPLC分离会受到分析物与HPLC仪器和色谱柱中金属表面相互作用的影响。该相互作用造成各种影响，包括峰展宽和拖尾以及峰面积损失和进样间差异性高。ACQUITY Premier解决方案采用新型表面技术：MaxPeak高性能表面，减轻了这些影响。本文比较了使用标准UPLC系统和色谱柱与ACQUITY Premier解决方案所获得的铁螯合药物去铁胺的UPLC分离结果。结果表明，使用ACQUITY Premier解决方案可以实现更高的峰面积并改善进样间重现性。

优势

- 与标准UPLC系统和色谱柱相比，ACQUITY Premier解决方案使去铁胺的峰面积更高且更一致
- 借助ACQUITY Premier解决方案，无需进行平衡或使用不常见的流动相添加剂，即可实现可重现的分离

简介

铁螯合药物用于治疗铁超载¹，并且具有免疫调节作用，因此有望用于治疗微生物和病毒感染（包括COVID-19）^{2,3}。其中一种药物是去铁胺（以商品名Desferal销售）。据报道，当使用HPLC分析去铁胺时，该化合物与色谱系统中的铁络合会导致意外峰形成以及保留时间变化⁴。用去铁胺溶液冲洗系统和色谱柱并在流动相中添加EDTA，可以减轻这些影响。这些步骤虽然有效，但增加了分离方法的时间和复杂性，并且在流动相中使用EDTA会导致该

方法与质谱检测不兼容。本文介绍了ACQUITY Premier系统和ACQUITY Premier色谱柱（统称为ACQUITY Premier解决方案）分析去铁胺的性能评估。ACQUITY Premier解决方案采用新型表面技术（MaxPeak高性能表面），减少了金属敏感化合物与UPLC系统和色谱柱中金属表面之间的相互作用⁵。我们比较了使用常规UPLC系统和色谱柱获得的结果。

实验

样品制备

去铁胺甲磺酸盐和硫脲购自Millipore Sigma。分别用10%乙腈/90%水和90%乙腈/10%水制备1 mg/mL和2 mg/mL储备液。在进样重现性研究中，测试混合物包含300 µg/mL硫脲和5 µg/mL去铁胺甲磺酸盐的5%乙腈/95% 10 mM甲酸铵水溶液(pH 3.00)。使用硫脲作为死体积(V_0)标志物。在新开封的色谱柱上连续进样三次该混合物，进样体积2 µL。在校正曲线研究中，用5%乙腈/95% 10 mM甲酸铵水溶液(pH 3.00)制备浓度分别为1、2.5、5、10、20和30 µg/mL的去铁胺甲磺酸盐。

方法条件

液相色谱条件

系统：	ACQUITY UPLC H-Class QSM，配备CM的FTN样品管理器 ACQUITY Premier H-Class QSM，配备CM的FTN样品管理器
检测器：	ACQUITY QDa质谱检测器
色谱柱：	ACQUITY Premier HSS T3, 1.8 µm, 2.1 × 50 mm; ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 µm, 2.1 × 50 mm

液相色谱条件

柱温:	30 °C
样品温度:	15 °C
进样体积:	2 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	10 mM甲酸铵水溶液, pH 3
流动相B:	95/5乙腈/200 mM甲酸铵水溶液, pH 3
梯度:	流动相B在2.65 min内从5%增加到50% (线性)
每次进样的运行时间:	5 min

质谱条件

系统:	ACQUITY QDa
质量数扫描范围:	50–800 Da
电离模式:	正扫描
锥孔电压:	15 V
目标采样速率:	8点/秒
毛细管电压:	正, 1.5 kV

SIR极性(+):	正
硫脲的SIR质量数(DA):	77
去铁胺的SIR质量数(DA):	561

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.5	95	5	初始
2.65	0.5	50	50	6
3.15	0.5	50	50	6
3.2	0.5	95	5	6

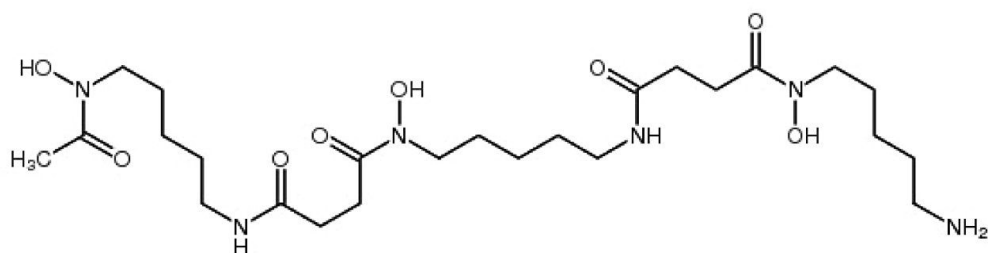
数据管理

色谱软件: Empower 3 FR 4

结果与讨论

如图1所示, 去铁胺是一种强极性弱碱, $\log P$ 为-2.2。因此选择HSS T3色谱柱, 以便利用其保留极性碱性物质的能力。由于去铁胺的UV吸收弱, 因此使用ACQUITY QDa质谱检测器。使用乙腈梯度与包含甲酸铵的水性流动相(pH 3), 可获得良好的峰形和灵敏度。如图2B所示, 当使用标准UPLC系统和色谱柱时, 发现去铁胺的峰面积差异性相对较高, 十次进样中的相对标准偏差(RSD)为16.8%。如图3所示, 在10次进样中, 峰面积逐渐增加, 这与其他金属敏感分析物的观察结果相同⁶。相比之下, 当使用ACQUITY Premier解决方案时, 十次进样中的去铁胺峰面积RSD仅为2.1%。此外, 平均峰面积相对于使用标准系统和色谱柱获得的结果高出62%。使用t检验, 发现该差异在

>95%的置信度下具有统计学显著性。由于已经证明样品在低载样量下与金属表面相互作用所导致的峰面积下降最严重⁵，因此使用ACQUITY Premier解决方案以及标准UPLC系统和色谱柱，在涵盖2–60 ng的若干不同载样量下确定去铁胺的峰面积。如图4所示，结果表明，在最低载样量下观察到使用ACQUITY Premier解决方案获得了最大的峰面积增加幅度。在2–5 ng的载样量下，与标准系统和色谱柱相比，峰面积高出约60%，而在40–60 ng的载样量下，峰面积则高出约32%。



LogP: -2.2
MW: 560.7 g/mol

图1.去铁胺(DFO)的化学结构和关键性质

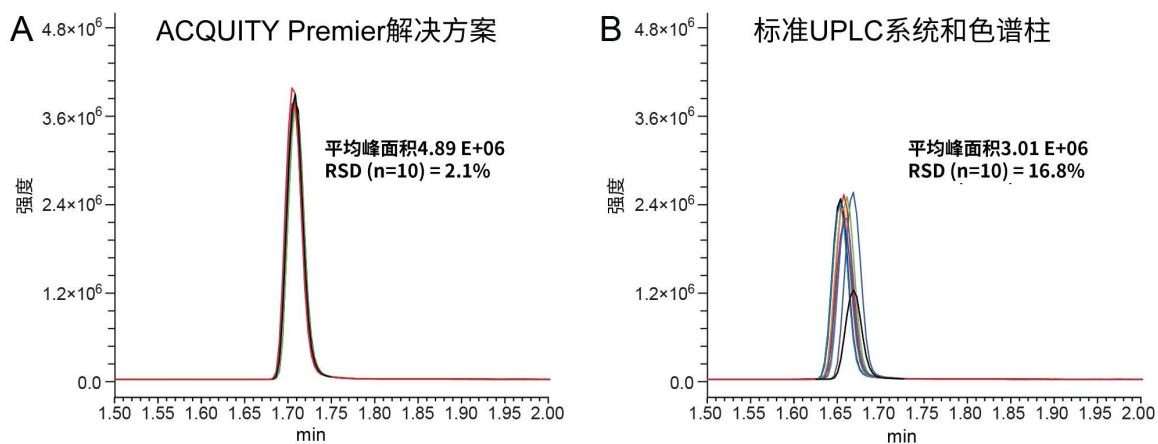


图2.(A)使用ACQUITY Premier解决方案获得的甲磺酸去铁胺重复进样10次的结果叠加图。(B)使用标准UPLC系统和标准色谱柱获得的同一分析物重复进样10次的结果叠加图。本研究使用ACQUITY UPLC HSS T3, 100 Å, 1.8 μm, 2.1 × 50 mm色谱柱。甲磺酸去铁胺的载样量为10 ng。运行乙腈和10 mM甲酸铵(pH 3.0)水性流动相组成的梯度进行分离，流速0.5 mL/min，温度30 °C。使用ACQUITY QDa检测器在SIR正离子模式下检测去铁胺峰，*m/z*为561.0。

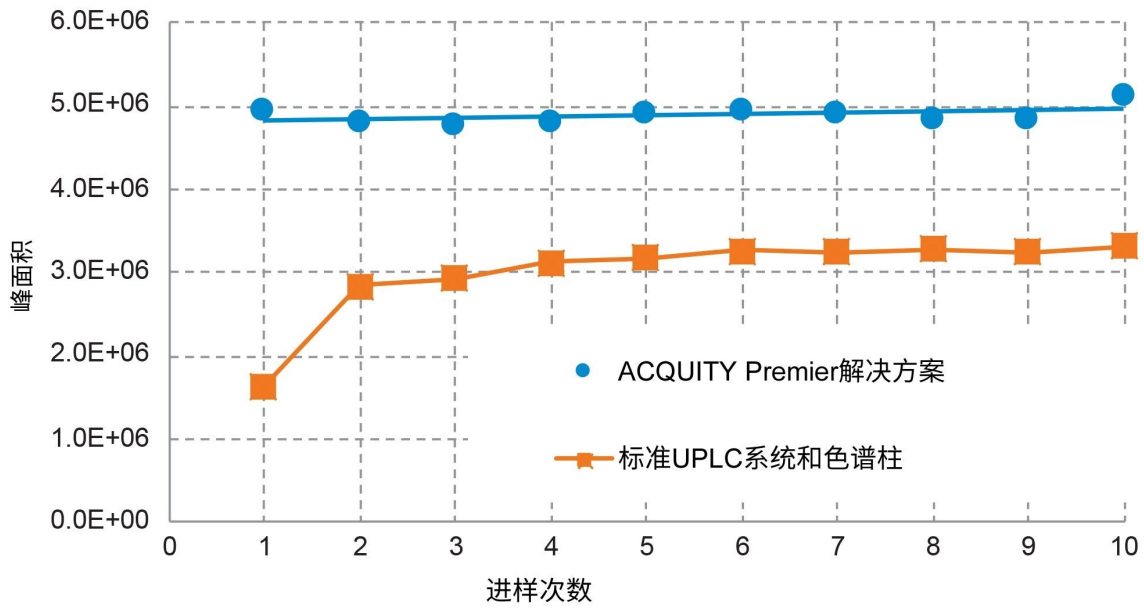


图3.使用ACQUITY Premier解决方案（蓝色圆圈）以及使用标准UPLC系统和色谱柱（橙色方块）在10次连续进样中所获得的去铁胺峰面积对比图

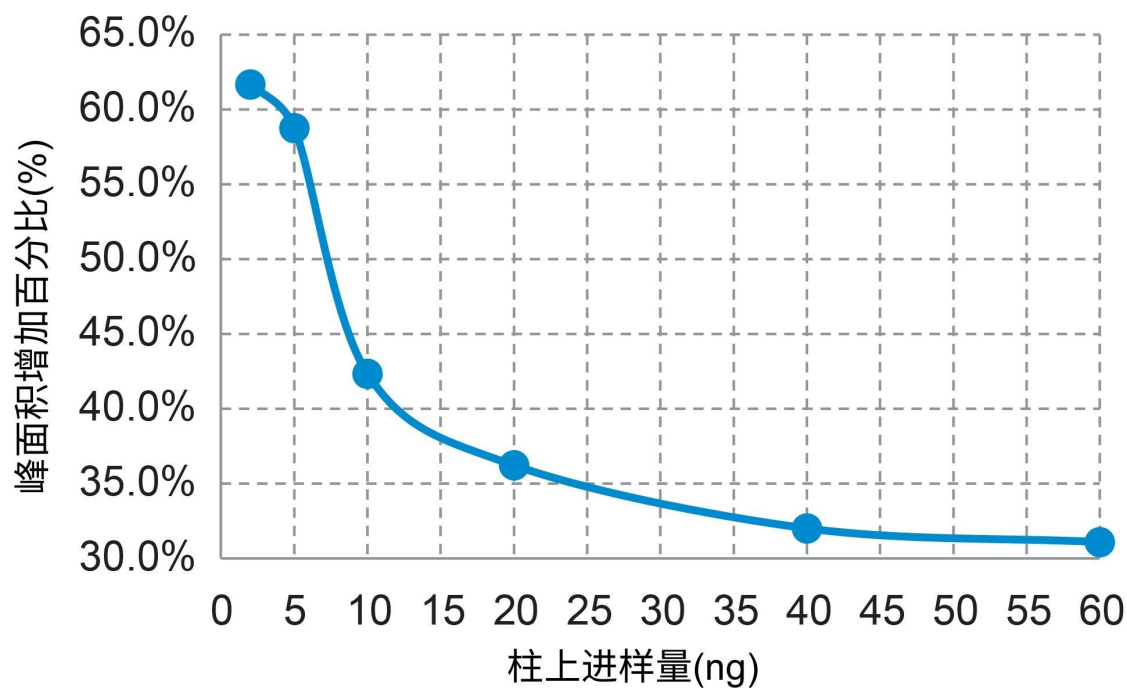


图4.使用ACQUITY Premier解决方案获得的去铁胺峰面积相比于使用标准UPLC系统和色谱柱所获得的峰面积的相对增加与甲磺酸去铁胺的柱上载样量的关系图。分离条件与图2相同。

结论

这些结果证明，相对于标准UPLC系统和色谱柱，ACQUITY Premier解决方案使去铁胺获得了更高的峰面积和更出色的峰面积重现性。还表明，使用ACQUITY Premier解决方案获得的峰面积相对于使用标准UPLC系统和色谱柱所获得的峰面积的差异随载样量减少而增加。这些结果与先前报道的使用ACQUITY Premier解决方案分析其他金属敏感分析物所得到的结果一致，并进一步证明了该解决方案在分析此类分析物时的价值。值得注意的是，与大多数其他表现出金属表面吸附的分析物不同，去铁胺呈碱性，并且不含磷酸根和羧酸根基团。这表明其他缺乏酸性基团的铁螯合剂也可能受益于ACQUITY Premier解决方案的使用。

参考资料

1. Mobarra, N.; Shanaki, M.; Ehteram, H.; Nasiri, H.; Sahmani, M.; Saeidi, M.; Goudarzi, M.; Pourkarim, H.; Azad, M. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int.J. Hematol.Oncol.Stem Cell Res.*2016, 10(4), 239–247.
2. Williams, A.; Meyer, D. Desferrioxamine as Immunomodulatory Agent During Microorganism Infection. *Curr.Pharm.Des.*2009, 15, 1261-1268.
3. Dalamaga, M.; Karampela, I.; Mantzoros, C. S. Commentary: Could Iron Chelators Prove to be Useful as an Adjunct to COVID-19 Treatment Regimens? *Metab.Clin.Exp.*2020, 108, 154260.
4. Cramer, S. M.; Nathanael, B.; Horvath, C. High-Performance Liquid Chromatography of Deferoxamine and Ferrioxamine: Interference by Iron Present in the Chromatographic System, *J. Chromatogr.* 1984, 295, 405-411.
5. Walter, T. H.; Trudeau, M.; Simeone, J.; Rainville, P.; Patel, A. V.; Lauber, M. A.; Kellett, J.; DeLano, M.; Brennan, K.; Boissel, C.; Birdsall, R.; Berthelette, K. Low Adsorption UPLC Systems and Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces: The ACQUITY Premier Solution. Waters White Paper, [720007128EN <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135079876&lcid=135079875>](https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135079876&lcid=135079875) , Feb. 2021.
6. Walter, T. H.; Murphy, B. J.; Jung, M. C.; Gilar, M.; Birdsall, R. E.; Kellett, J. Faster Time to Results for Ultra-Performance Liquid Chromatographic Separations of Metal-Sensitive Analytes. *Chromatography Today* Feb/March 2021, 40–44.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY Premier解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135071970>>

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

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

720007239ZH, 2021年4月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)
[设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号