

毛细管等电聚焦电泳 (cIEF) 测定司美格鲁肽的等电点

The Detection of Isoelectric Point for Semaglutide by Capillary Isoelectric Focusing (cIEF) Method

兰朝辉, 高铁, 陈泓序, 郭立海

Lan Zhaohui, Gao Tie, Chen Hongxu, Guo Lihai

SCIEX, 中国 SCIEX, China

关键词: cIEF; 司美格鲁肽; 等电点

1. 前言

司美格鲁肽 (Semaglutide) 属胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂 (GLP-1RA) 药物。GLP-1是一种肠促胰素, 以葡萄糖浓度依赖的方式促进胰岛素分泌, 抑制胰高血糖素分泌从而降低血糖, 同时还有延缓胃排空的作用。而正因为延缓胃排空这个附带作用, 司美格鲁肽除了能完成降糖本职之外, 兼有抑制食欲的作用, 使减肥成为其第二适应症, 也因此成为新晋的多肽类明星药物。

等电点 (pI) 是蛋白质和多肽类药物重要的理化参数, 对等电点的分析已成为医药工业质量控制的重要环节。cIEF是一种可以根据蛋白各异构体等电点的差异实现分离的方法。司美格鲁肽属多肽类药物是合成的; 对于合成的多肽类药物cIEF也是可以对其等电点进行表征。

PA800 Plus药物分析系统使用cIEF模式可进行多肽药物的等电点及电荷异构体的分析 (图1)。



图1. PA800 Plus药物分析系统与cIEF分析试剂盒

在毛细管等电聚焦电泳 (cIEF) 的分离过程中, 毛细管左右两端施加的高压电场使得阳极液和阴极液中的氢离子和氢氧根离子相向运动, 其内部填充的两性电解质在酸性 (阳极) 溶液和碱性 (阴极) 溶液所形成电场的作用下形成连续的pH梯度, 从而使得两性化合物向各自等电点迁移, 当分子迁移到与其pI相匹配的pH区域时, 其净电荷变为零, 停止迁移并在此区域聚焦, 形成狭窄的带状, 聚焦完成后, 依靠化学迁移的方式移动毛细管内聚焦的蛋白条带, 使其经过检测窗口被检测。

其优势如下:

- 1) 具有较长的分离距离 (30cm), 可得到更优的分离度。
- 2) 利用3个等电点标准品进行等电点测定, 等电点结果更准确。
- 3) 连续多针进样重复性好, 主峰pI值RSD < 0.4%。
- 4) 使用化学迁移的方式, 不影响各异构体的分离度。

毛细管等电聚焦实验中尿素浓度是影响样品分离度的主要因素, 本文对尿素浓度进行了优化来测定司美格鲁肽等电点。

2. 试剂耗材

2.1 试剂和样品

Advanced cIEF Starter KIT (SCIEX PN A80976), 包含cIEF Gel, cIEF Peptide Marker, 中性涂层毛细管。其他试剂如下: 两性电解质 (Pharmalyte 3-10 carrier ampholytes, GE Healthcare PN 17-0456-01), 阳极液 (200 mM磷酸, Sigma-Aldrich PN 345345), 阴极液 (300 mM氢氧化钠, Sigma-Aldrich PN 72082), 化学迁移液 (350 mM醋酸, Sigma - Aldrich PN 537020), 阳极稳定液 (200 mM亚氨基二乙酸, Sigma-Aldrich PN 220000), 阴极稳定液 (500 mM精氨酸, Sigma-Aldrich PN A5006), 尿素溶液 (4.3M

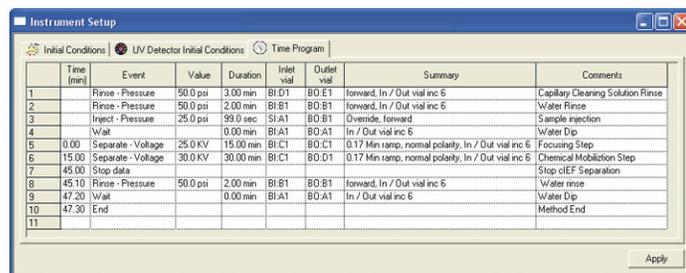
尿素, Sigma-Aldrich PN U0631)。司美格鲁肽由某企业提供, 样品原始浓度为18.7 mg/ml, 将样品稀释至5 mg/ml (盐浓度 <math>< 50\text{mM}</math>)。

参考SCIEX毛细管等电聚焦分析试剂盒的说明书, 根据司美格鲁肽的理论等电点选择pI值为9.5、7.0和4.1的等电点标准品, 配置可容纳多个样品的预混液, 提高实验的重现性。如表1, 再将10 μL 样品添加至一份预混液中, 充分涡旋混合。尿素胶中尿素浓度根据优化条件进行配置。

表1. 毛细管等电聚焦实验中样品预混液的配置

试剂	多个样品 (n) 所需体积 (μL)
尿素胶	$200 \times (n+1)$
两性电解质	$12 \times (n+1)$
阴极稳定液	$20 \times (n+1)$
阳极稳定液	$2 \times (n+1)$
等电点标准品 (9.5)	$2 \times (n+1)$
等电点标准品 (7.0)	$2 \times (n+1)$
等电点标准品 (4.1)	$2 \times (n+1)$

分析方法的时间程序见图2。



Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1	Rinse - Pressure	50.0 psi	3.00 min	BI-D1	BO-E1	forward, In / Out vial inc 6	Capillary Cleaning Solution Rinse
2	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI-B1	BO-B1	forward, In / Out vial inc 6	Water Rinse
3	Inject - Pressure	25.0 psi	99.0 sec	SI-A1	BO-B1	Overdrive, forward	Sample Injection
4	Wait	0.00 min		BI-A1	BO-A1	In / Out vial inc 6	Water Dip
5	Separate - Voltage	25.0 kV	15.00 min	BI-C1	BO-C1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 6	Focusing Step
6	Separate - Voltage	30.0 kV	30.00 min	BI-C1	BO-D1	0.17 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 6	Chemical Mobilization Step
7	Stop data						Stop cIEF Separation
8	Rinse - Pressure	50.0 psi	2.00 min	BI-B1	BO-B1	forward, In / Out vial inc 6	Water Rinse
9	Wait	0.00 min		BI-A1	BO-A1	In / Out vial inc 6	Water Dip
10	End						Method End
11							

图2. cIEF实验分析方法的时间程序

3. 实验

3.1 仪器参数

仪器: SCIEX PA 800 Plus 药物分析系统; 毛细管: 中性涂层毛细管, 20/30.2 cm (有效/总长度); 毛细管温度: 20 $^{\circ}\text{C}$; 样品储存温度: 10 $^{\circ}\text{C}$; 进样条件: 25 psi, 99 s; 聚焦条件: 25 kV, 15 min; 迁移条件: 30 kV, 30 min; 检测器及波长: 紫外检测器 (UV), 280 nm。

3.2 尿素浓度优化

固定样品预混液中的其他试剂, 进行尿素胶中尿素含量的优化, 分别配置4、5、6、7、8 mol/L的尿素胶, 进行样品预混液的配置。

4. 结果与讨论

4.1 尿素浓度的优化

通常溶液pH值等于蛋白的等电点时, 蛋白的稳定性较差, 容易发生析出沉淀现象。在样品预混液中添加尿素, 可促进蛋白在毛细管等电聚焦实验中的溶解, 使样品稳定的迁移至毛细管窗口并进行检测。此次实验优化中, 尝试了4~8 mol/L的尿素浓度, 结果如图3, 在4 mol/L尿素浓度下样品未出峰, 增大尿素浓度, 在8 mol/L尿素浓度下样品主峰明确, 且响应值良好, 因此在毛细管等电聚焦实验中, 选择8 mol/L的尿素浓度进行司美格鲁肽等电点的分析。

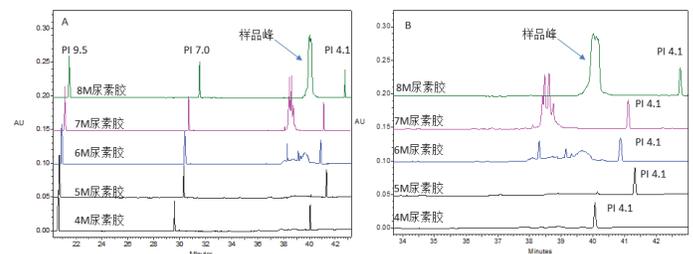


图3. 司美格鲁肽等电点分析结果 (A: 不同尿素胶浓度下司美格鲁肽等电点分析电泳图; B: 样品峰放大图)

4.2 方法重复性的考察

在8 mol/L尿素浓度条件下考察了方法的多针重复性 ($n=6$), 如图4, 以含量最高的峰为主峰, 样品等电点范围大致在4.77~4.85之间, 主峰等电点的RSD值为0.36%, 如表2。

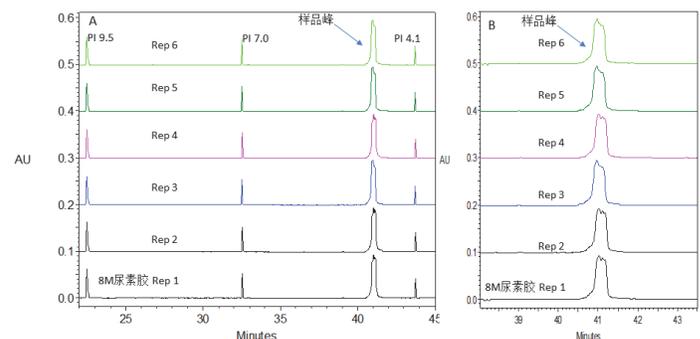


图4. 8M尿素浓度下样品6针重复性分析叠加图 (A: 样品全图; B: 样品峰放大图)

表2. 重复性考察中等电点范围及主峰等电点的RSD

样品	pI 范围	主峰 pI	主峰 pI平均值	主峰 pI RSD
Rep-1	4.79 ~ 4.82	4.82		
Rep-2	4.83 ~ 4.85	4.85		
Rep-3	4.80 ~ 4.82	4.82	4.82	0.36%
Rep-4	4.78 ~ 4.80	4.80		
Rep-5	4.77 ~ 4.81	4.81		
Rep-6	4.77 ~ 4.81	4.81		

5. 结论

毛细管等电聚焦法可对司美格鲁肽进行等电点测定，本技术说明通过优化尿素浓度，确定了尿素浓度为8 mol/L的条件下，可实现对司美格鲁肽的等电点分析。所分析的司美格鲁肽的样品等电点范围是4.77 ~ 4.85，在方法重复性考察实验中样品主峰等电点的RSD值为0.36%，方法重现性好，可用于司美格鲁肽的等电点测定。

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。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-33184-A



SCIEX中国

北京分公司
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](https://www.sciex.com.cn)