

## 重组人粒细胞集落刺激因子的高效液相色谱分析

钟 英(杭州 310018 杭州九源基因工程有限公司)

**摘要** 目的:测定重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)的蛋白浓度、分子量及纯度。方法:反相高效液相色谱(RP-HPLC)法及高效体积排阻色谱法(SEC)。结果:蛋白浓度测定方法可靠,平均回收率为100.17%,RSD=0.8%。重现性好,日内RSD=0.7%,日间RSD=1.1%,且与福林-酚法(Lowry法)测得结果无显著差异。样品无需处理,可直接上样,同时可得到样品的纯度数据。SEC法测得分子量与理论值相符合,且方法重现性好,日内RSD为0.7%,日间RSD为1.9%,在测定分子量的同时可得到rhG-CSF纯度数据。结论:适用于基因工程产品纯化各阶段以及制剂蛋白浓度、分子量、纯度的测定。

**关键词** 重组人粒细胞集落刺激因子;反相高效液相色谱法;高效体积排阻色谱法;分子量;纯度

### Analysis of recombinant human granulocyte colony stimulating factor by high-performance liquid chromatography

Zhong Ying (Zhong Y) (Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co., Ltd., Hangzhou 310018)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To determine protein content, protein molecular weigh and purity of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF). **METHOD:** Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and high-performace size-exclusion chromatography (SEC) were used. **RESULTS:** The mean recovery is 100.17%, RSD=0.8%. The RSD of within-day and day-to day were less than 2.0%. The samples do not need to be pretreated. **CONCLUSION:** This method is suitable to analyze products of gene engineering.

**KEY WORDS** recombinant human granulocyte colony stimulating factor, RP-HPLC, SEC, molecular weigh, purity

重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)是应用DNA重组技术生产的一种造血生长因子,它作用于骨髓中性粒细胞系造血前体细胞,促进其增殖、分化,促进中性粒细胞的成熟和释放。临床上主要应用于肿瘤化疗引起的中性粒细胞减少症,用于外周干细胞动员,与抗生素合用预防或治疗感染等。

rhG-CSF作为基因工程药物,在分离纯化过程中,蛋白质的定量测定对纯化的进行必不可少,同时在产品的质量控制在,蛋白质浓度也是一个极重要的指标<sup>[1]</sup>。蛋白质浓度的测定有多种方法,常用的方法有克氏定氮法、TCA比浊法、双缩脲法、福林-酚(Lowry)法、考马斯亮兰法(Bradford法)、紫外吸收法等等。但以上方法有种种局限性<sup>[2]</sup>,例如克氏定氮法方法过于繁琐,双缩脲法不够灵敏,有近200种化合物影响Lowry法测定的结果,Bradford法在比色过程中易出现沉淀等等,因此以上方法均不适用于纯化过程中间体

及成品中有干扰物存在时rhG-CSF蛋白的定量分析。我们通过实验选择反相高效液相色谱法(RP-HPLC法)作为测定有干扰因素存在时的蛋白定量,获得满意结果。

同时rhG-CSF其分子量大小以及纯度均是一个重要指标。蛋白质分子量大小的测定有多种方法,常用的有十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法,聚丙烯酰胺梯度电泳,高效体积排阻色谱法(SEC法)<sup>[3]</sup>,比较先进的方法有质谱法<sup>[4]</sup>。SDS-PAGE法耗时长,且一块板上最多同时可分析8个样品。质谱法需要昂贵的设备,不易普及。而高效体积排阻色谱法是根据溶质分子大小而分离的一种液相色谱技术,大分子优于小分子被洗脱出来,根据已知分子量的标准蛋白的洗脱体积可以建立测定蛋白质分子量的标准曲线,从标准曲线上计算出样品分子量。方法简便、快捷,一次可分析多个样品。我们通过实验选择高效

体积排阻色谱法测定 rhG-CSF 分子量及纯度,获得满意结果。

## 1 材料和仪器

### 1.1 仪器

Beckman 公司高效液相色谱仪,包括 125 型泵,168 型二极管阵列紫外检测器,System Gold 数据处理软件。色谱柱为 Bio-sil 250(7.8 mm × 300 mm, Bio-Rad 公司), Vydac C<sub>4</sub>(150 mm × 4.6 mm)。

### 1.2 试剂

三氟醋酸(Merck 公司);乙腈(上海脑海生物科技公司, HPLC 级);DC Protein Assay Kit(Bio-Rad 公司);磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,氯化钠均为国产分析纯;牛血清白蛋白(Bio-Rad 公司);分子量标准品(Bio-Rad 公司)。

### 1.2 样品

来自杭州九源基因工程有限公司。

## 2 方法和结果

### 2.1 rhG-CSF 蛋白浓度测定

2.1.1 RP-HPLC 分析条件 考察了色谱柱的种类、流动相的配比、流速、分析时间等等条件,最后确定分析条件如下:色谱柱为 Vydac C<sub>4</sub>(150 mm × 4.6 mm),流动相 A 为 0.1% 三氟醋酸(w/v),流动相 B 为乙腈-水(90:10),内含 0.1% 三氟醋酸(w/v),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 215 nm,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	75	25
30	20	80
32	75	25

2.1.2 Lowry 法分析条件 按照 Bio-Rad 公司提供的“DC Protein Assay Instruction Manual”操作,每个样品做 3 个重复。

2.1.3 对照品的制备 九源公司生产的 rhG-CSF 选择 RP-HPLC 纯度,凝胶过滤色谱纯度,毛细管电泳纯度,SDS-PAGE 纯度均大于 99.9% 的一批,以 Lowry 法重复测定 3 次,计算平均浓度,再用 20% 甘露醇,10 mmol/L 的醋酸缓冲液精确稀释调整为 1 mg/ml rhG-CSF,5% 甘露醇,10 mmol/L 醋酸缓冲液,即为蛋白浓度测定的对照品。

2.1.4 RP-HPLC 法标准曲线制备 分别吸取对照品 10, 20, 25, 30 和 35 μl 进样,记录峰面积,以峰面积(Y)对蛋白量(μg)(X)作标准曲线,得回归方程:Y = 3.7423 + 20.5237 X, r = 0.9994。蛋白浓度的计算公式如下:

$$\text{蛋白浓度}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{蛋白总量}(\mu\text{g})}{\text{进样量}(\mu\text{l})}$$

2.1.5 回收率实验 在对照品中加入 1 mg/ml 的牛血清白蛋白,精确吸取上述对照品 15 和 22 μl 进样,按 RP-HPLC 法分析条件重复进样 3 次,记录 rhG-CSF 峰面积,按上述回归方程计算 rhG-CSF 蛋白浓度,由此算出平均回收率为 100.17%, RSD = 0.8%。

2.1.6 精密度实验 rhG-CSF 中间体按 RP-HPLC 法分析条件同一天内重复测定 3 次,计算日内 RSD 为 0.7%,连续 5 d 重复测定,计算日间 RSD 为 1.1%。

2.1.7 RP-HPLC 法蛋白浓度测定与 Lowry 法蛋白浓度测定结果比较 8 批 rhG-CSF 原料药样品分别用 RP-HPLC 法及 Lowry 法测定蛋白浓度(μg/μl),结果见表 2。

表 2 2 种蛋白浓度测定方法结果

样品	Lowry 法测得 蛋白浓度	RP-PLC 法测得 蛋白浓度	两浓度的差值
原料药 1	1.87	1.77	0.1
原料药 2	1.48	1.34	0.14
原料药 3	0.67	0.78	-0.11
原料药 4	2.39	2.39	0
原料药 5	0.907	0.827	0.08
原料药 6	1.69	1.62	0.07
原料药 7	1.52	1.42	0.1
原料药 8	0.91	1.01	-0.1

经 t 检验 2 种测定方法得到的蛋白浓度无显著差异(P > 0.05)。

### 2.2 分子量测定

2.2.1 色谱条件的选择 考察了缓冲液种类、离子强度、pH 值等因素,最终选定的色谱条件为:色谱柱采用 Bio-sil 250(7.8 mm × 300 mm),流动相为 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.8),0.15 mol/L 氯化钠,流速为 1.0 ml/min,检测波长为 280 nm。

2.2.2 标准曲线制备 选择分子量范围在 15.8 kDa - 1.7 kDa 的牛 γ-球蛋白,牛血清白蛋白,鸡卵清蛋白,马肌红蛋白等标准蛋白制作标准曲线,以甲状腺球蛋白的洗脱体积作为外水体积(V<sub>0</sub>),维生素 B<sub>12</sub>的洗脱体积作为内水体积(V<sub>i</sub>),计算各标准蛋白的分配系数(K<sub>d</sub>)。

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad \text{其中 } V_e \text{ 为标准蛋白洗脱体积}$$

以标准蛋白分子量的对数对 K<sub>d</sub> 作直线回归,回归方程为 lg MW = 5.981 - 4.5773 K<sub>d</sub>, r = 0.9994,线性良好。

2.2.3 样品测定 6 批 rhG-CSF 原料药在上述色谱条件下分析,根据标准曲线和各样品的洗脱体积,计算分子量,结果见表 3。测得样品平均分子量为 18500 ±

5%道尔顿,与理论值相一致,且与 SDS-PAGE 法测得分子量无显著差异。

表 3 样品分子量数据

样品	洗脱体积/ml	K <sub>d</sub>	SEC 法测得分子量/MW	SDS-PAGE 法测得分子量/MW	相对百分含量/%
原料药 1	11.871	0.3772	17966	17783	99.082
原料药 2	11.863	0.3766	18080	18197	98.173
原料药 3	11.808	0.3725	18878	19055	98.063
原料药 4	11.859	0.3763	18137	18197	99.131
原料药 5	11.833	0.3744	18504	18489	99.238
原料药 6	11.831	0.3742	18543	18646	98.447

2.2.4 方法重现性 原料药 1 在同一天内重复测定 3 次,计算日内 RSD 为 0.7%。原料药 1 连续 3d 内重复测定,计算日间 RSD 为 1.9%,重现性好。

### 2.3 纯度测定

2.3.1 RP-HPLC 法纯度测定 RP-HPLC 法是基于溶剂极性流动相和固定相表面非极性基团之间疏水相互作用建立的一种色谱分离模式。不同蛋白质其表面疏水基团数量、种类及分布不同,因而与固定相表面的非极性基团之间的疏水相互作用就会不同,从而实现分离。在上述色谱条件下,分析 rhG-CSF 复性液及疏水柱收集峰,按疏水性的均一程度证明其纯度。复性液样品中目标峰峰面积占总积分面积的 79.602%,因此纯度为 79.602%。疏水收集峰中目标峰峰面积占总积分面积的 86.804%,因此纯度为 86.804%(见图 1)。

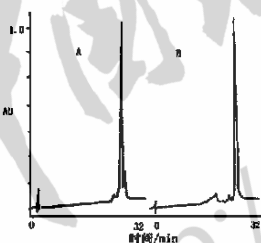


图 1 rhG-CSF RP-HPLC 法纯度测定图谱

A - 复性液; B - 疏水收集峰

2.3.2 SEC 法纯度测定 rhG-CSF 纯化中间体样 C、D、E 在上述色谱条件下分析,记录出峰时间、峰面积,以标准曲线计算分子量,并以面积归一化法计算相对百分含量作为 rhG-CSF 纯度的大小,结果见表 4,图 2。

由表 4 及图 2 可见, rhG-CSF 纯化中间体样品成分较复杂,存在聚体及小分子杂质。而由表 3 可见, rhG-CSF 原料药纯度均大于 98%,样品中只存在微量小分子杂质。

### 3 讨论

rhG-CSF 在纯化过程中带入的尿素、β-巯基乙醇等

表 4 rhG-CSF 纯化中间体分子量、相对百分含量

样品	洗脱体积/ml	分子量/MW	相对百分含量/%
C	10.87	37969	0.355
	11.82	18700	38.769
	13.306	5823	60.876
D	6.419	>200000	2.702
	11.857	18175	34.704
E	13.309	5811	62.595
	11.058	34027	0.524
	11.85	18271	73.096
	13.302	5841	23.380

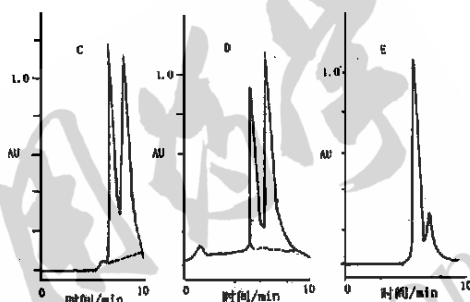


图 2 rhG-CSF 纯化中间体 SEC 图

试剂, rhG-CSF 制剂中加入的甘露醇、tween-80 等赋形剂等均会对 Lowry 法蛋浓度测定的结果产生偏差,无法作为复性过程、纯化过程及制剂的蛋白质定量,而 RP-HPLC 法灵敏度高,重现性好,样品不需处理,同时可做 rhG-CSF 的蛋白纯度分析。以外标法制作标准曲线,通过与样品在相同条件下层析比较,计算蛋白浓度,作为纯化过程及制剂的定量方法。

高效体积排阻色谱法的分离机理是分子筛效应,通过分子量的计算能分离样品中的单体和寡聚体,因此本方法也可作为 rhG-CSF 纯度测定的方法。方法简便、快捷,一次可同时分析多个样品,重现性好。

### 参考文献

- 1 卫生部.关于转发人用重组 DNA 制品等质量控制要点的通知.卫药政字(90)第 37 号.
- 2 胡卓逸,孙承琦.蛋白质定量方法的进展.生物化学与生物物理进展,1990,17(1): 23.
- 3 Martin Czok, Anita Katti, Georges Guiochon. Effect of sample viscosity in high-performance size-exclusion chromatography and its control. J Chromatogr, 1991, 550: 705.
- 4 Michael J Geisow. Mass measurement at high molecular weight- new tools for biotechnologists. Tibtech December, 1992, 10: 432.

收稿日期: 1999-01-26