

基于毛细管电泳技术的肉毒素纯度及等电点电荷异质性表征方法

Characterization method for purity and isoelectric point charge heterogeneity of botulinum toxin based on capillary electrophoresis technology

唐红梅, 陈泓序, 罗继, 刘冰洁

Tang Hongmei, Chen Hongxu, Luo Ji, Liu Bingjie

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Key words: 肉毒素、十二烷基磺酸钠-毛细管凝胶电泳、纯度、等电点

1. 前言

肉毒素(Botulinum Toxin)是一种由肉毒梭菌产生的神经毒素蛋白,广泛应用于神经系统疾病的治疗。作为治疗性蛋白药物,其质量控制至关重要,其中蛋白纯度及电荷异质性是关键的质量属性。蛋白纯度直接影响产品的安全性与有效性,而等电点电荷异质性则与产品的稳定性、活性及免疫原性密切相关。等电点(pI)是蛋白质重要的理化参数,对电荷异构体的分析已成为医药工业质量控制的重要环节。

毛细管凝胶电泳[CE-SDS]是一种基于分子大小差异进行分离的电泳技术,可在非还原[Non-Reduced, NR]和还原[Reduced, R]条件下对蛋白进行纯度分析。毛细管等电聚焦电泳[cIEF]则是一种根据蛋白各异构体等电点差异实现分离的方法,可用于等电点测定及电荷异构体分析。PA 800 Plus药物分析系统是同时满足CE-SDS以及cIEF应用的分析仪器,搭配相应的试剂盒,可实现对肉毒素样品纯度,等电点及电荷异质性的高准确性、高重现性分析。

本文采用CE-SDS和cIEF两种方法对肉毒素样品进行了全面的纯度,等电点及电荷异质性分析,并对两种方法的重现性进行了考察。

2. 实验部分

2.1 实验试剂和样品信息

CE-SDS实验试剂: IgG Purity Kit试剂盒包括: 熔融石英毛细管: 50 μm ID $\times$ 67 cm [SCIEX, 338451]、pH 9.0样品缓冲液[SCIEX, 5314719]、0.1 mol/L氢氧化钠[SCIEX, 338424]、0.1 mol/L盐酸[SCIEX, 5312349]、SDS凝胶缓冲液[SCIEX, PN A30341]、10 kDa内标[SCIEX, A26487]、巯基乙醇(Sigma, PN 97622)、碘乙酰胺(Sigma, PN 11149)、去离子水(Millipore);

cIEF实验试剂: cIEF Gel [SCIEX, 477497]、cIEF Peptide Marker Kit [SCIEX, A58481]、pH 3-10两性电解质[Cytia, 17-1319-01]、磷酸[Sigma-Aldrich, 345245]、氢氧化钠[Sigma-Aldrich, SS266-1]、醋酸[Sigma-Aldrich, A6283]、亚氨基二乙酸[Sigma-Aldrich, 220000]、精氨酸[Sigma-Aldrich, A5006]、尿素[Sigma-Aldrich, U0631];按照试剂盒说明书配制相应浓度的试剂。

样品: 某企业提供的肉毒素原液,样品浓度约1.0 mg/mL,理论pI约6.49。

2.2 样品前处理及试剂制备

CE-SDS样品前处理: 取两支1.5 mL离心管,分别依次加入50 μL 样品缓冲液[pH 6.5]、45 μL 样品[盐浓度小于50 mM],然后分别向两支离心管中各加入5 μL 2-巯基乙醇[还原法, CE-SDS-R]和250 mM的碘乙酰胺溶液[非还原法, CE-SDS -NR],充分涡旋,置于70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min。冷却到室温后,短暂离心去除气泡,吸取100 μL 混合液加入装有PCR内衬管的样品瓶中,作为待测溶液。

cIEF样品制备：配置方法详细请参考如下说明。

样品预混液制备：建议按照实际样品数量加1的原则，计算各个试剂所需的体积进行预混液的配制。每个样品中各个试剂的比例如下：20 μ L 8 M 尿素、35 μ L 1%HPMC、4 μ L 3-10两性电解质、10.0 μ L 阴极稳定剂、2 μ L阳极稳定剂和各0.5 μ L的pI marker [pI 9.5,5.5]、3 μ L去离子水。各取5 μ L样品与110 μ L样品预混液涡旋混匀，吸取110 μ L混合液加入装有PCR内衬管的样品瓶中，作为待测溶液。

2.3 仪器及方法

CE-SDS实验和cIEF实验均在SCIEX PA 800 Plus药物分析系统上完成。

CE-SDS方法实验条件：PDA检测器，采集频率：4 Hz，检测波长：220 nm；毛细管：熔融石英毛细管，50 μ m内径，20/30.2 cm[有效/总长度]；窗口狭缝：100 $\times$ 200 μ m；毛细管温度：25 $^{\circ}$ C；样品室温度：25 $^{\circ}$ C；进样条件：电压进样，-5 kV，40 s；分离条件：-15 kV，40 min。

毛细管针间冲洗和胶填充：0.1 mol/L氢氧化钠溶液在70 psi压力下冲洗3 min，然后用0.1 mol/L盐酸溶液在70 psi压力下冲洗1 min，再用去离子水70 psi压力下冲洗1 min，最后SDS凝胶分离缓冲液在70 psi压力下冲洗10 min。

cIEF方法实验条件：UV检测器，采集频率：4 Hz，采集波长280 nm；中性涂层毛细管，50 μ m内径，20/ 30.2 cm [有效长度/总长度]；窗口狭缝：100 $\times$ 200 μ m；毛细管温度：20 $^{\circ}$ C；样品室温度：10 $^{\circ}$ C；进样条件：25 psi，99 s；分离条件：25 kV，15 min聚焦；30 kV，30 min分离。

毛细管预冲洗：序列运行前毛细管先用350 mM的醋酸溶液进行50 psi冲洗5 min，去离子水进行50 psi冲洗2 min，再用cIEF gel进行50 psi冲洗5 min。每次运行开始时，350 mM的醋酸溶液进行50 psi冲洗3 min，再用去离子水进行50 psi冲洗2 min。

3. 结果与讨论

3.1 CE-SDS纯度分析结果

在非还原条件下[CE-SDS-NR]，肉毒素样品显示出清晰的主峰及若干杂质峰。电泳分离结果如图1所示，样品主峰尖锐对称，杂质峰可清晰辨识，主峰校正峰面积比例[CAP]为99.0%，表明样品纯度高。肉毒素本身由两条多肽链组成：重链[HC，约100kD]和轻链[LC，约50kD]，两者通过二硫键连接形成活性毒素，因此在还原条件下[CE-SDS-R]，能够清晰看到LC以及HC的峰，校正峰面积比例分别为35.10%，64.52%，还原纯度为99.62%。

3.2 方法重复性考察

方法重复性考察以非还原样品为例，对同一样品管进行连续6针重复进样，考察CE-SDS方法的重复性，谱图结果如图2所示，详

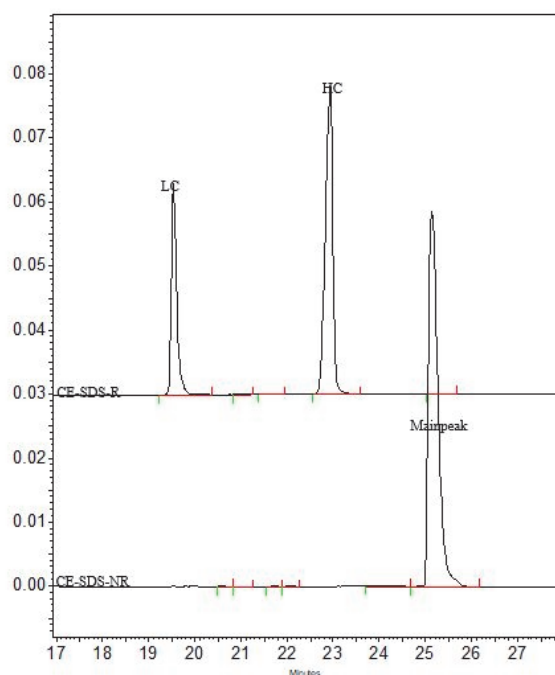


图1. CE-SDS法对肉毒素纯度分析的电泳图，CE-SDS-R[上]和CE-SDS-NR[下]。

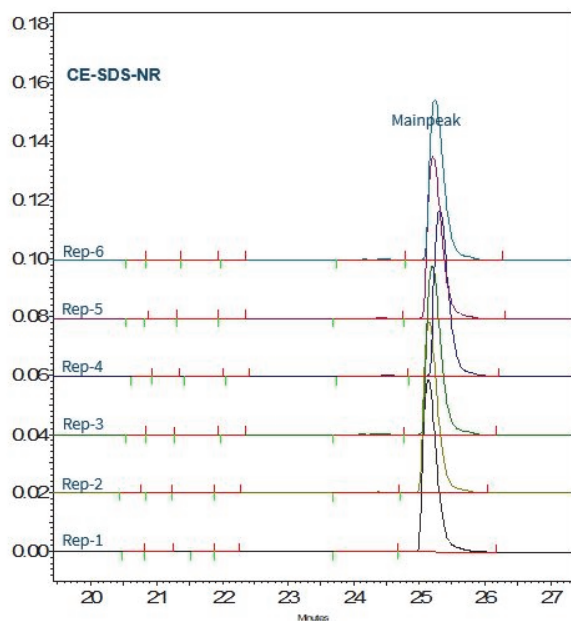


图2. CE-SDS-NR法对肉毒素纯度分析的重复性。

细数据结果如表1所示。CE-SDS方法连续6针进样，非还原结果中主峰迁移时间的RSD值为0.25%，主峰CAP的RSD值为0.05%，表明方法重复性良好。

表1. 肉毒素样品CE-SDS-NR纯度分析的6针连续进样数据结果统计表[n=6]

运行编号	MT	CAP
Rep- 1	25.18	99.10
Rep- 2	25.16	99.00
Rep- 3	25.20	99.01
Rep- 4	25.30	98.97
Rep- 5	25.29	98.96
Rep- 6	25.33	99.07
RSD%	0.25	0.05

3.3 cIEF等电点及电荷异质性分析结果

采用cIEF方法对肉毒素样品进行等电点及电荷异质性分析。肉毒素仅观察到少量电荷异构体峰，表明样品电荷异质性较弱。根据两个marker的pI值及迁移时间拟合线性标准曲线，R2值为1，表明线性很好；带入线性标曲计算主峰等电点，主峰计算等电点为6.46，与理论pI基本一致，样品整体等电点范围大致在6.33~6.46之间。

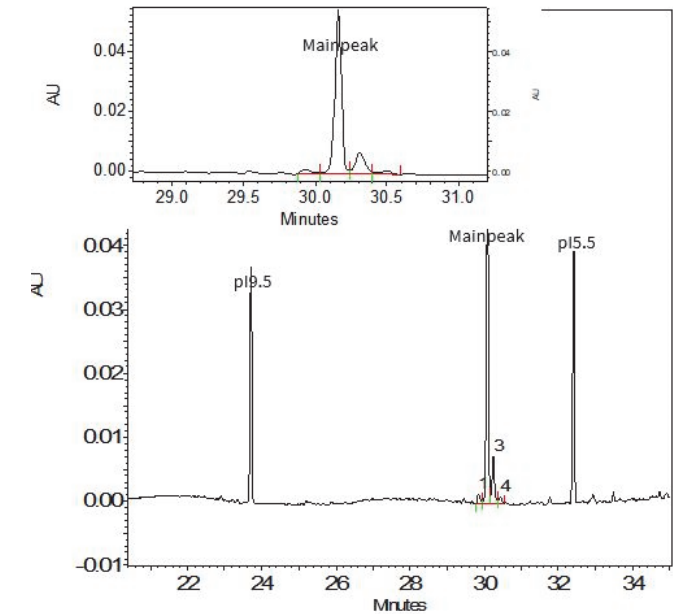


图3. CIEF法对肉毒素等电点及电荷异质性分析的电泳图

3.4 cIEF方法重复性

对一样品管进行连续6针重复进样，考察cIEF方法重复性，结果如表4所示。cIEF方法连续6针进样，主峰迁移时间的RSD值为0.12%，主峰pI的RSD值为0.49%，表明cIEF方法重复性优异。

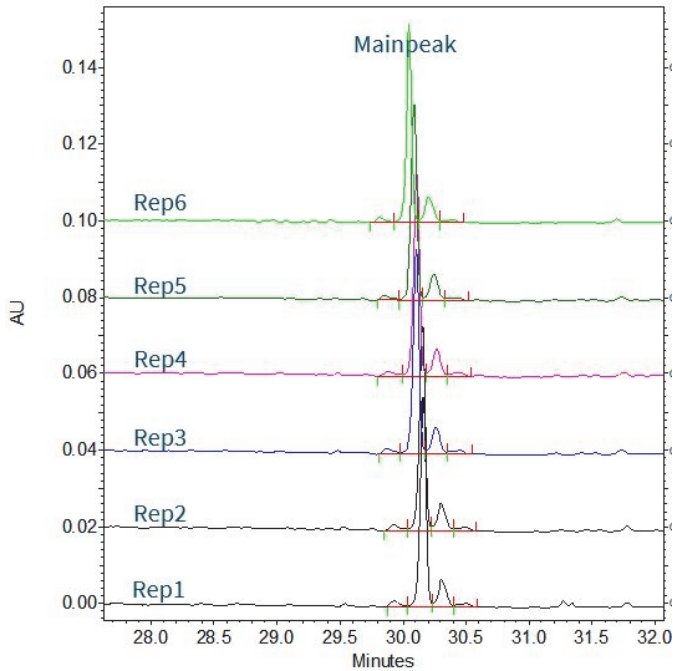


图4. CIEF法对肉毒素的等电点及电荷异质性分析的重复性。

表2. 肉毒素样品电荷异质性分析的6针连续进样数据结果统计表[n=6]

运行编号	MT	CAP
Rep- 1	30.30	6.53
Rep- 2	30.30	6.52
Rep- 3	30.26	6.47
Rep- 4	30.28	6.48
Rep- 5	30.24	6.46
Rep- 6	30.20	6.44
RSD%	0.12	0.49

4. 结论

本文借助PA 800 Plus药物分析系统，采用CE-SDS和cIEF两种方法对肉毒素样品进行了全面的表征，包括纯度、等电点及电荷异质性分析，主要结论如下：

- 1. CE-SDS方法表征肉毒素纯度：**非还原条件下主峰CAP为99.03%，还原条件下重链与轻链亚基清晰可见，表明样品纯度高且结构完整；
- 2. cIEF方法可有效测定肉毒素等电点及电荷异质性：**主峰pI为6.46，等电点范围在6.33~6.46之间，同时可观察到电荷异构体分布；
- 3. 两种方法重复性均优异：**CE-SDS以及cIEF方法中主峰的迁移时间RSD均小于0.50%、CAP的RSD均小于0.50%。
- 4. 可用作质控放行：**CE-SDS与cIEF联合使用，可为肉毒素样品的质量控制提供全面的纯度，等电点及电荷异质性信息，可作为样品检测放行方法。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2026 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-39617-A



SCIEX中国

北京分公司

北京市昌平区生命科学园科学园路
18号院A座一层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心

上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州办公室

广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)