

通则 3129 单抗电荷变异体测定法

本法系采用全柱成像毛细管等电聚焦电泳（icIEF）或毛细管等电聚焦电泳（cIEF），依据不同电荷变异体的等电点（pI）特征，按毛细管电泳法（通则 0542）将其分离，测定单抗产品各电荷变异体的等电点并计算百分含量。

第一法 全柱成像毛细管等电聚焦电泳法

~~（1）检测器 紫外检测器，波长：280 nm。~~

~~（2）毛细管 涂层石英毛细管。~~

试剂 （1）水（电阻率不低于 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）。

（2）1%甲基纤维素溶液 称取甲基纤维素 10 g，加水溶解并稀释至 1000 ml， $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤， $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

（3）0.1%甲基纤维素溶液 取 1%甲基纤维素溶液与水以 1:9 稀释， $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

（4）两性电解质（pH 3~10）。

（5）等电点标志物（pI Marker） 所选用的等电点标志物的等电点范围一般应涵盖供试品的等电点。

(6) 含 80mmol/L 磷酸的 0.1%甲基纤维素溶液。

(7) 含 100mmol/L 氢氧化钠的 0.1%甲基纤维素溶液。

(8) 预混溶液（可根据比例一次性配制多个供试品使用的预混溶液）。

试剂	体积 (μ l)	终浓度 (%)
两性电解质 (pH 3 ~ 10)	8	4.0
等电点标志物 1	1	0.5
等电点标志物 2	1	0.5
1%甲基纤维素溶液	70	35.0
水	80	/

系统适用性溶液 取系统适用性对照品适量，用水稀释至 1mg/ml。取 40 μ l，加预混溶液 160 μ l，混匀，以每分钟 13000 转离心 5 分钟。取上清液 150 μ l，转移至进样瓶（终浓度 0.2mg/ml）。

对照品溶液 对照品系经证明足够稳定可用于鉴别、理化分析的代表批次的产品，参照系统适用性溶液进行制备。可根据产品特征调整对照品预混溶液体系组分或比例、终浓度等。

供试品溶液 参照对照品溶液进行制备。

空白溶液 空白溶液系按照制剂配方配制，但不含有

单抗的溶液。若研究表明制剂配方成分与水的图谱无显著差异，也可用水制备空白溶液。空白溶液参照对照品溶液进行制备。

电泳条件 采用涂层石英毛细管和紫外检测器，检测波长为 280 nm；毛细管温度（环境温度）为 18~25℃；样品室温度为 4~10℃；按所选设备进样时间等参数自动进样；以含 80 mmol/L 磷酸的 0.1%甲基纤维素溶液和含 100 mmol/L 氢氧化钠的 0.1%甲基纤维素溶液为阳极液和阴极液，1kV 或 1.5kV 低电压下预聚焦 1 分钟后，3kV 高电压下聚焦 4.5~15 分钟（系统适用性溶液 1kV 或 1.5kV 低电压下预聚焦 1 分钟后，3kV 高电压下聚焦 7.5 分钟）。

测定法 取系统适用性溶液、空白溶液、对照品溶液、供试品溶液依序进样：系统适用性溶液至少进样 2 针、空白溶液进样 1 针、对照品溶液进样 1 针，供试品溶液 1、供试品溶液 2……系统适用性溶液至少进样 1 针，记录图谱。

系统适用性要求 系统适用性溶液进样应不少于 3 针（序列起始至少 2 针，序列尾至少 1 针）且主峰 pI 的标准偏差、主峰百分含量、主峰百分含量的标准偏差及相对标准偏差应在规定范围内（见该批次系统适用性对照品的说明书）。系统适用性溶液的电泳图谱应与参考

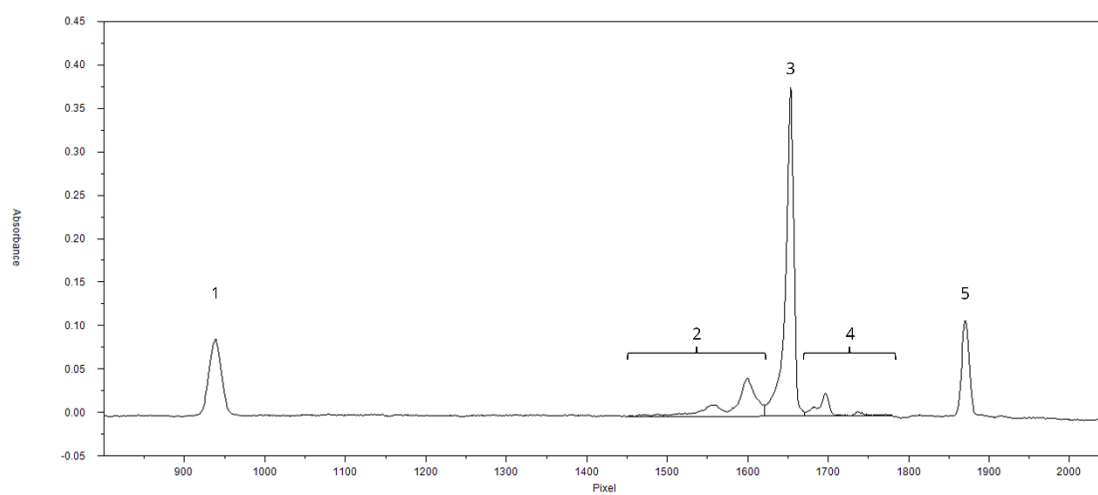
图谱相似。空白图谱中两个等电点标志物均被检出，且等电点标志物峰之间的供试品积分区域应无干扰积分的倒峰、尖峰等非蛋白峰。

结果计算 (1) 等电点 以各等电点标志物的等电点 (pI) 对其相应的像素值作线性回归，将电荷变异体的像素值带入线性回归方程，求出电荷变异体的等电点。(2) 百分含量 按峰面积归一化法计算，各电荷变异体的峰面积占有所有蛋白峰面积之和的百分比即为该批次单抗电荷变异体的百分含量。

注意事项 (1) 如供试品的盐浓度较高，需对其进行脱盐前处理。

(2) 可根据产品特征调整聚焦电压、聚焦时间、样品室温度等。

(3) 由于 icIEF 分析仪器品牌不同、毛细管品牌或者规格存在差异，系统适用性对照品的电泳图谱与参考图谱峰型相比，可略有差异。



1.等电点标志物1 2.酸性峰 3.主峰 4.碱性峰 5.等电点标志物2

图 1 icIEF 系统适用性对照品参考图谱

第二法 毛细管等电聚焦电泳法

试剂 (1) 水 (电阻率不低于 $18.2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

(2) 等电聚焦电泳用凝胶溶液 含有适当的亲水性聚合物作为分离介质或等效溶液。

(3) 两性电解质 (pH 3~10)。

(4) 等电点标志物 (pI Marker) 所选用等电点标志物的等电点范围一般应涵盖供试品的等电点。

(5) 等电聚焦电泳用凝胶溶液 取尿素 1.80g, 加等电聚焦电泳用凝胶溶液约 7ml, 涡旋混匀使溶解, 用等电聚焦电泳用凝胶溶液稀释至 10ml。

(6) 亚氨基二乙酸溶液 取亚氨基二乙酸 0.27g, 加水 10ml 溶解, 制成 200 mmol/L 亚氨基二乙酸溶液作为阳极稳定剂。

(7) 精氨酸溶液 取精氨酸 4.36g, 加水 50ml 溶解, 制成 500 mmol/L 精氨酸溶液作为阴极稳定剂。

(8) 磷酸溶液 取 85%磷酸溶液 1.35ml, 加水稀释至 100ml, 制成 200 mmol/L 磷酸溶液作为阳极液。

(9) 氢氧化钠溶液 取氢氧化钠 1.2g, 加水 100ml 溶

解，制成 300 mmol/L 氢氧化钠溶液作为阴极液。

(10) 醋酸溶液 取冰醋酸 1ml，加水稀释至 50ml，制成 350 mmol/L 醋酸溶液作为迁移液。

(11) 尿素溶液 取尿素 10.8g，加水 30ml，涡旋混匀使溶解制成 4.3 mol/L 尿素溶液。

(12) 预混溶液（可根据比例一次性配制多个供试品使用的预混溶液）。

试剂	体积 (μl)	终浓度 (%)
两性电解质 (pH3 ~ 10)	12	4.8
等电点标志物 1	1	0.4
等电点标志物 2	1	0.4
等电聚焦电泳用凝胶溶液	200	80.0
精氨酸溶液	20	8.0
亚氨基二乙酸溶液	2	0.8
水	4	/

系统适用性溶液 取系统适用性对照品适量，用水稀释至 5mg/ml。取上述溶液 10 μl，加预混溶液 240 μl，混匀，以每分钟 13000 转离心 5 分钟。取上清液 200 μl，转移至进样瓶（终浓度 0.2mg/ml）。

对照品溶液 对照品系经证明足够稳定可用于鉴别、理化分析的代表批次的产品，参照系统适用性溶液进行制备。

供试品溶液 参照对照品溶液进行制备。

空白溶液 空白溶液系按照制剂配方配制，但不含有单抗的溶液。若研究表明制剂配方成分与水的图谱无明显差异，也可用水制备空白溶液。空白溶液参照对照品溶液进行制备。

电泳条件 用涂层-熔融石英毛细管（内径 50 μm ），切割至总长度 30cm，有效长度 20cm；毛细管温度为 20℃；检测波长为 280 nm；样品室温度为 4~15℃；每次运行前，依次用尿素溶液和水在 50 psi 压力下冲洗毛细管 3 分钟和 2 分钟；进样端为正极，25psi 压力下进样 99 秒；以磷酸溶液和氢氧化钠溶液为阳极液和阴极液，正相极性，25kV 下聚焦 15 分钟；以醋酸溶液为迁移液替换阴极液，正相极性，30kV 下迁移 30 分钟；每次运行后，用水在 50 psi 压力下冲洗毛细管 2 分钟。

测定法 取系统适用性溶液、空白溶液、对照品溶液、供试品溶液依序进样：系统适用性溶液至少进样 2 针、空白溶液至少进样 1 针、对照品溶液进样 1 针，供试

品溶液 1、供试品溶液 2……系统适用性溶液至少进样 1 针，记录图谱。

系统适用性要求 系统适用性溶液进样应不少于 3 针（序列起始至少 2 针，序列尾至少 1 针）且主峰 pI 标准偏差、主峰百分含量、主峰百分含量的标准偏差及相对标准偏差应在规定范围内。系统适用性溶液的电泳图谱应与参考图谱相似。空白对照图谱中两个等电点标志物均被检出，且等电点标志物峰之间的供试品积分区域应无干扰积分的倒峰、尖峰等非蛋白峰。

结果计算 （1）等电点 以各等电点标志物的等电点（pI）对其相应的迁移时间作线性回归，将电荷变异体的聚焦时间带入线性回归方程，求出电荷变异体的等电点。

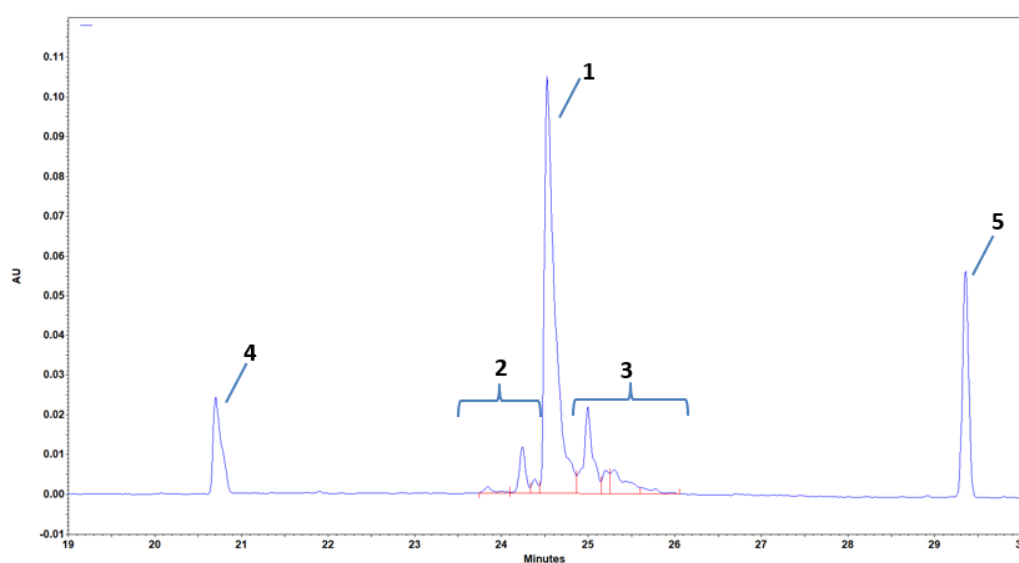
（2）百分含量 按峰面积归一化法计算，各电荷变异体的峰面积占有所有蛋白峰面积之和的百分比即为该批次单抗电荷变异体的百分含量。

注意事项 （1）如供试品的盐浓度过高，需对其进行脱盐前处理。

（2）可根据仪器的不同，调整实验条件（涂层-熔融石英毛细管的总长度和有效长度、进样的压力和时间等）；可根据产品的特征，调整预混溶液体系组分比例，调整电泳

条件（聚焦的时间等）。

（3）由于 cIEF 分析仪器品牌不同、毛细管品牌或者规格存在差异，系统适用性对照品电泳图谱与参考图谱峰型相比，可略有差异。



1.主峰 2.碱性峰 3.酸性峰 4.等电点标志物1 5.等电点标志物2

图2 cIEF系统适用性对照品参考图谱

第二法起草说明

一、概况

对于单抗电荷变异体的测定有多种分析的方法，其中包括毛细管等电聚焦电泳原理的两种方法：全柱成像毛细管等电聚焦电泳法（icIEF 法）和毛细管等电聚焦电泳法（cIEF 法）。目前各国药典均未收载用于测定电荷变异体的毛细管等电聚焦电泳（cIEF）通则方法，但是《欧洲药典》、《中国药典》均在单抗总论中提及毛细管等电聚焦电泳方法是电荷变异体测定的方法之一。《中国药典》2020 年版通则 3129 目前仅收载了单抗电荷变异体测定法：全柱成像毛细管等电聚焦电泳法（icIEF 法）。

（一）基本原理

icIEF 法和 cIEF 法两种方法原理基本相同，均将供试品与预混溶液（含两性电解质、等电点标志物、含尿素凝胶等）进行混合制备成供试品溶液并充满整根毛细管，而后将毛细管两端浸入电极液并施加电压，两性电解质在毛细管内形成 pH 梯度，蛋白质迁移至各等电点区域形成聚焦条带。两种方法的主要差异为检测过程和仪器：（1）cIEF 法中，毛细管只有 5mm 的检测窗口，聚焦完成后需要将聚焦的条带向右移动到检测器窗口进行检测。而 icIEF 法中，毛细管有 5cm 的检测窗口，样品在 5cm 的毛细管中聚焦，CCD 相机实时对这段毛细管进行拍照，聚焦和检测可同时完成；（2）cIEF 法使用的通用性毛细管电泳仪，可以用于包括等电聚焦电泳、凝胶电泳和区带电泳等多种模式。而 icIEF 法使用的仪器通常只能用于等电聚焦电泳一种模式。

（二）建立 cIEF 法的必要性

根据各国药典收载情况和企业调研结果，并考虑到 cIEF 法和 icIEF 法在检测方式（如数据采集和信号处理）以及设备上存在较大差异，有必要建立基于 cIEF 的单抗电荷变异体平台分析方法，补充完善药典通则中单抗电荷变异体分析方法，提高药典通则方法的适用性和可及性，满足不同企业对于单抗电荷变

异体分析方法的多种需求，使企业和检验检测相关单位可根据产品特点和自身软硬件设施合理选择适宜的分析方法。

二、标准起草说明

本次起草工作主要参考《中国药典》2020 年版通则 3129 以及文献资料中的 cIEF 法，建立了适用于单抗电荷变异体测定的 cIEF 法并进行了方法学验证。cIEF 法系依据不同电荷变异体的等电点 (pI) 特征，在毛细管中将其分离，测定单抗产品各电荷变异体的等电点并计算相对百分含量。方法包括 5 个步骤：1) 供试品溶液的制备：供试品与预混溶液（含两性电解质、等电点标志物、含尿素凝胶等）进行混合制备成供试品溶液；2) 进样：使供试品溶液充满整根毛细管；3) 聚焦：将毛细管两端浸入电极液并施加电压，两性电解质在毛细管内形成 pH 梯度，蛋白质迁移至各等电点区域形成聚焦条带；4) 迁移和检测：将聚焦的蛋白质移动到检测器窗口进行检测；5) 结果计算：计算电荷变异体的等电点和相对百分含量。方法的建立过程中对关键参数进行研究确定，并对建立的方法进行方法学验证，结果表明方法精密度、线性、准确度、定量限、稳定性和耐用性考察均良好。

在课题的开展过程中对 cIEF 法和 icIEF 法的检测结果进行了比较，等电点和百分含量的测定结果存在一定的差异，这主要是因为两种方法的检测过程和仪器存在差异。两种方法相互不能替代，各企业应结合产品的特征和软硬件设施选择适宜的电荷变异体分析方法，并根据所选用的分析方法设定相应的限度。

本课题建立的方法经中国食品药品检定研究院、广东省药品检验所和江苏省食品药品监督检验研究院复核，经 11 家生产企业进行扩大验证，结果表明 cIEF 法适用于单抗电荷变异体的检测。

参考文献

[1] Ingrid D Cruzado-Park; Scott Mack, Chitra K. Ratnayake. Identification of system parameters critical for high-performance cIEF. AB SCIEX Technology.

[2]武刚, 于传飞,王文波等. 成新毛细管等电聚焦电泳测定单抗等电点的若干影响因素. 药物分析杂志, 2018, 38(10):1727-1732

[3] 王文波, 武刚, 于传飞等. 治疗性单克隆抗体电荷异质性分析方法比较. 药物分析杂志, 2017, 37(8):1383-1388

[4] Jiaqi Wu, Tiemin Huang. Peak identification in capillary isoelectric focusing using the concept of relative peak position as determined by two isoelectric point markers. Electrophoresis, 2006, 27, 3584–3590

[5] Ingrid D Cruzado-Park; Scott Mack, Chitra K. Ratnayake. A Robust CIEF method: intermediate precision for the pH 5-7 range. AB SCIEX Technology.

起草单位：上海市食品药品检验研究院

联系方式：021-50798176