

CE-SDS方法对多肽药物的纯度分析

Purity analysis of polypeptide by CE-SDS method

刘冬科, 王文涛, 陈泓序, 刘冰洁

Liu Dongke, Wang Wentao, Chen Hongxu, Liu Bingjie

SCIEX, 中国

SCIEX, China

关键词: CE-SDS; 多肽药物; 司美格鲁肽; 胰岛素

1. 前言

多肽药物通常由10-100个氨基酸组成, 分子量介于小分子化药和抗体类生物药之间。作为现代药物研发的重要组成部分, 多肽药物在代谢性疾病(如糖尿病、肥胖症)、肿瘤靶向治疗、心血管疾、罕见病及抗感染等领域取得了显著成功, 诞生了诸如胰岛素、司美格鲁肽、利拉鲁肽等一系列重磅药物。

十二烷基磺酸钠-毛细管凝胶电泳(CE-SDS)从2015年写入中国药典以来, 被广泛用于分析治疗性蛋白制品的纯度。随着多肽药物快速发展, 国家药监局药审中心(CDE)制定的《化学合成多肽药物药学研究技术指导原则(试行)》、中国检验检测学会(CITS)发布的《靶向治疗用多肽药物技术规范》(T/CITS 490-2025)都强调了采用多种不同原理的分析方法进行多肽药物的有关物质检查, 以避免单一方法的分离局限性。本文在CE-SDS药典方法基础上进行优化, 开发出适用于多肽药物的纯度分析方法, 以用于评估多肽药物的产品质量。

2. 仪器及方法

毛细管电泳仪PA800 Plus, 配备紫外检测器(UV, 波长200 nm)。毛细管长度: 20 cm/30 cm(有效/总长), 进样条件: -5kV, 20sec; 分离电压: -20 kV, 15 min; 毛细管温度20℃, 样品室温度20℃, 毛细管的预处理、针与针间冲洗程序: 使用碱性冲洗液在70 psi压力下冲洗3 min, 酸性冲洗液70 psi冲洗1 min, 去离子水70 psi冲洗1 min, 背景电解质70 psi冲洗5 min。

2.1 试剂及样品

IgG 分子大小变异体分析试剂盒(SCIEX, A10663), 包含

50 μm内径熔融石英毛细管、SDS凝胶缓冲液、0.1 M氢氧化钠、0.1 M盐酸。pH 6.8 SDS样品缓冲液(100 mM Tris-HCl, 含有1% SDS, SCIEX C44807)。β-巯基乙醇(Sigma, PN M7154)、碘乙酰胺(Sigma-Aldrich PN I1149)。

司美格鲁肽、胰岛素样品由某企业提供, 初始浓度不等, 用水将浓度调整至约1.5 mg/mL, 各取上述浓度的样品40 μL, 分别添加pH 6.8的SDS样品缓冲液60 μL、β-巯基乙醇/250 mM碘乙酰胺5 μL, 涡旋混匀, 70℃孵育10分钟。冷却至室温后2000 rpm离心2 min, 再将处理好的样品转移至样品瓶中进行电泳分析。样品溶剂同样进行与样品一致的处理, 作为空白对照。

3. 结果与讨论

3.1 多肽药物CE-SDS方法优化

在常规CE-SDS-UV方法上, 多肽药物出峰受到系统峰(鱼翅峰)较大的干扰。经荧光标记后在CE-SDS-LIF上检测, 目标峰也会受到过量游离荧光染料的干扰。探索发现使用pH 6.8的SDS样品缓冲液变性样品, 并在200 nm波长下检测, 可显著降低鱼翅峰的响应, 适当提升出峰速度(增大分离电压或反端进样)可进一步降低鱼翅峰附近的基线波动, 避免对目标峰的干扰(未展示图谱)。

3.2 司美格鲁肽纯度分析结果

司美格鲁肽由31个氨基酸组成, 分子量约4.1 kDa, 含一对链内二硫键。图1展示了非还原CE-SDS的纯度分析效果, 参考空白对照对样品目标峰进行合理积分, 可观察到司美格鲁肽2样品(光照14天处理)较司美格鲁肽1(4度冷藏避光存放)主峰占比明显下降, 纯度由99.37%降低至91.00%, 聚体峰占比升高, 由0.63%升高至9.00%, 该方案能够准确地监测到样品纯度变化。

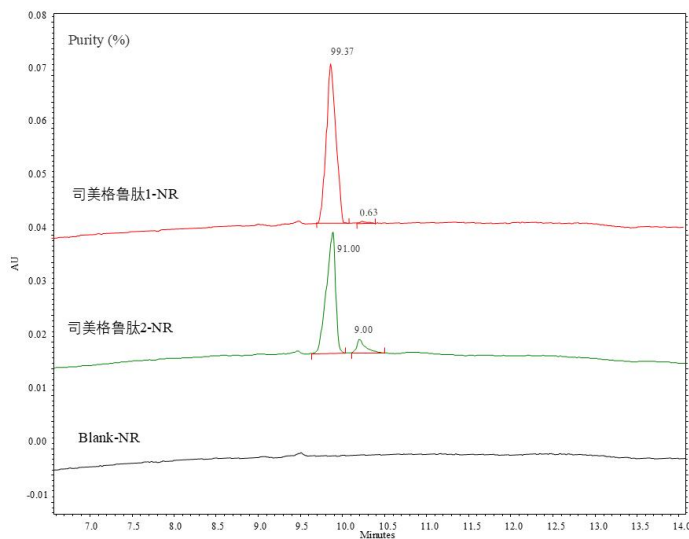


图1. 司美格鲁肽纯度分析电泳图（司美格鲁肽1：4度冷藏避光存放；司美格鲁肽2：光照14天处理）

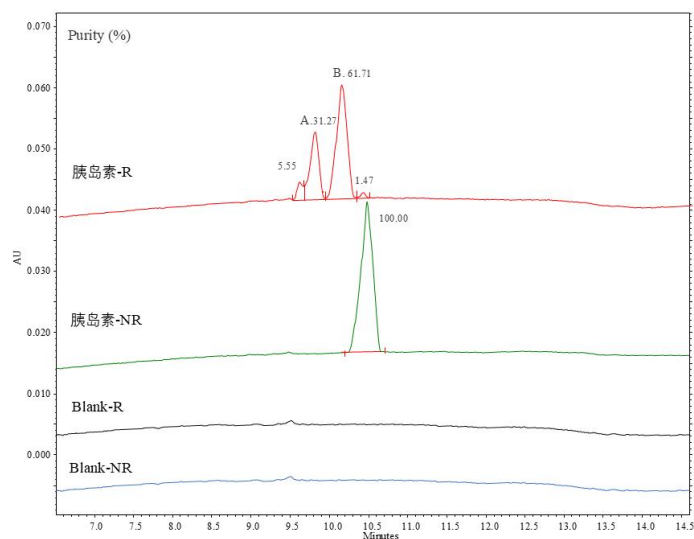


图2. 胰岛素纯度分析电泳图

3.3 胰岛素纯度分析结果

胰岛素由两条肽链通过两对链间二硫键组成，A链21个氨基酸（约2.4 kDa，含一对链内二硫键），B链30个氨基酸（约3.4 kDa），共51个氨基酸，分子量约5.8 kDa。图2展示了胰岛素在还原、非还原CE-SDS下的纯度分析效果，参照空白对照对目标峰进行合理积分，非还原条件下胰岛素样品只有一个主峰，纯度为100%，还原条件下检测到A链、B链两个主峰及两个相关杂质峰，样品纯度为92.98%（A%+B%）。该方法表现出较高的分辨率，可实现2.4 kDa的A链与3.4 kDa的B链的基线分离。

4. 结论

本文建立了CE-SDS方法分析多肽药物的纯度，方法对一条多肽链组成的司美格鲁肽，两条多肽链组成的胰岛素均具有良好的分离效果，并可准确反应不同条件处理的多肽药物纯度变化。该方法可作为平台化方法指导企业建立多肽药物的质量标准，以用于药物研发、生产各阶段的产品质量控制。

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。

© 2025 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-36737-A