

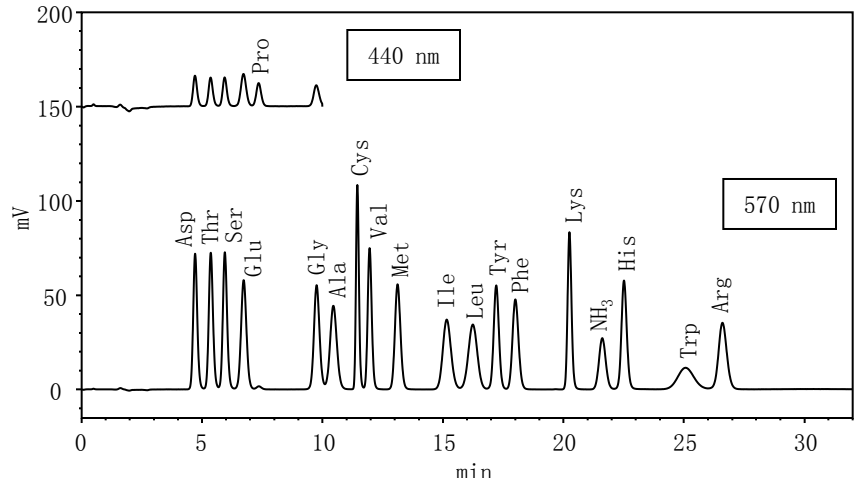
生物药品是指运用重组DNA技术及细胞培养技术生产的蛋白质类药品，其特征是以作为生物起源的高分子作为原料。此次，我们将介绍作为生物药品鉴别方法之一的“氨基酸分析法”。氨基酸分析法是测定氨基酸组成和含量的方法，旨在进行蛋白质类药品的结构解析 / 结构确认。该方法将蛋白质水解为构成蛋白质的各种氨基酸后进行测定。

基于水解方法的不同，可能存在无法定量回收的成分，因此，为了全面解析构成蛋白质的氨基酸，需酌情使用多种水解方法。我们以IgG单克隆抗体作为生物药品的模型样品，使用三种方法进行了水解，并进行了氨基酸的分析，在此对结果予以介绍。

◆氨基酸分析法简介◆



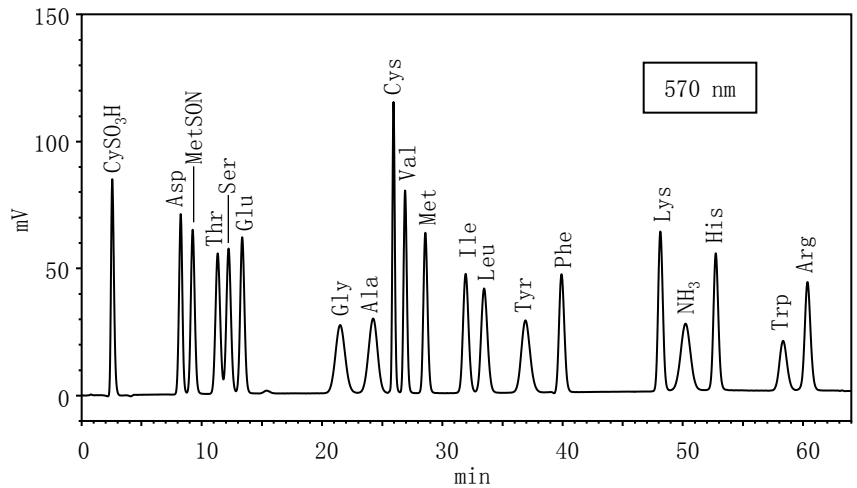
■氨基酸标准样品的测定例



<标准分析法色谱条件>

分析柱	: #2622PH
	4.6 mm I.D. × 60 mm
脱氨柱	: #2650L
	4.6 mm I.D. × 40 mm
流动相	: (PH Buffer Kit)
	(PH1-4、PH-RG)
流速	: 0.4 mL/min
柱温	: 57 °C
反应液	: Ninhydrin coloring solution kit for HITACHI
反应液流速	: 0.35 mL/min
反应温度	: 135 °C
检测波长	: VIS 570 nm、(440 nm)
进样量	: 20 μL

【基于标准分析法的氨基酸标准样品测定例 (2 nmol / 20 μL)】



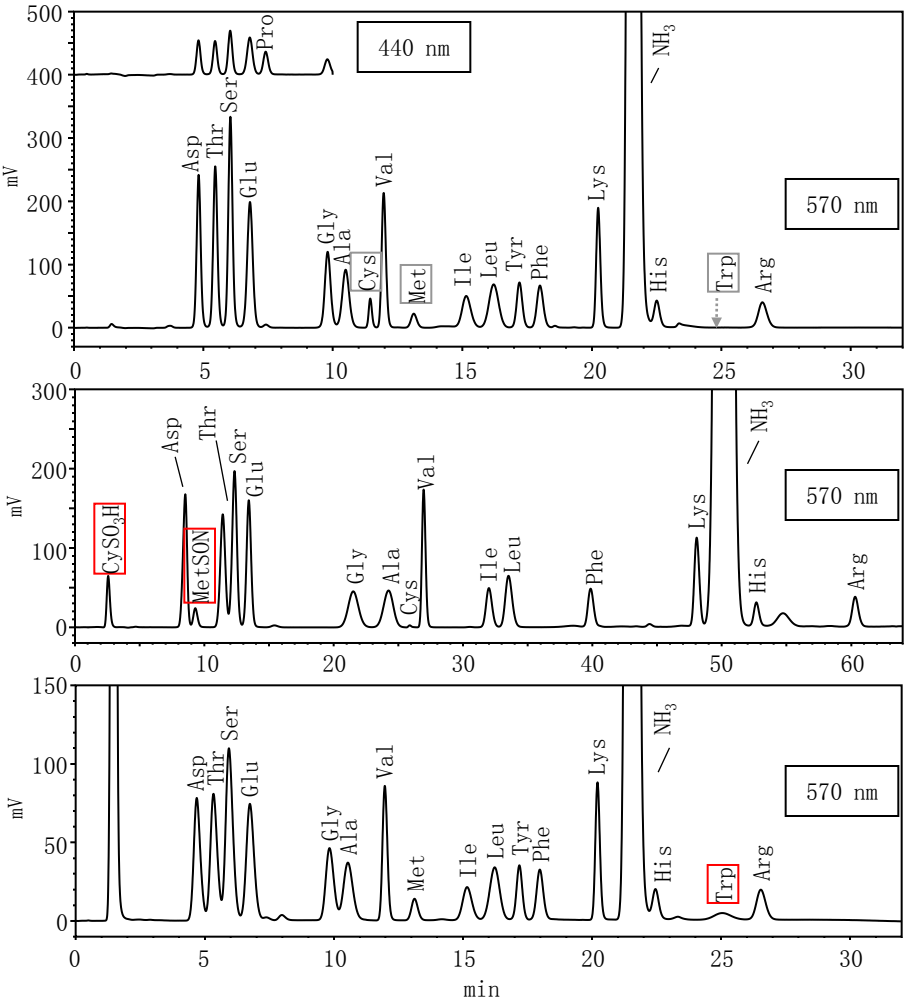
<特殊分析法色谱条件>

分析柱	: #2620M
	4.6 mm I.D. × 60 mm
脱氨柱	: #2650L
	4.6 mm I.D. × 60 mm
流动相	: 6液 (B1、PH2-4、B5、PH-RG)
流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 38 ~ 80 °C
反应液	: Ninhydrin coloring solution kit for HITACHI
反应液流速	: 0.3 mL/min
反应温度	: 135 °C
检测波长	: VIS 570 nm、(440 nm)
进样量	: 20 μL
	(流动相B1、B5使用配套试剂配制)

【基于特殊分析法的氨基酸标准样品测定例 (2 nmol / 20 μL)】

使用标准分析法测定蛋白质水解后的样品。蛋白质的水解虽有多种方法，但最常规的方法是盐酸水解法。可是使用该方法需设法将难以回收的氨基酸成分转化为不同化合物，有时需结合情况设定最佳分析条件。此次，我们使用标准分析法和针对难以回收成分的特殊分析法进行了分析。

■ IgG水解物的测定例和各种水解方法



(1) 盐酸水解

最常规的水解方法，可对除了色氨酸(Trp) / 胱氨酸(Cys) / 蛋氨酸(Met)之外的构成蛋白质的氨基酸进行定量分析。因在该水解法中色氨酸几乎全部被破坏，胱氨酸 / 蛋氨酸的回收率也偏低，故使用其他水解法。

(2) 使用过甲酸氧化后，盐酸水解

定量分析半胱氨酸 / 胱氨酸(Cys)及蛋氨酸(Met)的水解法之一。使用过甲酸将以上三种氨基酸氧化后，进行水解。在该方法中，半胱氨酸+胱氨酸以磺基丙氨酸(CySO<sub>3</sub>H)被检测出来，蛋氨酸以蛋氨酸磺(MetSON)被检测出来。分析条件使用了特殊氨基酸分析法。

(3) 巯基乙磺酸水解

定量分析色氨酸(Trp)的水解法之一。通过使用巯基乙磺酸，防止色氨酸氧化。

■各种水解方法的操作流程

(1) 盐酸水解

- 样品 IgG 单克隆抗体 1 mg
- ← 6mol/L 的盐酸 (含 1% 的苯酚) 1 mL
- 脱气
- 加热 110 °C、24 hr
- 减压干燥
- 使用 0.02 mol/L 的盐酸溶解为 2 mL (A)
- 过滤 Pore Size 0.2 μm
- 氨基酸分析样品

(2) 使用过甲酸氧化后，盐酸水解

- 样品 IgG 单克隆抗体 1 mg
- ← 添加 40 μL 甲酸
- 加热 50 °C、5 min
- ← 添加 200 μL 过甲酸
- 加热 室温、20 min
- 减压干燥
- ← 6 mol/L 的盐酸 (含 1% 的苯酚) 1 mL
- 脱气
- 以下步骤同 (A)

(3) 巯基乙磺酸水解

- 样品 IgG 单克隆抗体 1 mg
- ← 3 mol/L 的 2-巯基乙磺酸 1 mL
- 脱气
- 加热 110 °C、22 hr
- 使用 4 mol/L 的氢氧化钠将PH值调为 2
- 使用 0.02 mol/L 的盐酸定容至 3 mL
- 过滤 Pore Size 0.2 μm
- 氨基酸分析样品

\* 日本药典第16版中虽记载有基于气相的水解方法，但此次仅进行了基于液相的水解。

通过互补运用三种水解方法，并使用氨基酸分析仪进行测定，得以全面地分析了IgG单克隆抗体的构成蛋白质的氨基酸。根据结果计算出氨基酸组成，并通过与推测的组成进行比较，可用于蛋白质类药品的试验。此次向您介绍了氨基酸组成分析，但对于蛋白质类药品，还需结合末端氨基酸序列或肽图法的结果等综合地进行解析、评价。

仪器配置：L-8900全自动氨基酸分析仪

注意：本资料所示数据仅为测定例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。