

生物药品是指运用重组DNA技术或细胞培养技术生产的蛋白质类药品，其特征是以作为生物起源的高分子作为原料。关于其试验方法和评价方法，已经提出数种方针和准则。

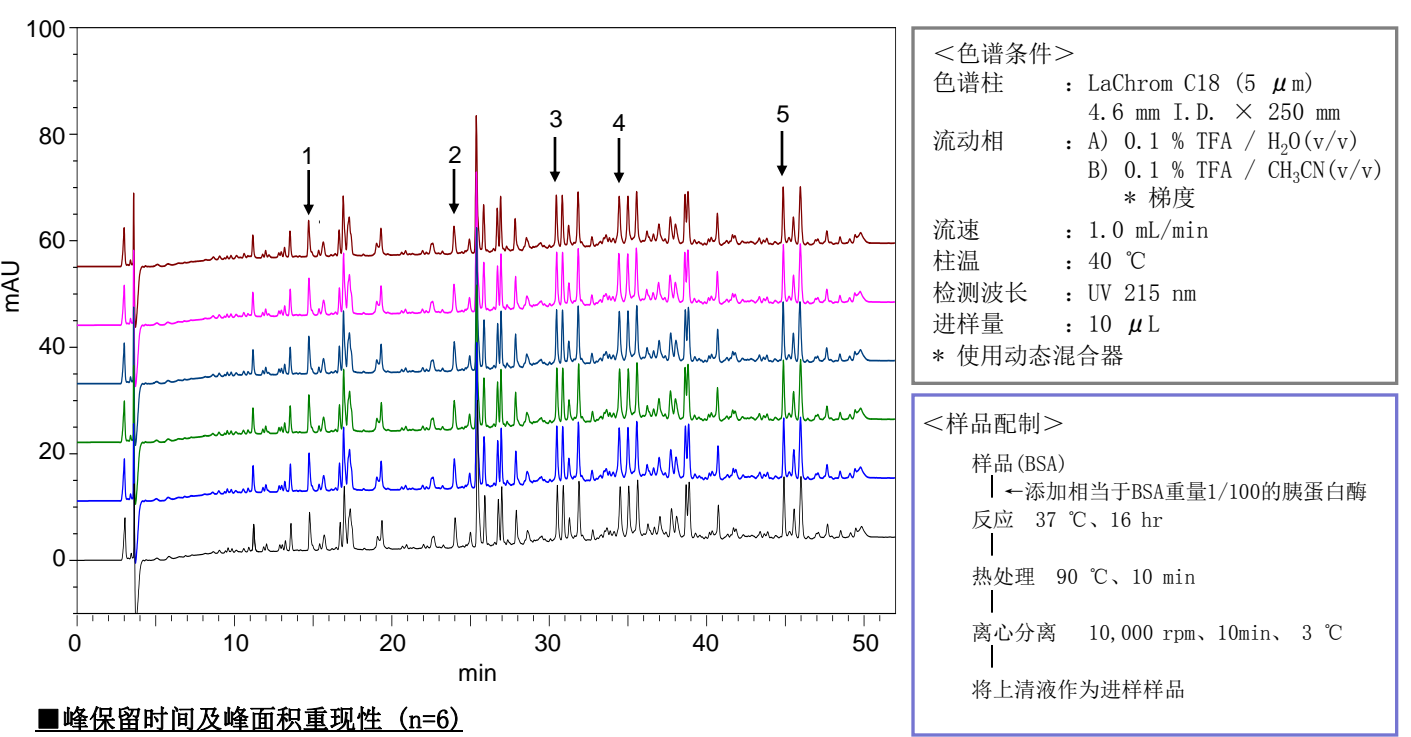
此次，我们将介绍作为生物药品鉴别方法之一的“肽图法”。肽图法是旨在进行蛋白质的特性解析、同一性或稳定性的评价、变异检测的方法。为了对多个出现肽峰的LC色谱图的洗脱模式进行比较，良好的峰保留时间和峰面积的重现性将成为非常重要的因素。

在此，我们以BSA和作为生物药品代表的抗体药物（IgG）作为模型样品，使用LC测定其消化物，并对重现性进行了评价。

◆肽图法简介◆



■BSA（牛血清白蛋白）消化物的测定例



■峰保留时间及峰面积重现性 (n=6)

【保留时间】	峰No.	1	2	3	4	5
	Average	13.579	23.998	30.508	34.488	44.911
	SD	0.009	0.012	0.012	0.018	0.012
	%RSD	0.06	0.05	0.04	0.05	0.03

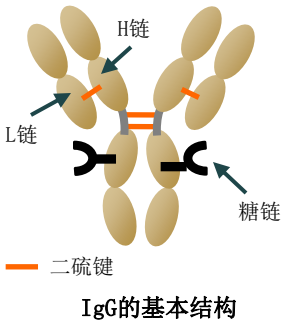
【峰面积】	峰No.	1	2	3	4	5
	Average	313951	477180	729175	922057	814068
	SD	6957	11499	17599	22397	21035
	%RSD	2.22	2.41	2.41	2.43	2.58

反复测定6次，峰保留时间的重现性(%RSD)在0.06%以下，峰面积重现性(%RSD)在 2.6%以下，获得了良好的重现性。据此可知，利用肽图法能够进行高可靠性的色谱模式分析。

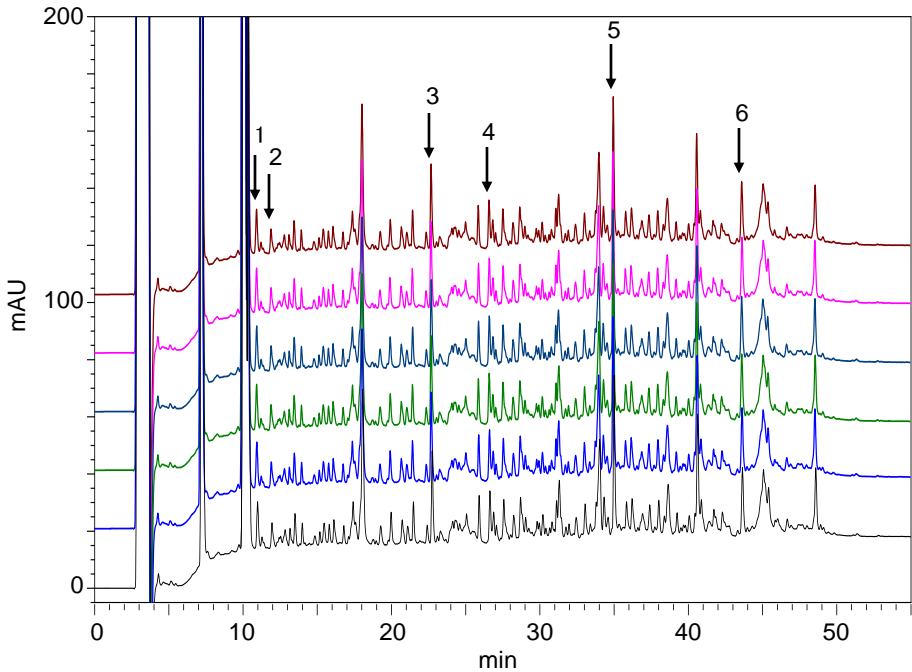
◆抗体药物 (IgG) 的结构◆

生物药品中利用抗体(免疫球蛋白)的抗体药物，多为具有糖链结构的糖蛋白，因其较高的特异性和有效性而备受瞩目。虽然存在多种免疫球蛋白，但作为抗体药物而投入实际应用的主要是IgG，其特征为具有“Y”字型的四链体结构。H链、L链各2条，分别以S-S键(二硫键)相连接，从而形成Y字型的异源四聚体。同时，经翻译后修饰与糖链相结合，该糖链结构可对活性产生很大影响。

在此将IgG经过还原烷基化处理后利用胰蛋白酶进行消化，使用LC测定其肽断片，并对色谱模式中峰的保留时间和峰面积的重现性进行了评价。



■IgG消化物的测定例



<色谱条件>

色谱柱 : LaChrom C18(5 μm)
4.6 mm I.D. × 250 mm

流动相 : A) 0.1 % TFA / H₂O(v/v)
B) 0.1 % TFA / CH₃CN(v/v)
* 梯度

流速 : 1.0 mL/min

柱温 : 40 °C

检测波长 : UV 215 nm

进样量 : 10 μL

* 使用动态混合器

<样品配制>

样品 (IgG)
└─添加二硫苏糖醇 (DTT)，使最终浓度达到10 mmol/L

反应 37 °C、30 min

└─添加碘乙酰胺 (IAA)，使最终浓度达到40 mmol/L

反应 37 °C、30min、遮光

└─添加半胱氨酸 (Cys)，使最终浓度达到40 mmol/L

反应 37 °C、30 min

└─添加相当于IgG重量1/100的胰蛋白酶

反应 37 °C、16 hr

└─热处理 90 °C、10 min

└─离心分离 10,000 rpm、10min、3 °C

└─将上清液作为进样样品

①还原烷基化处理

■峰保留时间及峰面积重现性 (n=6)

【保留时间】	峰No.	1	2	3	4	5	6
	Average	10.960	11.934	22.716	26.630	34.979	43.647
	SD	0.012	0.011	0.013	0.010	0.013	0.010
	%RSD	0.11	0.09	0.06	0.04	0.04	0.02

【峰面积】	峰No.	1	2	3	4	5	6
	Average	131165	80680	227672	135253	418818	200076
	SD	2547	2585	6966	4474	16010	8164
	%RSD	1.94	3.20	3.06	3.31	3.82	4.08

反复测定6次，峰保留时间的重现性(%RSD)在 0.1%以下，峰面积重现性(%RSD)在4.1%以下，获得了良好的重现性。据此可知，对于IgG消化物这类更为复杂的肽的测定，也能够进行高可靠性的色谱模式分析。

主要仪器配置：Chromaster
5110 泵(低压梯度、动态混合器)、5210 自动进样器、5310 柱温箱、5410 UV检测器

注意：本资料所示数据仅为测定例用数据而非可保证仪器性能的数据。
仪器只是研究用仪器，而不是诊断、治疗或预防人或动物疾病的医疗仪器。