

# SCIEX pH 6.5样品缓冲液：中国药典指定的CE-SDS分析用样品缓冲液

## SCIEX pH 6.5 sample buffer: Specified by Chinese Pharmacopoeia for CE-SDS analysis

张晓霞, 高铁, 陈泓序

Xiaoxia Zhang, Tie Gao, Hongxu Chen

SCIEX, 中国

SCIEX, China

**Keywords:** monoclonal antibody; non-reduced; CE-SDS; sample buffer

### 1. 前言

十二烷基硫酸钠毛细管电泳法(capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate, CE-SDS)是当前单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)纯度分析的重要方法, 在单抗药物研发到生产的全过程, 用于低含量蛋白碎片杂质的分离及含量检测。

CE-SDS方法最早收录于2015版《中国药典》三部, 3127: 单抗大小变异体测定法, 在2020版《中国药典》对该含量测定法进行了修订。其中, 一项重要修订为将推荐的SDS 样品缓冲液由含 1% SDS 的0.1 mol/L Tris-HCl溶液, pH 9.0, 改为含 1% SDS 的0.04 mol/L的磷酸盐溶液, pH 6.5或等效<sup>1</sup>。为方便中国的客户使用, SCIEX新推出了一款与中国药典2020版成分一致的pH 6.5的样品缓冲液(PN:C57805)。

文献报道, 碱性条件下, 两种常用的封闭剂 IAM 和 NEM均会出现明显降解, 降低封闭游离巯基的作用, 易产生游离巯基介导的链间二硫键断裂, 导致样品处理过程中发生非预期降解而产生额外的碎片, 进而影响非还原抗体纯度的准确性<sup>2</sup>。

本文以NIST单抗作为研究对象, 专门比较了用SCIEX的pH 6.5的样品缓冲液和pH 9.0的样品缓冲液处理后的样品非还原CE-SDS纯度结果。在pH 6.5条件下, 主峰含量比pH 9.0条件下主峰含量高1.26%左右。结果说明对于单抗样品的非还原CE-SDS纯度分析, 使用低pH的样品缓冲液进行处理, 能避免处理过程中碎片的产生, 进而

获得更高的纯度结果。另一方面, 本文还对使用pH 6.5样品缓冲液进行单抗样品处理的非还原CE-SDS的结果重复性进行考察, 6针重复性结果主峰校准峰面积百分比的RSD值为0.06%, 说明用pH 6.5的样品缓冲液进行非还原CE-SDS结果稳定性良好。

### 2. 实验部分

#### 2.1 试剂

IgG 纯度分析试剂盒(A10663, SCIEX): 包含SDS 凝胶缓冲液、pH 9.0样品缓冲液(1% SDS 的0.1 mol/L Tris-HCl溶液)、熔融石英毛细管、0.1 mol/L HCl和0.1 mol/L NaOH; IAM(4715, AltaAesar); NIST单抗(USP); pH 6.5样品缓冲液(C57805, SCIEX, 1% SDS 的0.04 mol/L磷酸盐溶液)

#### 2.2 溶液配制

0.25 mol/L的IAM: 称取46 mg高纯度IAM加入1.5 mL离心管中, 加入1 mL去离子水, 盖紧瓶盖充分混匀直至完全溶解, 现配现用。

非还原样品前处理: 取10  $\mu$ L NIST单抗标准品溶液至1.5 mL离心管中, 加入85  $\mu$ L样品缓冲溶液, 再加入5  $\mu$ L IAM, 再加入2  $\mu$ L的10kD内标。70°C加热10 min, 自然冷却至常温后1000 rpm离心2 min。

#### 2.3 仪器及方法

仪器: PA 800 Plus 药物分析系统(SCIEX), 匹配PDA检测器, 检测波长: 220 nm。熔融石英毛细管(PN. 338451): 20/30 cm(有效/总

长度), 50 μm 内径; 毛细管温度: 25°C, 样品温度: 25°C, 分离条件: -15 kV, 40 min; 进样条件为: -10 kV, 40 s。窗口狭缝: 2。

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, 0.1 mol/L 盐酸溶液在 70 psi 压力下冲洗 2 min, 二次去离子水在 70 psi 压力下冲洗 1min。SDS 凝胶缓冲液在 70 psi 压力下冲洗 10 min。

### 3. 结果与讨论

#### 3.1 不同pH的样品缓冲液对非还原纯度的影响

为了验证样品缓冲液的pH对单抗纯度结果的影响, 本研究分别使用SCIEX公司的pH 9.0的样品缓冲液和pH 6.5的样品缓冲液对NIST单抗标准品进行非还原纯度检测, 对比图谱如图1。从图中可看出pH 9.0时(蓝色图谱)HHL杂质的峰高明显高于pH 6.5时(黑色图谱)。对比pH 9.0与pH 6.5的含量测定结果, 结果如下表1, pH 6.5的

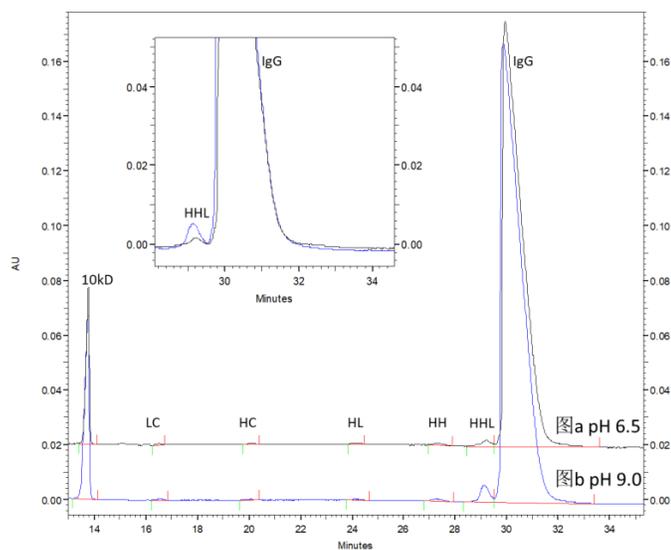


图1. 不同pH值的样品缓冲液处理的NIST单抗标准品图谱比较。图a: pH 6.5的样品缓冲液处理样品 (黑色), 图b: pH 9.0的样品缓冲液处理样品 (蓝色)

表1. 不同pH值的样品缓冲液处理的NIST单抗主峰及杂质峰含量百分比结果比较

样品缓冲液pH	%IgG	%HHL	%total fragments
pH 6.5	98.43	0.81	1.58
pH 9.0	97.17	1.82	2.83

条件下NIST单抗主峰纯度比pH 9.0时主峰纯度增加1.26%。该结果与文献报道的pH 6.0与pH 9.0的比较结果一致<sup>3</sup>。

#### 3.2 用SCIEX pH 6.5样品缓冲液处理的NIST单抗样品结果重复性考察

对pH 6.5的样品缓冲液处理的NIST单抗样品连续进样6针, 考察结果的重复性, 主峰校准峰面积的RSD值为0.4%, 校准峰面积百分比含量的RSD值为0.06%。

从结果上看pH 6.5的样品缓冲液处理的单抗样品校准峰面积和校准峰面积百分比结果的重复性均良好。

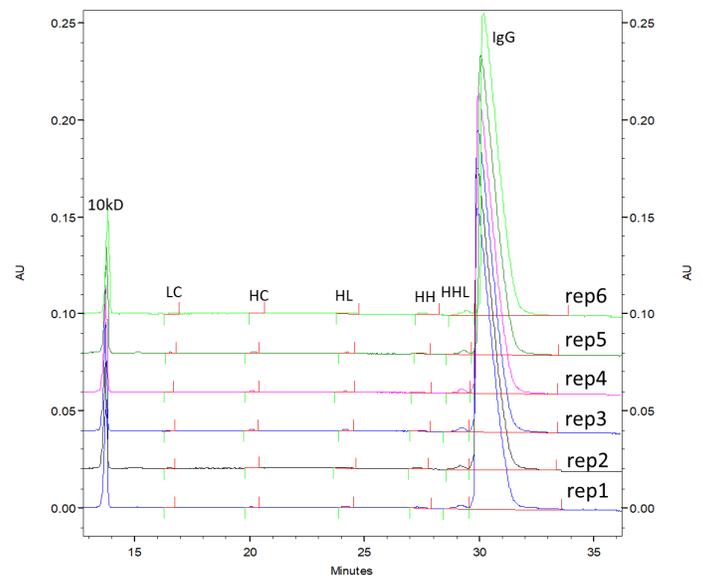


图2. pH 6.5 样品缓冲液处理的NIST单抗样品非还原分析重复性结果图谱 (n=6)

表2. pH 6.5 样品缓冲液处理的NIST单抗样品非还原分析重复性结果(n=6)

IgG	Corrected Area	Corrected Area Percent
主峰	87872	98.4%
	88169	98.4%
	88417	98.3%
	87800	98.4%
	87379	98.4%
	88007	98.3%
RSD	0.40%	0.06%

## 结论

样品缓冲液的pH值是单抗进行CE-SDS纯度分析时的一个重要影响因素，能够影响巯基封闭剂的降解以及二硫键的结合。本研究结果表明，SCIEX的pH值6.5的样品缓冲液(P/N C57805)与中国药典2020版推荐的样品缓冲液条件一致，均为含1% SDS的40 mM磷酸缓冲液，该样品缓冲液在非还原条件下比pH 9.0的样品缓冲液更加显著的降低NIST单抗的碎片含量，说明该条件下样品更稳定。同时对pH 6.5的样品缓冲液处理的样品在非还原条件下进行了6针重复性考察，结果主峰的校准峰面积及百分含量的结果重复性均较好。因此，在进行单抗非还原纯度分析时推荐使用pH 6.5的样品缓冲液进行样品前处理。

## 参考文献

1. 国家药典委员会.中国药典，三部[M].北京：中国医药科技出版社，2020:502-503.
2. Zhang, J., Burman, S., Gunturi, S., Foley, J., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 53 (2010) 1236–1243
3. 刘振东，高铁等，色谱，2019，37(6)：666-670.

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。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14024-ZH-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：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：SCIEX-China