

改进脂质纳米颗粒成分检测的ELSD优化工作流程

Kellen DeLaney, Duanduan Han, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

近年来，基于基因和核酸的治疗方法受到了广泛关注。为了使这些疗法达到预期的目标，需要一种合适的递送载体来保持稳定性和生物利用度。脂质纳米颗粒(LNP)已被证实是一种高效的递送载体。仔细分析LNP相关物质种类对确保其在开发和生产过程中的安全性和有效性至关重要。在这些工作流程中，蒸发光散射(ELS)是一种有效的“通用”检测技术。优化检测器响应以提高以检测限(LOD)表示的灵敏度，可提高LNP及其相关杂质分析的可信度。本研究展示了利用ELSD的LNP工作流程的系统优化，包括优化样品复溶溶剂和ELS检测的参数。最终优化的方法在不增加分析时间和样品消耗量的条件下，将四个脂质成分检测的信噪比平均提高了五倍。这些结果显示，花时间仔细优化工作流程可显著改善LNP的分析。

优势

- 易用的ACQUITY™ ELSD可在常规检测工作流程中检测脂质纳米颗粒成分
- 系统优化检测参数可以提高脂质分析的灵敏度
- 对流动相成分进行简单的修改可提高多分散化合物的分离度和检测能力，而不牺牲分析通量

简介

由于新型冠状病毒(COVID-19)在全球肆虐，mRNA疫苗和其他基因和核酸治疗方法越来越受到人们的关注。为了确保mRNA到细胞的靶向传递，需要使用递送载体进行包装，以确保mRNA的稳定性和生物利用度。LNP已被开发为高效的mRNA递送载体，使对抗新型冠状病毒(COVID-19)的疫苗成功研发出来¹。这些脂质外壳由四种脂质构成。起主要作用的是可电离脂质，它与带负电荷的mRNA结合并稳定LNP²。这种可电离脂质约占LNP成分的50%。另外三种脂质包括为脂质外壳提供流动性的胆固醇(CHO)、作为辅助脂质的磷脂（例如二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)）以及产生亲水微胶粒外表面的聚乙二醇脂质(PEG)²。这三种脂质确切的百分比取决于治疗方法，通常被视为知识产权。确保不同脂质成分以正确的比例制备LNP，以及评估用于制备LNP的原料的纯度和质量，是确保LNP作为递送载体的安全性和有效性的关键步骤。

有几个平台可用于从开发到生产的LNP分析工作流程。对于上游工作流程，例如发现和表征，通常采用液相色谱(LC)和质谱联用。对于下游流程，包括检测和生产工作流程，使用紫外(UV)或荧光检测等光学方法和LC分离。以上检测方法需要分析物分子中包含发色团，然而，并非所有脂质中都包含发色团。另外，蒸发光散射检测(ELSD)，通常称为“通用”检测技术，可检测非挥发性和半挥发性化合物，使其成为下游工作流程中脂质纳米颗粒分析的合理选择。ACQUITY ELS检测器包含优化的漂移管、喷雾器和气体流量，以尽可能减少扩散，得到理想的UPLC™系统性能。此外，该检测器体积小，易于集成到现有的UPLC系统配置中（包括带光学检测的系统配置）。

ELS检测的一般机制如图1的示意图所示。样品从色谱柱中洗脱出并进入检测器后，与氮气载气混合并被雾化成液滴气溶胶。较大的液滴落到雾化室的外壁上，并被转移到废液，而较小的液滴由氮气携带到漂移管中。在漂移管中，挥发性流动相被蒸发产生粒子，然后粒子通过一段光路。然后根据散射的光量来检测粒子，这与化合物的含量有关。谨慎优化影响这一过程的每个参数至关重要，因为它会影响液滴颗粒的形成，并影响最终的检测结果。在本研究中，我们系统地评估和优化了ELSD参数，用于在常规检测工作流程中分析LNP组分。

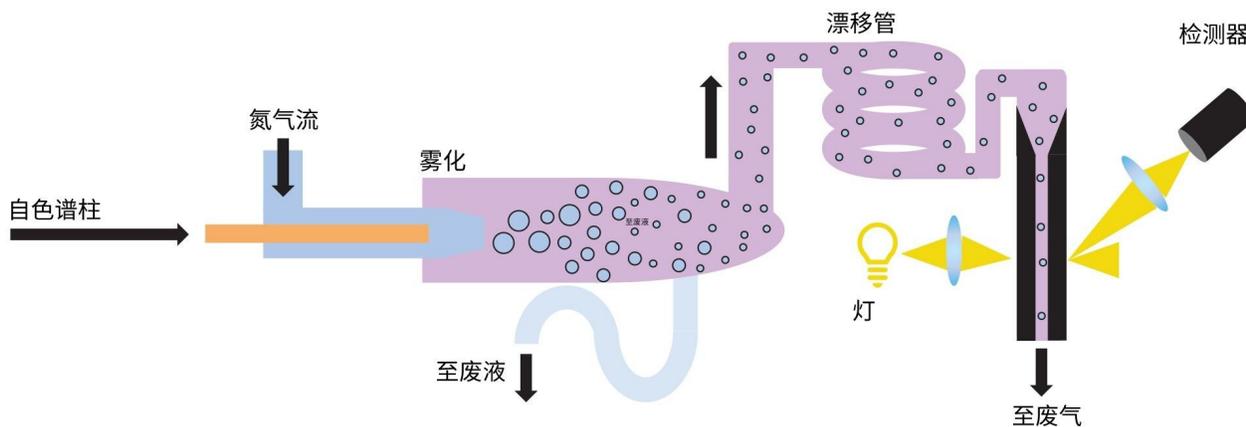


图1.ELSD检测机制概览

实验

本研究中的所有脂质均仅用于研究和演示目的，从以下供应商购买：胆固醇和DSPC购自Sigma-Aldrich；DMG-PEG 2000购自Avanti Lipid；SM-102购自BroadPharm。

样品描述

每种脂质储备液均使用甲醇制备，浓度为1 mg/mL。使用90/10的甲醇/水(v/v)稀释样品至合适的浓度。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY四元溶剂管理器系统
检测条件：	ACQUITY UPLC蒸发光散射
气流压力：	20.0 psi
喷雾器模式：	加热

功率级:	80%
漂移管温度:	48 °C
样品瓶:	TruView™最大回收样品瓶(P/N: 186005662CV)
样品瓶盖:	聚乙烯无隔膜螺旋盖(P/N: 186004169)
色谱柱:	ACQUITY Premier CSH™苯己基柱, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm (P/N: 186009474)
柱温:	50 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	3 μL
流速:	0.400 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸水溶液(v/v) (LCMS级)
流动相B:	0.1%甲酸/25%异丙醇/75%乙腈(v/v/v) (LCMS级)

数据管理

色谱软件:	Empower™ 3, FR5
-------	-----------------

结果与讨论

在LNP的工作流程中，对原材料中杂质的灵敏分析和成分比的准确定量是确保生成的LNP递送载体的安全性和有效性的关键。在方法开发阶段，仔细注意每个参数的影响，并根据具体分析的需要调整工作流程很重要，以确保分析的理想执行。在本研究中，我们讨论了各种参数对LNP组分的ELS检测结果的影响。

样品前处理

在制备使用任何仪器进行分析的脂质样品时，应考虑用于进样的样品复溶溶剂的成分。为了尽可能检出每种脂质，系统地测试了含40-100%甲醇的不同溶剂成分。所得的每个组分的峰面积被绘制成甲醇成分的函数，如图2所示。每种组分在不同溶剂成分下的响应值不同，但一般来说，甲醇成分越高，分析物响应值越大，平均90%的甲醇产生的响应值最大。这一发现与先前发布的数据³一致，并与预期一致，鉴于评估的脂质结构，除胆固醇外，均由一个极性头部基团和两个疏水尾部组成，因此主要具有疏水性。因此，本研究采用90/10的甲醇/水作为样品溶剂，用于所有脂质样品的进样。

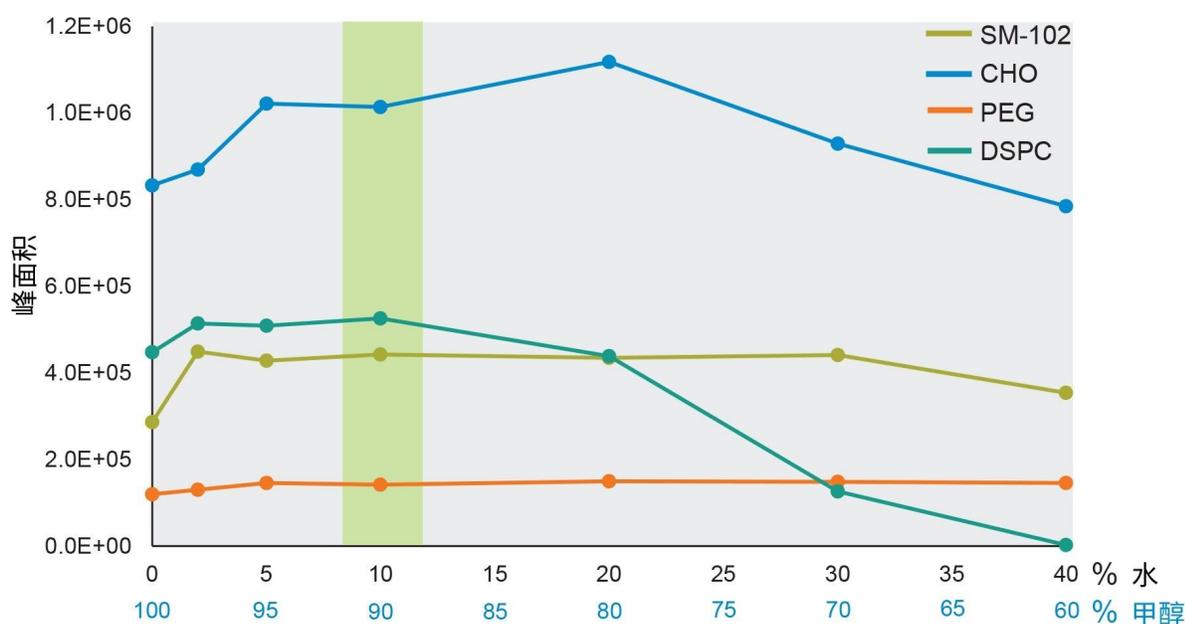


图2.样品溶剂成分对每种脂质纳米颗粒组分的峰面积的影响。每一条线表示不同的脂质组分，包括可电离脂质(SM-102)、胆固醇(CHO)、聚乙二醇化脂质DMG-PEG 2000 (PEG)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

LC分离

为了保证准确定量脂质纳米颗粒组分，优选在低浓度水平下充分分离并能可靠地检测的峰。优化LC分离的第一步

是使用一组适合的色谱柱对分析物混合物进行色谱柱筛选，以根据应用需求确定哪种形式和固定相具有理想性能。这一步在之前的沃特世应用纪要中已经讨论过，其中ACQUITY Premier CSH苯己基柱被证明能更好地分离四种脂质纳米颗粒组分⁴。

基于之前的研究结果，对色谱柱柱长和分离时间相对于理论塔板数和梯度进行了评估，作为进一步提高峰间（尤其是CHO和PEG峰间）分离度的手段。为了评估这些方面，测试了50 mm和100 mm两种色谱柱柱长。在每根色谱柱上以三种不同的梯度运行LNP混合物，包括6 min（最陡）、10 min和12 min（最缓）梯度。图3显示了每个分离得到的色谱图。正如预期的那样，峰到峰的分度随着梯度变缓而增加，如从左到右所示。比较图3中的上面一行和下面一行可以看出，随着色谱柱柱长的增加，峰到峰的分度也会增加，但6 min梯度例外，因为没有足够的时间让化合物从100 mm色谱柱中洗脱。在这两种情况下，可以观察到PEG峰的峰展宽增加，如图3的插图所示，可能是由于样品的非均质性和纵向扩散增加。这种峰展宽会导致PEG变得更加难以检测，并降低了分析的总体灵敏度。

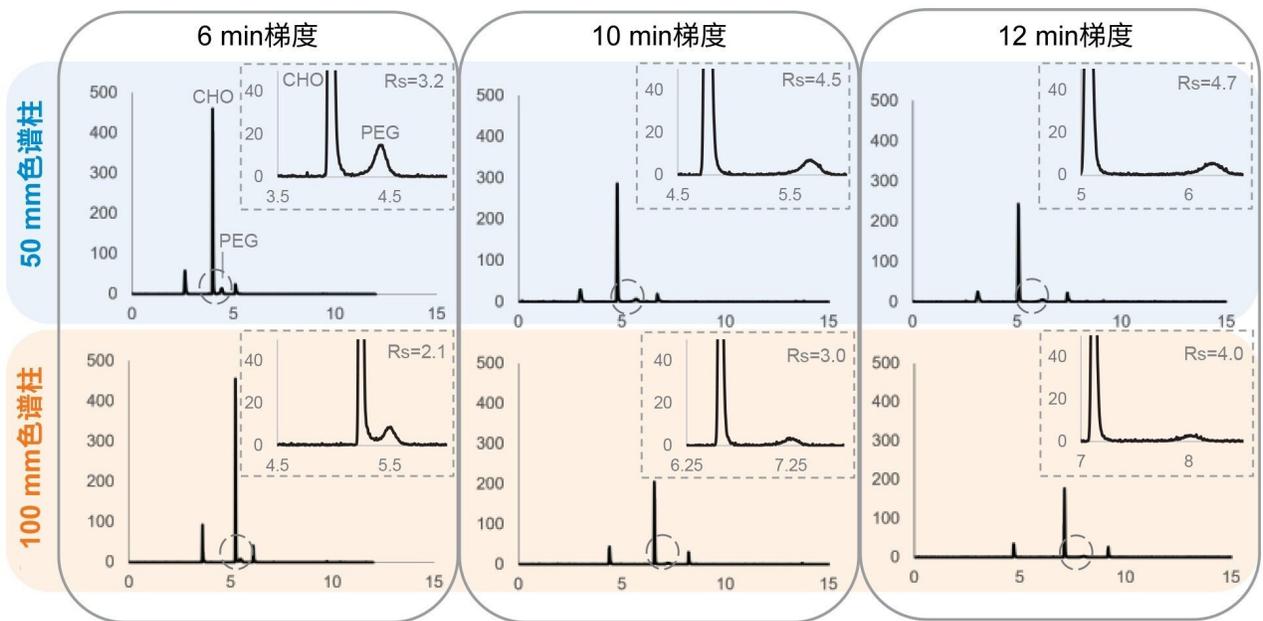


图3.分离长度对色谱分离度的影响，包括三种不同的梯度长度（从左到右分别为6 min、10 min和12 min）和两种不同的色谱柱柱长（上面为50 mm，下面为100 mm）。插图显示，由于保留时间的增加，对聚乙二醇化脂质的峰展宽效应。

为了在不影响PEG检测的情况下提高峰分离度，根据洗脱强度评估流动相组成，以改善传质和整体峰形。以往的

研究表明，异丙醇(IPA)可以增加流动相的洗脱强度，从而改善反相技术中脂质的分离⁵。在本研究中，评估了向流动相B（0.1%甲酸的乙腈溶液）中加入IPA至50% (v/v)的影响。如图4所示，流动相B中IPA的含量增加到25% (v/v)可以改善PEG的峰形，从而提高CHO和PEG之间的分离度。IPA的含量为50%时，当使用相同的梯度时，增加的洗脱强度使CHO和PEG再次共洗脱。为此，在如图所示的6 min梯度中，流动相B中IPA浓度为10%~25%时可获得最高的峰间分离度。

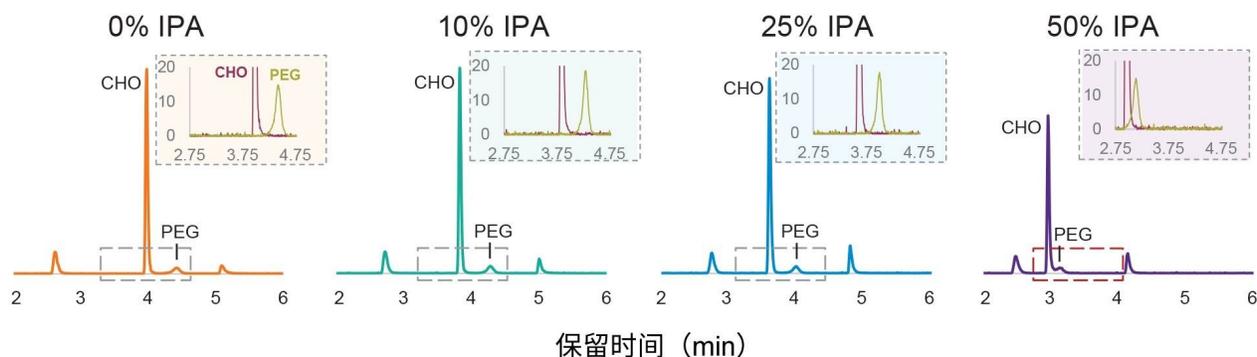


图4.流动相B中异丙醇(IPA)体积百分比的增加对四种脂质纳米颗粒组分色谱分离的影响。插图显示了对胆固醇和PEG分离度的影响。

ELSD参数

影响气溶胶和颗粒形成的三个主要ELSD参数是漂移管温度、喷雾器功率和整个仪器中的气体流速。通常建议针对每个应用优化这些参数，因为它们会随着流动相、流速和样品稳定性而变化。

漂移管是喷雾器中形成的液滴产生颗粒的地方。图5为漂移管温度对胆固醇峰响应的影响。漂移管温度为48 °C时，各个峰强度最高。为了确保信号增加不会同时导致基线噪音增加，还计算了每个峰的信噪比(S/N)。其趋势与峰强度相似，降低漂移管温度(48 °C)提高了每个峰的S/N。然而，将温度降低到48 °C以下可能会导致信号丢失，这表明流动相无法从分析物化合物中蒸发。

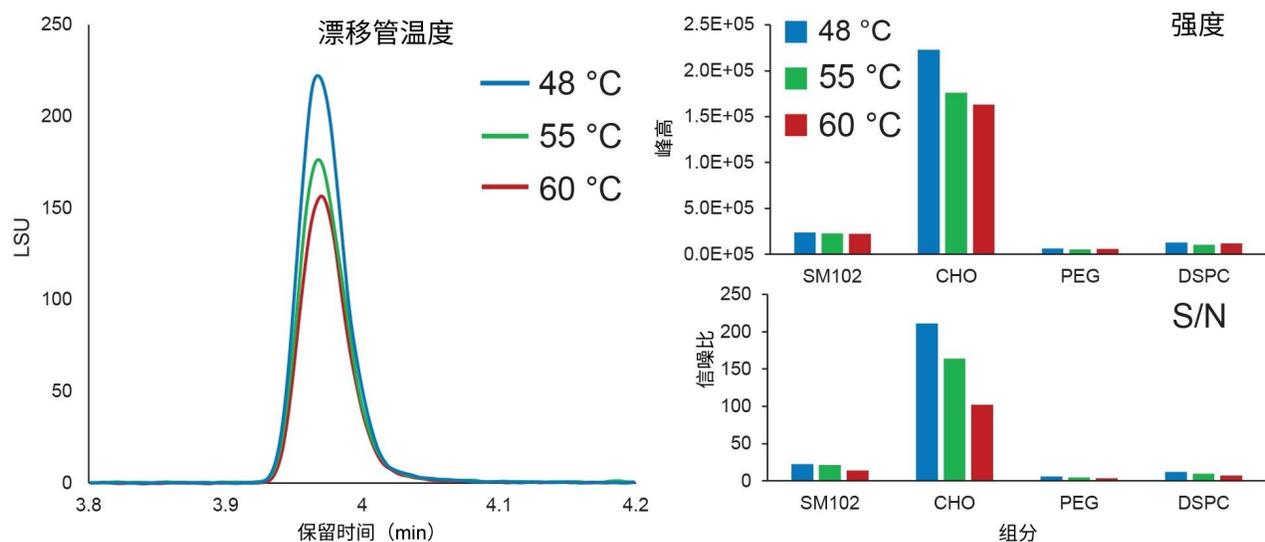


图5.漂移管温度对分析物响应的影响，包括胆固醇色谱图的叠加图（左），以及每个组分峰强度（上）和信噪比(S/N)（下）的数值，包括可电离脂质(SM-102)、胆固醇(CHO)、聚乙二醇化脂质DMG-PEG 2000 (PEG)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

喷雾器功率设置为相对于漂移管温度的百分比。例如，如果漂移管温度设置为48 °C，喷雾器功率100%表示48 °C，而80%表示42 °C等。在雾化过程中，因为流动相与载气混合，可以通过加热或冷却影响气溶胶的产生。图6显示了喷雾器功率对产生的峰信号的影响，包括冷却模式和加热模式下的5个不同功率等级。随着喷雾器功率的增加，每个组分的峰强度和S/N都增加了。这一趋势也可以在图6的色谱图中看到。在本研究中，发现当喷雾器功率为80%时，其S/N最高，而功率设置大于80%对S/N的影响可以忽略不计。

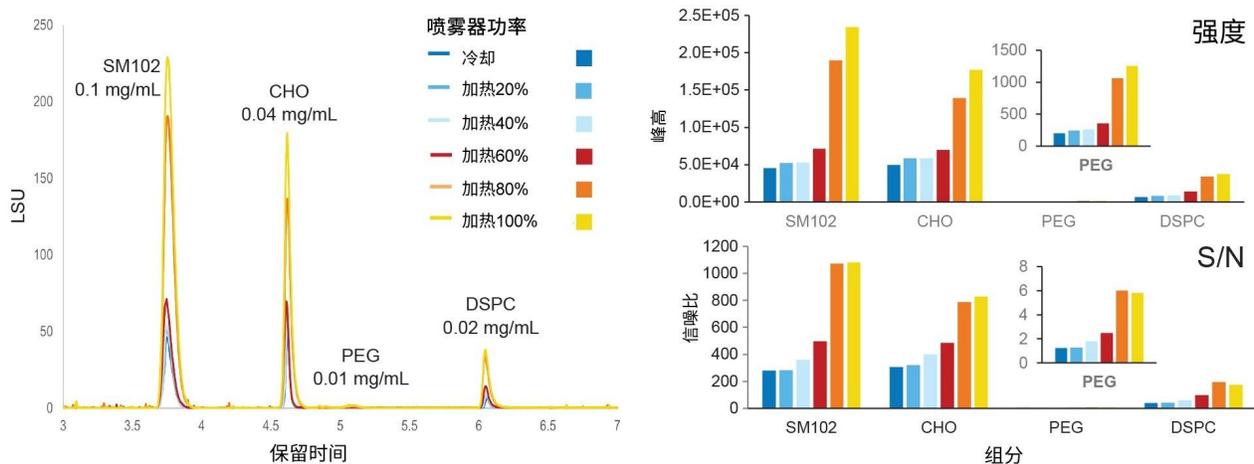


图6.喷雾器功率对分析物响应的影响，包括色谱图的叠加图（左），以及每个组分峰强度（上）和信噪比(S/N)（下）的数值，包括可电离脂质(SM-102)、胆固醇(CHO)、聚乙二醇化脂质DMG-PEG 2000 (PEG)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

载气既负责在ELSD的入口雾化液滴，又负责让颗粒通过漂移管并将其送入检测器。气体压力可以设置为20~60 psi之间，相当于大约1.5 L/min~3.5 L/min的气体流量。测试了整个范围内的气体压力，结果如图7所示。气体压力较低时每个峰的强度和S/N更高，这也可以在所示的色谱图中看到。这些结果表明，较低的气体压力可以改善脂质纳米颗粒组分的检测。

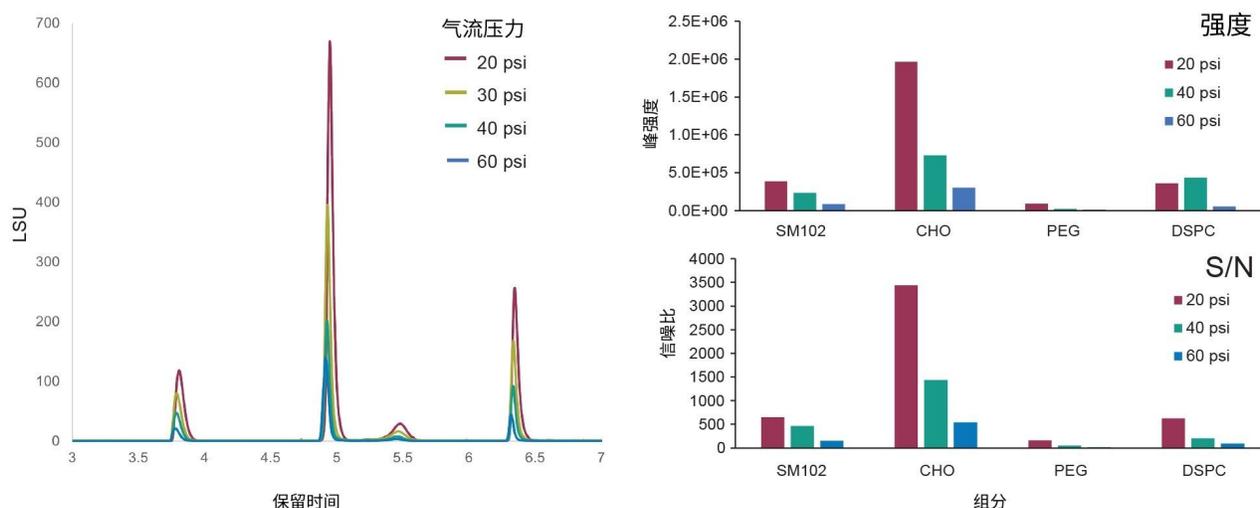


图7.载气压力对分析物响应的影响，包括色谱图的叠加图（左），以及每个组分峰强度（上）和信噪比(S/N)（下）的数值，包括可电离脂质(SM-102)、胆固醇(CHO)、聚乙二醇化脂质DMG-PEG 2000 (PEG)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。

与检测器相关的其他几个参数经常被忽略，包括增益、采样速率和时间常数。增加检测器的增益会增加峰信号和S/N（未显示数据）。然而，应考虑每个检测器的饱和上限。虽然增加检测器的增益可以降低检测限，但它不会提高单个组分的动态范围，应该根据分析的样品量进行调整。根据其他研究，步进增益设置还可以用于根据保留时间调整不同响应的分析物的增益⁶。采样速率和时间常数分别是指每秒采集的数据点数和应用于数据的高频噪音滤波器。这些参数设置不适当会导致峰畸变和灵敏度损失。因此，建议在优化方法时也考虑这些设置。

与光学检测相比，在处理ELSD数据时需要考虑的一个重要问题是，产生的检测器响应依赖于气溶胶的产生，导致含量和峰面积之间呈非线性关系，这可以用幂函数($A = aM^b$)来模拟，其中A=峰面积，M=浓度，a和b为常数。然而，在绘制校准曲线时通过对方程两边进行对数变换($\log A = b \log M + \log a$)可以实现线性关系⁷。

为了说明系统优化方法的优势，图8显示了优化前的一般ELSD方法和最终优化方法间的并排比较。从色谱图可以看出，采用优化的ELSD参数和LC流动相时，峰更容易被检测到。峰强度提高了13倍，S/N提高了9倍，表明LNP组分的检测得到改进。图8中的表列出了用于LNP分析的最终优化参数。

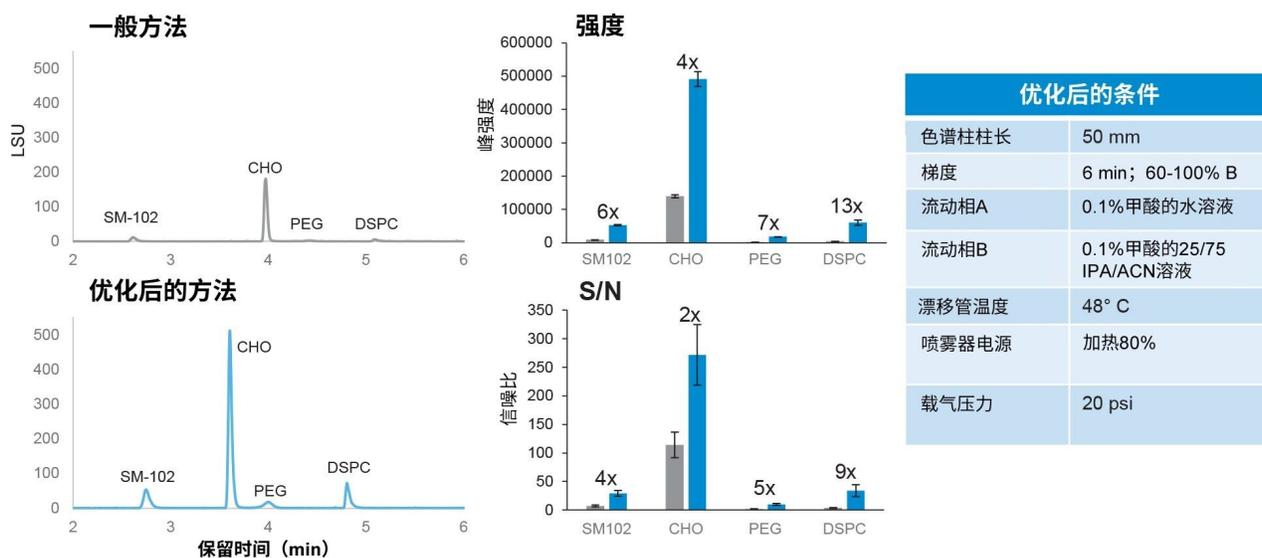


图8.总结通过优化工作流程参数所获得的改进，包括展示检测改进的色谱图（左），以及每个组分峰强度（上）和信噪比(S/N)（下）的数值，包括可电离脂质(SM-102)、胆固醇(CHO)、聚乙二醇化脂质DMG-PEG 2000 (PEG)和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)。每个集合旁边的数字表示用优化方法增加的倍数。最终优化条件如右表所示。

结论

在整个开发和制造过程中仔细分析LNP相关物质种类对确保其作为治疗递送载体的有效性至关重要。花时间系统地优化整个分析工作流程的条件可以大大提高分析性能。本研究探讨了各个参数对ELSD灵敏分析的影响，包括样品复溶溶剂和合适的检测器设置。分析物响应的改进表明了针对每种应用的优化方法的优势。本研究中描述的设置和条件可用于在各种分析工作流程中改善通过ELSD进行的LNP分析。

参考资料

1. Schoenmaker L, Witzigmann D, Kulkarni JA, Verbeke R, Kersten G, Jiskoot W, Crommelin DJA. mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *Int J Pharm.* 2021 Apr;601:120586.

2. Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, Paige M, Alameh MG, Weissman D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines*. 2021 Jan;9(1):65.
3. Karola VU, Dominik J, Gabriele L, Rainer H, Andreas W, Dietmar K. Impact of Alcoholic Solvents on the Recovery of Phospholipids in HPLC Analysis. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2011 Feb;34(3):217-230.
4. Alden BA, Isaac G, Chen W, Lauber MA. 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. 沃特世应用纪要. 720007331ZH, 2021年8月.
5. Xia YQ, Jemal M. Phospholipids in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Bioanalysis: Comparison of Three Tandem Mass Spectrometric Techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on Phospholipids Elution and the Association of Phospholipids with Matrix Effects. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009 Jul;23(14):2125-38.
6. Jeschek D, Lhota G, Wallner J, Vorauer-Uhl K. A Versatile, Quantitative Analytical Method for Pharmaceutical Relevant Lipids in Drug Delivery Systems. *J Pharm Biomed Anal*. 2016 Feb;119:37-44.
7. Vervoort N, Daemen D, Török G. Performance Evaluation of Evaporative Light Scattering Detection and Charged Aerosol Detection in Reversed Phase Liquid Chromatography. *J Chrom A*. 2007 Nov;1189:92-100.

特色产品

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

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

720007740ZH, 2022年10月

© 2022 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