

生物兼容液相色谱仪测定 PEG 修饰酶蛋白的 PEG 平均修饰度

LC-484

摘要： 本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio，通过将紫外检测器和示差折光检测器串联，计算得到 PEG 修饰酶蛋白的 PEG 平均修饰度。同时，采用多角度光散射检测器对 PEG 修饰酶蛋白的分子量进行分析，结果与 PEG 平均修饰度计算得到分子量偏差为 7.10%，进一步验证了 PEG 平均修饰度计算结果的准确性。

关键词： PEG 修饰酶蛋白 平均修饰度 多角度光散射检测器

技术特点：

- ❖ 将示差折光检测器和紫外检测器串联，通过间接计算方法得到 PEG 修饰酶蛋白的 PEG 平均修饰度；
- ❖ 将示差折光检测器和 MALS 检测器并联，不需要标准品即可测定 PEG 修饰酶蛋白的分子量，验证了 PEG 平均修饰度计算的准确性。

随着生物技术的发展，人们可以通过发酵工程、基因工程等途径获得所需的蛋白质。但经过大量的临床研究发现，有些未经任何修饰的蛋白类药物在体内具有半衰期短、免疫原性强、稳定性差、易被体内酶降解等缺陷，从而降低了临床效果。聚乙二醇 (PEG) 是 $[\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}]$ 的多聚物，是经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的极为少数的可作为体内注射药用的聚合物之一。蛋白类药物经过聚乙二醇修

饰后，降低了蛋白酶对蛋白类药物的降解作用，增加药物的稳定性和溶解性，可延长蛋白类药物在体内的半衰期，减少给药次数。

PEG 偶联至蛋白后，需对蛋白上结合的 PEG 数量进行质量控制。本文将示差折光检测器与紫外检测器串联，计算得到 PEG 修饰蛋白的 PEG 平均修饰度，并通过 MALS 检测器测定 PEG 修饰蛋白分子量，进一步验证 PEG 平均修饰度计算的准确性。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津生物兼容液相色谱系统 (Nexera Bio)。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	柱温箱：	CTO-20AC
脱气机：	DGU-20A 3R	检测器 1：	RID-20A
输液泵：	LC-20AD XR	检测器 2：	SPD-20A
自动进样器：	SIL-20A XR	检测器 3：	MALS*
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.118		
MALS*：	多角度光散射检测器		

1.2 分析条件

色谱柱：	SHIMSEN Ankylo SEC-300, (300 mm×7.8 mm I.D., 3μm), 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N 380-01215-10
流动相：	50 mM 磷酸缓冲盐 (pH=6.8) + 300 mM 氯化钠水溶液 + 50mM 精氨酸：乙腈 = 90 : 10

流	速	: 0.8 mL/min	示差检测器温度	: 35°C
进	样	体 积 : 20 μ L	紫外检测器温度	: 35°C
柱	温	: 30°C	紫外检测波长	: 280 nm

■ 标准溶液和样品配制方法

酶蛋白标准溶液：准确称取酶蛋白 10 mg，用流动相溶解并定容至 1 mL，浓度为 10 mg/mL，作为储备液。再采用流动相逐级稀释至 0.1、0.2、0.5、0.8、1 mg/mL，作为酶蛋白标准溶液；

PEG 标准溶液：准确称取 PEG 10 mg，用流动相溶解并定容至 1 mL，浓度为 10 mg/mL，作为储备液。再采用流动相逐级稀释至 0.1、0.2、0.5、0.8、1 mg/mL，作为 PEG 标准溶液；

PEG 修饰酶样品：采用流动相将 PEG 修饰酶蛋白样品稀释 10 倍，浓度约为 1 mg/mL。

■ 结果与讨论

3.1 PEG 平均修饰度计算原理

参考专利《聚乙二醇化蛋白类药物的平均修饰度测定方法》^[1]，采用紫外检测器(UV)与示差折光检测器(RID)串联测定 PEG 修饰蛋白样品中 PEG 平均修饰度。由于 PEG 分子中缺乏紫外吸收基团，在紫外检测器中无响应信号，因此可通过蛋白组分在紫外检测器中的响应值，结合其对应的 UV 校准曲线，计算得到 PEG 修饰蛋白中蛋白部分的浓度。

同时，基于蛋白在示差折光检测器中的校准曲线可推算出蛋白部分对 PEG 修饰蛋白样品总示差信号的贡献值。将 PEG 修饰蛋白样品在 RID 中的实测响应值扣除蛋白贡献值后，所得差值即为 PEG 部分在 RID 中的响应强度。进一步结合 PEG 在 RID 中的校准曲线，即可定量获得 PEG 的浓度。

最终，依据蛋白浓度与 PEG 浓度的摩尔比，计算得出 PEG 修饰蛋白的平均修饰度。

3.2 紫外及示差色谱图

将紫外与示差折光检测器串联，分析 PEG、酶蛋白和 PEG- 修饰酶蛋白样品，得到色谱图如图 1 所示。

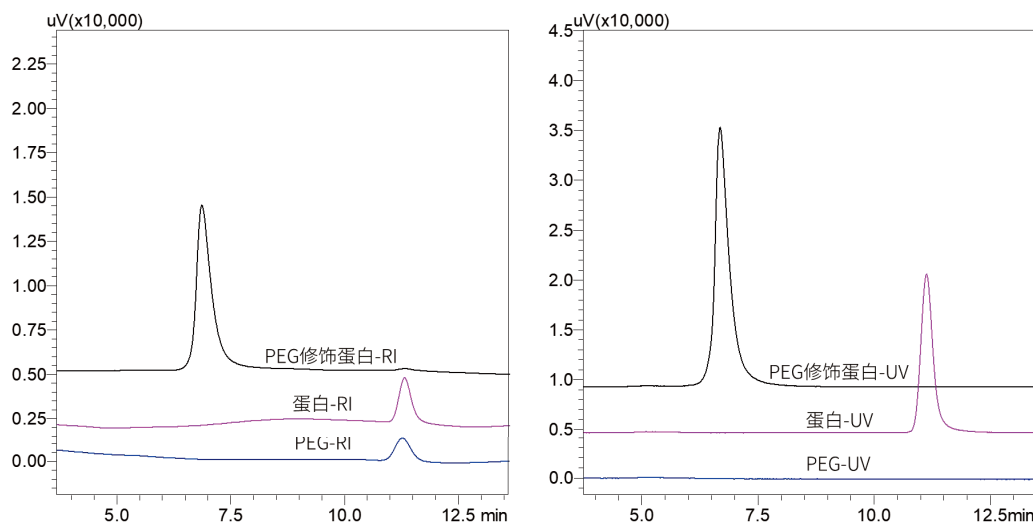


图 1 PEG 修饰酶蛋白样品、酶蛋白和 PEG 标准溶液紫外及示差色谱图（酶蛋白和 PEG 浓度为 0.2 mg/mL）

3.3 紫外及示差校准曲线

按照 1.2 分析方法建立示差折光检测器分析 PEG 的校准曲线、示差和紫外检测器分析酶蛋白的校准曲线，线性相关系数均大于 0.999，准确性为 97.3-105.4%。

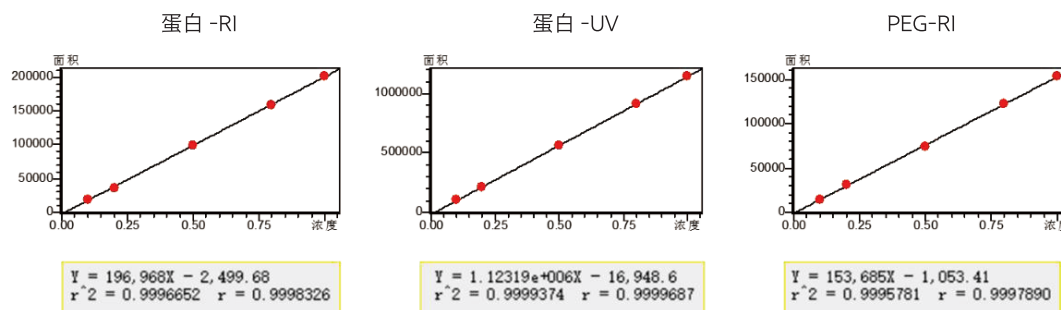


图 2 酶蛋白和 PEG 紫外及示差校准曲线

3.4 PEG 修饰酶蛋白修饰度计算

参考专利《聚乙二醇化蛋白类药物的平均修饰度测定方法》^[1]，根据 PEG 修饰酶蛋白示差和紫外检测器峰面积、酶蛋白和 PEG 校准曲线计算 PEG 修饰酶蛋白样品的 PEG 平均修饰度，具体计算方法如表 1 所示。

表 1 PEG 平均修饰度计算

No.	项目	计算方法	计算结果
1	PEG- 酶蛋白 UV 峰面积	软件记录的样品 PEG- 酶蛋白 UV 峰面积	478,378
2	$C_{\text{酶蛋白}}$ (mg/mL)	根据酶蛋白 UV 校准曲线计算 PEG- 酶蛋白中酶蛋白的浓度	0.441
3	PEG- 酶蛋白样品中酶蛋白贡献的 RI 峰面积	将酶蛋白浓度带入酶蛋白 RI 校准曲线，计算酶蛋白贡献的 RI 峰面积	84,363
4	PEG- 酶蛋白 RI 峰面积	软件记录的样品 PEG- 酶蛋白 RI 峰面积	196,632
5	PEG- 酶蛋白样品中 PEG 贡献的 RI 峰面积	PEG- 酶蛋白 RI 峰面积减去酶蛋白 RI 峰面积	112,268
6	C_{PEG} (mg/mL)	将 PEG RI 峰面积带入 PEG 校准曲线，计算 PEG 浓度	0.737
7	PEG 平均修饰度 N	$N = (C_{\text{PEG}}/M_{\text{PEG}})/(C_{\text{protein}}/M_{\text{protein}})$ $M_{\text{PEG}}=10 \text{ kDa}, M_{\text{protein}}=132 \text{ kDa}$	22.0

3.5 MALS 测定 PEG 修饰酶蛋白分子量

为了验证 PEG 平均修饰度计算的准确性，将示差检测器与多角度光散射检测器并联，测定 PEG 修饰酶蛋白分子量。通过 MALS 测定得到 PEG 修饰酶蛋白的重均分子量 M_w 为 377,619 Da，具体见图 3。通过平均修饰度计算得到 PEG 修饰酶蛋白的重均分子量为 352,000 Da，两者偏差为 7.10%。

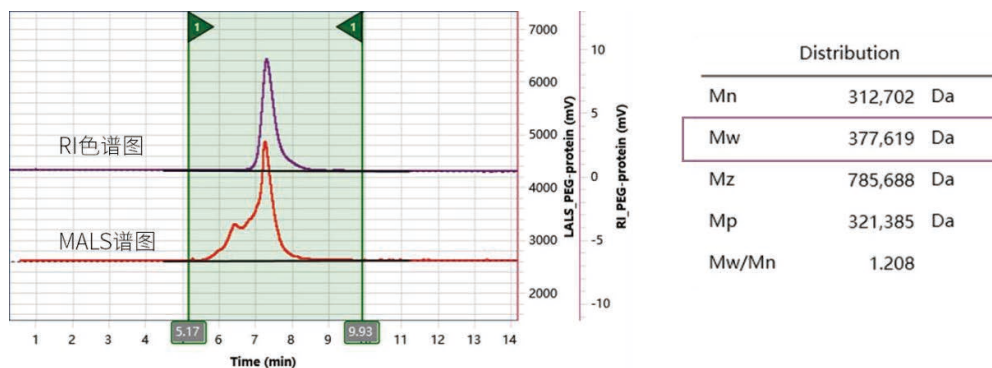


图3 MALS 和 RI 检测器色谱图及分子量计算结果

■ 结论

本文采用岛津生物兼容液相色谱仪 Nexera Bio，通过将紫外检测器和示差折光检测器串联，对 PEG 修饰酶蛋白的 PEG 平均修饰度进行了测定。同时，结合多角度光散射检测器对 PEG 修饰酶蛋白的分子量进行分析，进一步验证了 PEG 平均修饰度计算结果的准确性。

参考文献：

[1] 何云凤. 聚乙二醇化蛋白质类药物的平均修饰度测定方法: 201910154241.4 [P].2019-04-26

岛津应用云

