

使用Alliance™ iS Bio HPLC System对生物治疗药物的药典SEC方法进行现代化改进

Pawel Bigos, Robert E. Birdsall, Karen Nyholm

Waters Corporation

摘要

随着监管机构越来越注重方法生命周期管理，方法现代化过程由于需要将先进的系统技术和色谱柱技术整合到日常分析中，因此对于许多受法规监管的实验室而言是一项挑战。受法规监管的实验室通常依赖于几年前验证过的方法，虽然这些方法仍然耐用且有效，但我们仍然可以发现、评估更快、更耐用或者更灵敏的技术来取代这些方法，获得改进的机会。为满足这些需求，Waters™针对生物治疗药物推出了新一代HPLC系统：Alliance iS Bio HPLC System。这款新一代HPLC采用生物惰性流路和MaxPeak™高性能表面(HPS)技术，能够为生物制药应用提供稳定的分析。Alliance iS Bio HPLC System不仅保留了传统HPLC系统作为日常操作“主力”的稳定可靠特性，还新增了多项关键功能，例如直观的触摸屏控制、运行前检查，以及Empower™色谱数据系统(CDS)内的方法现代化工具，有利于减少常见错误。在本应用纪要中，我们将通过迁移美国药典(USP)通则<129>中概述的药典SEC方法并进行现代化改进来评估Alliance iS Bio HPLC System的优势。部署新一代生物惰性HPLC系统后，溶剂消耗显著减少，运行时间也有所缩短。此外，与传统HPLC系统相比，Alliance iS Bio HPLC System对大小异构体杂质的分离度和灵敏度更高。

优势

- 药典SEC方法的现代化改进显著减少了分析时间和流动相消耗
 - Alliance iS Bio HPLC System采用生物兼容性和生物惰性材料制成，非常适合SEC蛋白分析中使用的高离子强度流动相
-

简介

在HPLC分析中，药典方法常用于常规质量控制策略。然而，越来越多的人认为，这些方法是在大粒径色谱柱和高扩散系统普遍使用的时代建立的，在分离能力和效率方面已经过时。这关系到多个USP通则，为此，监管机构对USP通则<621>《色谱法》进行了更新。本次更新旨在与欧洲药典和日本药典协调一致，允许修改USP各论中的流速、色谱柱尺寸和粒径¹。QC科学家可以充分利用这些允许的变更，利用现代HPLC技术来提升方法性能，而无需对调整后的方法进行重新验证。

与此同时，Alliance iS Bio HPLC System（图1）是为生物制药应用设计的新一代HPLC平台。Alliance iS Bio HPLC System兼具生物兼容性和生物惰性，专为生物制药行业的QC环境而设计。这款仪器采用生物兼容性材料制成，包括钛、PEEK、MP35N[®]及其他有色金属材料，暴露于高离子强度的酸性流动相时能够耐腐蚀。该系统还在样品流路中采用了MaxPeak HPS技术，可消除分析物在金属表面的非特异性吸附。上述设计要素相结合，形成一套整体解决方案，消除了常规生物制药工作流程中金属敏感分析物分析的不可预知性。

本研究旨在评估使用Alliance iS Bio HPLC System迁移体积排阻色谱(SEC)方法并进行现代化改进的优势。选择USP通则<129>作为药典方法，因为其中概述了mAb分析的多种标准化分析程序。本章详细介绍在SEC分析中使用5 μm粒径色谱柱运行30 min等度方法²。为了评估Alliance iS Bio HPLC System的优势，我们在不做任何更改的情况下迁移了药典方法，并与传统HPLC系统进行了比较。此外，我们按照USP通则<621>中的指南对药典方法进行了缩放和修改，以适应现代色谱柱硬件尺寸。然后进行对比分析，评估新系统在性能和通量方面相较于传统系统有何提升。

alliance™ is | bio



图1. 配备可变波长紫外检测器的Alliance iS Bio HPLC System

实验

氯化钾(CAS 7447-40-7)购自Sigma Aldrich。磷酸二氢钾(CAS 7778-77-0)购自Acros Organics。磷酸氢二钾(CAS 7758-11-4)购自J. T. Baker。单克隆IgG系统适用性标准品和USP mAb参比标准品购自USP。所有USP mAb均用200 μ L流动相复溶，进样浓度10 mg/mL。

药典方法条件

液相色谱系统:	传统HPLC系统
检测:	$\lambda = 280 \text{ nm}$
色谱柱:	BioSuite™ Diol (OH) , 250 Å, 5 μ m, 7.8 mm x 300 mm色谱柱 (P/N: 186002165)
柱温:	30 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	20 μ L
流速:	0.50 mL/min
流动相:	10.5 g磷酸氢二钾、19.1 g磷酸二氢钾和18.6 g氯化钾溶于1 L水中 (0.20 M磷酸钾和0.25 M氯化钾) , pH 6.2
运行时间:	30分钟, 等度
色谱软件:	Empower 3, FR4

现代化改进后的方法1

液相色谱系统:	Alliance iS Bio HPLC System
检测:	TUV, $\lambda = 280 \text{ nm}$
色谱柱:	XBridge™ Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm , 7.8 × 150 mm (P/N: 186009961)
柱温:	30 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	10 μL
流速:	1.00 mL/min
流动相:	10.5 g磷酸氢二钾、19.1 g磷酸二氢钾和18.6 g氯化钾溶于1 L水中 (0.20 M磷酸钾和0.25 M氯化钾), pH 6.2
运行时间:	7.5分钟, 等度
色谱软件:	Empower 3.8.0

现代化改进后的方法2

液相色谱系统:	Alliance iS Bio HPLC System
检测:	TUV, $\lambda = 280 \text{ nm}$
色谱柱:	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250 Å, 2.5 μm , 4.6 x 150 mm +eConnect (P/N: 186009959RF)

柱温：	30 °C
样品温度：	8 °C
进样体积：	3.5 µL
流速：	0.35 mL/min
流动相：	10.5 g磷酸氢二钾、19.1 g磷酸二氢钾和18.6 g氯化钾溶于1 L水中（0.20 M磷酸钾和0.25 M氯化钾），pH 6.2
运行时间：	7.5分钟，等度
色谱软件：	Empower 3.8.0

结果与讨论

方法迁移

在QC环境中，实验室的首要任务是确保证验证过的方法在不同系统上保持一致的结果。这些实验室期望方法能够无缝迁移，并且在新的技术平台上也能发挥等效的方法性能。最直接的仪器迁移是将所有方法参数转移到新平台，并与传统系统比较，评估仪器性能。为简化方法迁移过程，沃特世开发了Intelligent Method Translator App (iMTA)，可通过Empower的“应用程序”菜单直接访问。如图2所示，iMTA可以转换各种系统的方法，并将泵、样品管理器、色谱柱室和检测器的关键参数自动转换为Alliance iS Bio HPLC System仪器方法的参数。只需点击几下鼠标，即可将旧的方法参数复制到新系统中，简化了繁琐的过程，消除了用户抄录错误的风险。



图2.iMTA应用程序可以从多个传统HPLC系统无缝转换方法条件，并将参数转换为 Alliance iS Bio HPLC System方法的参数。

为评估Alliance iS Bio HPLC System迁移方法的能力，本研究选择USP通则<129>中概述的SEC药典方法，因为该方法列出了可以用于不同系统之间比较的系统适用性标准。作为基准，该方法使用L59, 5 μm , 7.8 mm x 300 mm色谱柱在传统HPLC系统上运行，然后通过iMTA应用程序迁移至Alliance iS Bio HPLC System。图3展示了两个系统得到的色谱图，以及药典方法中列出的系统适用性标准。表中数据显示，两个系统均符合系统适用性标准，且系统之间的色谱图一致。方法迁移直接带来的好处之一是，在Alliance iS Bio HPLC System上观察到单体与杂质之间的分离度提高，证明系统扩散较低的现代LC对SEC方法的优势。分离度提高在低分子量物质(LMWS)中表现最为明显，因此能够更准确地定量杂质，如条形图所示。这些结果表明，Alliance iS Bio HPLC System可以运行药典SEC方法并产生相当的分析结果，无需进一步的方法优化。

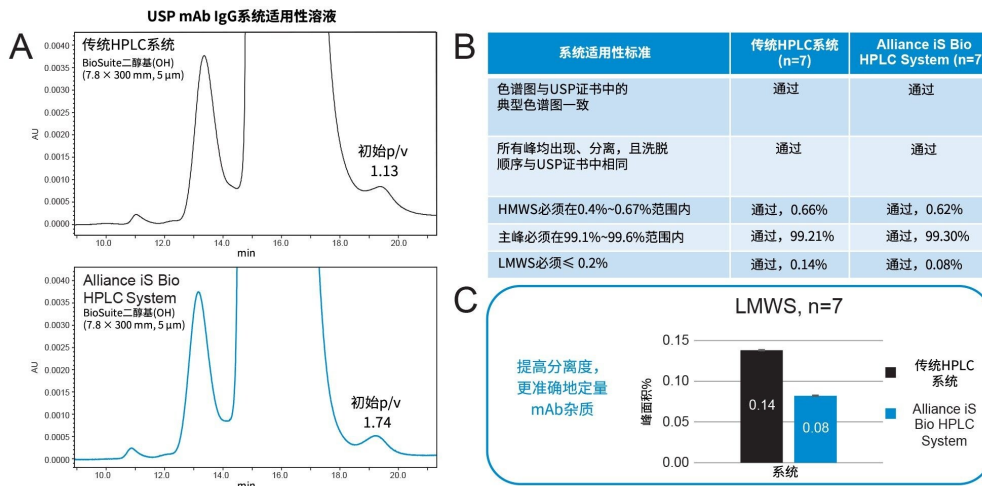


图3.A) USP mAb系统适用性溶液在传统HPLC系统和配备BioSuite二醇基SEC色谱柱的 Alliance iS Bio HPLC System上进行的SEC分离。B)两台仪器上n=7次进样的系统适用性结果。C)两套系统上LMWS回收率的条形图比较。

Alliance iS Bio HPLC System区别于传统HPLC系统的一个显著特点是，它配备一套减少错误的工具，旨在为受法规监管的实验室降低风险。在这些工具中，最重要的是运行前检查，可以通过触摸屏控制自助服务终端配置。图4为自助服务终端界面的截屏，用户可以在该界面中选择要在数据采集开始之前验证的自定义项目。这些检查包括验证色谱柱与仪器方法的匹配程度、评估溶剂液位和流动相的有效期，以及确认样品组中的所有样品瓶均已放入自动进样器。如果有任何可配置的运行前检查未通过，系统将暂停采集并停止液流，以节省耗材成本。这些运行前检查可减少常见的人为错误，避免产生不合格结果和重复分析，确保即使不做任何方法修改，Alliance iS Bio HPLC System也能较传统系统提高分析生产率。



图4.运行前可配置检查清单可在Alliance iS Bio HPLC System触摸屏界面的“设置”中找到

方法现代化

由于监管机构对方法生命周期管理的监管更加严格，方法现代化成为许多QC实验室面临的另一项挑战。同样，USP也在其应用纪要中认可了方法现代化，前提是遵守USP <621>指南³。作为新一代HPLC系统，Alliance iS Bio HPLC System能够兼容现代色谱柱硬件尺寸，有助于提高通量和柱效。要对方法进行现代化改进，必须缩放多个参数，使不同系统和不同色谱柱之间保持相同的分离效果。USP通则<621>中列出了允许的更改，但为了在色谱柱之间有效缩放方法参数，我们使用了沃特世方法转换计算器。在对USP通则<129>中的药典方法进行现代化改进时，我们选择了两种在分离能力（即柱长/粒径比）上与原始方法保持相同的现代SEC色谱柱。图5显示了更改后的方法参数，两种现代化改进的方法都使用沃特世方法转换计算器进行了缩放。

方法变量	USP方法	现代化改进后的方法1	现代化改进后的方法2
色谱柱	BioSuite二酮基(OH)色谱柱, 250Å, 5 μm, 7.8 mm × 300 mm	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250Å, 2.5 μm, 7.8 × 150 mm	XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱, 250Å, 2.5 μm, 4.6 × 150 mm
L/dp	60,000	60,000	60,000
流速	0.5 mL/min	1.0 mL/min	0.35 mL/min
进样体积	20 μL	10 μL	3.5 μL
运行时间	30 min	7.5 min	

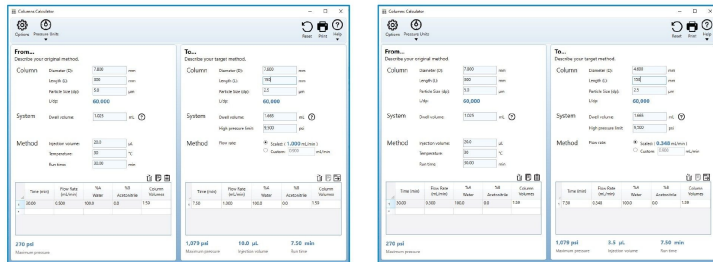


图5.使用沃特世方法转换计算器缩放两种现代色谱柱的方法参数，这两种色谱柱的柱长/粒径比(L/dp)与药典USP方法保持一致。

两种现代化色谱柱均为XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱，粒径和柱长完全相同，只是内径(ID)有所不同，一根色谱柱的内径为7.8 mm，而另一根的内径为4.6 mm。这些色谱柱仍归类为L59，但采用了键合至BEH™颗粒表面的聚环氧乙烷聚合物(BEH-PEO)，并结合了MaxPeak HPS，将SEC色谱柱的惰性提升至全新高度⁴。我们使用Alliance iS Bio HPLC System检验了两种缩放方法，并将结果与传统HPLC系统在药典方法条件下产生的数据进行了比较。图6和图7显示了三种方法分析两种USP mAb参比标准品的结果。每种色谱柱都有独特的优势，用户可以根据特定需求自行选择。

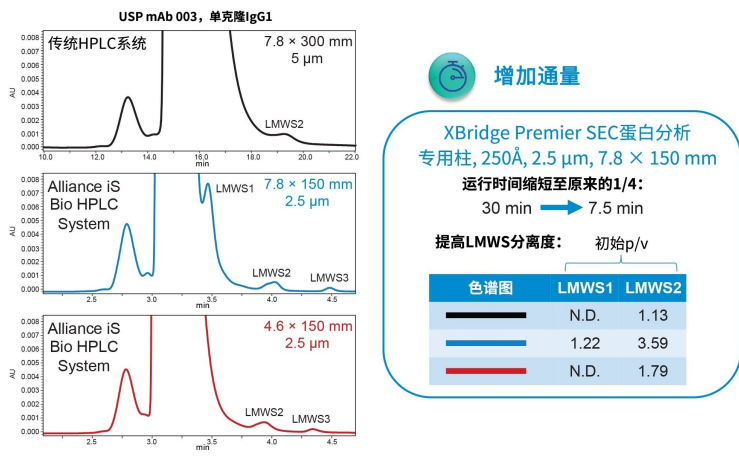


图6. USP mAb 003参比标准品在传统系统和配备XBridge Premier SEC, 250 Å, 2.5 μm, 7.8 x 150 mm (蓝色迹线) 和2.5 μm, 4.6 x 150 mm蛋白分析专用柱 (红色迹线) 的Alliance iS Bio HPLC System 上的SEC分离结果

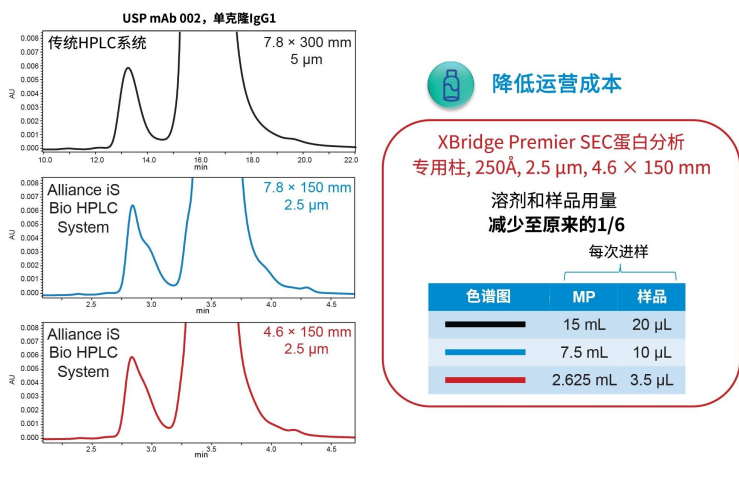


图7. USP mAb 002参比标准品在传统系统和配备XBridge Premier SEC, 250 Å, 2.5 μm, 7.8 x 150 mm (蓝色迹线) 和2.5 μm, 4.6 x 150 mm蛋白分析专用柱 (红色迹线) 的Alliance iS Bio HPLC System 上的SEC分离结果

重点关注图6中的7.8 mm内径XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱（蓝色迹线），它能够将药典方法的运行时间从30 min缩短至7.5 min（原来的1/4），因为粒径和柱长都减少了。在三种方法中，7.8 mm内径色谱柱的分离度也最高，能够分离出传统HPLC系统无法检出的LMWS峰。这些结果表明，对于主要目标是提高杂质分离度，从而准确定量大小异构体的用户而言，7.8 mm内径的色谱柱是理想选择。图7中使用另一种USP mAb参比标准品再次观察到两种缩放方法的选择性与药典方法保持一致。重点关注4.6 mm内径的XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱（红色迹线），与药典方法相比，该方法的流动相和样品消耗减少到原来的1/6。对于注重样品和流动相成本的用户而言，这款色谱柱是理想选择，能够大幅降低HPLC分析的操作成本。

结论

监管机构鼓励实验室用现代技术替代过时的分析仪器，在分析工作流程中探索现代化机遇。实验结果证明，Alliance iS Bio HPLC System能够对药典SEC方法进行迁移和现代化改进，以适应QC环境中当前和未来的生物制药工作流程。Alliance iS Bio HPLC System搭配XBridge Premier SEC蛋白分析专用柱使用可提高分离度，同时将分析时间缩短75%，流动相消耗减少82.5%。Alliance iS Bio HPLC System还包含许多新的软件功能，使工作流程更易于操作，并且如果用户出错，还能在数据采集开始之前予以提醒。总之，该系统让科学家能够紧跟生物治疗药物的发展进程，利用同样先进的HPLC仪器来获得准确和一致的结果。

参考资料

1. USP.Chromatography <621>.In: USP-NF.Rockville, MD: USP; Dec 1, 2022.
2. Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies.USP General Chapter <129>.2022.
3. Aggregation Analysis Using SE-HPLC and SE-UHPLC Methods in USP Chapter <129>.USP Application Note.2023.
4. Kizekai L, Shiner SJ, Lauber MA. Waters ACQUITY和XBridge Premier SEC 250 Å蛋白分析专用柱：惰性

特色产品

Alliance iS Bio HPLC System <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html>>

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

XBridge Premier色谱柱 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/columns/xbridge-premier-columns.html>>

720008290ZH, 2024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](#)