

国产芯片毛细管电泳仪性能研究及单克隆抗体分析应用

沈泓¹, 冯一鸣², 卜晨², 孙晗¹, 秦奕辉³, 阮昊¹, 王艳君³, 陈万勤¹, 潘攀³, 张慷³, 李志豪⁴, 彭姣², 何凯伦^{1*} [1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.聚光科技(杭州)股份有限公司, 杭州 310056; 3.天境生物科技(杭州)有限公司, 杭州 310018; 4.浙江工业大学, 杭州 310014]

摘要: 目的 以 PA800 Plus 毛细管电泳仪为参照对象, 对采用 MCE-SDS 原理的国内自主研发的芯片毛细管电泳仪 (MCE-100) 进行了性能参数对比研究及还原性单克隆抗体样品检测应用。方法 研究初期制备了人白蛋白和转铁蛋白参考品混合液作为非单抗类蛋白供试品, 分别从线性、灵敏度、精密度等方面对国产芯片毛细管电泳仪进行了系统性考察, 并进一步研究了国产芯片毛细管电泳仪在还原性单克隆抗体蛋白样品检测的应用, 同时进行了方法学验证。结果 该国产芯片毛细管电泳仪具有良好的系统性能, 能够快速、高通量地完成蛋白样品的检测分析。结论 MCE-100 国产芯片毛细管电泳仪具备蛋白分析检测能力, 可用于一般蛋白样品及单克隆抗体药物的纯度分析。

关键词: 国产化替代; 毛细管电泳仪; MCE-SDS; 单克隆抗体; 方法验证

中图分类号: R945 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)18-2563-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20240930

引用本文: 沈泓, 冯一鸣, 卜晨, 等. 国产芯片毛细管电泳仪性能研究及单克隆抗体分析应用[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(18): 2563-2571.

Performance and Application of Monoclonal Antibodies Analysis of Domestic Chip Capillary Electrophoresis Instrument

SHEN Hong¹, FENG Yiming², BU Chen², SUN Han¹, QIN Yihui³, RUAN Hao¹, WANG Yanjun³, CHEN Wanqin¹, PAN Pan³, ZHANG Su³, LI Zhihao⁴, PENG Jiao², HE Kailun^{1*} [1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Focused Photonics (Hangzhou) Inc., Hangzhou 310056, China; 3.TJ Biopharma (Hangzhou) Co., Ltd., Hangzhou 310018, China; 4.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the performance parameters of the chip capillary electrophoresis instrument independently developed in China base on MCE-SDS with the PA800 Plus capillary electrophoresis instrument, and the application of reducing monoclonal antibody sample detection with domestic capillary electrophoresis. **METHODS** A systematic examination of the domestic chip capillary electrophoresis apparatus in terms of linearity, sensitivity and precision using the mixture of human serum albumin and transferrin. Meanwhile, the application of domestic capillary electrophoresis instrumentation for the detection of reduced monoclonal antibody protein samples was further investigated, along with methodological validation. **RESULTS** The results showed that this domestic chip capillary electrophoresis instrument had good system performance and could complete the detection and analysis of protein samples quickly and in high throughput. **CONCLUSION** This domestic chip capillary electrophoresis instrument has the ability of protein analysis and detection, and can be used for the purity analysis of general protein samples and monoclonal antibody drugs.

KEYWORDS: domestic substitution; capillary electrophoresis; MCE-SDS; monoclonal antibody; method validation

单克隆抗体 (monoclonal antibodies, mAbs) 药物是生物制药产品中增长最快的类别之一^[1-2]。据统计, 自 1986 年第一个治疗性 mAbs 获得批准以来, 已有 >100 种 mAbs 被批准用于不同疾病的治疗^[3]。大量研究表明, mAbs 分子异质性对 mAb 的稳定性、疗效和安全性有重大影响^[4-6]。因此, 在

生产过程中建立对于 mAbs 药物高效且准确的表征就显得尤为重要^[7]。

纯度分析是 mAbs 药物重要的表征项目。其中十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 一直被广泛地应用于分子量大小不同

基金项目: 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划 (2023C030256); 浙江省“尖兵”研发攻关计划 (2022C10140); 浙江省药监局科技计划 (2023016)

作者简介: 沈泓, 女, 博士, 高级工程师 E-mail: shenhong@zjyj.org.cn *通信作者: 何凯伦, 男, 硕士 E-mail: hekailun@zjyj.org.cn

的变性蛋白分离，是常用纯度分析方法之一。在分析过程中，SDS 与多肽链的结合使得待测物质携带相似的电荷密度，从而实现分子量大小不同的 SDS-蛋白质复合物的电泳分离^[8-9]。当前，SDS-PAGE 实验主要是以人工操作为主，存在自动化程度低、步骤繁琐以及结果重复性差等缺点^[10]，其次染色以及褪染步骤使用的相关试剂刺激性大，对环境及人体健康也存在一定的危害性。为了克服 SDS-PAGE 的局限性，毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate, CE-SDS) 凭借其更好的定量能力、较低的变异性、通量高、自动化程度高等优势被广泛的关注和研究，特别在 mAbs 分析领域，CE-SDS 在精度、线性、重复性和分辨率方面表现出优异的性能^[11-12]。近年来，为了进一步提升 CE-SDS 的分离效率，已经开展了一系列的研究工作。Beckman 等^[13]通过使用十六烷基硫酸钠代替 SDS 分离重组蛋白，将塔板数提升了 3~8 倍。此外，Filep 等^[14]通过引入硼酸梯度介导的瞬时迁移率匹配方法，成功地实现了对迁移距离较远的 IgG 亚单位的最佳峰形分离。

在 CE 技术中，存在 2 种常见的分析方法，分别是基于传统毛细管的 CE-SDS 和基于微控芯片的 ME-SDS 检测方式。基于 CE-SDS 分析的毛细管电泳仪主要有贝克曼 PA800，安捷伦 7100 等，然而该类分析方法仍存在一些不足之处，例如耗时较长 (30 min~1 h)，仪器设备较大且操作不方便^[15]。芯片电泳技术是一种基于微流控芯片的分离和检测的方法，其原理是通过利用在石英、聚合物等材质芯片构建微米尺寸的通道网络，将分析所需的载样、进样、混合、分离等一系列步骤高度集成，从而实现分析的自动化。同时，受益于芯片的高表面积与体积的比值和十字交叉进样量方式，整个电泳分离过程可以缩短至 <1 min，相较于 CE-SDS 提升了至少 30 倍。此外，由于芯片尺寸小，所需仪器设备体积可以进一步缩小^[16]。近年来，芯片毛细管电泳技术在生命科学领域的应用日益广泛，其中进口主流仪器表现尤为突出^[17]。安捷伦科技的 2100 Bioanalyzer 系统凭借其高灵敏度和快速检测能力，在核酸等的定性定量分析中得到广泛应用^[18-20]。该系统采用微流体技

术，实现了在单一芯片上多样品的顺序分析，但其较多的手动操作步骤限制了其在大规模筛选场景中的应用潜力。与之相比，PerkinElmer LabChip 系统在生物大分子的高通量分析方面表现出色，其自动化程度较高，可自动完成筛分介质注入、芯片清洗等步骤^[21-23]。此外，通过外接毛细管将样品导入的方法，该系统可实现对 96 孔或 384 孔板内的样品连续分析，使其适用于高通量分析。然而，由于其采用的石英材质微流控芯片加工工艺复杂，导致芯片成本较高。此外，进口仪器普遍存在价格昂贵、维护成本高的问题，且部分功能难以满足特定应用场景的需求，一定程度上限制了该技术的更广泛应用。鉴于此，开发具有高性能、低成本和易于推广特征的国产芯片毛细管电泳仪器具有重要的现实意义。至今已有多篇文献报道成功地利用 MCE-SDS 对生物药物的纯度进行分析^[24-26]。

本研究旨在对比一种通用性毛细管电泳仪 (PA800 Plus) 以及一种国产的基于微流控技术的芯片毛细管电泳仪 (MCE-1000) 在 SDS-gel 分离模式下分析性能。为了保证测试的一致性，各仪器测试参数和方法采用制造商建议的方式进行，其中包括样品制备、方法参数、检测模式和数据评估等。同时，为了更全面地评估两台仪器分析性能，选择了具有不同分子量的蛋白混合物作为测试样本，分别对灵敏度、分离度以及线性等重要指标进行研究。进一步地，本研究还对还原性单克隆抗体样品在该国产芯片毛细管电泳仪的应用进行系统性研究考察。

1 仪器与试剂

采用杭州聚光科技股份有限公司生产的芯片毛细管电泳仪 (MCE-1000)。该设备配备激光诱导荧光检测系统，激发波长为 488 nm，发射波长为 520 nm。电泳芯片由聚合物材料制成，其分离通道深度和宽度分别为 10 μm 和 25 μm ，有效分离距离为 2 cm。实验所用荧光染料和胶液均由同一公司提供。参比仪器为 PA800 Plus 毛细管电泳仪 (贝克曼)。

SDS 凝胶缓冲液 (批号: M210540)、低 pH 样品缓冲液 (批号: M203657)、熔融石英毛细管 (货号: 338451)、200 μL 样品管 (货号: 144709)、空白毛细管卡盒 (货号: 144660) 均购自 SCIEX 公

司; 碘乙酰胺 (iodoacetamide, IAM)(阿拉丁, 批号: J2231082); 巯基乙醇 (2-mercaptoethanol, BME)(Sigma, 批号: 102511393); 快速蛋白分析试剂盒 (聚光科技, 批号: 2023112003); 人白蛋白 (Sigma, 批号: 1003579843); 转铁蛋白 (ACMEC, 批号: T49435DD0); 单克隆抗体蛋白及参考品 (企业提供); 人血白蛋白 (10 g/瓶, 20%)(浙江海康生物有限公司, 批号: 20230302)。

2 方法

2.1 样品处理

PA800 Plus 毛细管电泳仪: 样品用纯化水稀释至目标浓度, 取 20 μL 稀释后的样品溶液与 75 μL SDS 凝胶缓冲液混合, 其中非还原性样品再分别加入 5 μL IAM($0.8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 还原性样品分别加入 5 μL BME。上述样品再次混匀后置于 (70 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 15 min, 冷却至室温, $10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min 去除气泡, 吸取 90 μL 上清液于内插管, 即为待测供试品溶液。

MCE-100 国产芯片毛细管电泳仪: 样品用纯化水稀释至目标浓度, 同时根据快速蛋白分析试剂盒操作指导手册配制蛋白变性溶液, 即每 700 μL Protein Express 样品缓冲液加入 24.5 μL BME 或 IAM。分别取蛋白变性溶液 7 μL 、已稀释至目标溶液的供试品溶液 2 μL 加入到 96 孔 PCR 板孔内, 盖上封膜贴, 置于 (70 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 15 min。再向每个样品孔中加入 35 μL 超纯水, 即为待测供试品溶液。

2.2 仪器检测方法

PA800 Plus 毛细管电泳仪: 仪器设置检测器为 PDA, 检测波长为 220 nm, 数据传输率为 2 Hz, 样品温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 。毛细管预先在 20 psi 压力下分别运行 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 冲洗 10 min、

$0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 冲洗 5 min、超纯水冲洗 2 min 进行预处理, 然后在 70 psi 压力下预填充胶 10 min, 15 kV 分离电压反相极性运行 10 min 进行电泳预平衡。单克隆抗体蛋白样品进样电压为 5 kV, 反相极性进样 20 s; 样品分离电压为 15 kV, 反相极性分离 35 min。人血白蛋白和转铁蛋白混合样品进样电压为 5 kV, 反相极性进样 20 s; 样品分离电压为 18 kV, 反相极性分离 25 min, 每份样品检测 1 次。

MCE-1000 国产芯片毛细管电泳仪: 根据 MCE-1000 操作手册对微流控电泳芯片进行处理, 将处理后的芯片放置于仪器中进行预热和对焦等步骤, 完成仪器自校准后, 将制备好的装有供试品的 96 孔板进行上机检测, 每份样品检测 1 次。

3 仪器性能比对研究

为充分考察 MCE-1000 国产芯片毛细管电泳仪对蛋白样品检测的性能, 本实验初期制备了不同梯度浓度的非还原性人血白蛋白样品和转铁蛋白混合溶液, 分别从线性、准确度、重复性、定量限和检测限等方面进行了研究。线性检测结果以样品浓度为横坐标, 对应峰面积为纵坐标进行线性拟合, 检测限以信噪比为 3:1 或实际检测最低浓度时进行确定, 定量限以信噪比为 10:1 或实际检测最低浓度时进行确定。

3.1 分子量标准品迁移速率

采用试剂盒自带分子量标准品对 2 台不同型号的毛细管电泳仪进行进样, 采集不同分子量蛋白的出峰时间, 并以蛋白分子量 (kDa) 的 log 值为纵坐标, 迁移时间为横坐标进行线性拟合分析。结果显示, 分子量大小不同的蛋白其迁移时间与分子量大小的对数成良好线性关系, R^2 均 ≥ 0.98 , 见图 1。

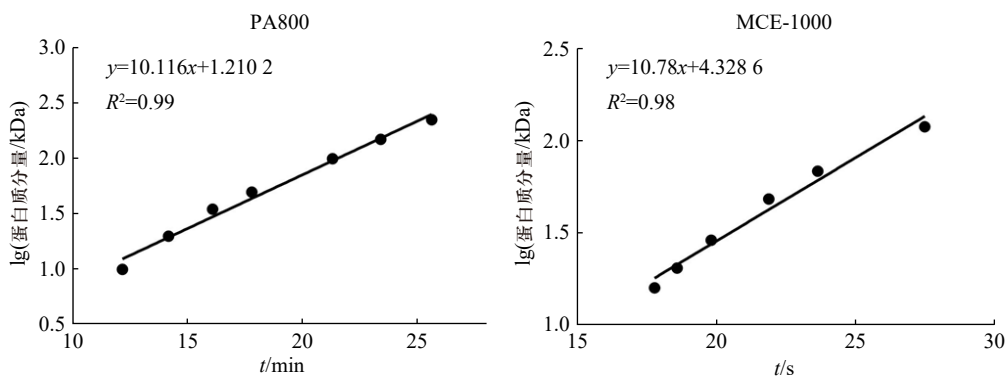


图 1 分子量标准品迁移速率线性图

Fig. 1 Linear results of molecular weight standard migration rate

3.2 专属性

分别进样非还原人血白蛋白样品和转铁蛋白混合溶液、空白对照溶液，分析空白对照组中是否存在干扰峰。结果显示，空白对照组在样品峰范围内无干扰峰存在，见图2，表明该方法具有良好的专属性。

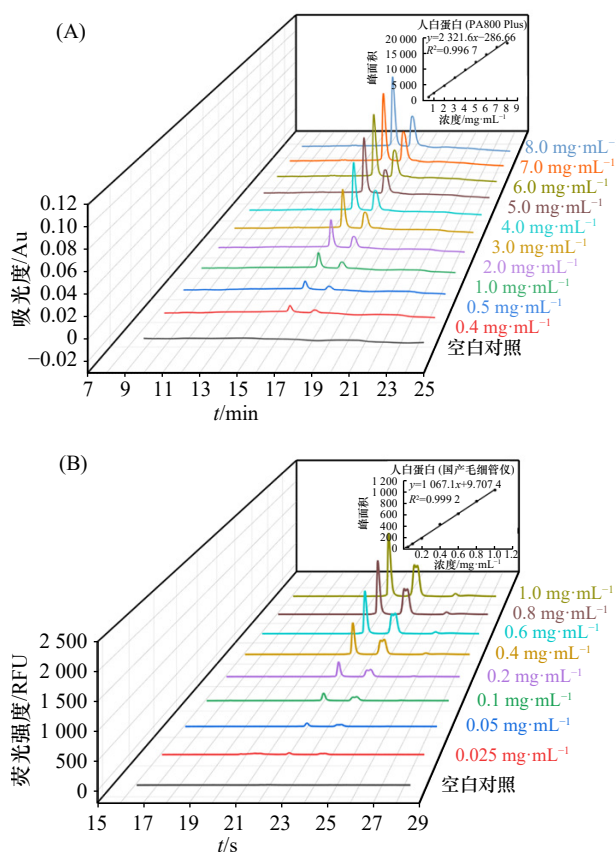


图2 毛细管电泳仪检测人白蛋白线性结果
A-PA800 Plus 毛细管电泳仪；B-国产芯片毛细管电泳仪。

Fig. 2 Linear results of human albumin by capillary electrophoresis instrument

A-PA800 Plus capillary electrophoresis instrument; B-domestic chip capillary electrophoresis instrument.

3.3 线性、检测限及定量限

PA800 Plus 毛细管电泳仪：制备系列梯度浓度非还原人血白蛋白样品 ($0.4\sim 8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和转铁蛋白 ($0.2\sim 4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 混合溶液进行上机检测，结果显示 (图2A) 人血白蛋白和转铁蛋白在上述浓度范围内均具有良好的线性关系，且 $R^2 \geq 0.99$ 。其中，人血白蛋白在 $0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时的性噪比 S/N 分别为 3.29 和 13.32。

MCE-100 国产芯片毛细管电泳仪：制备系列梯度浓度非还原性人血白蛋白样品 ($0.025\sim 1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和转铁蛋白 ($0.0125\sim 0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行上机检测，

结果显示 (图2B)，人血白蛋白上述浓度范围内均具有良好的线性关系，且 $R^2 \geq 0.99$ 。其中，人血白蛋白在 $0.025\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时的性噪比 S/N 分别为 7.76 和 17.34。

上述结果表明，MCE-1000 和 PA800 Plus 毛细管电泳仪对不同浓度梯度的非还原性人血白蛋白样品检测均具有良好的性能。同时，与 PA800 Plus 毛细管电泳仪相比，MCE-1000 能够对浓度更低的蛋白进行检测，灵敏度约是其 16 倍；此外，国产芯片毛细管电泳仪对每个样品检测时间 $< 1\text{ min}$ ，比 PA800 Plus 毛细管电泳仪更具效，能够快速、高通量地对样品完成检测。

3.4 相对准确度

PA800 Plus 毛细管电泳仪分别制备 4.0 、 5.0 、 $6.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 目标浓度样品溶液，MCE-1000 分别制备 0.2 、 0.4 、 $0.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 目标浓度样品溶液，每个浓度平行制备 3 份样品，上机检测。实验结果分析以各中间浓度 (如 $5.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 样品作为 100% 目标蛋白浓度溶液，理论总修正峰面积 = 100% 目标蛋白浓度溶液的实测总修正平均峰面积 \times 稀释倍数，回收率 (%) = 实测总修正平均峰面积 / 理论总修正峰面积 $\times 100\%$ 。结果显示，2 台不同的仪器对人白蛋白样品均具有良好的回收率，回收率在 95%~105%，见表 1。

3.5 精密度

3.5.1 重复性 本研究初期继续选择人白蛋白与转铁蛋白的混合溶液进行测试，并从人白蛋白的峰面积百分比 (纯度)、峰面积、出峰时间以及分离度等参数仪器性能稳定性进行了考察，结果见表 2~3。从峰面积和迁移时间来看，2 台不同仪器对人白蛋白检测的重复性均表现良好， $RSD \leq 2\%$ ；MCE-1000 对该样品的分离度略优于 PA800 Plus 毛细管电泳仪；但从纯度方面来看，PA800 Plus 毛细管电泳仪结果略偏大，MCE-1000 的检测结果偏小，二者的差异主要是由仪器本身造成的，因此建议在需要对样品进行定量时应选择同一种仪器进行分析。

3.5.2 中间精密度 以浙江海康生物有限公司的人血白蛋白为供试品，分别制备 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (PA800 Plus) 和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MCE-1000) 待测样品，每份样品平行制备 6 份，由不同人员在不同日期内进行检测，结果见表 4。从峰面积和迁移时间来看，

表 1 不同仪器的相对准确度结果

Tab. 1 Relative accuracy results of different instruments

仪器	浓度/mg·mL ⁻¹	迁移时间	实测峰面积	实测总修正平均峰面积	理论总修正峰面积	回收率/%
PA800 Plus	4.0	16.8 min	7 086.93	7 090.67	7 193.93	98.6
		16.8 min	7 047.36			
		16.8 min	7 137.71			
	5.0	16.8 min	9 111.34	8 992.41	8 992.41	100.0
		16.8 min	8 968.04			
		16.8 min	8 897.86			
	6.0	16.8 min	11 076.37	11 078.43	10 790.90	102.7
		16.8 min	11 084.84			
		16.8 min	11 074.09			
MCE-1000	0.2	22.1 s	194.78	200.63	207.90	96.3
		22.1 s	202.77			
		22.1 s	204.33			
	0.4	22.3 s	414.55	415.89	415.89	100.0
		22.3 s	416.19			
		22.3 s	416.92			
	0.6	22.3 s	602.60	600.68	623.83	96.5
		22.3 s	596.38			
		22.3 s	603.07			

表 2 PA800 Plus 人白蛋白重复性结果

Tab. 2 Repeatability results of human albumin by PA800 Plus

编号	峰面积		迁移时间/ min	分离度	纯度/%
	人血白蛋白	转铁蛋白			
1	11 470.35	7 001.86	16.4	2.9	62.10
2	11 500.14	7 045.66	16.4	2.9	62.01
3	11 917.28	7 289.10	16.4	2.9	62.05
4	11 578.57	7 052.33	16.4	2.9	62.15
5	11 896.37	7 182.81	16.4	2.9	62.35
6	11 865.75	7 219.26	16.4	2.9	62.17
7	11 857.28	7 211.36	16.4	3.0	62.18
8	12 002.31	7 209.65	16.5	2.9	62.47
9	11 998.00	7 244.10	16.5	2.9	62.35
10	11 506.35	6 945.36	16.5	3.0	62.36
RSD/%	1.76	1.56	0.30	1.37	0.23

表 3 MCE-1000 人白蛋白重复性结果

Tab. 3 Repeatability results of human albumin by MCE-1000

编号	峰面积		迁移 时间/s	分离度	纯度/%
	人血白蛋白	转铁蛋白			
1	425.50	499.81	22.1	3.4	45.98
2	424.66	496.60	22.1	3.4	46.10
3	424.51	498.69	22.1	3.4	45.98
4	431.42	506.63	22.1	3.5	45.99
5	428.67	501.85	22.1	3.4	46.07
6	427.53	501.76	22.1	3.4	46.01
7	424.58	499.15	22.1	3.4	45.96
8	426.33	498.71	22.1	3.4	46.09
9	427.68	500.80	22.1	3.4	46.06
10	425.71	497.23	22.1	3.4	46.13
RsD/%	0.49	0.55	0.00	0.88	0.12

2 台仪器的重复性能均表现良好, 组内 CV 值<5%, 组间 CV 值<10.2%, 其中国产芯片毛细管电泳仪的峰面积不同人员间的总体 CV 值较大, 与其检测浓度较低, 峰面积积分值较小有关。

表 4 人白蛋白中间精密度结果

Tab. 4 Intermediate precision results of human albumin

实验人员	编号	PA800 Plus		MCE-1000	
		峰面积	迁移时间/min	峰面积	迁移时间/s
A	1	9 951.75	16.6	903.95	22.0
	2	10 784.56	16.7	915.13	22.0
	3	11 110.94	16.7	908.14	22.0
	4	10 766.03	16.7	906.73	22.0
	5	10 287.20	16.7	911.81	22.0
	6	10 721.49	16.7	919.34	22.0
	CV/%		3.90	0.24	0.63
B	1	10 874.12	16.9	1 079.44	22.6
	2	10 962.92	16.9	1 054.66	22.6
	3	10 964.93	16.9	1 072.36	22.6
	4	11 216.35	16.9	1 108.52	22.5
	5	11 083.95	16.9	1 138.95	22.4
	6	11 117.03	16.9	1 148.56	22.4
	CV/%		1.13	0.00	3.45
组间CV/%		3.41	0.69	10.17	1.27

3.6 稳定性及耐用性

本研究还针对 MCE-1000 的稳定性及耐用性进行初步探索, 以 0.4 mg·mL⁻¹ 人白蛋白为例, 分别于第 1 天和第 2 天制备 30 份样品进行检测, 同时对第 2 天样品进行室温放置 6 h 处理, 再次上机

检测。结果见图 3，3 次试验共 90 次检测结果其迁移时间平均值为 24.66 s，RSD 为 2.81%；分子量平均值为 57.74 kDa，RSD 为 1.32%，该结果表明 MCE-1000 具有良好的稳定性。同时，日间不同时间检测结果其平均迁移时间相对偏差为 0.96%，平均分子量相对偏差为 0.36%，也表明该仪器对蛋白样品的检测具有良好的耐用性。

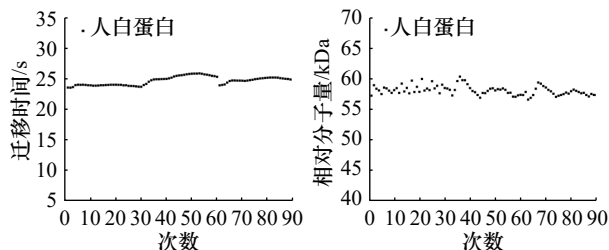


图 3 MCE-1000 稳定性及耐用性结果

Fig. 3 Stability and durability results of MCE-1000

4 国产芯片毛细管电泳仪还原性单抗药物检测应用

毛细管电泳仪在单克隆抗体药物领域应用已非常广泛，主要用于纯度、等电点及异质性等分析。其中，基于 CE-SDS 法对抗药物进行纯度分析和质量控制的技术早已非常成熟，主要用于还原性和非还原性单抗药物的纯度检测。在还原性单抗样品检测过程中，不仅需要对抗轻链和重链进行分离、定量，还要求能够对非糖基化重链进行很好的分离和准确定量，对毛细管电泳仪性能要求具备更高的分辨率。基于此，本研究选择以还原性单抗药物为研究对象，采用国产芯片毛细管电泳仪分别进行线性、相对准确度、精密度、定量限及检测限等参数的方法验证研究。

4.1 专属性

分别进样还原性单抗样品溶液和空白对照溶液，分析空白对照组中是否存在干扰峰，结果见图 4。空白对照组在样品峰范围内无干扰峰存在，表明该方法具有良好的专属性。

4.2 线性、定量限及检测限

制备系列梯度浓度还原性单抗药物参考品溶液进行上机检测，结果显示 (图 4)，在浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，还原性单抗样品的非糖基化重链无信号峰，故进行线性分析时舍去该浓度点。同时，以轻链的峰面积为纵坐标，对应浓度为纵坐标对其进行线性分析，其线性方程式为 $y = 1144.3x - 75.67$ ， R^2 为 0.9952。同时，在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

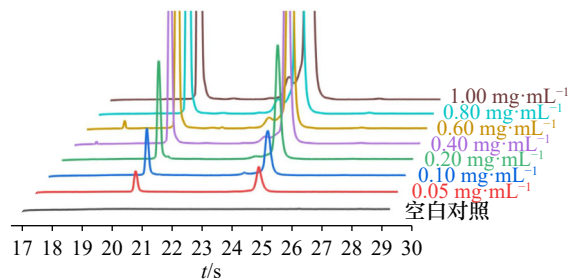


图 4 国产芯片毛细管电泳仪检测单克隆抗体线性结果

Fig. 4 Linear results of mAbs by domestic chip capillary electrophoresis instrument

浓度时非糖基化的性噪比 S/N 为 13.95，但因该仪器在低浓度时检测非糖基化重链峰信号变化极大，故该单抗样品的检测限和定量限采用实际测定值，其检出限和定量限均为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.3 相对准确度

分别制备 0.2 、 0.4 、 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 目标浓度样品溶液，每个浓度平行制备 3 份样品，上机检测，实验结果分析方法同“3.2”项。结果表明，MCE-1000 对还原性单抗样品具有较好的回收率，在 $80.82\% \sim 115.15\%$ ，见表 5。

表 5 单克隆抗体的相对准确度结果

Tab. 5 Relative accuracy results of mAbs

浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	轻链实测 峰面积	轻链实测总修 正平均峰面积	轻链理论总 修正峰面积	回收率/ %
0.2	146.87	149.21	184.62	80.82
	146.03			
	154.74			
0.4	374.28	369.24	369.24	100.00
	366.95			
	366.49			
0.6	709.20	637.75	553.86	115.15
	609.59			
	594.46			

4.4 精密度

由不同实验人员在不同日期分别制备 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 还原性单抗溶液，每次平行制备 6 份样品进行测定。结果显示，MCE-1000 能够稳定地完成还原性单抗样品轻链、重链及非糖基化重链的分离及检测，其中轻链和重链峰面积的 CV 值 $< 4\%$ ，迁移时间及纯度的 CV 值 $< 1\%$ ，见表 6。

5 国产芯片毛细管电泳仪非还原性单抗药物检测的初步探索

本研究还对非还原性单抗药物的检测进行初步探索，MCE-1000 平行制备 2 份 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 非

还原性单抗溶液样品，PA800 平行制备 2 份 1.0 mg·mL⁻¹ 非还原性单抗溶液样品进行测定。结果表明，对于样品纯度的检测结果，MCE-1000 与 PA800 无明显差别，见表 7。但从图谱上看，MCE-1000 有明显的前沿峰效应，杂质峰与主峰没有很好的分离，与 PA800 的相比，分离效果略差，见图 5。目前，课题组已着手从仪器和试剂盒两方面进行进一步优化，故此，对于非还原性单抗药物的其他方法内容研究暂时还未全面开展。

6 讨论

自中国药典 2015 年版正式收录了毛细管电泳法以来，经过多年发展，毛细管电泳法已在多领域取得了重大应用，不仅仅在生物医药领域，甚至扩展到食品、中药、化学药以及农药等领域^[27-29]。然而，国内大多数厂家及公司当前使用的毛细管电泳仪均以进口仪器为主，我国拥有自主化知识产权的毛细管电泳仪发展非常缓慢。本研究通过对一种国产的基于微流控原理的芯片毛细管电泳仪 (MCE-1000) 在 SDS-gel 分离模式下进行了性能研究分析，在对常规蛋白类样品分析过程中，本研究以 PA800 Plus 毛细管电泳仪为参比对象。研究结果表明，在线性、定量准确、重复稳定性等方面，该国产芯片毛细管电泳仪能够达到

进口仪器 (PA800 Plus) 的同等水平，以峰面积、迁移时间等参数进行评估，在同一组实验内的 CV 值均 <4%，满足常规蛋白类样品检测分析的误差要求。在对还原性单抗样品的分析过程中，国产芯片毛细管仪仍具有良好的分辨率，能够较好地完成还原性单抗样品中非糖基化重链的分离，并且纯度分析重复性的 CV 值 <1%，样品相对准确度达到 80.82%~115.15%。此外，因该国产芯片毛细管电泳仪采用的是微流控芯片技术，其检测速度也明显优于 PA800 Plus 毛细管电泳仪，平均每份样品检测时间 <1 min，能够快速、高效、高精度地完成样品的检测，非常适合研发初期高通量样品的筛选应用。但对于非还原性单抗的检测，国产芯片毛细管电泳仪还需进一步改善优化。

该国产仪器之所以优于 CE 毛细管电泳仪，其主要原因在于传统的 PA800 系统依赖于紫外-可见吸收光谱 (UV-Vis) 进行检测，而芯片电泳则采用激光诱导荧光 (laser-induced fluorescence, LIF) 技术。LIF 在检测灵敏度上显著优于 UV-Vis，通常高出 2~3 个数量级^[30]。这种显著差异主要源于背景噪声，激发光强和检测物质特性：背景噪声方面，UV-Vis 检测由于透射光的量子噪声，背景信

表 6 单克隆抗体的精密度结果

Tab. 6 Precision results of mAbs

实验人员	编号	峰面积			迁移时间/s			纯度/%	
		轻链	重链	非糖基化重链	轻链	重链	非糖基化重链	轻链和重链	非糖基化重链
A	1	490.15	1 590.46	53.56	19.86	24.00	23.25	97.5	2.5
	2	474.46	1 571.88	38.87	19.85	23.98	23.22	98.1	1.9
	3	475.94	1 591.32	39.84	19.85	23.99	23.25	98.1	1.9
	4	494.97	1 661.09	35.09	19.84	23.96	23.23	98.4	1.6
	5	506.03	1 666.79	30.01	19.87	24.00	23.25	98.6	1.4
	6	496.16	1 636.06	35.83	19.60	23.65	22.91	98.3	1.7
	CV/%	2.51	2.49	20.54	0.53	0.58	0.58	0.38	20.60
B	1	524.75	1 600.39	32.91	19.89	24.02	23.30	98.5	1.5
	2	526.48	1 584.35	32.68	19.95	24.10	23.38	98.5	1.5
	3	521.69	1 558.92	30.86	19.93	24.08	23.34	98.5	1.5
	4	526.28	1 564.16	30.22	19.93	24.06	23.32	98.6	1.4
	5	513.31	1 511.49	31.01	19.90	24.01	23.31	98.5	1.5
	6	522.75	1 559.27	28.01	19.86	23.96	23.26	98.7	1.3
	CV/%	0.94	1.93	5.78	0.17	0.21	0.17	0.08	5.77
总体CV/%		3.83	2.83	19.75	0.45	0.48	0.51	0.33	20.03

表 7 非还原性单克隆抗体的纯度结果

Tab. 7 Purity results for non-reducing monoclonal antibodies precision results of mAbs

仪器型号	样品编号	峰面积		纯度/%
		杂质峰	主峰	
PA800	1	354.06	13 158.11	97.4
	2	329.63	12 975.40	97.5
MCE-1000	1	45.91	2 241.68	98.0
	2	49.32	2 258.26	97.9

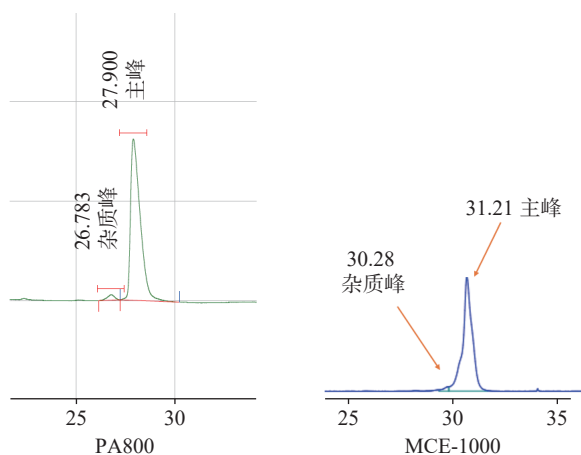


图 5 非还原性单抗结果峰形图

Fig. 5 Peak plots of non-reducing mAbs results

号相对较强。相比之下, LIF 通过滤光片有效屏蔽激发光, 从而大幅减少背景噪声^[31]。激发光强度方面, LIF 使用激光作为激发光源, 具有高强度和优异的单色性, 能够激发更多目标分子, 产生更强的荧光信号。而 UV-Vis 通常采用氙灯或钨灯作为光源, 其光强相对较弱^[31]。此外, 检测物质的特性也影响检测灵敏度。UV-Vis 的灵敏度受物质自身旋光系数的影响, 对于旋光系数较小的物质, 检测效果可能不佳^[32]。而 LIF 技术通过在目标物质上标记多个荧光基团, 可以显著增强初始荧光信号, 从而提高检测灵敏度。

芯片电泳技术在分离速度方面展现出显著优于传统毛细管电泳的特性, 这主要归因于 2 个关键因素。首先, 芯片电泳通过微通道结构能够调节样品进样长度。根据电泳理论, 理论塔板高度与进样长度的平方成正比关系, 因此减少进样长度可以显著提高分离效率。Jacobson 等^[33]研究表明, 芯片电泳的进样量可低至皮升级别, 比传统毛细管电泳减少了 2~3 个数量级。Harrison 等^[34]利用芯片电泳技术, 可在 <30 s 内完成氨基酸的分离, 相较于传统毛细管电泳方法, 分析时间缩短

了 90% 以上。其次, 芯片电泳系统由于其较大的比表面积, 热量可以更有效地散发, 从而允许施加更高的电压。高电压的应用不仅提高了电泳的迁移速度, 而且减少了由扩散引起的样本条带展宽问题。Effenhauser 等^[35]实验证实, 芯片电泳可以承受高达 $1\ 200\ \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的电场强度, 而传统毛细管电泳通常限制在 $300\sim 500\ \text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 范围内。

REFERENCES

- [1] MAHAJAN R V, CHAND S, SINGH M P, et al. Advances in production of therapeutic monoclonal antibodies[M].//SARAN S, BABU V, CHUABEY A. High Value Fermentation Products: Human Health. Scrivener Publishing LLC, 2019: 165-191.
- [2] ZINN S, VAZQUEZ-LOMBARDI R, ZIMMERMANN C, et al. Advances in antibody-based therapy in oncology[J]. *Nat Cancer*, 2023, 4(2): 165-180.
- [3] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(7): 491-495.
- [4] SPROULE K, MORRILL P, PEARSON J C, et al. New strategy for the design of ligands for the purification of pharmaceutical proteins by affinity chromatography[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 740(1): 17-33.
- [5] BECK A, WAGNER-ROUSSET E, AYOUB D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(2): 715-736.
- [6] LI S P, ZHANG Z L, XU S C, et al. Considerations on the analytical similarity study between monoclonal antibody biosimilars and reference drugs[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2022, 31(6): 523-531.
- [7] WANG H, WU L P, ZHENG L X, et al. Establishment of analytic platform of physicochemical characteristics for therapeutic monoclonal antibodies based on USP general principle[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2020, 37(23): 2817-2827.
- [8] KARGER B L, COHEN A S, GUTTMAN A. High-performance capillary electrophoresis in the biological sciences[J]. *J Chromatogr*, 1989(492): 585-614.
- [9] SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. *Anal Biochem*, 1987, 166(2): 368-379.
- [10] CHEVALLET M, LUCHE S, RABILLOU T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1852-1858.
- [11] ZHANG J G, BURMAN S, GUNTURI S, et al. Method development and validation of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for the characterization of a monoclonal antibody[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(5): 1236-1243.
- [12] XU G L, DU J L, FU Z H, et al. Validation of reduced CE-SDS method for monoclonal antibody drugs[J]. *J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报)*, 2024, 55(7): 916-921.
- [13] BECKMAN J, SONG Y L, GU Y, et al. Purity determination

- by capillary electrophoresis sodium hexadecyl sulfate (CE-SHS): A novel application for therapeutic protein characterization[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(4): 2542-2547.
- [14] FILEP C, GUTTMAN A. Electromigration dispersion in sodium dodecyl sulfate capillary gel electrophoresis of proteins[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(38): 13092-13099.
- [15] HE Y, ISELE C, HOU W Y, et al. Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(5): 548-555.
- [16] OU X W, CHEN P, HUANG X Z, et al. Microfluidic chip electrophoresis for biochemical analysis[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(1): 258-270.
- [17] ŠTĚPÁNOVÁ S, KAŠIČKA V. Recent developments and applications of capillary and microchip electrophoresis in proteomics and peptidomics (mid-2018-2022)[J]. *J Sep Sci*, 2023, 46(12): e2300043.
- [18] HATHAWAY L J, BRUGGER S, MARTYNOVA A, et al. Use of the Agilent 2100 bioanalyzer for rapid and reproducible molecular typing of *Streptococcus pneumoniae*[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3): 803-809.
- [19] BRENA R M, AUER H, KORNACKER K, et al. Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(3): e17.
- [20] LU C Y, TSO D J, YANG T, et al. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer[J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 318(1/2): 97-105.
- [21] YAGI Y, KAKEHI K, HAYAKAWA T, et al. Application of microchip electrophoresis sodium dodecyl sulfate for the evaluation of change of degradation species of therapeutic antibodies in stability testing[J]. *Anal Sci*, 2014, 30(4): 483-488.
- [22] PIPARIA R, OUELLETTE D, STINE W B, et al. A high throughput capillary electrophoresis method to obtain pharmacokinetics and quality attributes of a therapeutic molecule in circulation[J]. *MAbs*, 2012, 4(4): 521-531.
- [23] SCHELLER C, KREBS F, WIESNER R, et al. A comparative study of CE-SDS, SDS-PAGE, and Simple Western-Precision, repeatability, and apparent molecular mass shifts by glycosylation[J]. *Electrophoresis*, 2021, 42(14/15): 1521-1531.
- [24] CAI H, SONG Y L, ZHANG J, et al. Optimization of microchip-based electrophoresis for monoclonal antibody product quality analysis revealed needs for extra surfactants during denaturation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016(120): 46-56.
- [25] ŠTĚPÁNOVÁ S, KAŠIČKA V. Analysis of proteins and peptides by electromigration methods in microchips[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(1): 228-250.
- [26] SMITH M T, ZHANG S, ADAMS T, et al. Establishment and validation of a microfluidic capillary gel electrophoresis platform method for purity analysis of therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Electrophoresis*, 2017, 38(9/10): 1353-1365.
- [27] WANG J, ZHANG Y M, HAO Z Y, et al. Fingerprint chromatogram of polygalae radix from Shanxi Province with HPCE[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2012, 29(2): 133-136.
- [28] DONG Y L, CHEN X J, HU J, et al. Recent advances in the application of high performance capillary electrophoresis for food safety[J]. *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2012, 30(11): 1117-1126.
- [29] ZHANG G L, JING R X, GUO L, et al. Analysis technology and application progress of therapeutic monoclonal antibody drugs[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2021, 30(6): 528-534.
- [30] GONG M J, WEHMEYER K R, LIMBACH P A, et al. On-line sample preconcentration using field-amplified stacking injection in microchip capillary electrophoresis[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(11): 3730-3737.
- [31] SCHULZE P, BELDER D. Label-free fluorescence detection in capillary and microchip electrophoresis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(2): 515-525.
- [32] OU G Z, FENG X J, DU W, et al. Recent advances in microchip electrophoresis for amino acid analysis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(25): 7907-7918.
- [33] JACOBSON S C, HERGENRODER R, KOUTNY L B, et al. Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip electrophoresis devices[J]. *Anal Chem*, 1994, 66(7): 1107-1113.
- [34] HARRISON D J, FLURI K, SEILER K, et al. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip[J]. *Science*, 1993, 261(5123): 895-897.
- [35] EFFENHAUSER C S, PAULUS A, MANZ A, et al. High-speed separation of antisense oligonucleotides on a micromachined capillary electrophoresis device[J]. *Anal Chem*, 1994, 66(18): 2949-2953.

收稿日期: 2024-03-29

(本文责编: 曹粤锋)