

3127 单抗分子大小变异体测定法

第一法 十二烷基硫酸钠毛细管电泳法（CE-SDS法）

.....

第二法 分子排阻色谱法（SEC法）

本法系采用分子排阻色谱法，利用凝胶色谱柱的分子筛机制分离单克隆抗体各分子大小变异体并测定其含量。

试剂 磷酸盐缓冲液 取磷酸二氢钾 4.76 g、磷酸氢二钾 2.61 g 和氯化钾 18.64 g，加水 900ml 使溶解，调 pH 至 6.2，用水稀释至 1000 ml。

系统适用性溶液 取系统适用性对照品，加流动相使溶解并稀释成每 1ml 含 10mg 的溶液。

对照品溶液 取供试品对应的单抗对照品，加流动相使溶解并稀释成每 1ml 含 10mg 的溶液。

供试品溶液 取供试品，加流动相使溶解并稀释成每 1ml 含 10mg 的溶液。

色谱条件 以适合分离 10-500kD 蛋白质的亲水改性硅胶为固定相（30cm×7.8mm，5μm，孔径 250Å 或等效色谱柱），柱温 25℃；以磷酸盐缓冲液为流动相，流速为每分钟 0.5 ml；检测器波长 280 nm；进样器温度 2℃～8℃；进样体积 20μl。运行时间 30 min。

系统适用性要求 系统适用性溶液图谱应与参考图谱基本一致；理论板数按主峰计应不低于 4900，主峰的拖尾因子应不大于 1.4，聚

体峰与主峰之间的分离度应不小于 2.0，主峰和片段峰之间的分离度应不小于 1.8。

测定法 取系统适用性溶液、对照品溶液和供试品溶液，注入液相色谱仪，记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。按面积归一法分别计算聚体、主峰和片段的含量。

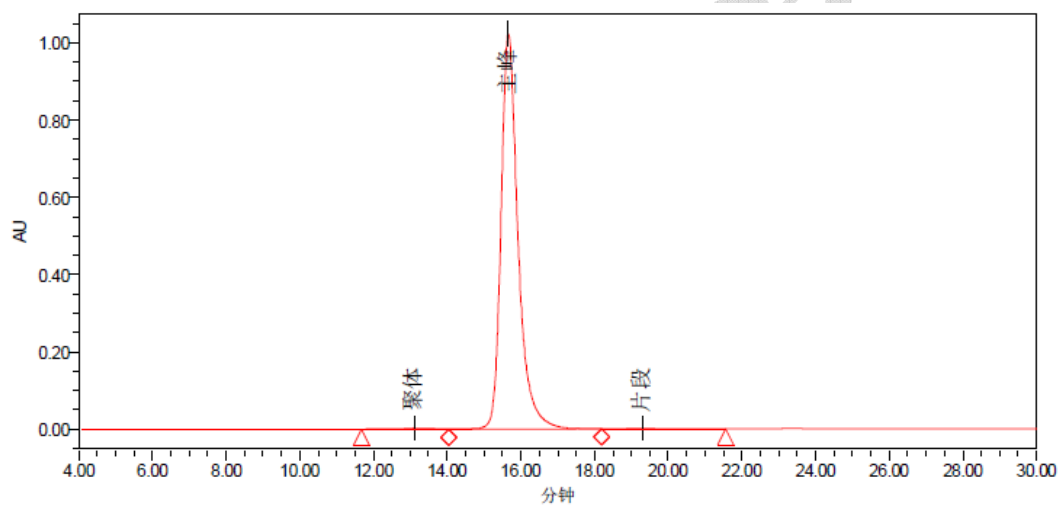


图 1 系统适用性对照品参考图谱

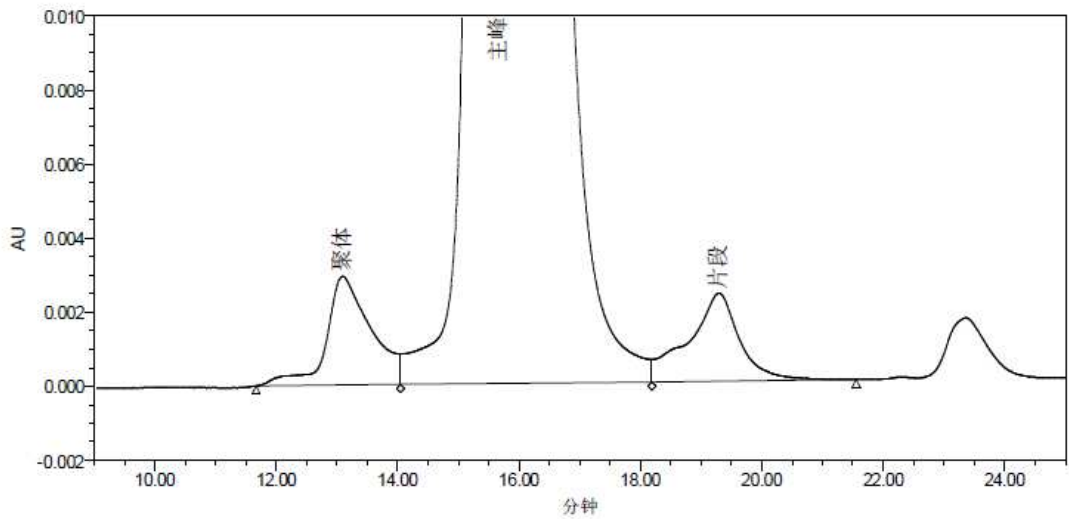


图 2 系统适用性对照品参考图谱局部放大图