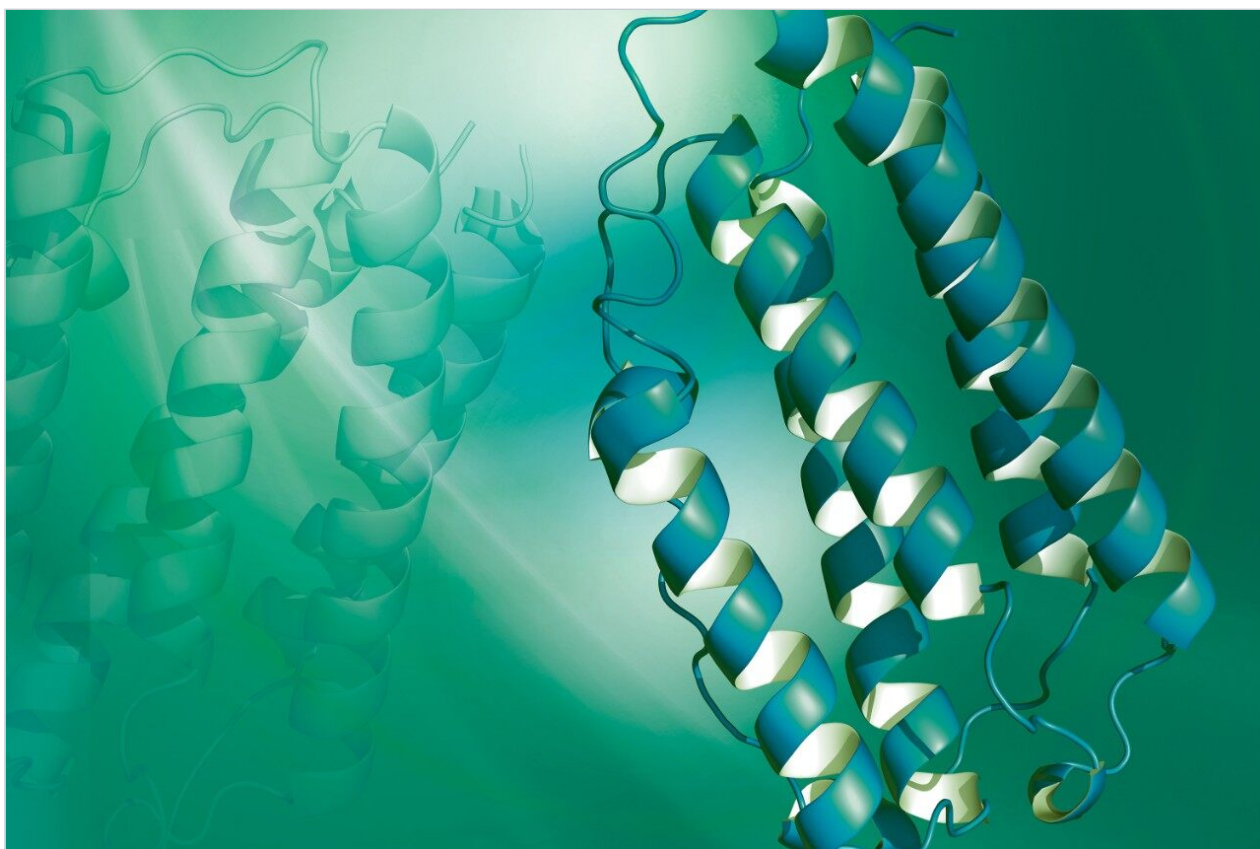


通过反相肽图分析方法的方法转换证明 ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系 统与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统的方 法等效性

David Dao, Brooke M. Koshel, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



摘要

随着更多现代液相色谱平台的推出，务必要证明新系统适合传统方法且所用分析方法可以在新系统与原始平台之间建立等效性。本研究利用RPLC肽图分析方法评估了方法从ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统转换至ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统时，两套系统之间的保留时间和峰面积重现性。当系统使用其标准出厂配置运行时，在不同系统之间观察到相似的性能。采用两套系统获得的13个肽峰的平均保留时间差异为约1.5 s。但是，液相色谱系统通常由于流路直径或配置（例如，溶剂混合器体积）的差异而在延迟体积方面有所不同，因此预计保留时间会发生漂移。为解决这些差异，例如两个液相色谱平台之间系统延迟体积不同的情况，可以使用“智能梯度起点”技术调整进样前的梯度以对齐保留时间，而无需更改梯度表。应用梯度补偿后，再次观察到两套系统获得相似的色谱性能。13个峰的保留时间正交图显示， R^2 值为0.99996，表明选择性在不同平台之间得到保留。峰面积百分比也在不同系统之间得以保持。这些结果证明，现有方法能够在两套液相色谱系统之间轻松转换，获得相似的色谱和定量结果。

优势

- 用户可以使用Empower中的“智能梯度起点”技术调整不同混合器体积对保留时间的影响，从而对齐不同液相色谱系统之间的保留时间
- 通过两套二元UPLC系统之间的保留时间和峰面积重现性证明方法等效性

简介

由于样品复杂程度的提高和新型药物的不断发展，生物治疗药物的分析越来越具有挑战性。开发稳定耐用的分析方法对于确保生成可重现的数据至关重要，当分析方法转换至外部合同组织或内部质量控制和生产场所时尤其如此。分析方法通常在多个供应商平台之间转换，但随着旧仪器平台的逐步淘汰，分析方法还应当适应新技术的引入。考虑液相色谱平台之间的性能差异是全面了解发送实验室和接收实验室之间差异的关键。

本研究将肽分析RPLC方法在两个不同的二元UPLC平台（即不锈钢ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统）之间转换，并在测试的条件下评估方法等效性。“生物兼容性”或“生物惰性”液相色谱系统在生物制药行业中备受关注，因为它们采用耐腐蚀的材料制成和/或包含无金属流路，可以减少与蛋白质和其他生物样品的表面相互作用。虽然耐腐蚀材料可能更适合SEC或IEX等应用，但许多实验室未配备专用仪器，因此同样的液相色谱系统也用于RPLC分离。ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统是一款生物兼容性二元液相色谱系统，利用生物兼容性流路和较大的管路内径，更适合生物基质

和流动相条件，并且配备二元泵，可实现更可靠的梯度输送。

实验

样品描述

将Waters胰蛋白酶酶解物标准品（部件号：[186009126 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)；NIST mAb标准品的还原和烷基化胰蛋白酶酶解物）复溶于0.1% v/v甲酸水溶液中，涡旋混合60 s，得到最终浓度为0.5 µg/µL的样品。所有样品均在进样前现用现配。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统（生物兼容性） ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统（不锈钢）
检测波长：	214 nm
样品瓶：	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery样品瓶
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 × 100 mm
柱温：	60 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 µL
流速：	0.5 mL/min
流动相A：	0.1% v/v甲酸水溶液

流动相B: 0.1% v/v甲酸的乙腈溶液

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.500	99.0	1.0	6
1.30	0.500	99.0	1.0	6
24.70	0.500	60.0	40.0	6
27.00	0.500	35.0	65.0	6
30.30	0.500	35.0	65.0	6
33.00	0.500	99.0	1.0	6
40.00	0.500	99.0	1.0	6

数据管理

色谱软件: Empower 3 FR4

结果与讨论

为评估方法转换性能，在专用于RPLC应用的不锈钢二元UPLC系统（ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统）上运行通用的RPLC肽图分析方法。两套二元液相色谱系统均在默认出厂配置下进行评估。这两套液相色谱系统在整个梯度范围内使对选的13个峰获得了相似的色谱分离结果（图1）。峰保留时间完全对齐，无需应用任何手动补偿，表明两套系统的梯度延迟体积非常相似。表1报告了四次进样中所选峰的平均保留时间。从表1可以看出，计算出的保留时间平均差异为1.5 s。这相当于延迟体积差异为12.5 μ L，该差异可以忽略不计，并且与通过独立实验确定的各系统的延迟体积差异一致¹。在评估系统内数据时，两套系统上13个峰的保留时间平均标准偏差分别为0.0017（ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统

) 和0.0012 (ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统)。这两套系统均获得了满足仪器规格要求的保留时间数据,同时产生了彼此相当的数据,可满足应用要求。

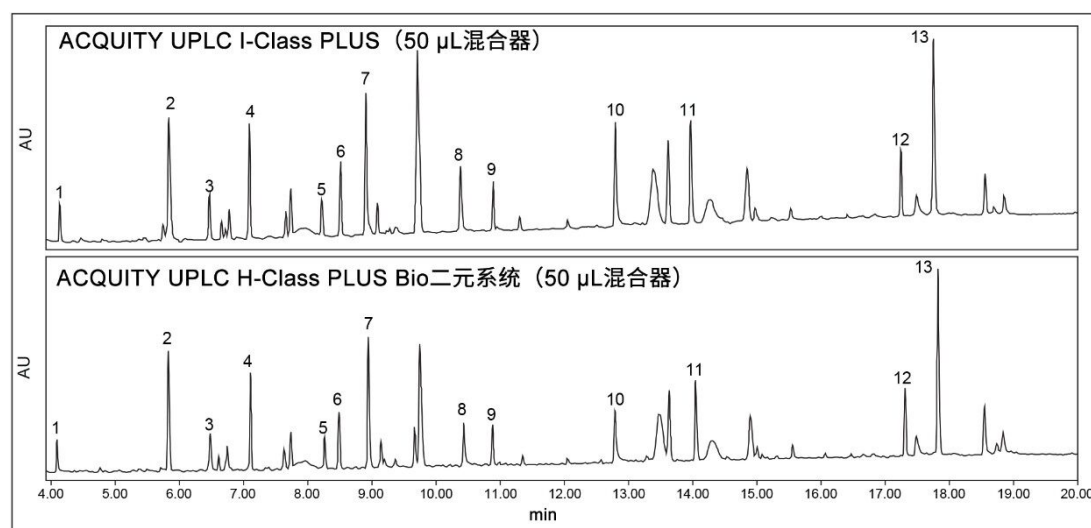


图1.使用默认出厂配置获得的NIST mAb胰蛋白酶酶解物标准品的RPLC色谱图。按照Hong和McConville概述的方法,测得各系统的延迟体积分别为89.4 μL (ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统)和95.8 μL (ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统)¹。这些值满足仪器规格要求,并且支持在色谱图中生成相似的保留时间。采用不同系统获得的色谱图在很大程度上相似,其中一些差异可归因于系统准备方案的不同。

峰编号	ACQUITY UPLC I-Class PLUS (N=4)				ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统(N = 4)		
	保留时间平均值	保留时间SD	保留时间%RSD		保留时间平均值	保留时间SD	保留时间%RSD
1	4.10	0.0019	0.046		4.06	0.0013	0.032
2	5.81	0.0024	0.041		5.80	0.0017	0.029
3	6.44	0.0017	0.027		6.46	0.0013	0.019
4	7.06	0.0024	0.033		7.08	0.0013	0.018
5	8.20	0.0014	0.017		8.24	0.0013	0.016
6	8.49	0.0026	0.031		8.47	0.0010	0.011
7	8.88	0.0017	0.020		8.92	0.0014	0.016
8	10.36	0.0013	0.012		10.41	0.0013	0.012
9	10.87	0.0022	0.020		10.86	0.0008	0.008
10	12.78	0.0021	0.016		12.77	0.0015	0.012
11	13.95	0.0010	0.007		14.03	0.0006	0.004
12	17.23	0.0005	0.003		17.30	0.0006	0.003
13	17.74	0.0013	0.007		17.82	0.0015	0.008

表1.在四次进样中得到的13种肽（图1）的平均保留时间(min)比较

运行相同方法时，由于不同液相色谱系统之间延迟体积的差异，观察到保留时间发生漂移的情况并不罕见。我们之前的研究已经证明了更大体积的混合器在肽图分析应用中的优势²。为观察可能使用更大的混合器且不同液相色谱平台之间延迟体积明显不同的情况，将ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统上的标准50 μ L混合器替换为340 μ L混合器，并按照之前概述的步骤运行相同的肽图分析方法。尽管采用ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统（50 μ L混合器）与ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统（配备340 μ L混合器）获得的色谱图相似，但现在观察到更大的保留时间漂移（图2A）。通常，分析方法的可接受标准会报告相对保留时间，以解决液相色谱系统具有不同延迟体积的问题，但是也可以应用“智能梯度起点”技术调整保留时间，而无需更改梯度表。在该示例中，两套系统之间的延迟体积差异为约296 μ L。借助“智能梯度起点”技术，现在可以利用该体积延迟进样之前的梯度起点（图2B）。现在，这种调整可以使标准ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统配置与配备340 μ L在线混合器的ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统之间的峰保留时间对齐（图2A）。

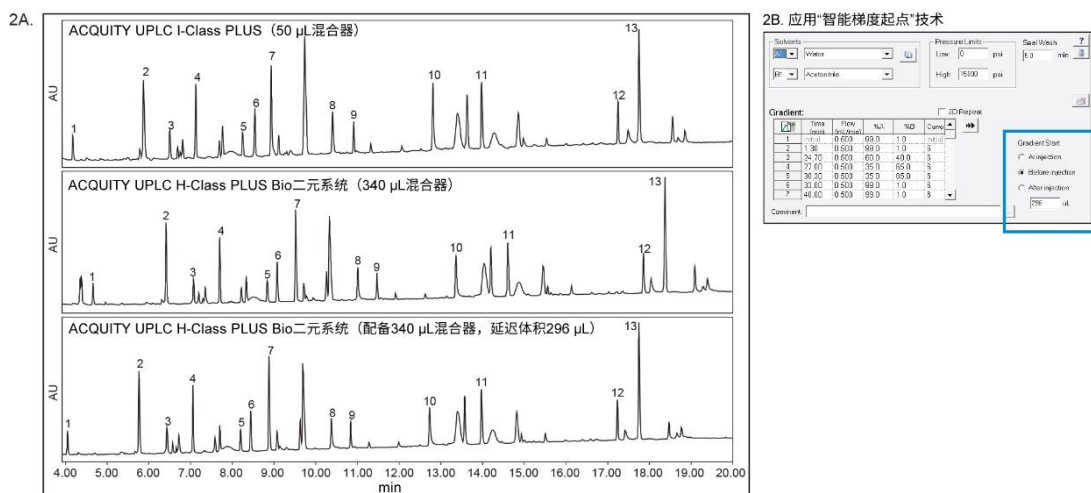


图2A.展示方法转换的色谱图，使用Empower软件中的“智能梯度起点”技术解决系统具有不同延迟体积的问题。图2B.梯度起点可设置在进样时、进样前或进样后，并在Empower软件中输入以 μ L为单位的体积。该值可通过计算根据Hong和McConville概述的方法¹所测得的系统延迟体积差异来确定，也可以在实验中通过RT偏移量(min) $\times$ 流速(mL/min)来确定，其中RT偏移量通过比较图2A中的顶部色谱图和中间色谱图确定。这两个值均与常见计算结果吻合，确定混合器体积的差异 $340 \mu\text{L} - 50 \mu\text{L} = 290 \mu\text{L}$ 。底部色谱图是在进样前应用梯度起点所得到的结果。

为进一步解析这些数据，图3绘制了利用两套系统在四个重复进样中得到的13个选定峰的保留时间，以观察选择性变化。 R^2 值为0.999996，表示在该应用中，不同平台之间的选择性高度相似。峰面积重现性是成功实施方法转换后预计得以保留的另一项指标。13种肽的峰面积百分比记录在图4中。两套系统得到的峰面积值相似。所有肽的峰面积差异均小于1%（峰7除外，其差异为约1.2%），其中有几种肽的峰面积差异为0.1%或更小。虽然在ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统上观察到大多数肽的标准偏差和%RSD更小，但两套系统均符合仪器规格要求，并表现出彼此相当的结果。

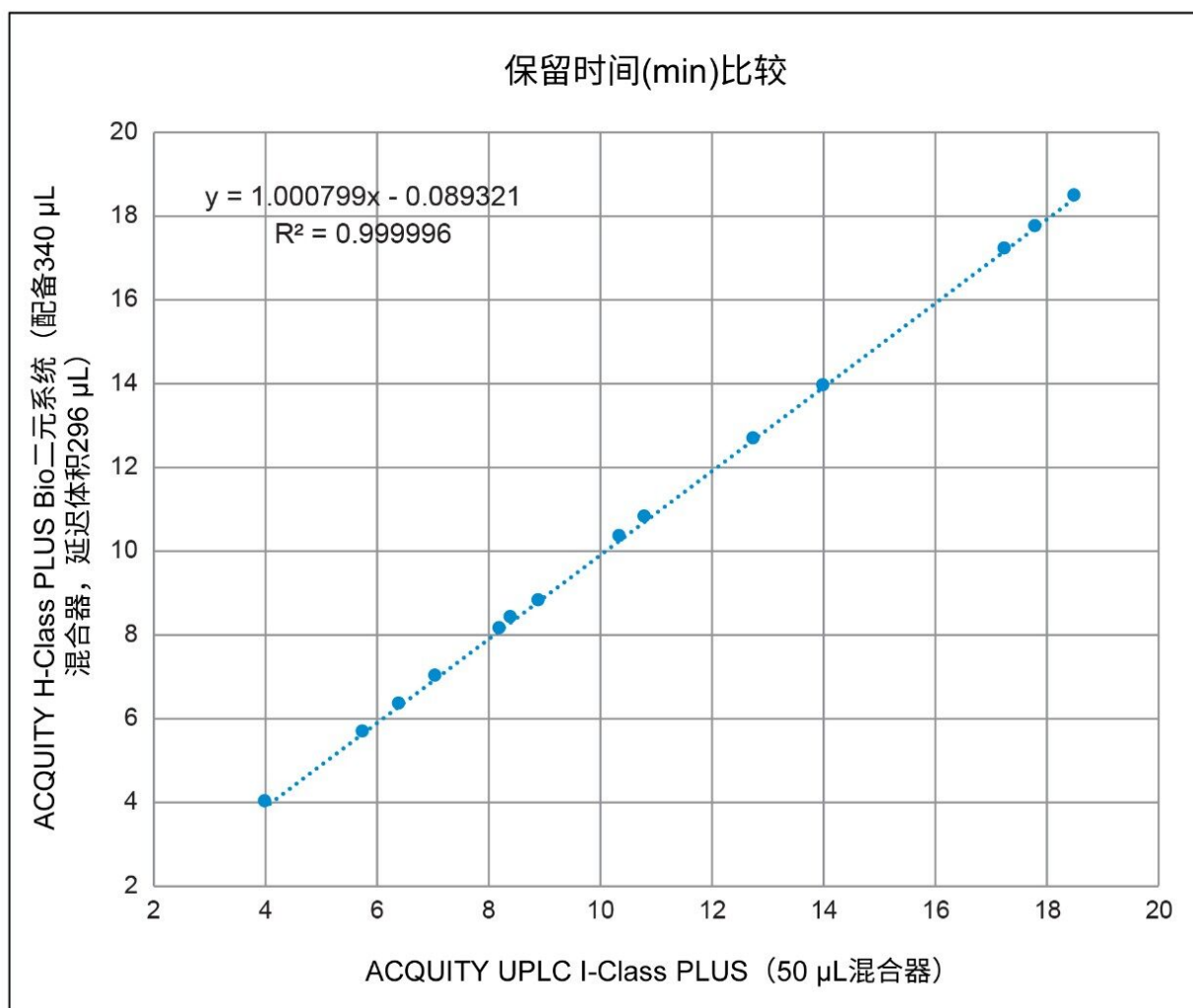


图3.采用ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统（配备340 μL 混合器和梯度延迟）和ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统得到的原始保留时间(min)比较。数据表明，选择性在不同系统之间得以保留。

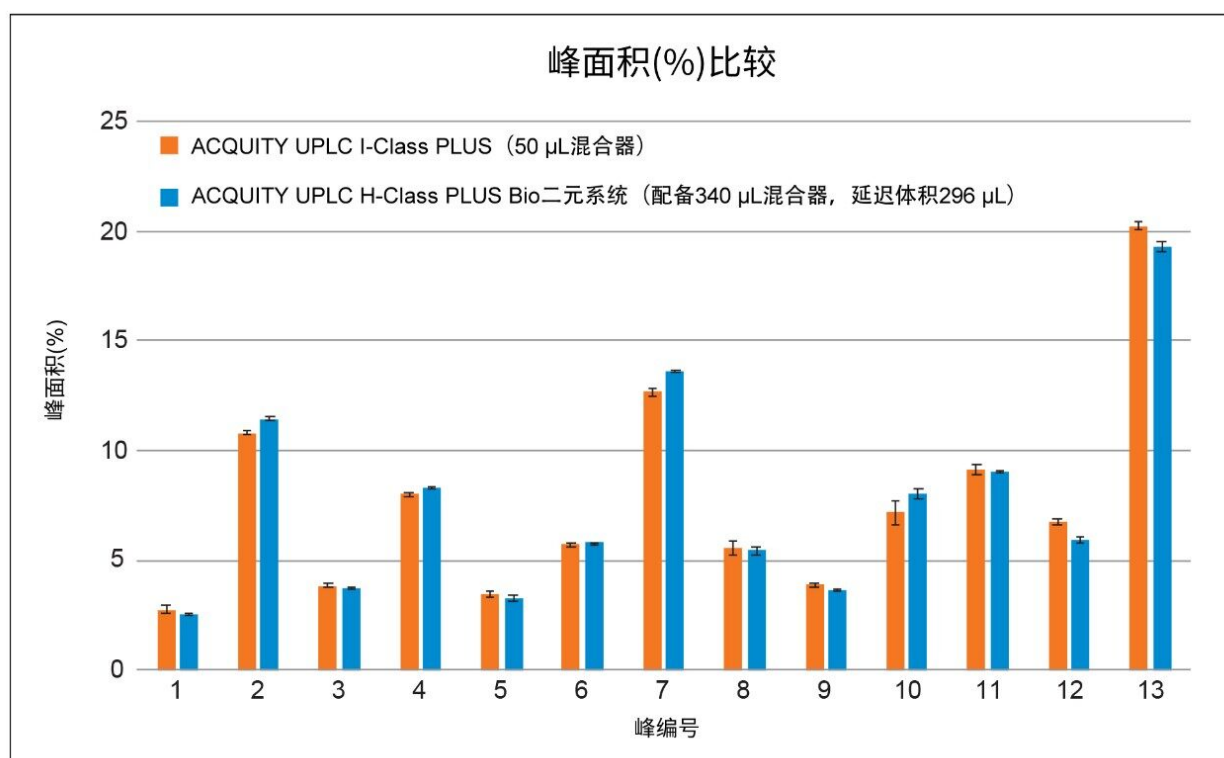


图4.采用ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统（配备340 µL混合器和梯度延迟）在四次进样中得到的峰面积(%)比较。数据表明，峰面积在不同系统之间得以保留。

结论

生物制药公司依靠稳定的液相色谱系统在药物产品的生产和测试中提供可靠的结果。ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统利用生物兼容性流路和二元泵，可提供更精密、准确的梯度输送。从ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统平台到ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio二元系统的方法转换表明，可以获得等效的保留时间和峰面积结果。还以两个液相色谱平台之间系统延迟体积不同的情况为例，展示了“智能梯度起点”技术能够对齐不同系统之间的保留时间。报告的标准偏差和%RSD值很低，表明批内精密度出色，系统之间的结果高度相似。

参考资料

1. Hong, P, McConville, PR.延迟体积与柱外体积的定义及其如何影响方法转换.沃特世白皮书, 720005723ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005723en.pdf>> .2016年5月.
2. Dao, D, Birdsall, RE, Yu, YQ.提高分析重现性和灵敏度需要考虑的仪器混合器要素.沃特世应用纪要, 720007011ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007011en.pdf>> .2020年9月.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

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

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

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

720007147ZH, 2021年2月