

使用Waters™方法转换计算器通过自动方法缩放获得等效的IEX色谱性能

Pawel Bigos, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

在上游工作流程的不断开发和完善中，相关的分析方法最终会迁移到下游用于工艺开发，以及常规监测与活性药物成分相关的产品和工艺属性。对于生物治疗药物，监测与单克隆抗体(mAb)相关的电荷异构体对于建立产品稳定性和工艺一致性至关重要。就这方面而言，在方法向下游迁移时确保分析结果保持一致，可以节省确认与验证活动所花的时间。在本应用纪要中，我们使用沃特世方法转换计算器对单克隆抗体(mAb)的离子交换色谱(IEX)法进行缩放，将该方法从ACQUITY™ Premier系统(UPLC™)迁移到Arc™ Premier系统(UHPLC)，这两个系统分别代表上游和下游LC配置。本研究的结果证明，通过适当的缩放可以将方法迁移到下游工作流程，同时保持选择性和峰面积百分比方面的色谱性能。

优势

- ACQUITY Premier和Arc Premier系统使用pH或盐梯度提供一致的结果
- 提供多种尺寸的BioResolve™ SCX mAb色谱柱，以支持跨UPLC和UHPLC平台的IEX工作流程
- BioResolve CX pH浓缩缓冲液可缩短制备时间和工作台操作时间，以实现稳定且可重现的阳离子交换分离
- 沃特世方法转换计算器可以实现简单的方法缩放，需要用户输入的内容很少

简介

制药公司通常会在不同实验室中部署各种各样的色谱仪器，以支持生物治疗药物的开发和生产。在这个动态过程中，分析方法经常在不同实验室之间开发和迁移，理想情况下产生的结果应一致。然而，系统间的流路差异会影响系统体积和扩散，从而影响后续的色谱结果。考虑到色谱柱尺寸和系统延迟体积的差异，必须对多个参数进行适当缩放，从而不管使用哪种分离技术都能保持色谱性能（图1）。以手动方式缩放时，相关的计算非常耗时并且容易出错。沃特世为用户提供了方法转换计算器2.0版，它可以自动执行方法缩放过程，需要用户输入的内容很少。

为了证明这一点，我们使用沃特世方法转换计算器对在ACQUITY Premier系统上开发的IEX UPLC方法进行缩放，然后迁移到Arc Premier系统上作为UHPLC方法使用。为优化方法在不同系统间的性能，沃特世为两种系统提供相同的BioResolve SCX mAb色谱柱颗粒技术，其中2.1 mm内径色谱柱适用于UPLC仪器，4.6 mm色谱柱适用于UHPLC仪器。使用这些色谱柱，迁移缩放方法时可以保持分离性能。鉴于pH和盐梯度在电荷异构体分离中普遍使用，因此对其进行了评估。本研究使用峰面积百分比和相对保留时间作为指标，来证明上游方法成功迁移到下游工作流程。

实验

氯化钠、MES一水合物、MES盐和咖啡因购自Sigma Aldrich。英夫利昔单抗药品Remicade™购自Amerisource Bergen，使用无菌水按照生产商说明制备(10 mg/mL)，然后直接进样。

ACQUITY Premier LC/UV条件¹

| | |
|---------|--|
| 液相色谱系统： | ACQUITY Premier系统（带QSM模块） |
| 检测条件： | ACQUITY TUV, FC=Ti 5 mm, λ =214 nm、280 nm |
| 样品瓶： | 配置MaxPeak™高性能表面的QuanRecovery™样品瓶(P/N: 186009186) |
| 色谱柱： | BioResolve SCX mAb, 3 μ m, 2.1 mm \times 100 mm (P/N: 186009056) |

| | |
|-------|--|
| 柱温: | 40 °C |
| 样品温度: | 10 °C |
| 进样体积: | 1 µL |
| 流速: | 0.100 mL/min |
| 流动相A: | BioResolve CX pH浓缩液A (P/N: 186009063) 或20 mM MES缓冲液, pH 6.7 |
| 流动相B: | BioResolve CX pH浓缩液B (P/N: 186009064) 或20 mM MES缓冲液加200 mM NaCl, pH 6.7 |
| 色谱软件: | Empower 3, FR4 |

Arc Premier LC/UV条件

| | |
|---------|---|
| 液相色谱系统: | Arc Premier系统 (带QSM模块) |
| 检测条件: | 2489紫外/可见光检测器, 10 mm光程, $\lambda=214$ nm、280 nm |
| 样品瓶: | 配置MaxPeak高性能表面的QuanRecovery样品瓶 (P/N: 186009186) |
| 色谱柱: | BioResolve SCX mAb, 3 µm, 4.6 mm × 100 mm (P/N: 186009060) |
| 柱温: | 40 °C |
| 样品温度: | 10 °C |

进样体积： 4.8 μ L

梯度开始 - 进样后： 785 μ L

流速： 0.480 mL/min

流动相A： BioResolve CX pH浓缩液A (P/N: 186009063)
或20 mM MES缓冲液，pH 6.7

流动相B： BioResolve CX pH浓缩液B (P/N: 186009064)
或20 mM MES缓冲液加200 mM NaCl，pH 6.7

色谱软件： Empower 3, FR4

ACQUITY Premier梯度 (BioResolve CX pH浓缩液)

| 时间 | 流速 (mL/min) | %A | %B | %C | %D | 曲线 |
|-------|----------------|------|------|-----|-----|----|
| 初始 | 0.100 | 81.5 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 初始 |
| 45.00 | 0.100 | 61.0 | 39.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 46.00 | 0.100 | 10.0 | 90.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 49.00 | 0.100 | 10.0 | 90.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 50.00 | 0.100 | 81.5 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 70.00 | 0.100 | 81.5 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 6 |

Arc Premier梯度 (BioResolve CX pH浓缩液)

| 时间 | 流速 (mL/min) | %A | %B | %C | %D | 曲线 |
|-------|----------------|------|------|-----|-----|----|
| 初始 | 0.480 | 81.5 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 初始 |
| 45.00 | 0.480 | 61.0 | 39.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 46.00 | 0.480 | 10.0 | 90.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 49.00 | 0.480 | 10.0 | 90.0 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 50.00 | 0.480 | 81.5 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 6 |
| 70.00 | 0.480 | 81.5 | 18.5 | 0.0 | 0.0 | 6 |

结果与讨论

在药品的整个生命周期中，从药物发现到药物上市，分析方法从表征实验室逐渐向下游迁移到生产和质量控制工作流程。理想情况下，下游方法的结果应与早期开发的分析方法所生成的历史数据相当。在下游工作流程中，用于生产和质量控制的仪器在设计时对方法条件的包容性更强，并且为了提高稳定性，管路和色谱柱内径往往更大。如图1所示，为解决这些差异，必须考虑几个参数，以便将方法成功迁移到下游。沃特世方法转换计算器能够自动执行相关的计算，需要用户输入的内容很少。从显示的参数来看，只有系统延迟体积补偿取决于单个系统且必须通过实验确定。

在本研究中，ACQUITY Premier系统和Arc Premier系统按照图2中列出的条件确定系统延迟体积²。在沃特世方法转换计算器中输入系统延迟体积结果以及色谱柱尺寸和ACQUITY Premier系统梯度条件（图3）。由于两个Premier系统之间的色谱柱尺寸不同，方法转换计算器适当地调整了流速和进样体积，使色谱柱载样量和色谱柱体积保持相同。基于两个系统之间的延迟体积差异，方法转换计算器建议迁移后的Arc Premier系统的等度保持体积为785 μL ，以匹配从ACQUITY Premier系统观察到的保留时间。输入这些缩放条件作为方法参数，如图3所示。

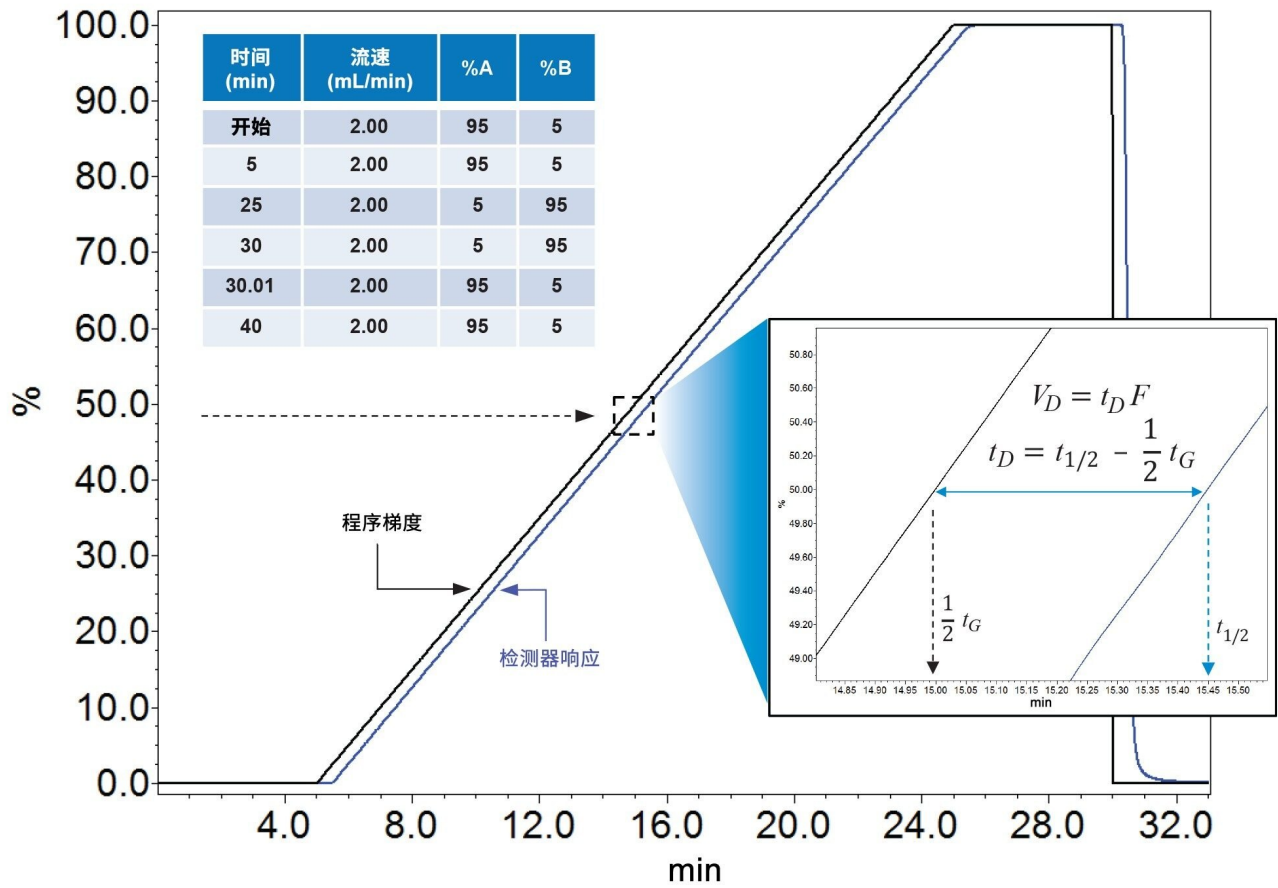


图2.通过计算检测器响应与程序梯度之间的差异来测量系统延迟体积。流动相A: 水, 流动相B: 10mg/L咖啡因水溶液, 波长: 273 nm。

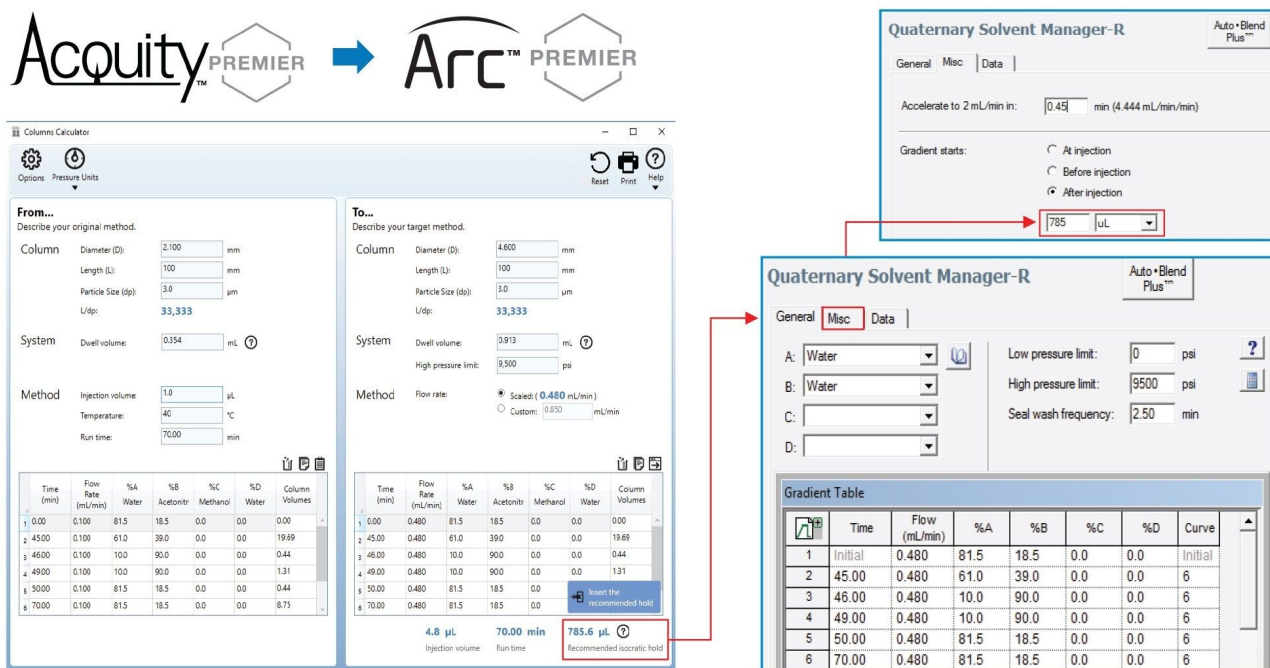


图3.在仪器方法中输入缩放参数和系统延迟体积差异。

本研究中迁移的方法是使用BioResolve CX pH浓缩液和BioResolve SCX mAb色谱柱的IEX方法。这些BioResolve pH浓缩液经过精心设计，能够提供可重现的线性pH梯度，以便在使用IEX色谱柱（例如BioResolve SCX mAb色谱柱）时对电荷异构体实现理想分离。在保持相同分离能力（长度/粒径比）的同时，原始方法和缩放方法使用了两根具有不同内径的BioResolve SCX mAb色谱柱。使用原始方法以及调整/未调整系统延迟体积的缩放方法分析mAb药物Remicade的结果如图4所示。两种方法中，五次重复进样的保留时间%RSD均低于1%，证明了BioResolve色谱柱技术的重现性。然而，从中间的色谱图可以看出，当不使用等度保持体积时，整个谱图偏移了大约两分钟。虽然峰分离度得以保持，但在受法规约束的实验室环境中，由于指定了分析方法的保留时间，色谱图匹配才是实现充分方法迁移的重中之重。当使用等度保持体积时（图4底部色谱图），色谱图与原始方法的色谱图非常接近。

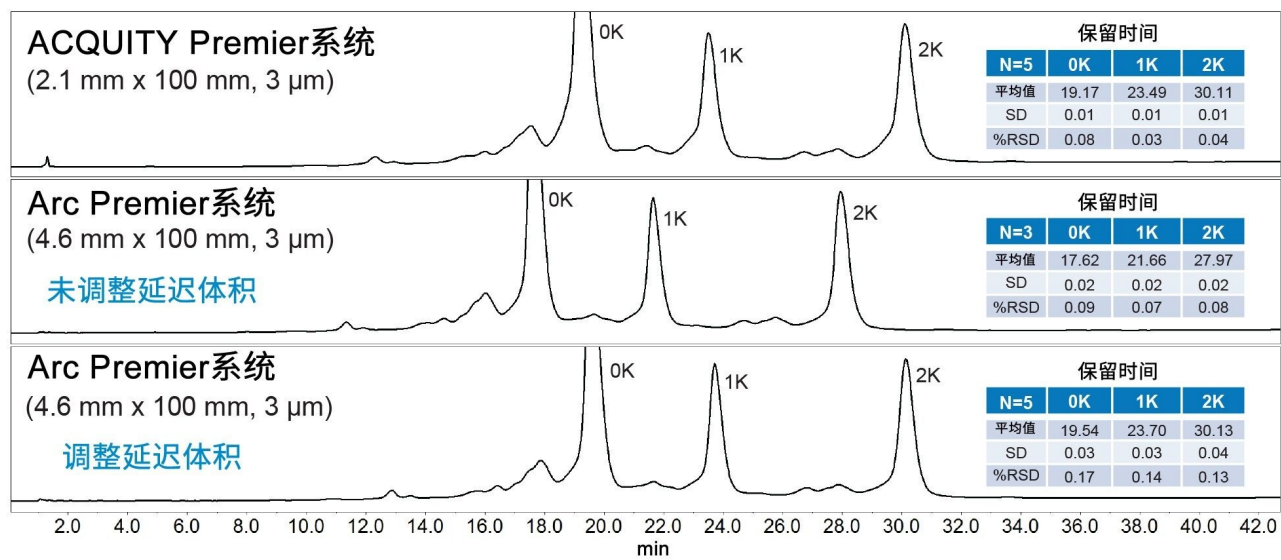
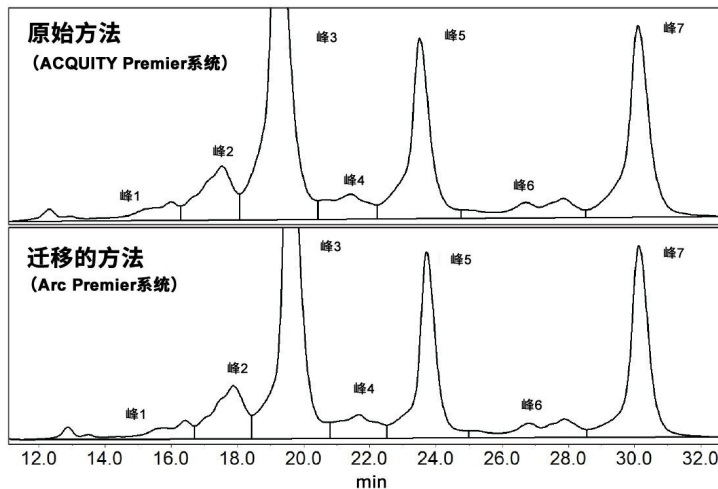


图4.考虑和不考虑系统延迟体积差异时，迁移方法的保留时间差异评估。

本研究计算了五次重复进样的相对保留时间和相对峰面积百分比，以评估缩放方法的重现性和色谱性能。如图5所示，缩放方法的相对保留时间与原始方法的绝对差异低于0.03，相对峰面积百分比与原始方法的差异在约0.5%以内。此外，还对常规盐梯度进行了缩放，以评估BioResolve色谱柱使用更多传统流动相时保持色谱性能的能力，从而证明更广泛的适用性。缩放方法的选择性和峰面积与原始方法相当，大幅减少了进一步优化两种梯度的需要（图5）。这些结果凸显出两种仪器的稳定性能以及方法转换计算器正确缩放IEX方法的能力。



相对保留时间

| N=5 | BioResolve CX pH浓缩液 | | | MES盐缓冲液 | | |
|-----|---------------------|-------------|-------|-----------------|-------------|-------|
| | ACQUITY Premier | Arc Premier | 绝对差异 | ACQUITY Premier | Arc Premier | 绝对差异 |
| 峰1 | 0.834 | 0.841 | 0.007 | 0.823 | 0.808 | 0.015 |
| 峰2 | 0.914 | 0.915 | 0.001 | 0.890 | 0.877 | 0.013 |
| 峰3 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 1.000 | 1.000 | 0.000 |
| 峰4 | 1.117 | 1.108 | 0.009 | 1.106 | 1.094 | 0.012 |
| 峰5 | 1.226 | 1.213 | 0.013 | 1.219 | 1.219 | 0.000 |
| 峰6 | 1.453 | 1.427 | 0.026 | 1.454 | 1.450 | 0.004 |
| 峰7 | 1.571 | 1.542 | 0.029 | 1.561 | 1.570 | 0.009 |

相对峰面积%

| N=5 | BioResolve CX pH浓缩液 | | | MES盐缓冲液 | | |
|-----|---------------------|-------------|-------|-----------------|-------------|-------|
| | ACQUITY Premier | Arc Premier | 绝对差异 | ACQUITY Premier | Arc Premier | 绝对差异 |
| 峰1 | 4.408 | 4.486 | 0.078 | 4.258 | 4.644 | 0.386 |
| 峰2 | 8.106 | 8.628 | 0.522 | 7.480 | 7.558 | 0.078 |
| 峰3 | 38.410 | 38.316 | 0.094 | 38.324 | 38.448 | 0.124 |
| 峰4 | 4.704 | 4.660 | 0.044 | 5.670 | 5.714 | 0.044 |
| 峰5 | 18.362 | 18.288 | 0.074 | 17.652 | 17.530 | 0.122 |
| 峰6 | 5.396 | 5.350 | 0.046 | 5.594 | 5.546 | 0.048 |
| 峰7 | 20.608 | 20.264 | 0.344 | 21.020 | 20.560 | 0.460 |

图5.使用pH和盐梯度，对比原始方法和迁移方法的相对保留时间和相对峰面积百分比。

结论

沃特世方法转换计算器是快速缩放方法的重要工具，可自动计算操作参数，提供等效的色谱性能。本应用纪要表明，计算出的方法条件在缩放后的UHPLC系统上表现出与原始UPLC方法相同的性能。使用pH和盐梯度在系统之间进行比较时，Remicade相对保留时间的绝对差异低于0.03，相对峰面积在原始方法的0.5%以内。当适当缩放时，IEX方法可以在系统之间无缝迁移，并有望产生稳定的性能。

参考资料

1. Birdsall RE, Koshel BM, Yu YQ.使用BioAccord™系统加快生物治疗药物的电荷异构体分析.沃特世应用纪要.2022. [720007706ZH](#).
2. Hong P, McConville PR.什么是延迟体积和柱外体积？它们如何影响方法转换？沃特世应用纪要.2018. [720005723ZH](#). <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf>>

特色产品

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

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

用于纯化和模块化LC系统的2489紫外/可见光(UV/Vis)检测器 <<https://www.waters.com/134721513>>

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

BioResolve CX pH浓缩缓冲液A <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009063-bioresolve-cx-ph-concentrate-a.html>>

BioResolve CX pH浓缩缓冲液B <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009064-bioresolve-cx-ph-concentrate-b.html>>

BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 μm, 4.6 mm x 100 mm, 1个/包 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009060-bioresolve-scx-mab-column-3--m-46-mm-x-100-mm-1-pk.html>>

BioResolve SCX mAb色谱柱, 3μm, 2.1 mm X 100 mm, 1个/包 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009056-bioresolve-scx-mab-column-3-m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>>

采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery 12 x 32 mm螺纹口样品瓶, 300 μL, 100个/包 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186009186-quanrecovery-with-maxpeak-hps-12-x-32-mm-screw-neck-vial-300--l-.html>>

沃特世方法转换计算器 <<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=134891632&type=DWNL>>

720007807ZH, 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