

使用UPLC在线监测纯化过程中的层析柱洗脱液

Tanya Tollifson

Waters Corporation

摘要

PATROL UPLC过程分析系统为工艺开发提供了参比标准方法，可直接放大到商业化生产，无需校准光谱传感器或将可疑样品送至离线QC实验室检测。本应用纪要介绍了如何应用UPLC监测纯化层析柱洗脱液。

优势

PATROL UPLC过程分析系统配备自动化的在线和旁线分析功能，通过提供有关工艺洗脱液的实时信息协助提升生产通量和产率。利用单个标准品样品瓶创建多点校准曲线有助于我们基于目标产物以及产物和工艺杂质的定量数据制定有关洗脱液馏分收集的实时决策。

简介

相较于其他行业，过程分析技术(PAT)对于制药和生物制药企业而言尤为重要，它是整个药物生产工艺的关键组成部分，有助于生产者更全面地掌握生产过程并确保产品质量的一致性，同时以更少的废物生成量获得更高的产率。

PAT需要我们在整个生产过程中进行实时检测，目的是验证工艺批次的质量并掌握该工艺中每个关键步骤的性能。

整个生产过程需要应用多种不同的传感器技术，用于测定各工艺批次的属性。部署适用的传感器用于监测已知的关键质量参数(CQA)有助于在已建立的操作设计空间内保持过程控制和运行情况良好。

通常情况下，诸如纯化之类的工艺步骤采用光谱传感器（例如近红外光谱(NIR)或拉曼光谱传感器）进行评估。这类技术能够提供关于纯化工艺的实时信息，但是无法有效分离和定量洗脱液流中的多种组分。

这些传感器的性能需要比对参比标准进行基准测试，多数情况下都以高效液相色谱(HPLC)作为参比标准，因为这是一种高选择性且高灵敏度的技术，线性动态范围更宽，并且能够定量复杂样品中的多种组分。

HPLC是药物QC实验室中使用较为广泛的技术。然而，HPLC的运行时间较长、系统操作复杂，不适用于常规的旁线或在线分析。

随着Waters UltraPerformance LC (UPLC)技术的问世，我们现在可以对生产过程样品实现近乎实时的色谱分析。UPLC分析通过集成的硬件和软件完成，系统设计十分简单，几乎不需要用户干预。

PATROL UPLC过程分析系统为工艺开发提供了参比标准方法，可直接放大到商业化生产，无需校准光谱传感器或将可疑样品送至离线QC实验室检测。本应用纪要介绍了如何应用UPLC监测纯化层析柱洗脱液。

实验

采用以下条件模拟层析柱洗脱液，并利用PATROL UPLC过程分析系统进行监测：

色谱柱：	Waters ACQUITY UPLC BEH 2.1 mm x 50 mm, C ₁₈ , 1.7 μm
洗脱液：	A：0.1%甲酸水溶液 B：0.1%甲酸乙腈溶液
梯度：	在1 min内从10%增加到25%；曲线4
流速：	1.0 mL/min
温度：	50 °C

进样体积：	5 μ L
检测：	243 nm；40 Hz；时间常数0.025 s
清洗液：	70:15:15乙腈/水/异丙醇
过程样品上样体积	1 mL（4倍传输管路体积）
运行时间：	1 min
运行周期：	2 min，40 s

结果与讨论

方法

生产过程API的纯化步骤决定了最终产物的纯度和产率。用于评估纯化过程中的层析柱洗脱液时，LC在选择性和灵敏度方面比光谱技术更胜一筹。采用UPLC来监测层析柱洗脱液，终产物API的质量能够得到更可靠的控制和优化。

为了展示使用PATROL UPLC过程分析系统进行在线监测的实用性，我们采用四元梯度泵模拟纯化工艺的色谱洗脱液。

为了模拟层析柱洗脱液，我们建立了梯度曲线，用于模拟纯化含两种杂质的API时产生的洗脱液。采用紫外可见光检测器测得的曲线如图1所示。分离曲线中有两种杂质，其中一种杂质与API实现了良好的分离，但另一种未与API完全分离。

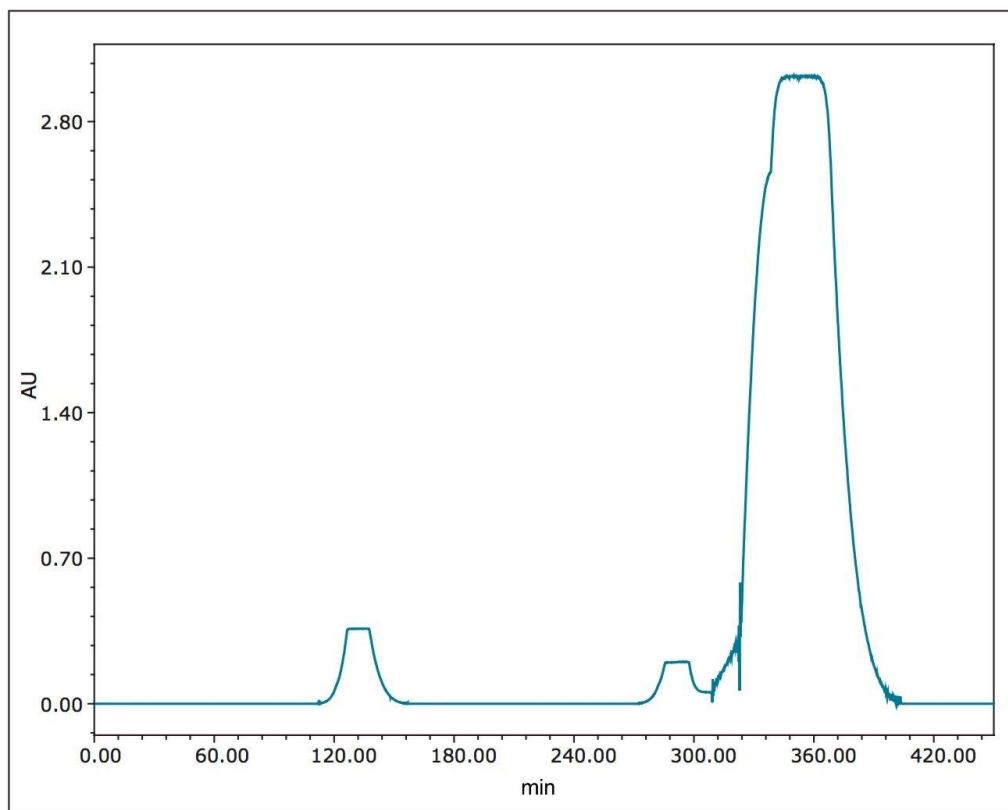


图1.模拟层析柱洗脱液的紫外可见光检测谱图(243 nm)。

UPLC技术

UPLC基于亚2 μm 色谱柱颗粒以及充分利用这些颗粒优势的系统技术。自UPLC问世以来，许多用户已成功将其HPLC QC方法转换为UPLC方法，在通量、灵敏度和分离度方面实现了极大的改善。

PATROL UPLC过程分析系统采用LC作为实时传感器，将这些重大改进引入了生产车间。该系统采用整体式设计，整合了UPLC技术、控制软件以及性能稳定的样品管理模块，该模块能够在生产环境中有效管理样品和 workflows。该系统的组件以及所有溶剂、废液和标准品均包含在一个完全符合生产环境要求的封闭外壳内。

该系统经过专门设计，可兼容在线（直接从工艺过程中自动采样）和旁线（从工艺过程中手动采样）分析。ACQUITY UPLC过程样品管理器(PSM)可连接工艺液流或反应器以执行实时分析和定量，无需用户干预。可将数据发送至分散控制系统(DCS)或实验室信息管理系统(LIMS)，实现全自动监测。对于旁线应用，系统配备有带条形码扫描功能的一站式界面，技术人员无需手动输入信息。此外，该系统还提供样品监管链功能，而此功能以符合21 CFR第11部分法规要求的Empower软件为基础。

应用

在模拟层析柱的纯化过程之前，我们通过样品瓶进样分析了系统适应性标准品(API)。10次重复进样的重复性（表1）完全符合方法要求。在洗脱液流路内安装三通接头，通过传输管路将样品传递到ACQUITY UPLC PSM的进样阀中。

	保留时间 %RSD	峰面积 %RSD	峰高 %RSD
API（非那西汀）	0.08%	0.06%	0.14%

表1.10次重复进样的重复性。

PATROL UPLC过程分析系统能够监测模拟层析柱的洗脱液，并成功定量了全部三个色谱峰，生成的曲线与紫外可见光检测器生成的曲线相同（图2）。

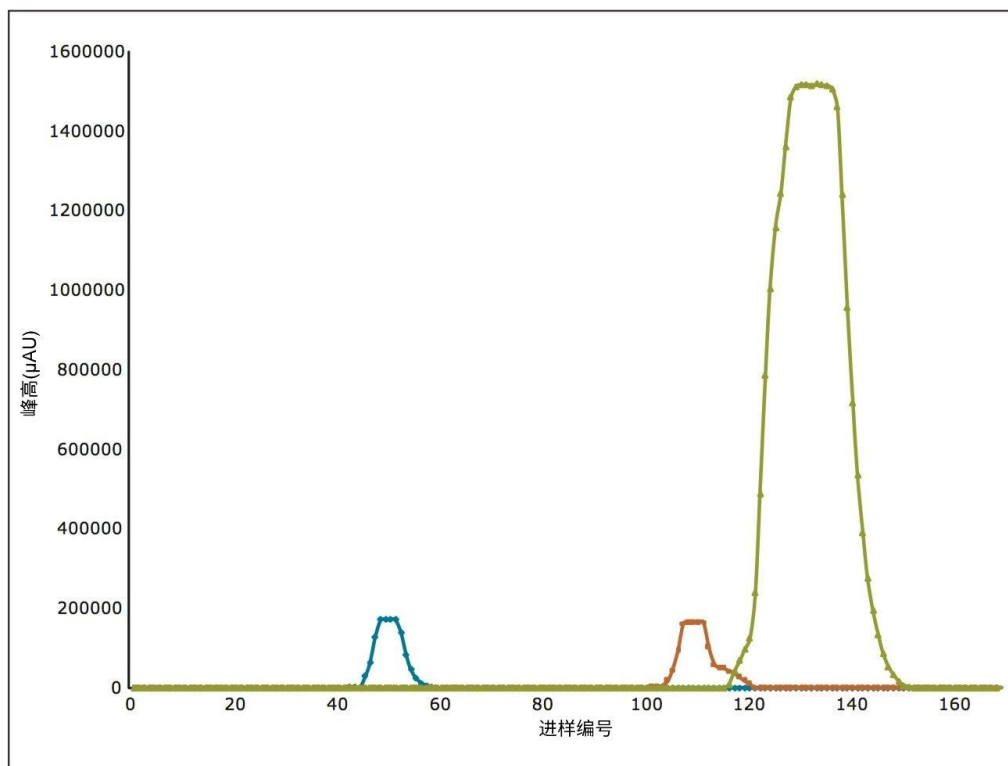


图2.UPLC监测模块生成的峰高汇总结果与紫外可见光检测器生成的谱图相似，但利用该谱图可以在未实现基线分离的情况下对单个峰进行定量。

在模拟过程的不同时间点提取的三幅提取色谱图（图3）表明，该系统可在纯化工艺的整个进程中对每种组分进行定量。相较于其他光谱方法，采用UPLC进行监测的显著优势是能够确定开始收集API的最佳时间点。

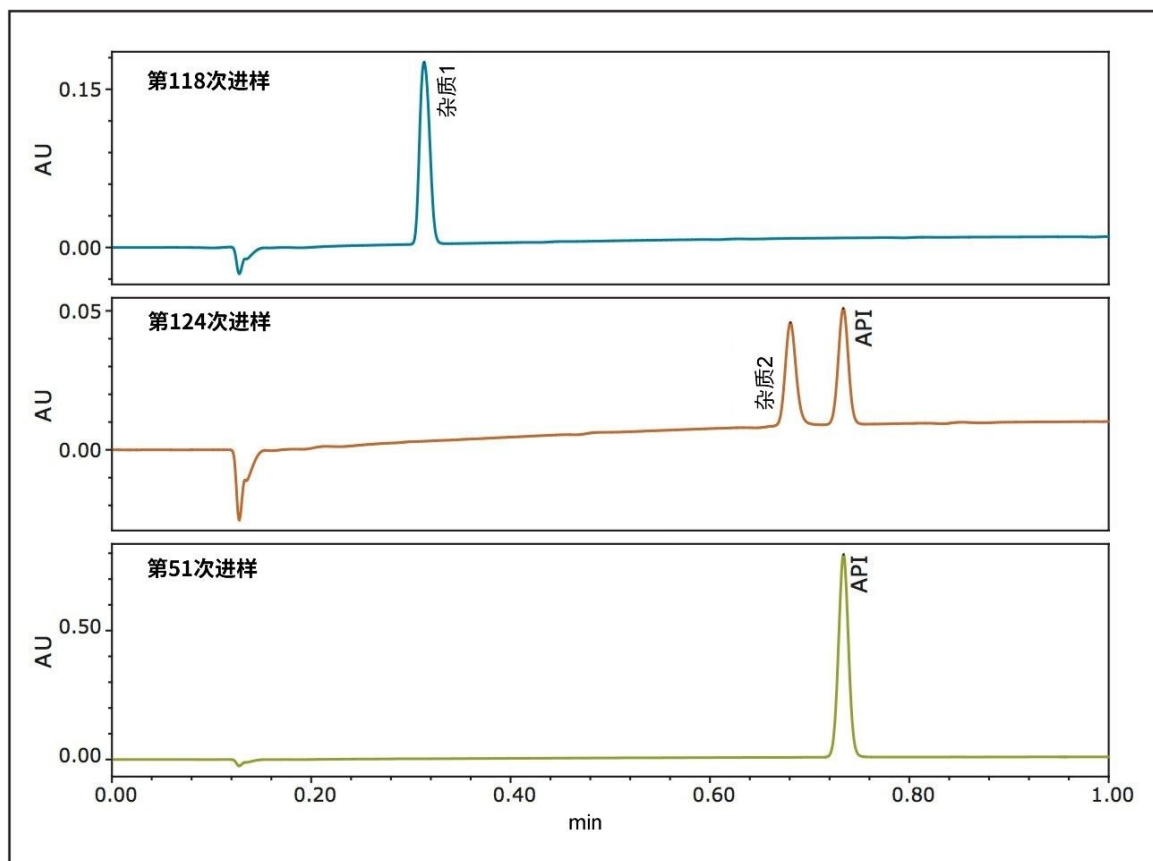


图3.分析模拟层析柱洗脱液采集到的单张色谱图有助于我们评估API的纯度，并且可用于触发馏分收集步骤。

图4是以层析柱模拟实验中杂质2的峰顶点所对应的时间为起点，以API峰顶点所对应的时间为结束点，将此期间所有进样的谱图叠加而成的叠加图。两个峰在UPLC色谱柱上的分离效果良好，可轻松实现定量，即使浓度差异极大也丝毫不受影响。表2汇总了通过PATROL UPLC过程分析系统每次单独进样的结果计算所得的峰面积。由此可确定杂质从层析柱上彻底洗脱的时间点，即使杂质含量与API含量相比非常低，也不会影响判断（图5）。

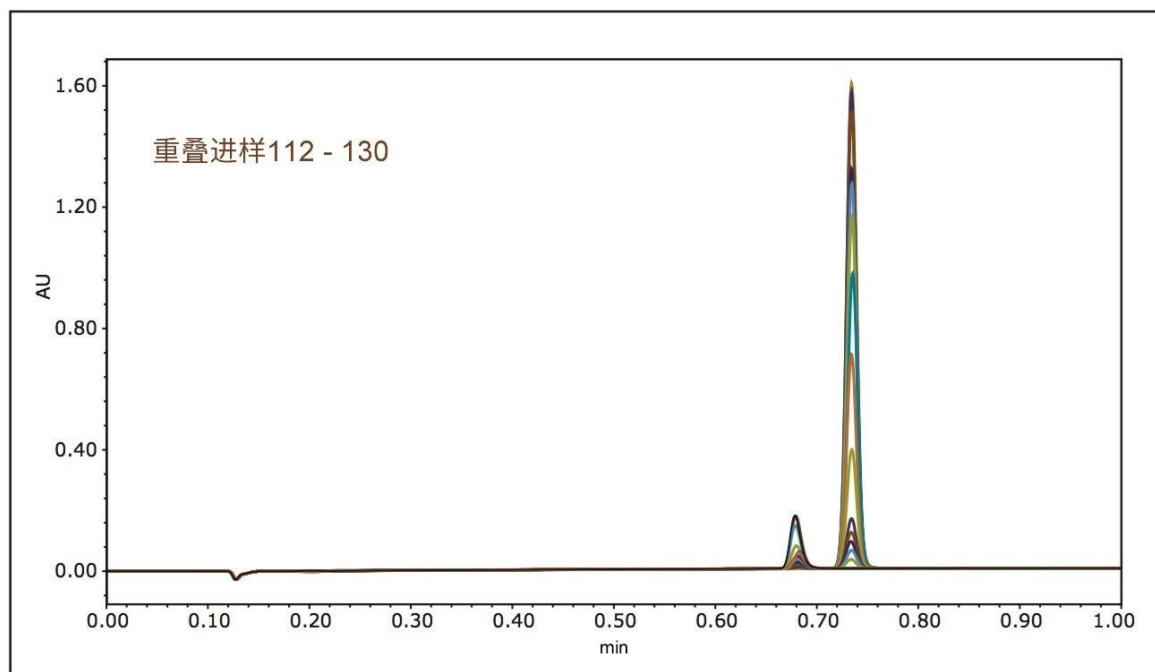


图4.以层析柱模拟实验中杂质2的峰顶点所对应的时间为起点，以API峰顶点所对应的时间为结束点，将此期间所有进样的谱图叠加而成的叠加图。

进样编号	水杨酸峰面积	非那西汀峰面积	$\frac{\text{水杨酸峰面积}}{\text{非那西汀峰面积}} \times 100\%$
112	131278	—	
113	107101	—	
114	57779	—	
115	42602	—	
116	40202	—	
117	33420	420	7957%
118	24705	21240	116%
119	17451	42089	41.5%
120	10129	62435	16.2%
121	3442	83320	4.13%
122	440	114626	0.38%
123	—	273784	
124	—	493515	
125	—	682528	
126	—	818540	
127	—	901826	
128	—	939711	
129	—	1072950	
130	—	1112468	

表2.根据每次单独进样的结果计算所得的峰面积汇总。

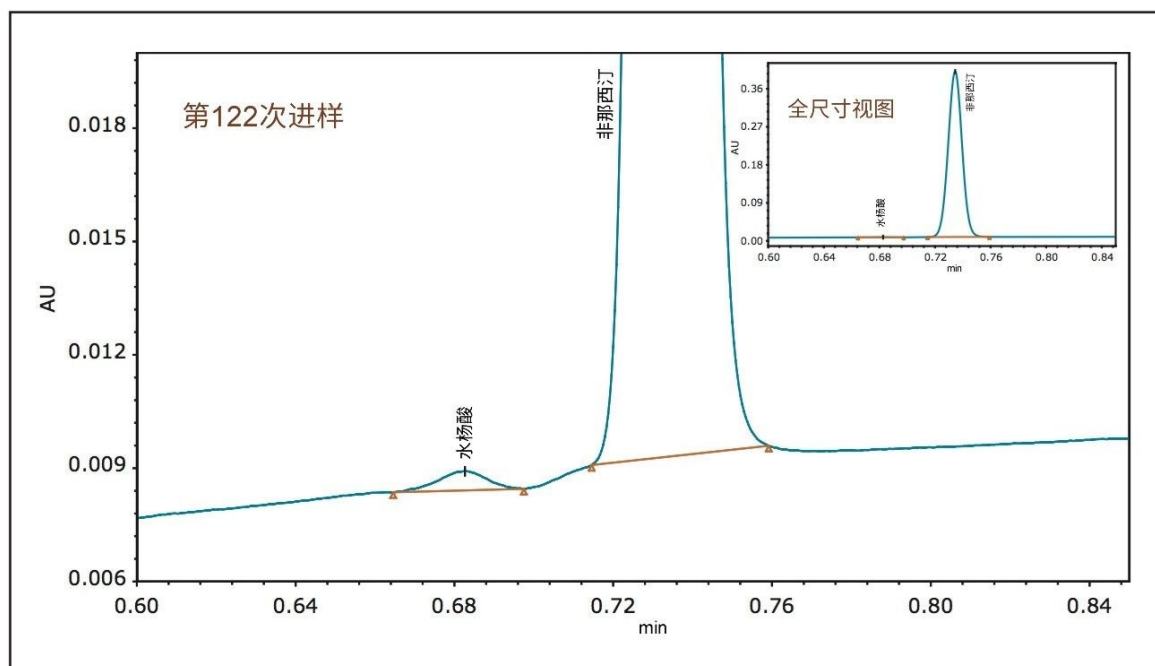


图5.确定所有杂质从层析柱上彻底洗脱的时间点，即使杂质含量与API含量相比非常低，也不会影响判断。

结论

- 利用UPLC监测层析柱洗脱液可同时定量API和工艺杂质，有助于尽可能提高产率和产品纯度。
- 在生产环境中部署PATROL UPLC过程分析系统可提高工艺效率，同时使相关人员能够全面掌握生产过程。
- PATROL UPLC过程分析系统的设计注重易用性，可满足生产过程样品具有挑战性且多样化的应用需求。
- 集成全自动的在线分析和一站式旁线分析功能，有效降低用户手动处理出错带来的风险。

特色产品

ACQUITY UPLC系统 <<https://www.waters.com/514207>>

PATROL UPLC过程分析系统 <<https://www.waters.com/10046886>>

Empower 3色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

Connections INSIGHT <<https://www.waters.com/1000345>>

NuGenesis SDMS <<https://www.waters.com/513068>>

ACQUITY UPLC过程样品管理器 <<https://www.waters.com/134796101>>

720002604ZH, 2014年5月



©2019 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