

# RP-HPLC 法测定抗 CD20 单克隆抗体药物中尿苷含量

廉开礼<sup>1,2</sup> 刘忠<sup>3</sup> 彭伟<sup>1,2</sup> 刘邦涛<sup>1,2</sup> 李清华<sup>1,2</sup> 赵丽丽<sup>1,2\*</sup>

1. 山东新时代药业有限公司 山东临沂 273400

2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室 山东临沂 273400

3. 鲁南制药集团股份有限公司 山东临沂 276000

**摘要:** 建立反相-高效液相色谱 (RP-HPLC) 法测定抗 CD20 单克隆抗体药物中尿苷的含量。色谱柱为 YMC-Triart C18 (250 mm × 4.6 mm, S-3 μm, 12 nm), 流动相为 50 mmol/L-1 磷酸二氢钾缓冲液 pH7.0: 甲醇 = 95:5 (等度洗脱), 流速 0.6 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 262 nm, 柱温 40℃。对 RP-HPLC 法进行方法学验证, 并测定供试品中尿苷含量。结果表明, 尿苷含量在 0.0001 ~ 0.001 g · L<sup>-1</sup> 范围内, 峰面积与浓度的线性关系良好 (R<sup>2</sup>=1.000); 精密度良好 (RSD ≤ 2.0%); 供试品在 41.5% ~ 207.4% 范围内添加尿苷, 平均加样回收率均在 96.7%~104.5% 之间 (RSD ≤ 2.0%)。供试品中尿苷的含量远低于限定值。该方法专属性强、准确度高、精密度好, 可用于测定抗 CD20 单克隆抗体药物中尿苷含量, 为抗体药物中尿苷含量测定提供方法参考。

**关键词:** 反相-高效液相色谱 (RP-HPLC) 法; 抗 CD20 单克隆抗体药物; 尿苷; 含量测定; 方法验证

抗 CD20 单克隆抗体药物, 即利妥昔单抗, 通过作用于 B 淋巴细胞上 CD20 抗原, 用于治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 及相关疾病<sup>[1]</sup>。近年来从美罗华到国内生物类似药的相继上市, 抗 CD20 单克隆抗体药物取得了良好的临床疗效和市场价值<sup>[2-3]</sup>。抗 CD20 单克隆抗体药物通过中华仓鼠卵巢巢细胞 (CHO) 培养产生, 细胞生长需要各种氨基酸、维生素、嘌呤、嘧啶等生长素<sup>[4-5]</sup>。各类生长素在蛋白纯化工艺过程中作为杂质需要被去除, 尿苷是生长素的一种, 尿苷的残留含量是抗体药物的关键质量属性。

尿苷, 中文别名: 尿嘧啶核苷, 分子量 244.20 道尔顿, 白色针状结晶或粉末, 能溶于水, 微溶于稀醇, 不溶于无水乙醇。尿苷是中药材的有效成分, 大多数报道高效液相色谱法测定炒土鳖虫、黑木耳、菘蓝根等中药材中尿苷含量<sup>[6-8]</sup>, 几乎没有文章报道尿苷在抗体药物中的含量测定。2020 版《中国药典》没有尿苷含量测定方法。因此, 本研究开发建立 RP-HPLC 法测定抗 CD20 单克隆抗体药物中尿苷的含量, 为抗体药物尿苷含量测定提供参考方法, 对抗体药物质量控制具有十分重要的意义。

## 1. 仪器与试剂

高效液相色谱仪带 VWD 检测器, 电热恒温水浴锅 (北京市光明医疗仪器有限公司, DZKW-D-2), 离心机 (Thermo,

Pico17), 移液枪 (Sartorius), AB204-L 电子天平 (d=0.0001 g, Mettler Toledo), IQ7000 纯水仪 (Milli-Q), FE-28 pH 计 (Mettler Toledo)。

磷酸二氢钾 (西龙科学股份有限公司), 氢氧化钠 (西龙科学股份有限公司), 甲醇 (Merck)。

尿苷标准品 (新乡拓新药业股份有限公司, 药用级, 批号 C03201904002), 抗 CD20 单克隆抗体发酵工艺产品 (山东新时代药业有限公司, 批号 F007mab220309 上样), 抗 CD20 单克隆抗体纯化工艺产品 (山东新时代药业有限公司, 批号 F007mab220309)。

## 2. 色谱条件

色谱柱: YMC-Triart C18 (4.6 mm × 250 mm, S-3 μm, 12 nm); 流动相: 50 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾 pH 7.0; 流速: 0.6 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量: 100 μL; 柱温: 40 °C; 检测波长: 262 nm; 检测时间: 20 min。

## 3. 溶液配制

### 3.1 标准品溶液

精密称取尿苷 0.0100g, 加入到 1 L 超纯水中, 溶解混匀, 得到质量浓度为 0.01 g · L<sup>-1</sup> 的尿苷标准品贮备液。精密量取 1000μL、200.0μL、133.3μL 的 0.01 g · L<sup>-1</sup> 的尿苷标准品贮备液, 加入 9000μL、3800μL、3866.8μL 超纯水中, 混匀

得 0.001 g · L<sup>-1</sup>、0.0005 g · L<sup>-1</sup>、0.00033 g · L<sup>-1</sup> 系列尿苷标准品溶液，再分别精密量取 1500uL、800.0uL、533.3uL、600.0uL 的 0.001 g · L<sup>-1</sup> 的尿苷标准品溶液，加入 4500uL、3200uL、3466.7uL、5400uL 超纯水中，混匀得 0.00025 g · L<sup>-1</sup>、0.0002 g · L<sup>-1</sup>、0.000133 g · L<sup>-1</sup>、0.0001 g · L<sup>-1</sup> 系列尿苷标准品溶液。

### 3.2 供试品溶液

取抗 CD20 单克隆抗供试品 500 μL 置于 1.5mLEP 管中，95 °C 水浴加热 10min，15000g 超速离心 10min 沉淀蛋白，发酵工艺产品（F007mab220309 上样）初始尿苷含量非常高，取上清液用流动相 100 倍稀释后进样，纯化工艺产品 F007mab220309 取上清液直接进样。

## 4. 方法与结果

### 4.1 SEC-HPLC 方法验证

#### 4.1.1 专属性验证

按“2”项下色谱条件，分别取流动相、buffer(纯化洗脱液)、0.00025 g · L<sup>-1</sup> 标准品溶液、供试品溶液（F007mab220309）进样测定。比较各成分色谱峰，确定尿苷标准品溶液保留时间为 10.623min，流动相及 buffer 在尿苷出峰处无干扰峰，专属性良好（图 1）。

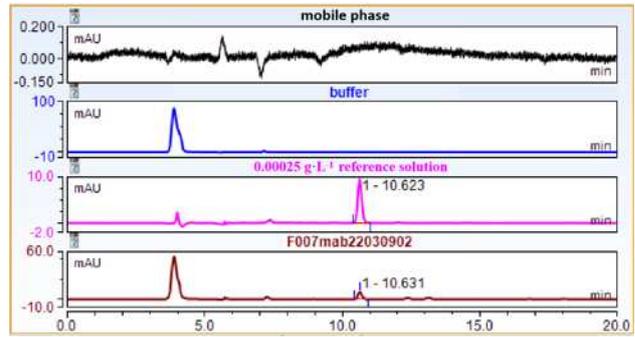


图 1 流动相、buffer、0.00025 g · L<sup>-1</sup> 标准品溶液、供试品溶液及供试品溶液色谱图叠加

#### 4.1.2 线性关系、准确度及范围验证

取“3.1”项下 0.0001 g · L<sup>-1</sup>、0.000133 g · L<sup>-1</sup>、0.0002 g · L<sup>-1</sup>、0.00025 g · L<sup>-1</sup>、0.00033 g · L<sup>-1</sup>、0.0005 g · L<sup>-1</sup>、0.001 g · L<sup>-1</sup> 系列浓度标准品溶液，按“2”项下色谱条件测定，平行制备 3 份，记录峰面积，以标准品峰面积为横坐标，各浓度点为纵坐标，拟合标准曲线，得回归方程：

$Y=1.5194 \times 10^{-4} X+6.8331 \times 10^{-6}$ ,  $R^2=0.9999$ ；由标准曲线计算尿苷的浓度，以实测值与理论值计算平均回收率均在 99.5%~100.7% 之间，且回收率 RSD (n=3) 均小于 1.7%，结果见表 1。

表 1 线性关系、准确度及范围

线性溶液浓度 (g · L <sup>-1</sup> )	峰面积 (mAU*min)	峰面积 (mAU*min) 平均值	尿苷浓度实测值 (g · L <sup>-1</sup> )	平均回收率 (%)	回收率 RSD (%)
0.0001	0.602		0.00009830		
0.0001	0.623	0.613	0.0001015	100.0	1.7
0.0001	0.615		0.0001003		
0.000133	0.829		0.0001328		
0.000133	0.840	0.834	0.0001345	100.2	0.63
0.000133	0.834		0.0001336		
0.0002	1.284		0.0002019		
0.0002	1.274	1.281	0.0002004	100.7	0.44
0.0002	1.284		0.0002019		
0.00025	1.600		0.0002499		
0.00025	1.608	1.602	0.0002512	100.1	0.35
0.00025	1.597		0.0002495		
0.000333	2.134		0.0003310		
0.000333	2.149	2.142	0.0003334	99.8	0.35
0.000333	2.142		0.0003323		

0.0005	3.229		0.0004974		
0.0005	3.216	3.229	0.0004955	99.5	0.39
0.0005	3.241		0.0004993		
0.001	6.550		0.001002		
0.001	6.548	6.544	0.001002	100.1	0.14
0.001	6.534		0.0009996		

结果表明，在 0.0001 g · L<sup>-1</sup> ~ 0.001 g · L<sup>-1</sup> 浓度范围内，尿苷的浓度与峰面积呈现良好的线性关系，准确度良好。

#### 4.1.3 中间精密度验证

分析员甲按照“3.1”项配制低、中、高（0.0002 g · L<sup>-1</sup>、0.00025 g · L<sup>-1</sup>、0.0005 g · L<sup>-1</sup>）3种浓度的尿苷溶液，平

行制备3份，分析员乙在不同天按照相同方法配制标准品溶液，按“2”项下色谱条件测定，记录峰面积。结果显示低、中、

高3种浓度峰面积RSD(n=3)均小于1.1%，中间精密度良好，

结果见表2。

表2 中间精密度

低、中、高浓度 (g · L <sup>-1</sup> )	峰面积 (mAU*min)		峰面积平均值 (mAU*min)	峰面积 RSD (%)
	分析人员甲	分析人员乙		
0.0002	1.252	1.284		
0.0002	1.282	1.274	1.278	1.1
0.0002	1.291	1.284		
0.00025	1.591	1.600		
0.00025	1.594	1.608	1.597	0.41
0.00025	1.591	1.597		
0.0005	3.207	3.229		
0.0005	3.223	3.216	3.218	0.53
0.0005	3.193	3.241		

#### 4.1.4 加样回收率验证

取供试品溶液 F007mab220309，与“3.1”项下“0.0001 g · L<sup>-1</sup>、0.000133 g · L<sup>-1</sup>、0.0002 g · L<sup>-1</sup>、0.00025 g · L<sup>-1</sup>、0.000333 g · L<sup>-1</sup>、0.0005 g · L<sup>-1</sup>”系列浓度标准品溶液按照体积比 1: 1 混合，各平行配制 3 份，按“2”项下色谱条件

测定，记录峰面积，代入“4.1.2”项下线性回归方程，回收

率 = (实测总量 - 样品量) / 加入标准品量 \* 100，计算加样回收率均在 96.7% ~ 104.5% 之间，RSD 值均小于 0.98%，结果见表 3。

表3 加样回收率

峰面积 (mAU*min)	实测总量 (g · L <sup>-1</sup> )	样品量	回收率 (%)	平均回收率 (%)	回收率 RSD (%)
1.069	0.0001671		93.1		
1.067	0.0001658		90.4	96.9	0.48
1.066	0.0001670		92.8		
1.168	0.0001828		93.3		
1.175	0.0001838	0.0001206	94.9	96.7	0.96
1.175	0.0001838		94.9		
1.387	0.0002115		90.9		
1.383	0.0002109		90.3	96.8	0.37
1.387	0.0002115		90.9		

1.604	0.0002354	91.8		
1.618	0.0002375	93.5	104.5	0.98
1.603	0.0002352	91.7		
1.874	0.0002764	93.6		
1.886	0.0002782	94.7	102.9	0.82
1.868	0.0002755	93.0		
2.408	0.0003575	94.8		
2.413	0.0003583	95.1	100.9	0.25
2.405	0.0003571	94.6		

#### 4.2 供试品含量检测

按照“3.2”项下制备供试品溶液，按“2”项下色谱条件测定，记录峰面积，代入“4.1.2”项下线性回归方程，计算供试品 F007mab220309 上样和 F007mab220309 中尿苷的含量，结果见表 4。

表 4 供试品浓度检测

供试品	峰面积 (mAU*min)	尿苷浓度 (mg/mL)
F007mab220309 上样	243.4	0.036989029
F007mab220309	1.542	0.000241125

结果表明，发酵工艺产品（F007mab220309 上样）尿苷含量较高，经过纯化后工艺产品（F007mab220309）尿苷含量显著降低，远低于该抗体药物上市尿苷含量限定标准，该方法可以用于抗体药物尿苷含量测定。

#### 5. 结论

综上所述，本文采用 RP-HPLC 法准确测定了抗 CD20 单克隆抗体药物中尿苷含量，该方法专属性强、准确度高、精密度良好。

供试品处理方法：蛋白残留会干扰尿苷的检测，同时会缩短色谱柱的使用寿命，因此需要开发供试品溶液蛋白去除方法。由于尿苷不溶或微溶于有机溶剂<sup>[9]</sup>，不适合有机溶剂沉淀法，结合抗体药物本质为蛋白质，高温容易变性沉淀，本文预实验中采用 95℃ 加热供试品 10min 沉淀蛋白，高速离心后取上清液。结果发现 95℃ 加热 10min 后，检测上清液蛋白浓度为零，蛋白去除干净。同时，通过加样回收率试验验证了加热沉淀法去蛋白对尿苷的含量没有影响。因此，本实验采用 95℃ 加热供试品溶液 10min 沉淀去除蛋白。

流动相的选择：采用甲醇和水的梯度洗脱尿苷时间较长。因此，本研究使用更加快速、简便的等度洗脱条件，参考《中国药典》氟脲苷含量检测采用磷酸盐缓冲液为流动相，

所得的尿苷色谱峰形良好，最终确定流动相为 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲液 pH7.0: 甲醇 = 95:5。

经过验证，本文采用 RP-HPLC 法准确测定抗 CD20 单克隆抗体药物中尿苷含量，该方法专属性强、准确度高、精密度良好。用于抗体药物尿苷残留检测，发酵样品经纯化工艺去除后，尿苷含量明显降低，低于限定值，可准确检测样品中尿苷含量，评估纯化去除工艺效果，也可用于最终上市抗体药物尿苷残留量检测，为抗体药物尿苷残留检测提供可靠检测方法。

#### 参考文献：

- [1]. Reagan PM, Friedberg JW. Reassessment of Anti-CD20 Therapy in Lymphoid Malignancies: Impact, Limitations, and New Directions. *Oncology (Williston Park)* [J]. 2017 May 15;31(5):402-11.
- [2]. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy [J]. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:140-74.
- [3]. Shanebandi D, Majidi J, Kazemi T, Baradaran B, Aghebati-Maleki L. CD20-based Immunotherapy of B-cell Derived Hematologic Malignancies [J]. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017;17(5):423-444.
- [4]. Dumont J, Eewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives [J]. *Crit Rev Biotechnol*. 2016 Dec;36(6):1110-1122.
- [5]. 张莉莉, 李玉坤. 生长因子对骨代谢影响的研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2012,(02):121-126.
- [6]. 韩宇, 赵明会, 李徽. 高效液相色谱法测定炒土鳖虫中尿嘧啶和尿苷含量 [J]. *中国社区医师*, 2021, 37(4):2.

[7] 郑雪, 郑春英, 吴桐. HPLC 法测定黑木耳中腺苷及尿苷含量 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(32):3.

[8] 刘东, 杜弢. 不同生态类型菘蓝根中有效成分含量测定 [J]. 化学世界, 2021.

[9] 王建新. 化妆品天然成分原料介绍 ( X X II ) [J]. 日用化学品科学, 2021, 44(4):5.

**作者简介:**

廉开礼 (1990—), 男, 硕士, 从事药物质量分析研究。

通信作者: 赵丽丽 (1977—), 女, 博士, 高级研究员, 从事蛋白药物研究与开发。

**项目基金:**

山东省重点研发计划 (泰山产业领军人才工程) tscx202306088

**基金项目:**

国家重点研发计划, 项目编号: 2023YFF0725500。