

中图分类号: R917; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)17-0090-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.17.015



SDS - PAGE 法测定 1 种单抗药物中蛋白纯度*

张 婷, 周长明, 丁 锐, 邵天舒, 梁 谋[△]

(北京市药品检验研究院·北京市疫苗检验中心·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立测定 1 种单抗药物中蛋白纯度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法。方法 将单抗药物还原为重链、轻链等,按相对分子质量大小进行分离,根据蛋白纯度的不同会呈现出不同的条带,采用 Vision Works 软件分析条带灰度面积,从而控制其纯度,开展方法学考察,并采用建立的方法检测 5 批单抗药物的蛋白纯度。结果 方法专属性较好;供试品线性溶液的质量浓度在 1.0~2.5 mg/mL 范围内与灰度值线性关系良好($R^2 = 1.000\ 0$);检测限为 0.2 mg/mL;精密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 1.0%;平均加样回收率为 100.19%,RSD 为 0.52%($n = 9$)。5 批样品的蛋白纯度为 97.80%~98.56%。结论 所建立的 SDS-PAGE 法可用于定量分析单抗药物的分子大小变异体,测定下限低,干扰因素小,灵敏度高,方法重复性好。

关键词:十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法;单抗药物;蛋白纯度;定量分析;方法学验证

Detection of Protein Purity in a Monoclonal Antibody Drug by SDS - PAGE Method

Zhang Ting, Zhou Changming, Ding Rui, Shao Tianshu, Liang Mou[△]

(Beijing Institute for Drug Control · Beijing Center for Vaccine Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drug · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To establish a SDS - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) method for the detection of protein purity in a monoclonal antibody drug. **Methods** The monoclonal antibody drug was reduced to heavy chains, light chains, etc., and they were separated according to their relative molecular weight. Different bands were observed based on protein purity. Vision Works software was used to analyze the gray area of the bands to control their purity. Methodological investigations were conducted, and the established method was used to detect the protein purity in five batches of monoclonal antibody drugs. **Results** The method had good specificity. The mass concentration of the test linear solution had a good linear relationship with the gray value in the range of 1.0 - 2.5 mg / mL ($R^2 = 1.000\ 0$). The limit of detection (LOD) was 0.2 mg / mL. The RSDs of precision, repeatability, and stability test results were all lower than 1.0%. The average recovery rate was 100.19%, with an RSD of 0.52% ($n = 9$). The protein purity in the five batches of samples ranged from 97.80% to 98.56%. **Conclusion** The established SDS - PAGE method can be used for the quantitative analysis of molecular size variants of monoclonal antibody drugs, with low LOD, minimal interference factors, high sensitivity, and good reproducibility.

Key words: SDS - polyacrylamide gel electrophoresis; monoclonal antibody drugs; protein purity; quantitative analysis; method validation

单抗药物是指含抗体基因片段的蛋白药物,其能与靶抗原进行特异性结合,具有有效性、安全性等特

*基金项目:北京市科技计划项目[Z251100004625003]。

第一作者:张婷,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品质量标准,(电子信箱)ting72@163.com。

[△]通信作者:梁谋,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品质量标准,(电子信箱)lm308021718@126.com。

- 材膜/片的微生物计数方法差异研究[J]. 中国药业, 2019, 28(12): 78-81.
- [20] 刘鹏,张颖,高华. 固体药用硬片微生物污染状况分析[J]. 中国药业, 2018, 27(8): 56-59.
- [21] ICH. Quality Risk Management Q9(R1) [EB/OL]. (2023-01-26) [2026-03-13]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [22] 张亚敏,许真玉. 药包材微生物检测方法适用性研究进展[J]. 中国药品标准, 2023, 24(3): 231-236.
- [23] ICH. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances Q6A [EB/OL]. (1999-10-06) [2026-03-13]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [24] 康美娟,李辉,赵霞. 中国药包材微生物检查方法及标准的合理性探讨[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(10): 1435-1440.
- [25] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典 2015 年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1101-1107.
- (收稿日期:2026-03-11;修回日期:2026-07-20)

点,已成为当前临床治疗恶性肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病、心血管疾病、器官移植排斥等重大疾病的“明星药物”,社会效益和经济效益巨大,在生物制药领域举足轻重^[1-2]。为加强抗体药物监管,保证单抗药物的使用安全、有效,《欧洲药典(11.0版)》(EP 11.0)^[3]和2025年版《中国药典》(ChP 2025)^[4]相继出台了人用重组单克隆抗体制品总论,《美国药典(2021年版)》(USP 2021)^[5]颁布了通则129“重组治疗单克隆抗体的分析过程”,均提到要对单抗药物的分子大小变异体进行严格控制。ChP 2025指出分子大小变异体的检测方法有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法、分子排阻色谱(SEC)法、SDS-毛细管电泳(SDS-CE)法等,但ChP 2025(四部)中未见SDS-PAGE法相关指导原则。为更有效地控制单抗药物的质量,本研究中以1种典型单抗注射液为例^[6],建立了分析抗体药物蛋白纯度的SDS-PAGE法,并参照2025年版《中国药典(四部)》通则9101 分析方法验证指导原则进行方法学验证,为进一步完善单抗药物质量控制标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

XA205DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);EPS-301型电泳仪(美国Thermo公司);UVP GelStudio PLUS型凝胶成像仪(德国AJ公司);水浴锅(德国Julabo公司)。

1.2 试药

单抗注射液(企业A,批号分别为AVXS281601, AVXS280601, AVXS280101, AVXS280501, AVXS282402, 规格均为每支1 mL:150 mg);1,4-二巯基-DL-苏糖醇(DTT,德国Sigma公司);NuPAGE LDS样品缓冲液(SB4×)、NuPAGE 4%-12% Bis-Tris凝胶、Mark12分子量标准品、NuPAGE MES SDS缓冲液(20×)、染色试剂盒(美国Invitrogen公司);单抗参比制剂(中国食品药品检定研究院,批号为CC0208B,含量为150 mg/mL);水为超纯水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

供试品溶液:向700 μL水中加入50 μL单抗注射液,涡旋,混匀(质量浓度为10 mg/mL),精密量取40 μL,用50 μL还原样品缓冲液RSB4×(将310 mg DTT溶于10 mL SB4×,即得)和110 μL水稀释,涡旋,混匀(质量浓度约为2 mg/mL),85℃水浴加热5 min,将样品置实验台上冷却至室温,即得。

参比制剂溶液:向700 μL水中加入50 μL单抗参比制剂,按供试品溶液制备方法,自“精密量取40 μL,

用50 μL还原样品缓冲液……”操作,即得。

空白溶液:向700 μL水中加入50 μL处方缓冲液(组氨酸、精氨酸、聚山梨酯20,按供试品溶液制备方法,自“精密量取40 μL,用50 μL还原样品缓冲液……”操作,即得。

2.2 检测方法^[7-10]

取2.1项下空白溶液、参比制剂溶液、供试品溶液各15 μL及Mark12分子量标准品20 μL,分别加样至NaPAGE 4%~12% Bis-Tris凝胶中。采用NuPAGE MES SDS缓冲液以130 V恒压电泳约70 min,待染料前沿到达凝胶边缘时停止电泳。取出,用100 mL水冲洗,加100 mL固定液(无水乙醇500 mL,冰醋酸100 mL,水400 mL,混匀,即得)固定约25 min,同时轻轻搅拌,弃固定液,用100 mL水冲洗凝胶,加入考马斯亮蓝染色剂染色50 mL,轻轻搅拌孵育约20 h,用脱色液(取乙醇200 mL、冰醋酸100 mL、水700 mL,混匀,即得)脱色至背景无色、条带清晰,用凝胶成像仪扫描凝胶,并用Vision Works软件分析条带。计算供试品的纯度,应不低于95%。纯度(%)=(重链条带灰度值+轻链条带灰度值)/(重链条带灰度值+轻链条带灰度值+杂蛋白条带灰度值)×100%。

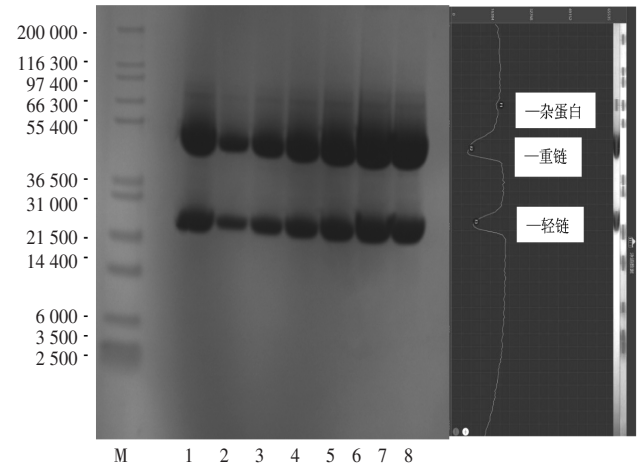
2.3 方法学考察

专属性试验:取2.1项下空白溶液,按2.2项下方法进行检测,分析还原样品缓冲液RSB4×、水是否存在显著干扰。结果显示,在目标检测范围内未见任何干扰。

线性关系考察:取2.1项下供试品溶液(批号为AVXS281601),按表1方法制备供试品线性溶液,按2.2项下方法进行检测。单抗注射液由2条450个或451个氨基酸残基(相对分子质量约为49 500)组成的重链和2个218个氨基酸残基(相对分子质量约为24 000)组成的轻链构成,经与Mark12分子量标准品、参比制剂对比,确定重链、轻链和杂蛋白条带。结果见图1。可见,随着供试品线性溶液质量浓度的递增,特征蛋白条带的颜色深度也呈递增趋势。特征蛋白条带的颜色越深,对应灰度值越高,经软件分析得到重链、轻链和杂蛋白灰度值。以供试品线性溶液质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、重链加轻链灰度值总和(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得标准曲线方程 $Y = 277\,205\,564.40X + 212\,066\,090.30$ ($R^2 = 1.000\,0$, $n = 6$)。结果表明,供试品线性溶液的质量浓度在1.0~2.5 mg/mL范围内与灰度值线性关系良好;以供试品线性溶液质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、杂蛋白灰度值(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得标准曲线方程 $Y = 83\,536\,539.600X + 25\,525\,125.700$ ($R^2 = 0.999\,9$, $n = 6$)。结果表明,供试品线性溶液质量浓度在1.0~2.5 mg/mL范围内与灰度值线性关系良好。

表 1 供试品线性溶液制备方法(μL)
Tab. 1 Preparation methods of the test linear solution (μL)

供试品含量	加入量		
	供试品	RSB4 ×	超纯水
0. 5 mg / mL	10	50	140
1. 0 mg / mL	20	50	130
1. 5 mg / mL	30	50	120
2. 0 mg / mL	40	50	110
2. 5 mg / mL	50	50	100
3. 0 mg / mL	60	50	90



M. Mark12 分子量标准品 1. 空白溶液 2. 参比制剂溶液
3 - 8. 供试品线性溶液(质量浓度分别为 0. 5, 1. 0, 1. 5, 2. 0, 2. 5, 3. 0 mg / mL)

图 1 SDS - PAGE 线性关系考察图谱

M. Mark12 molecular weight standard 1. Blank solution 2. Reference preparation solution 3 - 8. Test linear solution (mass concentrations of 0. 5, 1. 0, 1. 5, 2. 0, 2. 5, 3. 0 mg / mL)

Fig. 1 SDS - PAGE linear relation test image

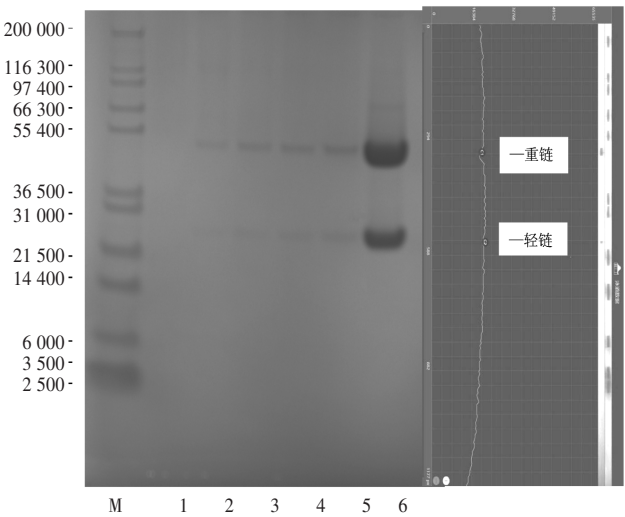
表 2 限度溶液制备方法(μL)

Tab. 2 Preparation method of the limit solution (μL)

参比制剂 质量浓度	加入量		
	参比制剂溶液	RSB4 ×	超纯水
0. 1 mg / mL	10	50	140
0. 2 mg / mL	10	25	65
0. 3 mg / mL	15	25	60
0. 4 mg / mL	20	25	55

检测限确定:通常检测限为测定最低质量浓度的 3 ~ 10 倍,故取参比制剂溶液(质量浓度为 2 mg / mL),按表 2 中的方法制备检测限溶液,按 2. 2 项下方法进行检测。结果见图 2。可见,当参比制剂质量浓度为 0. 2 mg / mL 时,条带均能显色,则检测限确定为 0. 2 mg / mL。

精密度试验:取参比制剂溶液适量,按 2. 2 项下方法重复测定 6 次。结果纯度分别为 97. 49%, 98. 00%, 98. 01%, 98. 54%, 97. 98%, 98. 39%, 平均值为 98. 07%,



注:图右侧为 0. 2 mg / mL 质量浓度参比制剂定量分析示意。
M. Mark12 分子量标准品 1. 空白溶液 2 - 5. 参比制剂检测限溶液(质量浓度分别为 0. 1, 0. 2, 0. 3, 0. 4 mg / mL) 6. 参比制剂溶液

图 2 SDS - PAGE 检测限确定图谱

Note:The quantitative analysis of the reference preparation with a mass concentration of 0. 2 mg / mL is shown on the right side of the figure.

M. Mark12 molecular weight standard 1. Blank solution 2 - 5. Reference preparation detection limit solution (mass concentrations of 0. 1, 0. 2, 0. 3, 0. 4 mg / mL) 6. Reference preparation solution

Fig. 2 SDS - PAGE detection limit determination image

RSD 为 0. 35% (n = 6), 同一仪器连续测试存在系统波动,但 RSD < 2%, 表明仪器精密度良好。

重复性试验:取 2. 1 项下供试品溶液(批号为 AVXS281601)适量,按 2. 2 项下方法重复检测 6 次。结果纯度分别为 97. 12%, 97. 20%, 98. 61%, 98. 16%, 98. 59%, 98. 55%, 平均值为 98. 04%, RSD 为 0. 71% (n = 6), 存在仪器误差和操作误差,但 RSD < 2%, 表明方法重复性良好。

稳定性试验:取 2. 1 项下供试品溶液(批号为 AVXS281601)适量,分别在室温放置 0, 1, 4, 8 h 和 2 ~ 8 °C 放置 0, 24, 48 h 时按 2. 2 项下方法进行检测。结果供试品溶液室温放置 0, 1, 4, 8 h 时的纯度分别为 98. 31%, 98. 55%, 98. 04%, 98. 12%, RSD 为 0. 23% (n = 4); 2 ~ 8 °C 放置 0, 24, 48 h 时的纯度分别为 98. 31%, 97. 96%, 97. 46%, RSD 为 0. 47% (n = 3)。表明供试品溶液室温放置 8 h 内和 2 ~ 8 °C 放置 2 d 内的稳定性均良好。

准确度试验:精密量取质量浓度为 10 mg / mL 的参比制剂溶液 32, 40, 48 μL, 按 2. 1 项下供试品溶液制备方法制备成 80%, 100%, 120% 3 个浓度的供试品溶液,各平行 3 份,按 2. 2 项下方法进行检测,并计算回收率。结果回收率分别为 100. 27%, 100. 01%, 100. 75%, 99. 95%, 99. 89%, 100. 74%, 99. 37%, 100. 94%, 99. 80%,

平均回收率为100.19%,RSD为0.52%($n=9$),表明方法准确度良好。

2.4 方法验证

取5批样品各适量,精密称定,按2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2项下方法进行检测,结果见表3。根据参比制剂及Mark12分子量标准品确定供试品溶液中的重链和轻链,其余条带为杂蛋白条带,均符合规定。

表3 样品中蛋白纯度测定结果

Tab.3 Results of the detection of protein purity in samples				
序号	批号	灰度值(重链和轻链)总和	杂蛋白灰度值	纯度(%)
1	AVXS281601	1 278 264 158	25 604 550	98.04
2	AVXS280601	1 313 468 216	26 102 655	98.05
3	AVXS280101	1 321 797 823	19 307 729	98.56
4	AVXS280501	1 353 270 871	30 404 287	97.80
5	AVXS282402	1 234 210 196	23 850 521	98.10

3 讨论

免疫球蛋白G(IgG)型单抗是单抗的核心类型,相对分子质量约为150 000,由相对分子质量分别约为50 000和25 000的2条重多肽链和2条轻多肽链组成。本研究中所选单抗注射液由2条相对分子质量约为49 500的重链和2条相对分子质量约为24 000的轻链构成,其相对分子质量为150 000,具有单抗典型结构。单抗药物是在细胞培养中使用具有主细胞库和工作细胞库的种子批系统生产的。收获后,纯化步骤可确保将产品和工艺相关杂蛋白降至可接受的水平。污染蛋白和抗体降解产物是单抗的主要杂质类型,分子大小变异体源于单抗分子自身降解或修饰,属“固有异质性”;污染蛋白则是工艺中混入的无关成分。均影响纯度的评价,而高纯度的抗体药物对于保证其有效性和安全性至关重要^[11-13]。

SDS-PAGE法、SEC法、SDS-CE法均可用于分子大小变异体的检测。SEC法是基于多孔填料对不同相对分子质量蛋白质的排阻效应分离,非变性条件下保留生物活性,但分辨率较低,且柱容量有限。SDS-CE法采用毛细管替代凝胶,结合SDS变性处理,通过高压电场实现快速分离,其自动化程度高,设备成本昂贵。SDS-PAGE法无需昂贵仪器,常规实验室均可开展,染色后可直接观察条带分布,可同时分析多个样品,适合批量筛查,方法开发简单。尤其在单抗纯度控制中,可将单抗经典结构的单抗药物还原分离为重链、轻链等,按相对分子质量大小进行分离,检测相对分子质量的范围为6 000~200 000的变性蛋白和还原蛋白。根据蛋白纯度的不同呈现出不同的灰度,对灰度面积进行定量分析,从而检查重链和轻链的纯度,直观显示抗体药物的杂质纯度^[14-15]。本研究中杂蛋白主要位于相对

分子质量55 000以上,因位于高分子量区,初步推断其为宿主细胞蛋白或糖基化重链。

本研究中以典型IgG型单抗注射液为例,对SDS-PAGE法进行方法学验证研究。结果表明,该方法可用于单抗药物纯度的定量分析,其灵敏度高、方法重复性好。本研究中所包含的测试原理也可适用于其他相关类型单抗,如IgM等,为单抗药物检测提供了一个可行的纯度定量分析方法。

参考文献

[1] 白露,叶日平,刘蒙蒙,等. 抗CD33单克隆抗体肽图分析方法的建立与验证[J]. 中国药学杂志,2024,59(16):1495-1503.

[2] 徐刚领,杜加亮,付志浩,等. 单抗药物还原毛细管电泳法方法学验证研究[J]. 山西医科大学学报,2024,55(7):916-921.

[3] Council of Europe. European Pharmacopoeia (11.0)[M]. Strasbourg: Council of Europe, 2023:2978-2983.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:三部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2025:14-16.

[5] The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia[M]. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2021:1-6.

[6] 盛宇明. 奥马珠单抗在瘙痒性皮肤病(慢性荨麻疹、特应性皮炎、结节性痒疹)治疗中的真实世界数据研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2021:9.

[7] Luca A, Jonathan O R, Alan L K, et al. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 59:18-26.

[8] GB/T 38482-2021 国家食品标准:动物源性I型胶原蛋白成分测定聚丙烯酰胺凝胶电泳法[S].

[9] 林海珠,何嫦娥,冯昕韡,等. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定饮料中红豆含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(5):1845-1849.

[10] Singh S K, Kumar D, Nagpal S, et al. A charge variant of bevacizumab offers enhanced FcRn-dependent pharmacokinetic half-life and efficacy[J]. Pharm Res, 2022, 39(5):851-865.

[11] 梁红远,李翱翔,邱建华,等. 利妥昔单抗及其生物类似药的杂质分析[J]. 国际生物制品学杂志, 2018, 41(5):209-212.

[12] 贾哲,郭莎,王文波,等. 阿达木单抗生物学活性质控方法的建立和验证[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(14):1423-1431.

[13] 李青莲,王斌,徐楠楠,等. ELISA法定量测定食蟹猴血清中的抗CTLA-4单克隆抗体[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(7):1209-1217.

[14] 陈丝丝,夏芙蓉,於洋,等. 百日咳毒素、丝状血凝素和百日咳黏附素精制抗原纯度的SDS-PAGE检测方法的验证[J]. 微生物学免疫学进展, 2024, 52(4):23-29.

[15] Brunelle J L, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)[J]. Methods in Enzymology, 2014, 541:151-159.

(收稿日期:2025-03-27;修回日期:2026-07-08)