

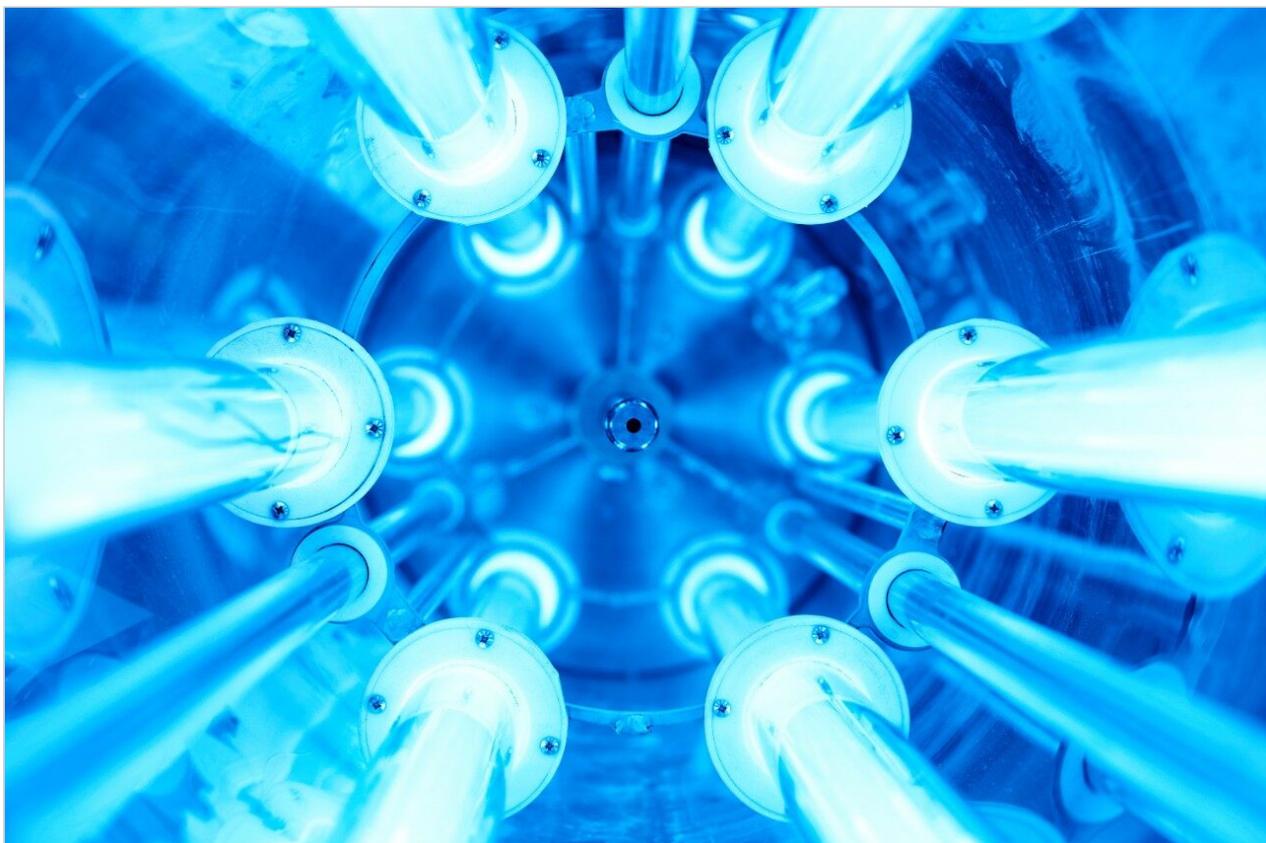
应用纪要

## 提高分析重现性和灵敏度需要考虑的仪器混合器要素

---

David Dao, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

## 摘要

作为药物质量体系的一部分，生物制药公司依靠耐用的方法在药品生产中提供一致且准确的结果。在达到或接近检测限的条件下运行检测器时，确定生物制药产品的可接受标准可能具有挑战性。尤其是基于液相色谱的紫外检测器，这些检测器对流经溶剂的光学活性和异质性非常敏感。基于液相色谱的混合器代表一种易于更换的硬件组件，其能够大幅缩短系统停机时间并减小对梯度的影响，同时降低由溶剂组成异质性引起的基线噪音，明显提高分析重现性和准确度。沃特世近期发布了340  $\mu\text{L}$ 生物兼容性混合器（部件号：700011554），该混合器已完成评估，在光学性能方面能够显著降低基线噪音，同时提高峰面积响应和积分精度。本研究在专用的液相色谱系统上使用50  $\mu\text{L}$ 普通混合器和340  $\mu\text{L}$ 生物兼容性混合器运行相同的肽图分析样品。信噪比提高多达50%，实验值 $>3$ ；选定峰的峰面积RSD%减小至1/5不止，达到2.0%以下，这些差异可能影响分析的动态范围和可接受标准。本研究证明了使用Waters 340  $\mu\text{L}$ 生物兼容性混合器在几乎不改变仪器配置的情况下优化色谱性能和检测器响应的优势。

## 优势

- 大体积混合器可降低光学基线噪音，从而提升分析性能
- 降低基线噪音有助于改善峰积分和定量精度

---

## 简介

整个生物制药行业的实验室常使用结合紫外(UV)检测功能的光学分析技术。其部分原因在于，蛋白质分子固有的吸收/发射特性非常适合UV检测，且UV检测器技术的成本效益较高，可轻松扩展和部署以满足各种组织的需求。在样品量有限或需要监测痕量杂质的情况下，尽量提高检测器响应以确保分析提供一致且准确的结果非常重要。对于液相色谱分析，通常在优化过程中评估梯度、温度、流动相组成和离子对类型等参数。除色谱柱以外，通常不评估液相色谱系统硬件对分析性能的影响，以保持工作效率。在受法规监管的环境中尤其如此，其使用的方法仅限于验证过程中定义的参数和硬件配置。考虑到这一点，溶剂混合器代表一种易于更换的硬件组件，无需对方法进行重新验证或确证，同时对分析性能具有显著影响。

流动相组分流经光学检测器时，其光学活性和异质性可能导致基线噪音升高，从而在检测限(LOD)和定量精度方面对分析性能产生不利影响。当使用较低的UV采集波长，并采用将缓梯度与低流速相结合的方法（例如在肽分析中）时，这种现象更为突出。有一种降低梯度分离中基线噪音的缓解策略，即增加溶剂混合室的体积，以减小流动相组成的异质性。沃特世液相色谱仪在设计时就考虑到为用户提供能够选择混合器产品组合的能

力，以促进高效的方法开发并大幅提升分析性能。本研究的目的是证明如何使用大体积混合器降低基线噪音，从而改善检测器响应和方法耐用性。

---

## 结果与讨论

为研究混合器体积对UV检测器基线噪音的影响，本研究针对所用的液相色谱平台和技术提供了一些考虑因素。选择ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统作为液相色谱平台，是因为它在梯度分离中能够提供非常高的混合准确度。ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统设计为通过三通组件合并液流，直接混合来自两个不同泵的溶剂，然后将混合后的溶剂引入色谱柱之前的混合室中，以提高流动相的混合准确度。为尽量减小系统变异性，使用同一套ACQUITY UPLC H-Class Bio PLUS二元生物兼容系统运行相同的流动相、色谱柱和样品，每个数据集仅更换混合器，比较50  $\mu$ L普通混合器与340  $\mu$ L混合器（部件号：700011554）得到的结果。本研究选择业内使用梯度时常用的反相色谱技术。流动相(MP)为包含0.1% (v/v)甲酸的水溶液（流动相A）和乙腈溶液（流动相B）。执行标准的135 min肽图分析：梯度为每分钟增加1.7%流动相B，流速0.200 mL/min，使用ACQUITY UPLC CSH C<sub>18</sub>肽分析专用柱（130Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm x 100 mm，部件号：[186006937 <https://www.waters.com/nextgen/xg/en/shop/columns/186006937-acquity-uplc-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1k.html>](https://www.waters.com/nextgen/xg/en/shop/columns/186006937-acquity-uplc-peptide-csh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1k.html)）分离沃特世胰蛋白酶酶解物标准品（部件号：[186009126 <https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)），在214 nm的波长下进行UV检测。为确保硬件更换后的基线响应稳定，运行包含4次空白进样的样品组，然后进样5次胰蛋白酶酶解物标准品。

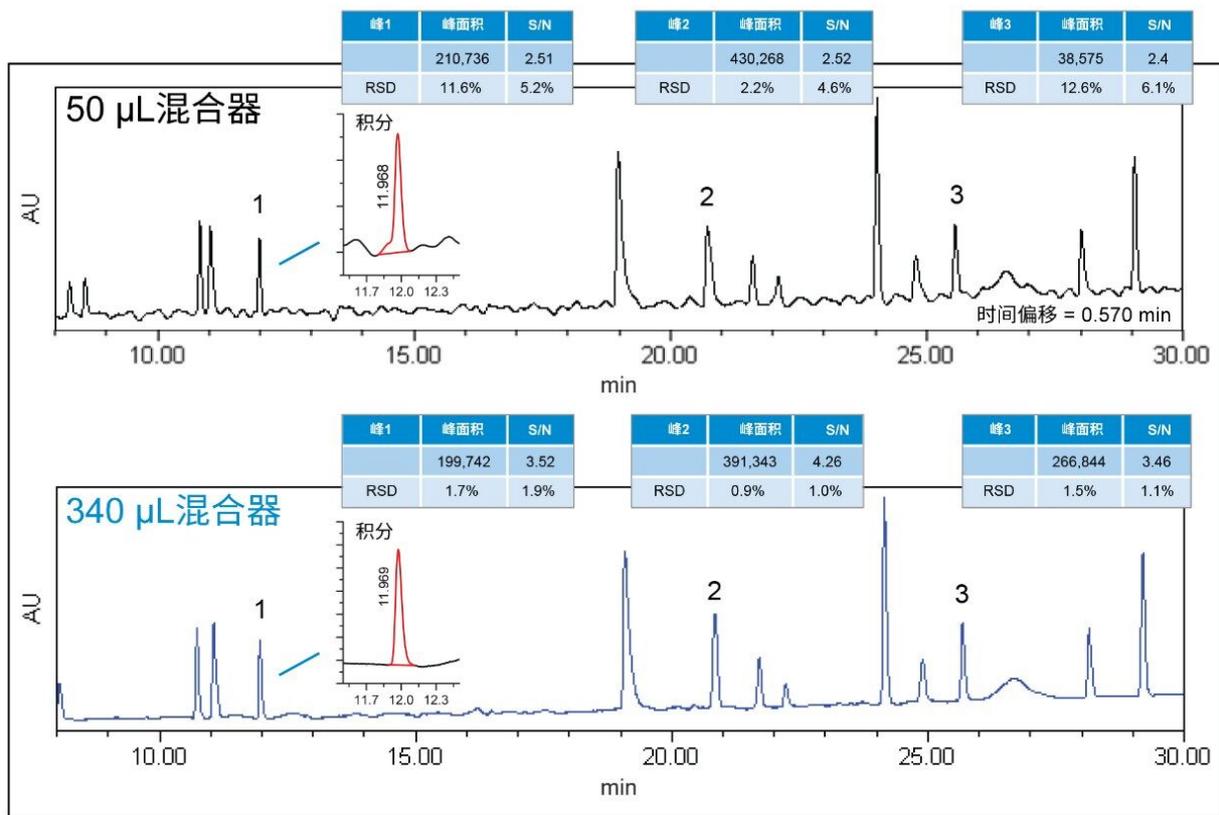


图1.采用两种体积的混合器获得的叠加色谱图，表明使用50 µL混合器与340 µL混合器在相同色谱条件下运行相同样品时，前者得到的基线噪音水平更高。基线噪音更低时，得到的信噪比实测值和重现性更高。

如图1所示，使用较大体积的混合器可明显降低基线噪音（底部色谱图）。选择一组峰用于计算峰面积和信噪比(S/N)，以量化混合器体积对分析性能的影响。如顶部色谱图所示，当使用较低体积的50 µL混合器时，所选峰的S/N计算值小于3，该S/N值被视为低于分析阈值的“实际值”。但是，使用较大体积的340 µL混合器时，观察到同一个峰的S/N>3，这种差异可能影响分析的动态范围或可接受标准的定义。此外，由于整个进样系列中的峰积分精度提高，因此在分析中使用较大体积的混合器所得到的峰面积重现性提高至8倍（插图）。这些结果证明，增加混合体积可缓解基线噪音，大幅提高UV检测器的响应，从而在色谱系统改变极小的情况下提升分析性能。

## 结论

在方法开发过程中，必须优化系统性能以便获得可靠且一致的结果。光学检测噪音或流动相组成异质性增加导

致的高基线噪音可能在峰信噪比和峰面积重现性方面对色谱性能产生不利影响。沃特世提供了混合器选件产品组合，可用于在仪器改变极小的情况下提升系统性能并满足应用需求，使用户能够开发出更耐用且重现性更高的方法。

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/513188>>

720007011ZH, 2020年9月