

快速CZE方法对EPO变异体的分析

Rapid CZE Analysis of Erythropoietin Variants

高铁¹、珈增²、李响³、陈泓序¹、任挺钧¹、王文涛¹

Tie Gao¹、Zeng Jia²、Xiang Li³、Hongxu Chen¹、Tingjun Ren¹、Wentao Wang¹

¹ CE & Biopharma, Sciex, China; ² 北京博思雅生化技术研究院; ³ 中国食品药品检定研究院重组药物室, 北京

¹ CE & Biopharma, Sciex, China; ² Beijing BioCEart Technology Institute, China; ³ Division of Recombinant Biological Products, National Institute of Food and Drug Control, Beijing, China

Key Word: Erythropoietin; Capillary zone electrophoresis; Rapid; Variants

Abstract: Erythropoietin (EPO) is a highly glycosylated glycoprotein hormone secreted by the kidney and liver, whose main function is to promote the production of red blood cells. EPO has a high content of glycosylation modification, leading to the microheterogeneity of EPO molecules and becoming different variants (isoforms) carrying different glycosylated chain. The type and content of variants are important parameters for quality control of EPO products. Capillary zone electrophoresis (CZE) is a basic separation model in capillary electrophoresis, which separates different analytes on the basis of the difference of charge/volume. Owing to the differences of glycosylation sites, number and glycoform of EPO variants, they can be isolated in CZE. Currently, the European pharmacopoeia uses CZE (Called EP-CZE) to characterize EPO variants. However, the capillary condition and separation will take a long time, and the repeatability of migration time is poor in traditional EP-CZE method. In this study, we developed a rapid CZE method (Called Rapid-CZE), which can realize rapid analysis of EPO variants and provides better repeatability. Compared with the EP-CZE method, the number and relative content of EPO variants are consistent. The resolution of the 5th and 6th variants is 1.39, which meet the requirements of European pharmacopoeia. The Rapid-CZE method has good repeatability. The RSD of migration time of each variant is about 1%, and the RSD of the corrected peak area% of the main variants are less than 5%. The Rapid-CZE method has faster separation time and capillary condition time than the EP-CZE method, which is very appropriate for the rapid analysis of EPO variants.

1、前言

促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是由肾脏和肝脏分泌的一种高度糖基化的糖蛋白类激素, 其主要功能为促进红细胞的生成。EPO具有较高含量的糖基化修饰, 导致EPO分子的微观不均一性, 成为携带不同糖链变异体 (Isoform) 的混合物。变异体的种类和含量是EPO产品质量控制的重要参数。毛细管区带电泳 (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) 是利用待测物质的电荷/体积的差异进行分离的一种毛细管电泳基本模式。由于EPO变异体糖基化位点、数量及糖型的差异, 它们会在CZE中得以分离。目前, 欧洲药典使用毛细管区带电泳的方法 (简称EP-CZE) 进行EPO变异体的表征。但此方法毛细管活化时间和分离时间均较长, 迁移时间重复性较差。本研究中, 我们开发了一种快速的CZE方法 (简称Rapid-CZE), 可以实现对EPO变异体的快速分析, 并提供更好的重复性。与欧洲药典CZE的方法对比, EPO的变异体数目和相对含量均获得了一致的结果。

2、仪器和试剂

2.1、仪器

毛细管电泳仪 (PA800 Plus生物制药分析系统, UV检测器, Sciex); 分析天平 (AL104, Mettler Toledo); 离心机 (Biofuge, Thermo); pH计 (FE20, Mettler Toledo)。

2.2、试剂与耗材

pH 4.0缓冲液、pH 7.2缓冲液和Initiator (NTMP试剂盒, Analis); 尿素 (Urea, U0631-500G, Sigma-Aldrich); 氢氧化钠 (NaOH, 795429-500G, Sigma-Aldrich); 二次去离子水 (Millipore); 熔融石英毛细管 (Sciex PN 338472); Ultracel YM-10 滤膜 (Millipore PN A11530)。

2.3 样品及前处理

欧洲药典EPO标准品 (Eur, 购自EDQM)。采用Ultrasel YM-10 滤膜对其进行超滤浓缩处理, 最终浓度为10 mg/mL。

3、CZE方法

毛细管: 熔融石英毛细管、50 μm 内径、80/90 cm有效/总长度; 进样: 0.5 psi, 12 s; 分离电压: 30 kV; 分离时间: 40 分钟; 背景电解质: buffer pH 4.0; buffer pH 7.2 = 9:1, 7 M尿素; 样品室温度: 10 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管温度: 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 214 nm。

新毛细管的预平衡: 0.1 mol/L NaOH, 20 psi压力冲洗5 分钟; Initiator, 20 psi压力冲洗5 分钟; 背景电解质, 20 psi压力冲洗10 分钟; 重复Initiator与背景电解质冲洗两次。每针之间的冲洗: 0.1 mol/L NaOH, 20 psi压力冲洗3 分钟; Initiator, 20 psi压力冲洗3 分钟; 背景电解质, 20 psi压力冲洗5 分钟。

4、结果及讨论

4.1、快速CZE方法对EPO变异体的分析

利用快速CZE方法对EPO标准品的变异体分析结果见图1。EPO标准品的8个变异体得到了基线分离, 迁移时间在31-36 分钟之间。P5与P6之间的分离度为1.39, 符合欧洲药典中其分离度不小于1的要求。

4.2 快速CZE方法的重复性考察

连续3针运行EPO标准品进行快速CZE方法的重复性考察。迁

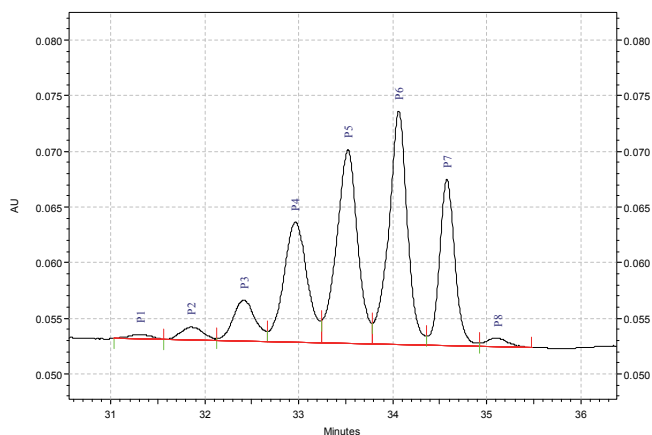


图1. 快速CZE方法对EPO标准品变异体分析的电泳图。电泳条件: 见第3节。

移时间和校准峰面积%的RSD见表1。每个变异体的迁移时间RSD均在1%左右, 主要变异体(校准峰面积%大于3%的峰)校准峰面积%的RSD均小于5%。

表1. 快速CZE方法迁移时间与校准峰面积%重复性的考察 (n=3)。

Pk#	Migration Time (MT, min)				Corrected Area Percent (CAP, %)			
	Rep1	Rep2	Rep3	RSD	Rep1	Rep2	Rep3	RSD
P1	30.77	31.25	31.31	0.95%	0.56	0.54	0.68	12.76%
P2	31.32	31.85	31.95	1.07%	1.84	1.85	2.19	10.17%
P3	31.88	32.41	32.5	1.04%	5.96	6.05	6.35	3.34%
P4	32.43	32.98	33.05	1.03%	18.34	18.39	18.66	0.93%
P5	32.99	33.56	33.63	1.05%	26.82	26.73	26.71	0.22%
P6	33.53	34.11	34.18	1.05%	28.54	28.27	28.08	0.82%
P7	34.04	34.64	34.7	1.06%	16.61	16.83	16.38	1.35%
P8	34.58	35.21	35.24	1.06%	1.33	1.34	0.96	17.90%

4.3、快速CZE方法与欧洲药典CZE方法分析结果的对比

分别使用快速CZE方法和欧洲药典CZE方法对EPO标准品进行了变异体的分析。两个方法均可分离得到8个变异体, 快速CZE方法迁移时间在31-36分钟之间, 而欧洲药典CZE方法在55-68分钟之间。P1-P8的迁移时间和校准峰面积%的比较结果见表2。8个变异体的校准峰面积%在两个方法中具有高度的一致性。

表2. 快速CZE方法与欧洲药典CZE方法对EPO变异体分析的结果比较。

Pk	Migration Time (MT, min)		Corrected Area Percent (CAP, %)	
	快速CZE	欧洲药典CZE	快速CZE	欧洲药典CZE
P1	30.77	55.36	0.63	0.56
P2	31.32	57.11	1.92	1.65
P3	31.88	58.77	5.98	5.18
P4	32.43	60.52	18.46	18.27
P5	32.99	62.38	26.77	28.11
P6	33.53	64.27	28.47	28.59
P7	34.04	66.15	16.59	16.68
P8	34.58	67.83	1.19	0.96

5、结论

本研究建立了一种对EPO变异体分析的快速CZE方法，并与欧洲药典CZE方法进行了对比。结果显示：

1. 快速CZE方法分离得到的变异体数目和相对含量与欧洲药典CZE方法一致；
2. 快速CZE方法对变异体 5、6的分离度不小于1，符合欧洲药典的要求；
3. 快速 CZE方法的重复性好，每个变异体的迁移时间RSD在1%左右，主要变异体（校准峰面积%大于3%的峰）的校准峰面积%的RSD均在5%以下。
4. 快速CZE方法的分离时间快，出峰在31-36分钟，而欧洲药典CZE方法出峰在55-68分钟，甚至更长。
5. 快速CZE方法的毛细管平衡时间快，35分钟即可完成，而欧洲药典CZE方法的平衡时间长达一天左右。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-9620-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX