

通过表面带电杂化颗粒苯己基柱分离与蒸发光散射检测分析脂质纳米颗粒成分

Bonnie A. Alden, Giorgis Isaac, Weibin Chen, Matthew A. Lauber

Waters Corporation



需要帮助？如需详细了解沃特世如何为您抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供助力，请联系 [新型冠状病毒肺炎\(COVID-19\)疫情创新响应团队](#)

摘要

药品包封用脂质的成分对于药品的结构-功能特性至关重要，在制剂开发或质量控制测试中，必须对脂质纳米颗粒中所含脂质进行可靠的定量分析。使用正表面电位固定相和较简单的流动相，开发出一种分离Patisiran (ONPATTRO)脂质纳米颗粒制剂中所用四种脂质的耐用方法。利用表面带电杂化颗粒使可电离脂质DLin-MC3-DMA获得了对称窄峰。低疏水性苯己基键合相促进了疏水性极强的磷脂（二硬脂酰磷脂酰胆碱）的洗脱。检测模式采用蒸发光散射，但应用电雾式检测和电喷雾电离MS (ESI-MS)时拥有同样的潜力。

优势

- 简单的流动相组成，同时兼容ELS和MS检测
- ACQUITY UPLC Premier CSH苯己基柱技术使可电离的阳离子脂质DLin-MC3-DMA获得尖锐的窄峰
- 低疏水性苯己基键合相促进了疏水性极强的分析物的洗脱，例如DSPC（二硬脂酰磷脂酰胆碱）

简介

由于药品包封小分子干扰RNA (siRNA)和新型mRNA疫苗的有效性得到证实，而疫苗成功取决于安全高效的递送载体的可用性，因此，有关脂质纳米颗粒的研究和药理学试验呈爆炸式增长。用于颗粒形成的脂质可赋予包装RNA更高的生物利用度，使制剂药的整体结构保持稳定。脂质纳米颗粒制剂优化的典型例证即Patisiran (ONPATTRO)的开发，它是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的第一种siRNA药物，于2018年获批。在该制剂开发过程中获得的知识必定对快速开发COVID-19 mRNA疫苗有所帮助¹。

随着脂质纳米颗粒技术在药物递送中的应用越来越多，因此亟需一种快速、耐用的色谱分析方法来测定制剂中脂质的相对含量。本应用纪要展示了在脂质纳米颗粒成分分析中，带正电表面电位修饰的低疏水性固定相作为一个非常有用的起点所发挥的优势。开发反相分离方法时的一个常见挑战是实现所需的保留水平，难保留的极性小分子酸通常面临这一挑战。不过，疏水性极强的化合物（例如脂质）也可能存在这一挑战，即可能难以获得足够高的洗脱强度来洗脱分析物。为此，我们评价了六种不同的反相固定相在分离Patisiran脂质纳米颗粒所含化合物方面的适用性。本研究的分析目标是在6 min梯度内分离四个脂质峰，使Patisiran药品中使用的各种脂质（图1）获得对称窄峰。本研究采用蒸发光散射作为检测模式，但使用挥发性流动相，在应用电雾式检测和电喷雾电离MS (ESI-MS)方面拥有同样的潜力。

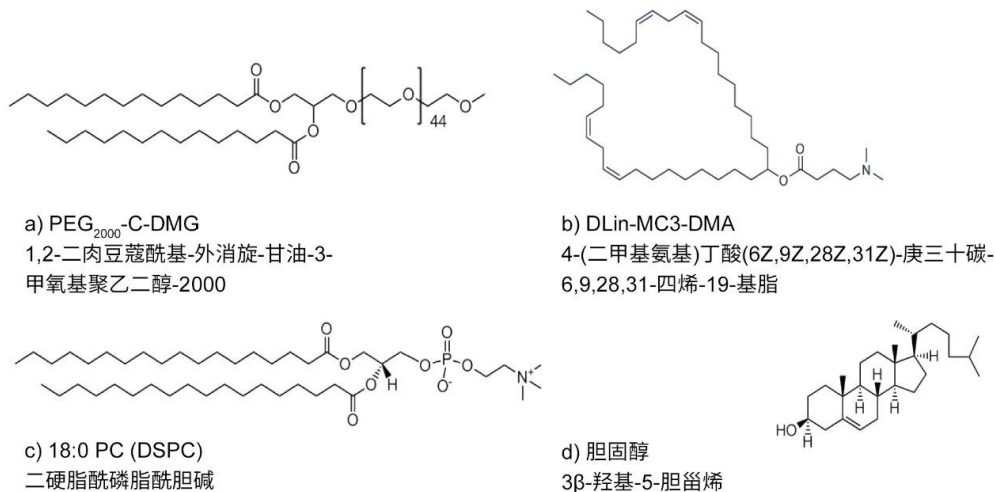


图1.四种脂质纳米颗粒成分的化学结构

实验

保留因子检测条件

使用小分子标记物茚测定保留因子，以确定色谱柱的相对疏水性。所用流动相为乙腈和水70/30 (v/v)，流速为300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。样品浓度为硫脲10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (V_0)、茚200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

数据管理：	Empower 3 FR4色谱数据软件
液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class
检测器：	ACQUITY UPLC光电二极管阵列检测器
波长：	254 nm
柱温：	30 °C
样品温度：	24 °C
进样体积：	1.5 μL
流速：	0.3 mL/min

脂质分析检测条件

利用以下实验条件分析ONPATTRO处方说明书中提及的四种脂质（图1）。

注：ACQUITY UPLC蒸发光散射检测器未采用高性能表面，外板标识蓝色。该检测器中的组件可能会影响金属敏感分析物的回收率，因此分析人员可能需要考虑方法条件和样品钝化，以减少损失和峰拖尾。

数据管理：	Empower 3 FR4色谱数据软件
液相色谱系统：	ACQUITY Premier四元系统

检测器:	ACQUITY UPLC蒸发光散射
气体压力:	40.0 psi
喷雾器模式:	加热
功率级:	70%
漂移管温度:	48 °C
柱温:	50 °C
样品温度:	24 °C
进样体积:	3 μ L
流速:	0.4 mL/min

最初采用0.1%甲酸的乙腈溶液执行线性梯度，以评价哪种固定相为进一步方法优化提供了合适起点。梯度1：在6 min内从输送60%流动相B增加至输送100%流动相B；使用0.1%甲酸的100%水溶液作为流动相A (MP A)，使用0.1%甲酸的100%乙腈溶液作为流动相B (MP B)。100%流动相B恒定保持2 min，以洗脱在6 min梯度窗口内未洗脱的脂质。总运行时间为12 min。梯度2使用的流动相为：向MP A和MP B中加入恒定量的异丙醇，替换10%的乙腈。流动相A为含0.1%甲酸(v/v)的异丙醇:乙腈:18 M Ω 水(10/50/40) (v/v/v)溶液。流动相B为含0.1%甲酸(v/v)的异丙醇:乙腈:18 M Ω 水(10/80/10) (v/v/v)溶液。梯度2在6 min内从输送100%流动相A增加至输送100%流动相B，100%流动相B保持2 min。

梯度表 - 1

时间	mL/min	A	B	曲线
初始	0.4	40	60	*
6.00	0.4	0	100	6
8.00	0.4	0	100	6
8.50	0.4	40	60	6
运行时间 = 12 min				

梯度表 - 2

时间	mL/min	A	B	曲线
初始	0.4	100	0	*
6.00	0.4	0	100	6
8.00	0.4	0	100	6
8.50	0.4	100	0	6
运行时间 = 12 min				

Patisiran制剂中使用的脂质纳米颗粒由四种主要成分制得：中性磷脂、胆固醇、聚乙二醇(PEG)化脂质和可电离的阳离子脂质。可电离脂质DLin-MC3-DMA对于颗粒形成以及siRNA的络合和释放起重要作用。PEG₂₀₀₀-C-DMG有助于LNP在循环中的稳定性，获得理想循环时间，促进Patisiran被肝脏吸收。DSPC和胆固醇赋予LNP理化稳定性²。四种脂质的结构如图1所示。

脂质标准品从多家供应商购得：DSPC（二硬脂酰磷脂酰胆碱）购自Sigma (PN 1138)、DLin-MC3-DMA（阳离子脂质）4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-庚三十碳-6,9,28,31-四烯-19-基脂购自Ambeed (Arlington Hts, IL 60004, USA)、PEG₂₀₀₀-C-DMG（1,2-二肉豆蔻酰基-外消旋-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000）购自Avanti Polar Lipids、USP胆固醇标准品购自Sigma (PN 8667)。标准品储存于-80 °C。

用100%甲醇制备1 mg/mL单标储备液，储存于-20 °C。为制备稀释液，在用乙腈稀释之前将储备液升温至室温。制备四种脂质的混合物，PEG₂₀₀₀-C-DMG、DLin-MC3-DMA、胆固醇和DSPC的最终浓度分别为300 µg/mL、100 µg/mL、50 µg/mL和50 µg/mL。使用0.1%甲酸的100%乙腈溶液将样品定容至刻度。利用该样品中的浓度进行方法开发，并作为代表LNP RNA解离药品的样品浓度起点。阳离子脂质、DLin-MC3-DMA和胆固醇的用量不到Patisiran制剂中用量的一半，DSPC几乎等量。由于PEG₂₀₀₀-C-DMG在所选色谱条件下呈现为较宽的峰，因此使

用10倍浓度以确保其得到鉴定。

结果与讨论

本研究评价了六种不同反相固定相的分离度、选择性和保留性，这些固定相具有各种类型的键合相和表面电位，包括ACQUITY Premier CSH C₁₈ (CSH C₁₈)色谱柱、ACQUITY UPLC Premier BEH C₁₈ (BEH C₁₈)色谱柱、Atlantis Premier BEH C₁₈ AX (BEH C₁₈ AX)色谱柱、ACQUITY UPLC BEH C₈ (BEH C₈)色谱柱、ACQUITY Premier CSH苯己基 (CSH苯己基) 色谱柱和ACQUITY UPLC BEH苯基 (BEH苯基) 色谱柱。所有固定相的色谱柱配置均为2.1 × 50 mm，1.7 μm颗粒；CSH C₁₈色谱柱和CSH苯己基柱采用MaxPeak高性能表面(HPS)硬件评价，BEH苯基柱和BEH C₈色谱柱采用ACQUITY不锈钢硬件评价。之前的评价结果表明，在疏水性较强的C₁₈固定相上，溶血甘油磷酸胆碱往往以峰形不佳的宽峰洗脱。磷脂在苯基固定相上的保留性最低³。较低的脂质保留性可减少脂质在色谱柱入口处积聚而导致色谱柱性能下降的问题。

在使用脂质分析物评价色谱柱性能之前，先用小分子标记物范评价色谱柱以确定相对疏水性，如表1所示。ACQUITY Premier CSH C₁₈ 1.7 μm、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm和Atlantis Premier BEH C₁₈ AX 1.7 μm三种色谱柱使范的保留因子达到3.0或更高。其余三种色谱柱ACQUITY Premier CSH苯己基柱1.7 μm、ACQUITY UPLC BEH苯基柱1.7 μm和ACQUITY BEH C₈ 1.7 μm对范的保留因子较低，约为1.5。

色谱柱	保留因子
Atlantis Premier BEH C ₁₈ AX色谱柱	4.66
ACQUITY Premier CSH C ₁₈ 色谱柱	3.17
ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 色谱柱	3.02
ACQUITY Premier CSH苯己基柱	1.59
ACQUITY BEH C ₈ 色谱柱	1.61
ACQUITY UPLC BEH苯基柱	1.40

表1.使用乙腈/水(70/30, v/v)时范的保留因子

蒸发光散射检测方法可用于等度或梯度模式，使用各种流动相和添加剂。推荐的流动相通常与质谱(MS)兼容，为将分析转移至MS检测提供了一个合理的起点。梯度1仅使用含0.1%甲酸的乙腈梯度，对CSH C₁₈和BEH C₈色谱柱进行初步筛选。这两种色谱柱均使DSPC峰在梯度的最后2 min保持段洗脱，表明梯度对于化合物几乎没有作用。

此外，这两种色谱柱得到的峰面积均显著下降，如图2中的BEH C₈色谱柱所示，表明0.1%甲酸的乙腈/水溶液流动相的强度可能不足以从这两种固定相中洗脱磷脂（峰1）。对于这两种固定相，未完全洗脱的样品可能积聚在色谱柱上，导致色谱柱性能随着时间的推移而下降³。对这些固定相使用其他有机溶剂（例如异丙醇和甲醇）或溶剂组合的替代流动相可能是更好的选择，可作为替代方法开发选项进行探索。例如，其他研究人员使用乙腈/甲醇(60/40, v/v)的等度方法洗脱胆固醇⁴。但是，基于该初步结果，未进一步评价BEH C₁₈和BEH C₁₈ AX色谱柱，因为我们倾向于找到与较简单的流动相组成相匹配的保留性。

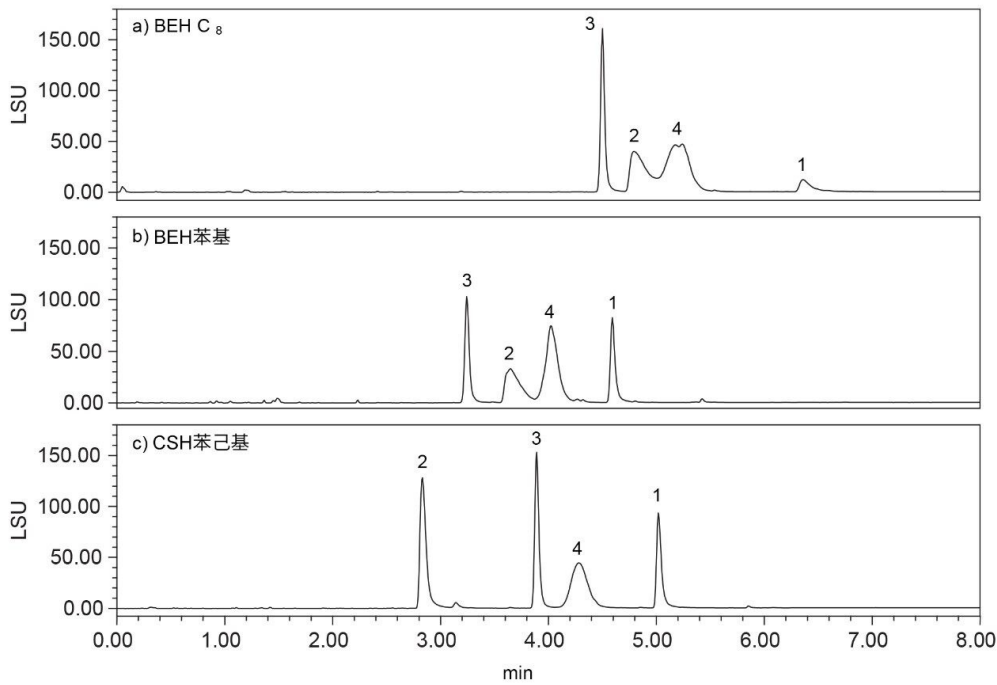


图2.使用6 min梯度（40%流动相A和60%流动相B，流动相B随后增加至100%，并在最终条件下保持2 min，流动相A为0.1%甲酸的100%水溶液，流动相B为0.1%甲酸的100%乙腈溶液）比较三种固定相。峰鉴定结果为：1.)DSPC，2.)DLin-MC3-DMA，3.)胆固醇，4.)PEG2000-C-DMG。

由于本研究的目标之一是提供快速分析，因此延长采用100%有机溶剂时的运行时间并不可取。使用该流动相体系时，CSH苯基和BEH苯基柱获得的色谱分离结果更为出色，如图2所示。胆固醇（峰3）和DSPC（峰1）均获得窄峰。性能差异体现为，采用CSH苯基柱时DLin-MC3-DMA（峰2）的峰宽更窄且峰形更对称。

虽然两种固定相均使用与BEH颗粒键合的苯基硅烷制得，但CSH苯基固定相还使用了在酸性流动相中可重现

的低水平正表面电荷⁵。此修饰已证明可以改善阳离子分析物（例如DLin-MC3-DMA， pK_a 为6.44）的峰锐度和对称性。梯度1和梯度2所用的低离子强度酸性流动相会使质子化DLin-MC3-DMA与质子化固定相表面发生离子排斥。采用CSH苯己基柱时，在13.4%峰高处测得的DLin-MC3-DMA峰宽为6.4 s；采用BEH苯基柱时（该色谱柱填充的固定相无表面电荷修饰），测得的峰宽为16.6 s。本研究仍然选择搭载在ACQUITY Premier色谱柱上的CSH苯己基固定相，这款色谱柱由具有有机-无机杂化表面的硬件制成。这些表面有助于减少色谱柱老化需求，从而帮助分析人员即使在首次使用，甚至处理潜在的金属螯合化合物（例如含有磷酸酯基团的DSPC脂质）时，也能获得更对称的峰。

另一种脂质成分值得探讨，即聚乙二醇化脂质。该物质通常被分离为一个相对较宽的峰。例如，采用上述两种苯基柱时，PEG₂₀₀₀-C-DMG在13.4%峰高处的峰宽约为胆固醇峰宽的4倍。聚乙二醇化脂质在CSH苯己基柱上分离得到的峰宽为17.5 s，而胆固醇在同一色谱柱上分离得到的峰宽为4.5 s。宽峰是PEG₂₀₀₀-C-DMG固有特点，不能归因于柱效。

结论

脂质在脂质纳米颗粒中的应用已被证明对siRNA和mRNA疫苗的递送均有效，因此引起大量关注。这两种类型包封药品中所用脂质的成分对于药品的结构-功能特性至关重要，因此，在制剂开发或质量控制测试中，必须对脂质纳米颗粒中所含脂质进行可靠的定量分析。此类分析的可靠性源于色谱方面的考虑因素。

上述结果证明了表面带电的低疏水性固定相（即CSH苯己基固定相）的优势，采用此类固定相的色谱柱是开发脂质纳米颗粒成分分析方法的有效起点。低疏水性苯己基固定相有助于完全洗脱疏水性极强的分析物，例如DSPC（二硬脂酰磷脂酰胆碱）。疏水性较高的C₁₈固定相在梯度或高有机相保持时间内无法完全洗脱DSPC。CSH苯己基固定相的CSH技术还具有额外优势，即能够使可电离的阳离子脂质DLin-MC3-DMA获得尖锐的窄峰。最后，使用同时适合ELS和MS检测的简单流动相组成，所用方法只需6 min即可分离Patisiran制剂的4种脂质。

参考资料

1. Let's Talk About Lipid Nanoparticles. *Nature Reviews | Materials* 2021.
2. Zhang, X., Goel, V., Robbie, G.J., Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin - Mediated Amyloidosis. *The Journal of Clinical*

Pharmacology 2020, 60 (5), 573–585.

3. Neville, D.; Houghton, R.; Garrett, S., Efficacy of Plasma Phospholipid Removal During Sample Preparation and Subsequent Retention Under Typical UHPLC Conditions. *Bioanalysis* 2012, 4 (7), 795–807.
4. Kolarič, L.; Šimko, P., Determination of Cholesterol Content in Butter by HPLC: Up-to-Date Optimization, and In-House Validation Using Reference Materials. *Foods* 2020, 9 (10), 1378.
5. Iraneta P.C., W. K. D., McCabe D.R., Walter T.H., Hybrid Particle Technology Part Three: Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography. Waters White Paper, 720003929EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003929en.pdf>> , 2011.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC ELS检测器 <<https://www.waters.com/514219>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007331ZH, 2021年8月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号