

doi: 10.12452/j.fxcxb.26062503

高效液相色谱-电雾式检测器法测定单克隆抗体药物中残留葡聚糖硫酸钠

康怀腾[#], 梁梓洋[#], 张秋炎, 莫智威, 梁韵蕊, 董钰龙, 罗辉泰^{*}, 黄芳

(广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心), 广东省化学测量与应急检测技术重点实验室, 广东省中药质量安全工程技术研究中心, 广东 广州 510070)

摘要: 该文建立了高效液相色谱-电雾式检测器(HPLC-CAD)测定单克隆抗体药物中葡聚糖硫酸钠(DSS)残留量的分析方法。供试品经硫酸铵溶液沉淀、过滤和稀释后,以50 mmol/L乙酸铵溶液为流动相,采用TSKgel G3000PWxl色谱柱(7.8 mm × 300 mm, 7 μm)等度洗脱,CAD检测器检测,外标法定量。结果表明,DSS在25~500 μg/mL范围内线性关系良好($r = 0.9980$),方法检出限为50 μg/mL,定量限为100 μg/mL,平均加标回收率($n = 9$)为94.0%,仪器精密性相对标准偏差(RSD)小于4%,方法重复性RSD为3.31%。对照品及加标供试品溶液室温放置42 h内,DSS峰面积变化率均在±10%以内;流速与柱温变动条件下,DSS测得量相对于原条件相对偏差均在±5%以内。该方法现已完成29批次单克隆抗体药物的实际样品检测,其中1批次样品被检出含有DSS残留,测得含量为252 μg/mL。该方法操作门槛低、数据重复性好,能够为单克隆抗体药物中DSS残留的质量标准建立与日常质控工作提供可行的技术方案。

关键词: 高效液相色谱(HPLC);电雾式检测器(CAD);单克隆抗体;葡聚糖硫酸钠(DSS);质量控制

中图分类号: O657.7; R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-07

Determination of Residual Dextran Sulfate Sodium in Monoclonal Antibody Drugs by High Performance Liquid Chromatography-Charged Aerosol Detection

KANG Huai-teng[#], LIANG Zi-yang[#], ZHANG Qiu-yan, MO Zhi-wei, LIANG Yun-rui, DONG Yu-long, LUO Hui-tai^{*}, HUANG Fang

(Guangdong Provincial Engineering Research Center for Quality and Safety of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Measurement and Emergency Test Technology, Institute of Analysis, Guangdong Academy of Sciences (China National Analytical Center, Guangzhou), Guangzhou 510070, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography - charged aerosol detection (HPLC-CAD) method was developed for the determination of dextran sulfate sodium (DSS) residues in monoclonal antibody drugs. After precipitation with ammonium sulfate solution, filtration, and dilution, the samples were separated on a TSKgel G3000PWxl column (7.8 mm × 300 mm, 7 μm) using 50 mmol/L ammonium acetate solution as the mobile phase in an isocratic elution mode, and detected by CAD. Quantification was performed using an external standard method. The method demonstrated excellent linearity for DSS in the range of 25–500 μg/mL ($r = 0.9980$). The detection limit was 50 μg/mL, and the quantitation limit was 100 μg/mL. The average recovery ($n = 9$) was 94.0%, the relative standard deviations of instrument precision was less than 4%, and the relative standard deviations of method repeatability was 3.31%. Within 42 h storage at room temperature, DSS peak area changes of the reference solution and spiked sample solution were all within ±10%. Under flow rate and column temperature variation conditions, the relative deviations of DSS assay results from the original conditions were all within ±5%. This method has been applied to the actual sample testing of 29 batches of monoclonal antibody drugs, and DSS residue was detected in 1 batch

收稿日期: 2026-06-25; 修回日期: 2026-07-22

* 通讯作者: 罗辉泰, 副研究员, 研究方向: 色谱-质谱分析技术应用研究, E-mail: luohuitai@qq.com

[#] 共同第一作者

网络首发日期: XXXX-XX-XX

with a measured content of 252 $\mu\text{g/mL}$. This method features easy operation and good data repeatability, which can provide a feasible technical scheme for the establishment of quality standards and routine quality control of DSS residue in monoclonal antibody drugs.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); charged aerosol detection (CAD); monoclonal antibody; dextran sulfate sodium (DSS); quality control

凭借高安全性、强靶向性和显著的临床疗效等核心优势,单克隆抗体药物已跻身生物制药行业最热门赛道之一,同时也是近年全球治疗性药物研发的重点方向,其临床应用场景已覆盖肿瘤、神经系统疾病、自身免疫性疾病、心血管疾病以及抗感染治疗等多个关键医疗领域^[1]。治疗性单克隆抗体的生产多采用CHO细胞(中华仓鼠卵巢细胞, Chinese Hamster Ovary Cells)表达系统^[2],在该表达体系的大规模工业生产中,悬浮培养相较于贴壁培养,在发挥细胞生产潜能,保证生物制品稳定性及均一性等方面具有明显优势^[3],因而应用更为广泛。

细胞培养工艺的稳定性是单克隆抗体药物生产的关键,然而在悬浮培养过程中,细胞常发生结团现象,团内细胞因代谢异常、乳酸堆积而死亡,进而影响产物的产量与质量^[4]。为解决该问题,可通过添加葡聚糖硫酸钠(DSS)来改变细胞表面的电荷,促使单细胞悬浮,从而有效抑制细胞结团,进而起到提高细胞培养密度以及细胞活力的作用^[5-6]。然而,DSS本身具有一定的安全风险,研究表明其可导致结肠屏障损伤、炎症浸润、直肠出血及肠道菌群失调等不良反应^[7],且可引起肝脏急性损伤^[8]。由此可见,单克隆抗体药物中残留的DSS对人体健康存在潜在风险,有必要对其进行严格控制。

目前,国内外已针对DSS残留建立了多种分析方法,主要包括计时电位法^[9]、共振瑞利散射法^[10-11]、荧光探针法^[12]及衍生化高效液相色谱法^[13-14]等。然而,上述方法仍存在不同程度的局限性:计时电位法虽具备快速检测的潜力,但其电极制备工艺复杂、维护繁琐^[9];共振瑞利散射法灵敏度较高,但基于静电作用的识别机制容易受溶液中其他阴离子或颗粒物的非特异性干扰,基质效应显著^[15-16];荧光探针法同样表现出高灵敏度的特性,但也存在特异性不足的问题,难以区分结构相似的阴离子多糖(如肝素),存在假阳性风险^[12];衍生化高效液相色谱法包括柱前衍生与柱后衍生两种策略,前者需长时间加热与还原反应,操作繁琐且耗时,后者则依赖复杂的专用衍生系统,不仅设备成本高,且需付出较高的维护成本^[13-14]。鉴于此,本研究旨在建立一种基于电雾式检测器(CAD)且无需衍生化的HPLC检测方法,以期在保证高灵敏度与高可靠性的前提下有效提升检测效率,为单克隆抗体药物中DSS残留的质量控制提供更为理想的技术方案。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

Vanquish Flex 液相色谱仪(配置CAD检测器,赛默飞世尔科技有限公司);BT25S电子分析天平(德国赛多利斯集团);H1850R离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);涡旋振荡器(上海精科实业有限公司);0.22 μm 水相微孔滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司)。

葡聚糖硫酸钠(纯度100%,Sigma-Aldrich);乙酸铵(LC-MS级,赛默飞世尔科技有限公司);硫酸铵(分析纯,广州化学试剂厂);水(一级,实验室制备);单克隆抗体药物供试品均来自于委托送检。

1.2 溶液配制

沉淀剂:取硫酸铵约80 g,置250 mL烧杯中,加入水50 mL,超声30 min,混匀,常温放置30 min后取上层清液,即得。

对照品储备液:取葡聚糖硫酸钠对照品500 mg,置10 mL容量瓶,加入水溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

对照品稀释剂:取沉淀剂25 mL,置100 mL容量瓶,用水稀释至刻度,混匀,即得。

线性对照品溶液:取对照品储备溶液,分别用对照品稀释剂定量稀释成每1 mL中含葡聚糖硫酸钠25.0 μg 、50.0 μg 、125 μg 、200 μg 、250 μg 、300 μg 、375 μg 和500 μg 的溶液,即得。

空白溶液:精密量取水0.5 mL,置1.5 mL离心管,精密加入沉淀剂0.5 mL,涡旋2 min,以8000

r/min 离心 5 min, 精密移取上清液 0.5 mL, 精密加入水 0.5 mL, 混匀, 经 0.22 μm 水相滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

供试品溶液: 精密量取供试品 0.5 mL, 置 1.5 mL 离心管, 精密加入沉淀剂 0.5 mL, 涡旋 2 min, 以 8000 r/min 离心 5 min, 精密移取上清液 0.5 mL, 精密加入水 0.5 mL, 混匀, 经 0.22 μm 水相滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

加标供试品溶液: 精密量取供试品 0.5 mL, 置 1.5 mL 离心管, 加入适量的对照品储备液, 混匀, 精密加入沉淀剂 0.5 mL, 涡旋 2 min, 以 8000 r/min 离心 5 min, 精密移取上清液 0.5 mL, 精密加入水 0.5 mL, 混匀, 经 0.22 μm 水相滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

1.3 仪器条件

色谱柱: TSKgel G3000PWxl (7.8 mm $\times$ 300 mm, 7 μm); 流动相: 50 mmol/L 乙酸铵溶液; 进样量: 20 μL ; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 洗脱程序: 等度洗脱; 运行时间: 35 min; 检测器: 电雾式检测器 (CAD); 雾化温度: 70 $^{\circ}\text{C}$; 采集频率: 5 Hz。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

DSS 是葡聚糖经硫酸化修饰形成的阴离子多糖化合物, 通常以钠盐形式存在, 主要通过葡聚糖与氯磺酸反应合成, 反应副产物以硫酸根离子为主, 同时含有大量无机离子。由于 CAD 为通用型检测器, 对无机离子及有机物均有响应, 为确保 DSS 的分析不受干扰, 需要在色谱分离上对 DSS、钠离子 (Na^+) 和硫酸根离子 (SO_4^{2-}) 进行完全分离。尽管在日常分析中常用凝胶色谱柱分析多糖类化合物, 但 C_{18} 色谱柱在特定情况下仍能提供不同的选择性以适应不同的样品基质^[17], 因此本文尝试分别考察 C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 和 TSKgel G3000PWxl (7.8 mm $\times$ 300 mm, 7 μm) 两种分离模式色谱柱对 DSS 分离情况的影响, 结果如图 1 所示。结果表明, C_{18} 柱因缺乏离子交换能力, 对无机离子及强极性的 DSS 保留弱, 未能实现 DSS 与 SO_4^{2-} 的分离; 而 TSKgel G3000PWxl 基于体积排阻机制实现分离, 尺寸大的 DSS 先出峰, 而尺寸小的 Na^+ 和 SO_4^{2-} 后出峰, 在 50 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相时即可对上述三种组分进行有效分离。综上, 选择 TSKgel G3000PWxl 色谱柱进行后续的分析。

2.2 沉淀剂的选择

凝胶色谱柱基于体积排阻机制实现化合物分离, 其分离效果与分子量相关。考虑到抗体药物通常分子量较高, 可能对 DSS 的测定产生干扰, 为提高 DSS 分析方法的选择性与可靠性, 采用蛋白沉淀法去除样品中的抗体, 确保 DSS 的分析不受基质影响。先后考察了甲醇、乙腈、10% 三氯乙酸溶液和饱和硫酸铵溶液 4 种常用的蛋白沉淀剂对加标供试品中 DSS 回收率的影响, 结果如表 1 所示。

在实验现象上, 抗体样品与上述 4 种沉淀剂按表 1 的比例混合时均可见明显的沉淀, 表明 4 种沉淀剂均能实现对抗体蛋白的沉淀。使用甲醇与乙腈这两种常用有机沉淀剂时, 未能回收 DSS, 推测原因可能是供试品中大量的甲醇或乙腈竞争性结合水分子, 破坏了 DSS 分子表面的水化层, 导致其疏水相互作用增强, 最终因聚集沉淀而无法回收。DSS 分子携带有大量具有强电负性的硫酸基团, 在水溶液中, 分子链间因静电排斥作用而难以发生聚集。当采用强酸性的 10% 三氯乙酸溶液作为沉淀剂时, DSS 的硫酸基团所带电荷被中和, 分子间的静电斥力减弱, 进而致使其溶解度降低, 最终体现为回收率下降。当采用高离子强度的饱和硫酸铵溶液作为沉淀剂时, 其主要借助盐析效应实现蛋白沉淀。而在高离子强度环境中, DSS 的电荷被屏蔽, 分子链发生收缩, 呈现出与去离子化葡聚糖相似的状态^[18], 仍具备良好的水溶性, 故而能够获得较为理想的回收率。此外, 饱和硫酸铵溶液与供试品的混合比例 ($v:v$) 为 1:1 和 2:1 时均有较好的回收率, 为避免过多难挥发的 SO_4^{2-} 进入 CAD 检测器而造成污染, 选择 1:1 的比例进行蛋白沉淀, 同时对沉淀后的清液以水进行稀释, 在满足灵敏度要求下尽可能减少难挥发盐进入检测器的量, 保证仪器运行的稳定性。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性 取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液和加标供试品溶液, 依据“1.3”项下仪器条件进样分析, 所得色谱图如图 2 所示, 在对照品溶液及加标供试品溶液中, DSS 与 SO_4^{2-} 的分离度为

2.2, 二者间能实现良好分离, 空白溶液与供试品溶液在 DSS 色谱峰附近未见明显干扰峰, 表明该方法专属性良好。

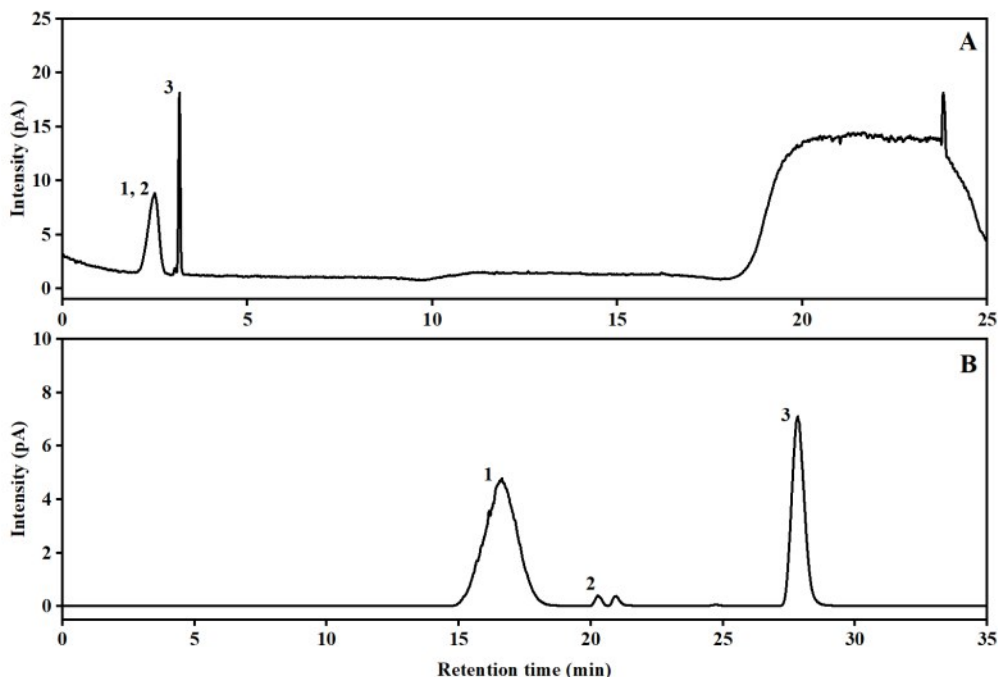


图1 对照品溶液经 (A) C18 和 (B) TSKgel G3000PWxl 两种不同色谱柱分离的色谱图 (峰标识: 1. DSS; 2. SO_4^{2-} ; 3. Na^+)

Fig. 1 Chromatograms of the reference solution separated by (A) C18 and (B) TSKgel G3000PWxl columns (Peak identifications: 1. DSS; 2. SO_4^{2-} ; 3. Na^+)

表1 不同沉淀剂对 DSS 回收率的影响

Table 1 Effect of different precipitants on the recovery of DSS

Precipitant	Ratio of precipitant to sample ($v:v$)	Recovery of DSS (%)
Methanol	3: 1	0
Acetonitrile	3: 1	0
10% Trichloroacetic acid	0.2: 1	32.8
10% Trichloroacetic acid	2: 1	29.3
Saturated ammonium sulfate	1: 1	98.9
Saturated ammonium sulfate	2: 1	99.1

2.3.2 检出限与定量限 精密量取对照品储备液, 用对照品稀释剂逐级稀释, 按照“1.3”项下仪器条件进样分析, 通过信噪比 (S/N) 指标系统评估目标化合物的检测灵敏度。以 $S/N \geq 3$ 时的浓度作为检出限, $S/N \geq 10$ 时的浓度作为定量限。结果表明, 本方法条件下 DSS 的方法检出限为 $50 \mu\text{g/mL}$, 定量限为 $100 \mu\text{g/mL}$ 。定量限溶液连续进样 6 次, DSS 峰面积 RSD 为 4.90%, 表明本方法灵敏度良好。

2.3.3 线性范围 取线性对照品溶液, 按照“1.3”项下的仪器分析条件逐一进样分析, 以测得的质量浓度作为横坐标 x ($\mu\text{g/mL}$), 峰面积作为纵坐标 y ($\text{pA} \cdot \text{min}$) 进行线性回归计算, 以相关系数 r 评价线性关系。最终结果显示, DSS 对照品溶液在 $25 \sim 500 \mu\text{g/mL}$ 范围内, DSS 的回归方程为 $y = 0.008x + 0.072$, $r = 0.9980$ (> 0.990), 表明本方法线性关系良好。

2.3.4 仪器精密度 取浓度为 $250 \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 按照“1.3”项下的仪器工作条件下连续进行进样, 测得 DSS 峰面积的 RSD ($n=6$) 为 3.31%, 保留时间的 RSD ($n=6$) 为 0.14%, 表明本方法仪器精密度良好。

2.3.5 方法重复性 精密量取供试品 6 份, 按照“1.2”项下方法制备加标供试品溶液, 其中对照品储备液加入量为 $10 \mu\text{L}$, 依据“1.3”项下仪器条件进行测试, 测得 DSS 含量平均值为 $1064 \mu\text{g/mL}$ ($n=6$), RSD 为 3.31% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

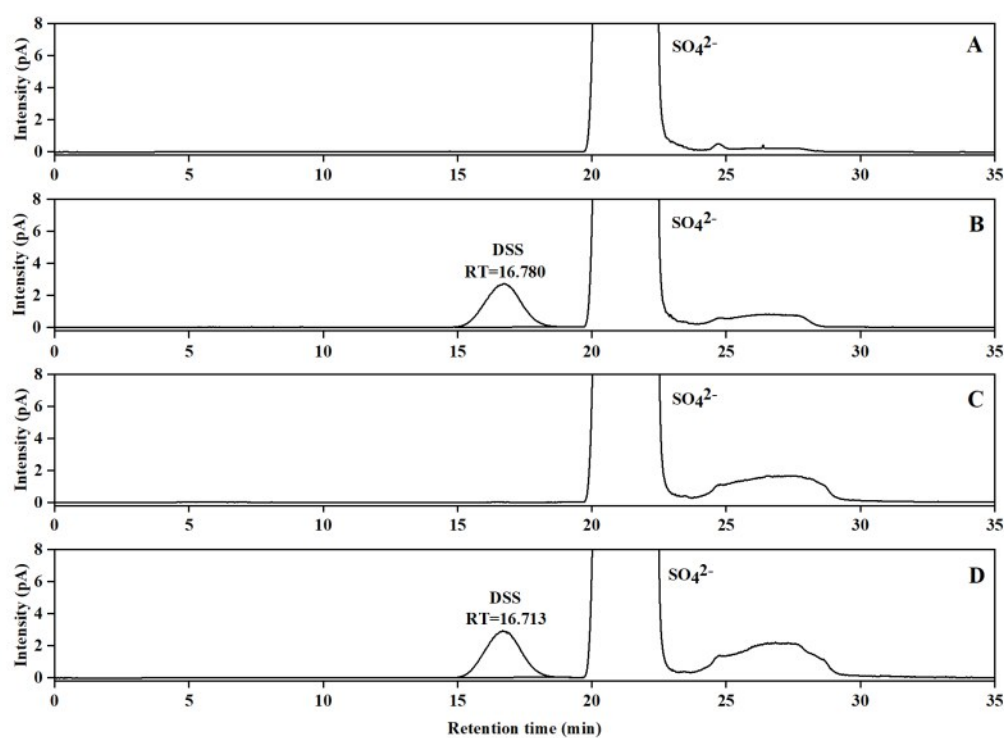


图2 专属性试验下各溶液的色谱图（A：空白溶液；B：对照品溶液；C：供试品溶液；D：加标供试品溶液，对照品溶液和加标供试品溶液中DSS浓度均为250 μg/mL）

Fig. 2 Chromatograms of different solutions in specificity test (A: Blank solution, B: Reference solution, C: Sample solution, D: Spiked sample solution (D)), concentration of DSS in reference solution and spiked sample solution were all 250 μg/mL)

2.3.6 准确度 精密量取供试品9份，按照“1.2”项下方法制备加标供试品溶液，其中对照品储备液加入量分别为5、10、15 μL（各3份），按照“1.3”项下的仪器工作条件下进行进样，计算3个浓度水平下的加标回收率（结果见表2）。结果表明，3个浓度水平的加标回收率处在85%~105%之间，表明本方法准确度良好。

表2 单克隆抗体药物中DSS加标回收率及相对标准偏差

Table 2 Recoveries and relative standard deviations of DSS in monoclonal antibody drugs

Original (μg)	Added (μg)	Measured (μg)	Recovery (%)	Mean recovery (n=9, %)	RSD (n=9, %)
0	250	232.55	93.0	94.0	5.69
		228.64	91.5		
		252.06	100.8		
	500	476.11	95.2		
		518.27	103.7		
		474.48	94.9		
	750	675.32	90.0		
		665.01	88.7		
		660.70	88.1		

2.3.7 稳定性 取“2.3.6”项下的10 μL加标供试品溶液和浓度为250 μg/mL的对照品溶液，于室温（25℃）条件下分别放置0、6、12、24和42 h后进样分析，以各时间点测得的峰面积RSD作为评价指标考察方法的稳定性。结果表明，室温放置42 h内，对照品溶液中DSS峰面积相对于0 h的变化率为-7.80%~+3.87%，加标供试品溶液中DSS峰面积相对于0 h的变化率为+0.20%~+9.05%，表明本方法稳定性良好。

2.3.8 耐用性 精密量取供试品6份，按照“1.2”项下制备加标供试品溶液，其中对照品储备液加入量为10 μL。在其它条件保持不变下，分别考察流速和柱温变化对目标化合物测定结果的影响（结

果见表3)。结果表明,流速变动时,DSS测得量相对于原条件的相对偏差为-4.32%~-0.47%;柱温变动时,DSS测得量相对于原条件的相对偏差为-4.98%~+3.67%,表明本方法耐用性良好。

表3 耐用性试验下DSS的测得量

Table 3 Measured content of DSS in robustness test

Conditions	Original condition	Flow rate (mL/min)		Column temperature / $^{\circ}\text{C}$	
		0.38	0.42	33.25	36.75
Measured content ($\mu\text{g/mL}$)	1064	1018	1059	1103	1011

2.4 实际样品测定

采用本研究建立的检测方法对29批次单克隆抗体药物开展实际样品分析,仅1批次样品检出DSS残留,其测定值为252 $\mu\text{g/mL}$ 。考虑到DSS具有一定的肠道及肝脏毒性,在长期反复给药的临床治疗周期中,可能对人体造成隐匿性的健康损伤,因此建议相关制药企业需持续高度关注单克隆抗体药物中的DSS残留问题,并落实严格的残留管控措施。

3 结 论

本研究建立了一种测定单克隆抗体药物中DSS残留的高效液相色谱-电雾式检测器测定方法。经方法学确认,该方法操作门槛低、灵敏度表现良好、测定结果准确度高,可为单克隆抗体药物的DSS残留专项质量管控提供有效的技术参考。

参考文献:

- [1] Gu G L, Fang M. *J. Chinese Journal of Biotechnology*. (顾光磊, 方敏. 生物工程学报), 2024, 40 (05): 1431-1447.
- [2] Li W S. *J. Biological Chemical Engineering*. (李未思. 生物化工), 2018, 4 (03): 133-134+137.
- [3] Yang Y M, Li D Y, Xie J Y, Feng R F. *J. Chinese Journal Of Pharmaceutical Biotechnology*. (杨妍梅, 李殿玉, 谢晶莹, 冯若飞. 药物生物技术), 2026, 33 (01): 141-148.
- [4] Zhang Y N, Zhang G Z, Li G. *J. Biological Chemical Engineering*. (张燕娜, 章郭真, 李刚. 生物化工), 2022, 8 (05): 74-79.
- [5] Zhang F, Zhang L, Yi X P, Sun X M, Zhang Y X. *J. High Technology Letteres*. (张芳, 张立, 易小萍, 孙祥明, 张元兴. 高技术通讯), 2005, 15 (7): 73-78.
- [6] Teng X N, Yi X P, Sun X M, Zhang Y X. *J. Chinese Journal of Biologicals*. (滕小锴, 易小萍, 孙祥明, 张元兴. 中国生物制品学杂志), 2010, 23 (10): 1080-1083+1086.
- [7] Chi X Q, Cai C W, Zhang H J, Wu L Q. *J. Chinese Pharmaceutical Journal*. (迟笑倩, 柴常伟, 张海婧, 吴练秋. 中国药学杂志), 2024, 59 (17): 1581-1589.
- [8] Yang Y S, Feng Y Q, Cui S L, Chen K, Wang H. *J. Journal of Guangdong Pharmaceutical University*. (杨元生, 冯英巧, 崔淑兰, 陈垦, 王晖. 广东药学院学报), 2015, 31 (06): 781-785.
- [9] Gordon E, Segal S, Sabou A K, Gemene K L. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1149: 338208.
- [10] Xiu L H, Nian B L, Hong Q L. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 71: 1673-1677.
- [11] Liu D. *J. Journal of Sichuan University of Arts and Science*. (刘丹. 四川文理学院学报), 2011, 21 (02): 51-54.
- [12] Prasad S A, Mirgane H A, Garge S Y, Bhosale S V, Singh P K. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2025, 443: 138157.
- [13] Fan M N, Tan C Y, Duan Y, Chen Q, Qin G H. *J. Biological Chemical Engineering*. (樊梦妮, 谭澄莹, 段颖, 陈秋, 秦国宏. 生物化工), 2024, 10 (03): 89-93.
- [14] Tazi L M, Jayawickreme S. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1011: 89-93.

- [15] Peng J D, Liu S P, Liu Z F, Shi Y. *J. Acta Chimica Sinica*. (彭敬东, 刘绍璞, 刘忠芳, 石燕. 化学学报), **2005**, 63 (8): 745-751.
- [16] Ma C J, Zhong W Y, Zhang W A, Bai Y. *J. Journal of Analytical Science*. (马彩娟, 钟卫焯, 张伟爱, 白研. 分析科学学报), **2017**, 33 (04): 473-477.
- [17] He Y, Hou W, Thompson M, Holovics H, Hobson T, Jones M T. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1323: 97-103.
- [18] Katchalsky A. *Biophysical Journal*, **1964**, 4 (1): 9-41.

(责任编辑:)