Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

IEX方法转换：采用ACQUITY Arc系统重现单克隆抗体分析方法

Brooke M. Koshel和Sean M. McCarthy
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 将方法无缝转换至ACQUITY Arc系统，无需改变方法参数
- 利用Arc Multi-flow path™技术轻松重现HPLC或UHPLC分离

沃特世解决方案

ACQUITY® Arc™系统
2489紫外/可见光(UV/Vis)检测器
Empower® 3色谱数据软件(CDS)

关键词

方法转换，ACQUITY Arc，
IEX，单克隆抗体

简介

如今，许多畅销的生物制药都是蛋白质类药物。与合成小分子药物的受控化学工艺不同，生物制剂生产采用的是活细胞，因此更易出现变异。为了确保产品质量和安全性，生物制药的整个生命周期通常需要应用多项分析技术。离子交换色谱(IEX)是一项常用的电荷变体监测技术，它可以反映生物制药在发酵、纯化和制剂等不同生产阶段发生的各种变化。

ACQUITY Arc系统属于四元LC产品组合系列，专为解决分析人员在整个产品测试过程中面临的结果一致性问题而设计。ACQUITY Arc系统采用了Arc Multi-flow path技术，可轻松重现传统的HPLC方法(流路1)，或者将现有方法转换为性能更出色的UHPLC分离方法(流路2)。本应用纪要将重点展示如何轻松重现现有的单克隆抗体离子交换分离方法并获得可重现的结果。

实验

LC条件

液相系统统:	配备2489紫外可见检测器ACQUITY Arc系统，流路1 配备四元泵和DAD检测器的Agilent 1100系列HPLC系统
吸收波长:	280 nm
采样速率:	20 Hz
色谱柱:	Dionex ProPac WCX-10 10 µm, 4.0 mm x 250 mm色谱柱
柱温:	30 °C
流动相A:	0.02 M MES，pH 6.0
流动相B:	0.02 M MES，0.4 M氯化钠，pH 6.0
样品:	1 mg/mL利妥昔单抗，溶解于含0.15 M氯化钠、0.025 M柠檬酸钠和0.06% (v/v)吐温80的溶液中，pH 6.5
样品温度:	5 °C
进样体积:	40 µL

梯度表:

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D
初始条件	0.700	100	0	0	0
0.01	0.700	100	0	0	0
5.00	0.700	100	0	0	0
10.00	0.700	83	17	0	0
95.00	0.700	55	45	0	0
100.00	0.700	0	100	0	0
102.00	0.700	0	100	0	0
102.01	0.700	100	0	0	0
115.00	0.700	100	0	0	0

数据管理

Empower® 3 CDS软件，SR2

结果与讨论

ACQUITY Arc系统能够轻松重现现有的IEX-HPLC方法并且具有出色的重现性

一般而言，分析人员在药品的整个生命周期中都需要对电荷变体进行监测，执行严格的工艺控制。因此，无论采用何种仪器进行测试，分析人员都必须确定系统间的差异，以便确保产品质量。理想情况下，采用的任何系统都必须能够提供符合产品分析指导原则的一致结果。为了研究将阳离子交换方法从传统仪器转换至现代LC平台的可行性，我们采用Agilent 1100系列HPLC系统分析了利妥昔单抗(一种单克隆抗体)，并将分析结果与ACQUITY Arc系统的分析结果进行了比较。所用方法选自USP药物标准集[1]，虽然该方法现已停用，但它仍是该制药行业的代表性方法。

我们未对上述方法进行任何修改，直接将其应用于Agilent 1100系列HPLC系统和ACQUITY Arc系统(图1)。如图所示，两个系统的色谱性能几乎完全一致。如图1的插图所示，该方法在两个平台间转换时，成功保持了同样的选择性和分离度。表1列出了经过数据处理得到的主峰相对保留时间，以及其它酸性和碱性变体的相对保留时间。虽然分析物在两个系统上的保留时间之间存在一定差异，但值得注意的是，所有主要色谱峰的相对保留时间基本上是一致的。

我们可通过计算多个参数来确定分析方法是否符合系统适用性标准，分离度就是其中之一。根据USP药物标准集1的规定，利妥昔单抗主峰(MP)与赖氨酸变体峰(1B)的分离度不得小于1.5。5次进样后，Agilent 1100系列HPLC系统的平均分离度为1.95 ± 0.02，而ACQUITY Arc系统的平均分离度为2.09 ± 0.02，因此这两个系统均符合标准。

要保证产品一致性，不仅需要系统之间具有重现性，确保同一仪器内的重现性也非常重要。图2展示了在ACQUITY Arc系统上采用上述方法条件，5次重复进样利妥昔单抗所得的叠加色谱图。在整个运行时间范围内，每张色谱图几乎完全重叠。插图中所示的放大色谱图进一步证实了该结论。

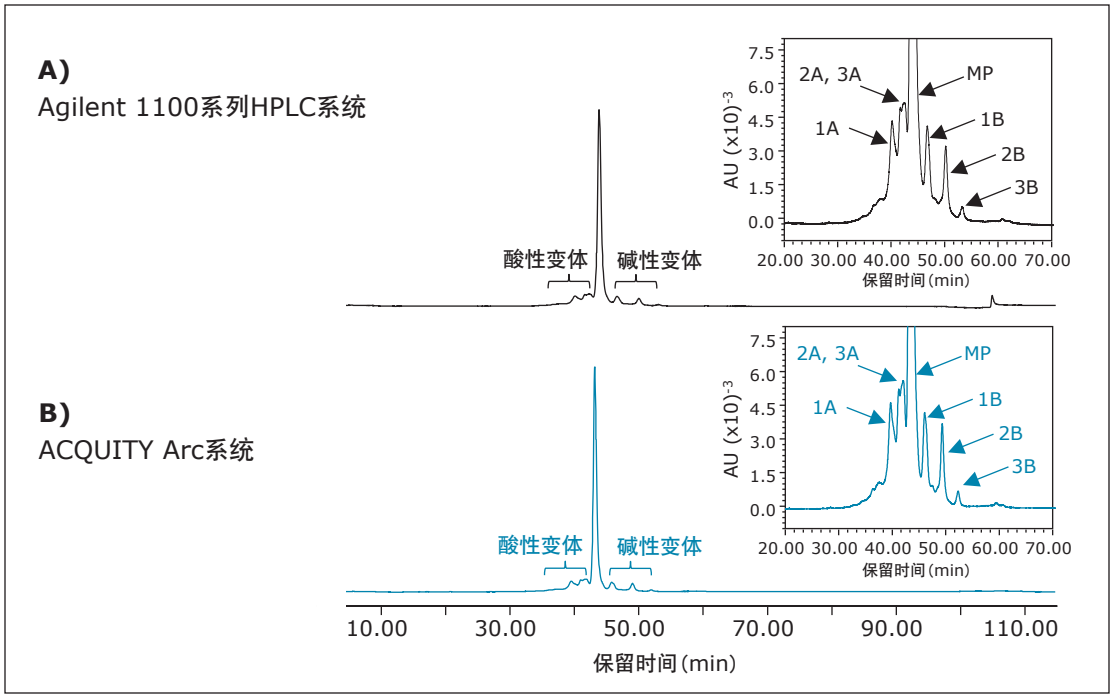

图1.IEX采集数据比较，使用A) Agilent 1100系列HPLC系统和B) ACQUITY Arc系统。插图显示了酸性和碱性变体的分离情况。利妥昔单抗主峰标示为MP。其它酸性(1A、2A、3A)和碱性(1B、2B、3B)残留物均进行了相应标示，并在表1中列出了各自的保留时间。

色谱峰	Agilent 1100系列HPLC系统		ACQUITY Arc系统		Δ
	保留时间 (min)	相对保留时间	保留时间 (min)	相对保留时间	
1A	40.06	0.91	39.52	0.92	-0.003
2A	41.59	0.95	40.96	0.95	-0.001
3A	42.37	0.97	41.78	0.97	-0.002
MP	43.82	1.00	43.10	1.00	0.000
1B	46.60	1.06	45.82	1.06	0.001
2B	50.01	1.14	49.08	1.14	0.003
3B	53.06	1.21	51.95	1.21	0.006

表1.在Agilent 1100系列HPLC系统和ACQUITY Arc系统上进行IEX分析所得的保留时间比较。酸性和碱性组分的峰标示见图1。Δ值表示两个系统的相对保留时间之间的差异。所有结果均为5次进样的平均值。

表2列出了对图2中的数据进行定量分析的结果，包括主峰、酸性变体和碱性变体的峰面积百分比，以及将这些值与Agilent 1100系列HPLC系统5次进样所得数据的比较情况。总体而言，两个系统获得的数据相当。两个系统所得的主峰、酸性变体和碱性变体的峰面积差异分别为0.53%、0.38%和0.90%。

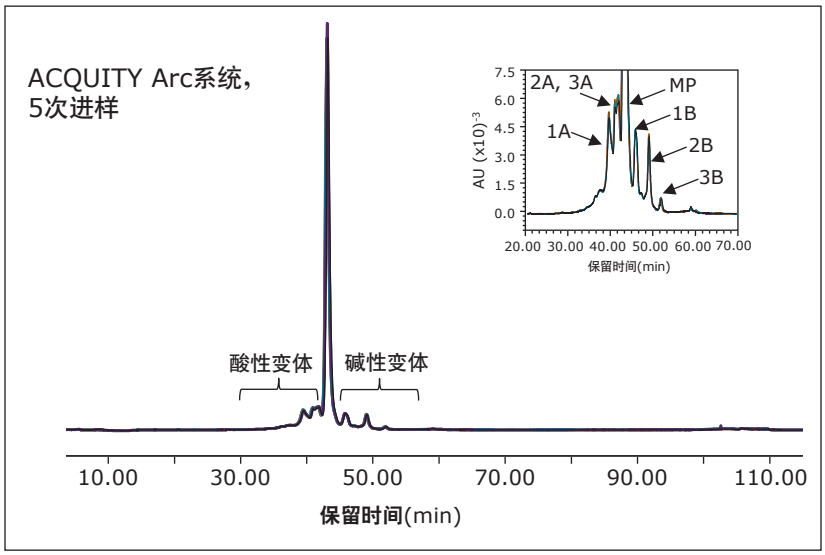

图2. ACQUITY Arc系统5次进样的IEX色谱图的叠加图。先于主峰洗脱的所有峰均为酸性变体，而在主峰之后洗脱所有峰为碱性变体。从插图中我们总共可鉴定出3种酸性变体(1A、2A、3A)和3种碱性变体(1B、2B、3B)，表2列出了总酸性变体和总碱性变体的汇总结果。

系统	相对峰面积(%)								
	酸性变体			主峰			碱性变体		
	$\bar{x}$	σ	%RSD	$\bar{x}$	σ	%RSD	$\bar{x}$	σ	%RSD
Agilent 1100系列HPLC系统	19.49	0.21	1.10	69.67	0.28	0.41	10.84	0.13	1.22
ACQUITY Arc系统	19.87	0.10	0.50	70.20	0.12	0.17	9.93	0.04	0.38
Δ	0.38			0.53			-0.90		

表2. Agilent 1100系列HPLC系统和ACQUITY Arc系统采集所得的IEX数据定量比较结果。酸性变体和碱性变体包括先于主峰洗脱以及在主峰之后洗脱的所有物质。Δ值表示两个系统所得峰面积的差异。所有结果均为5次进样的平均值。

结论

借助Arc Multi-flow path技术，用户可利用ACQUITY Arc系统模拟传统HPLC方法或将分析方法更新为UHPLC分离方法。本应用纪要证实，IEX方法能够从Agilent 1100系列HPLC系统轻松转换至ACQUITY Arc系统(流路1)。在保持所有方法参数不变的前提下，我们获得了相对保留时间几乎完全一致的色谱图。此外，在ACQUITY Arc系统上进行5次重复进样所得的检测结果显示出了极高的重现性。

参考文献

1. U.S. Pharmacopeial Convention <http://www.usp.org/global/medicines-compendium> (accessed March 2015).

扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY和Empower是沃特世公司的注册商标。
Arc和Multi-flow path是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司 中国印刷 2015年11月 720005529ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com