

---

## 单抗电荷变异体测定法（iCIEF 法）

本法系采用全柱成像毛细管等电聚焦电泳（iCIEF），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相对百分含量。

### 全柱成像毛细管等电聚焦电泳系统

- (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) 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，配制成1%甲基纤维素溶液，0.22 μm滤膜过滤，2~8 °C保存。取该溶液与超纯水以1:9稀释，配制成0.1%甲基纤维素溶液，2~8 °C保存。
- (2) 两性电解质（pH 3-10）。
- (3) 80mmol/L磷酸的0.1%甲基纤维素溶液
- (4) 100mmol/L氢氧化钠的0.1%甲基纤维素溶液
- (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。

### 系统适用性对照品溶液的制备

采用适宜浓度的单克隆抗体作为系统适用性对照品。系统适用性对照品应经国家药品检定机构审查、认可。

(1)用超纯水将系统适用性对照品稀释至1mg/ml。

(2)进样预混溶液制备（可根据比例一次性配制多个供试品使用的预混溶液）：

试剂	( $\mu\text{L}$ )	终浓度
两性电解质 3-10	8	4%
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	0.35%
超纯水	80	N/A

注：样品溶液与预混溶液总体积为 200  $\mu\text{L}$

(3)取系统适用性对照品预稀释溶液（1 mg/ml）40  $\mu\text{L}$ ，加入预混液 160  $\mu\text{L}$ ，混匀，以每分钟13000转离心5分钟。取150  $\mu\text{L}$ 上清液，转移至进样瓶，低电压（1000 V 或1500 V）预聚焦1 min后，高电压（3000 V）聚焦7.5 min。

### 参比品溶液的制备

参比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，参照系统适用性对照品制备方法进行制备。可根据产品特征调整参比品预混溶液体系组分或比例、终浓度、聚焦电压、聚焦时间等。

### 供试品溶液的制备

参照参比品溶液进行制备。可根据产品特征调整供试品预混溶液体系组分或比例、终浓度、聚焦电压、聚焦时间等。

### 空白对照溶液的制备

---

空白对照系按照制剂配方配制,但不含有单抗的溶液。参照参比品溶液进行制备。

## 测定法

取参比品/供试品溶液,按所选设备进样时间等参数自动进样,低电压(1000 V 或 1500 V)预聚焦 1 min 后,高电压(3000 V)聚焦 4.5 min~15 min,样品室温度为 4~10 °C,毛细管温度(环境温度)为 18~25 °C。

进样顺序:系统适用性对照品溶液至少进样2针、空白对照溶液进样1针、参比品溶液进样1针、供试品溶液1、供试品溶液2……,系统适用性对照品至少进样1针。

## 系统适用性

系统适用性对照品进样应不少于 3 针(序列起始至少 2 针,序列尾至少 1 针)且应满足主峰 pI 的标准偏差不高于 0.10 pI 单位,相对标准偏差不高于 1.0%;主峰百分含量的均值为 66.02%~75.54%,标准偏差不高于 4.8%,相对标准偏差不高于 6.7%。系统适用性对照品电泳图谱应与参考图谱相似(附后)。

空白对照图谱中两个等电点标志物均被检出,且等电点标志物之间应无干扰峰。

## 结果计算

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,将电荷变异体的的像素值带入线性回归方程,求出电荷变异体的等电点。按面积归一化法计算,各电荷变异体的峰面积占所有峰面积之和

---

的百分比即为该电荷变异体的相对百分含量。

### 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、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可略有差异。

系统适用性对照品参考图谱：

