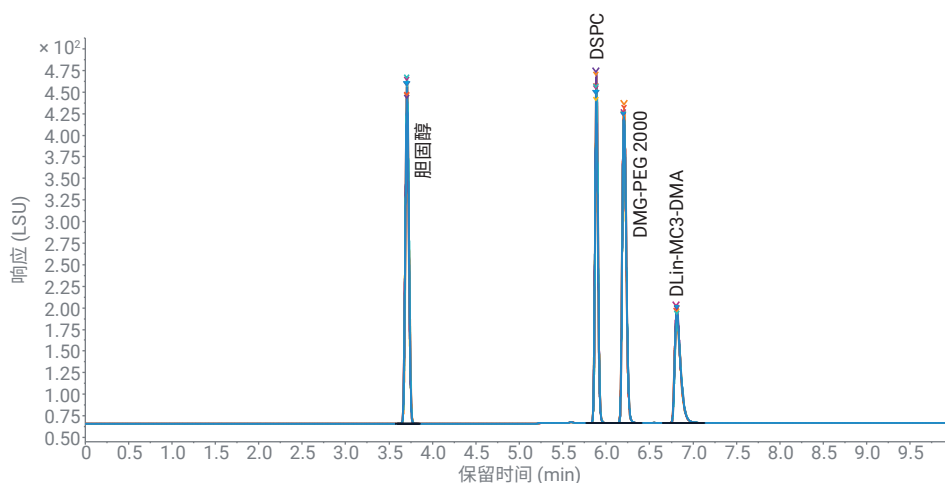


脂质纳米颗粒组成分析

结合蒸发光散射检测实现超高分离度四元液相方法开发



作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

脂质纳米颗粒 (LNPs) 已成为制药行业中颇具前景的核酸递送载体。为了确保最终药品的安全性和有效性，需要对脂质成分、比例和降解情况进行分析表征。在本应用简报中，展示了用于分析 patisaran（商品名 Onpattro）脂质成分的四元液相色谱方法开发。该方法结合了甲醇 (MeOH) 和乙腈 (ACN)，可实现四种 LNP 成分的出色分离，并具有优异的峰形、精度和灵敏度。配备 Agilent 1290 Infinity II ELSD 的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱仪能够对缺少紫外生色团的脂质成分实现通用检测。此外，Agilent 1290 Infinity II ELSD 的高动态范围还能够检测 patisaran 类似样品中的所有四种脂质。

前言

近年来，基于 RNA 的疗法和基因编辑技术前景广阔，引起了人们对 LNP 研究的兴趣。

LNPs 可作为安全有效的递送载体，尤其是脂质与寡核苷酸的组合在制药行业取得了巨大成功。LNP 系统可实现稳定的载药，并提高靶向作用位点的递送效率。在配制的药物中，寡核苷酸如小干扰 RNA (siRNA) 或信使 RNA (mRNA) 被包裹在 LNPs 中，有助于细胞通过内吞作用摄取并递送到胞质溶胶中。

LNPs 是球形囊泡，通常主要由四种成分组成 (图 1)^[1,2]：

- 胆固醇
- 一种中性磷脂 (主要是 DSPC)
- 聚乙二醇 (PEG)-脂质
- 可电离的阳离子脂质 (通常是专有的)

结构脂质 DSPC、胆固醇和 PEG-脂质的主要目的是控制粒径，提供颗粒稳定性和血液相容性，此外，提高 LNP 的血液循环寿命^[3]。PEG-脂质是 LNP 制剂中含量最低的脂质，同时也作为空间屏障防止储存期间发生聚集。可电离脂质是第二代阳离子脂质，具有 pH 依赖性。在低 pH 值下，这些脂质带正电的可电离胺基使它们能够进行相互作用 (例如，与阴离子 RNA 相互作用形成 LNP-RNA 包装复合体)。它们在血液的生理 pH 值下几乎不带电，从而尽可能降低毒性。

第一个获得 FDA 和 EMA 批准的 LNP 封装 RNA 药物是 patisiran (商品名 Onpattro)，它是 siRNA 的 LNP 制剂^[4]。它含有 DLin-MC3-DMA (作为可电离的

阳离子脂质)、DSPC、胆固醇和 DMG-PEG-2000 (参见图 2)。Onpattro 获得监管批准为许多基于纳米颗粒递送的核酸疗法的开发铺平了道路。

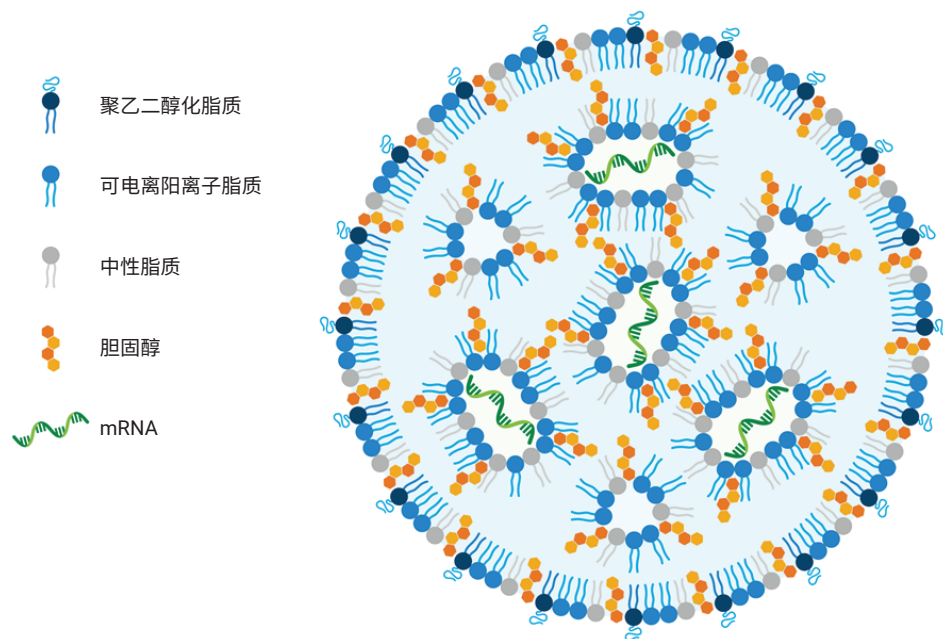


图 1. mRNA 或 siRNA-LNP 结构示意图，受 Schoenmakers 等人^[1]和 Evers 等人^[2]的启发绘制

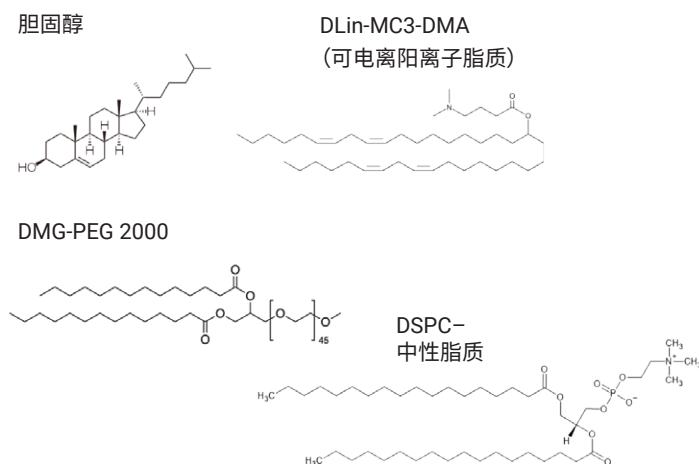


图 2. Onpattro Patisiran LNP 的主要成分

除了对 LNPs 装载的 RNA 进行分析外，还需要对脂质成分进行分析表征，以确保整个药物的安全性和有效性。在药物和配方设计过程中，需要针对成品药的体内性能和质量控制进行广泛的分析^[5]。监管法规要求包括对物理参数的测试，如 siRNA 封装或粒径，以及对各个脂质成分的检测（例如组成、特性和纯度）^[5]。

在分析之前，通常使用有机溶剂（如甲醇或异丙醇）进行稀释，破坏脂质体和 LNPs。

通常，LNP 组成或降解分析通过反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 进行^[6]。在色谱分离之后，蒸发光散射检测 (ELSD) 是用于检测脂质等缺乏紫外发色团的分子的理想检测技术。Agilent 1290 Infinity II ELSD 非常适合对脂质进行可重现且灵敏的检测^[7]。除了它的通用检测能力外，另一个巨大优势就是可以使用梯度（与示差折光检测 (RID) 相比）。

本应用简报展示了用于分析 Onpattro 的 LNP 的四种成分的 UHPLC 方法开发。四种成分（包括疏水性 DSPC、可电离脂质和聚乙二醇化脂质）的化学性质各不相同，使得通过一种固定相和流动相组合实现所有成分的对称、尖锐峰形极具挑战。使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统可实现四元泵的灵活性，并且能够轻松开发方法，以测试不同溶剂和缓冲液组合。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器 (G7116-60071)
- Agilent 1290 Infinity II ELSD (G7102A)

软件

Agilent OpenLab CDS 2.6 版或更新版本

色谱柱

InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 x 50 mm, 1.9 µm（部件号 699675-912）

化学品

Agilent InfinityLab LC/MS 级超纯甲醇 (5191-4497) 和 Agilent InfinityLab LC/MS 级超纯乙腈 (5191-4496)，用于所有 ELSD 分析。异丙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 µm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。乙酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

胆固醇和 1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0 PC 或 DSPC) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。DLin-MC3-DMA（4-(二甲基氨基)-丁酸(10Z,13Z)-1-(9Z,12Z)-9,12-十八碳二烯-1-基-10,13-十九碳二烯-1-基酯）购自 Cayman Chemical (MI, USA)。1,2-二肉豆蔻酰-rac-甘油-3-甲氧基聚乙二醇-2000 (DMG-PEG 2000) 购自 Avanti Polar Lipids (AL, USA)。

按两种不同的浓度溶解样品。为了能够完全溶解，将试管加热至 35 °C 并保持 3-4 分钟，然后再继续使用。

用于方法开发的混合样品在 1220 µL MeOH 中配制，以使所有成分的峰高和峰面积大致相似，如表 1 中所述。

模拟 Onpattro LNP 成分比例的样品成分按如下混合：将脂质溶解在 MeOH 中，浓度为 3.89 mmol/L。采用 3.89 mmol/L 等摩尔浓度各组分，以 38.5:50:1.5:10 的比例溶解胆固醇、DLin-MC3-DMA、DMG-PEG 和 DSPC。

使用此混合物，通过 1:3 连续稀释步骤配制系列稀释液，浓度范围为 972.5 µmol/L 到 0.44 µmol/L（5 µL 进样量为 4.8625 nmol 到 2.22 pmol），以用于线性分析。

表 1. 用于方法开发的样品组成

脂类	分子量 [Da]	浓度 [mmol/L]	质量 [µg]
DMG-PEG 2000	2509.20（由于 PEG 的多分散性，采用平均分子量）	0.0984	300
DLin-MC3-DMA	642.09	0.6380	500
胆固醇	386.67	0.1060	50
DSPC	790.15	0.1670	150

缓冲液配制

配制 500 mmol/L 乙酸铵（pH 约为 7，无需进一步调节 pH），并使用 0.2 μm 滤膜过滤。对于二元方法，用水将乙酸铵储备溶液稀释至 100 mmol/L，然后将 100 mL 该缓冲液与 900 mL 甲醇（通道 A）或 900 mL 乙腈（通道 B）混合。

结果与讨论

使用水 + 10 mmol/L 乙酸铵（通道 A）和 MeOH + 10 mmol/L 乙酸铵（通道 B）^[7] 的初始二元梯度设置进行成分分析（5 分钟内 B 从 82% 升至 100%，并保持 5 分钟），获得了以下结果（如图 3 所示）。所有其他参数与实验部分中描述的相同。前三个中性脂质峰显示出良好的峰形和分离度。最后一个洗脱的可电离脂质 DLin-MC3-DMA 峰宽较宽（因此比较平缓）。方法开发选项（如改变温度或梯度斜率）并未改善可电离脂质的峰形。因此，改变溶剂组合是进行干预的重点。使用水和 ACN（均含 0.1% 甲酸）代替水和 MeOH 进行进一步实验，结果并未获得良好的分离度或峰形（数据未示出）。

作为实现溶剂组合方法开发的基础，我们采用了四元 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统。在四个通道中分别提供水、ACN、MeOH 和 500 mmol/L 乙酸铵，通过从通道 D 连续输送 2% 乙酸铵以获得恒定浓度的 10 mmol/L 缓冲溶液，从而测试不同的溶剂组合。

方法

表 2. 色谱条件

参数	值				
溶剂	A: 水 B: ACN C: MeOH D: 500 mmol/L 乙酸铵				
流速	0.4 mL/min				
最终四元梯度	时间	通道 A %	通道 B %	通道 C %	通道 D %
	0 分钟	16	0	82	2
	3 分钟	8	0	90	2
	5 分钟	8	90	0	2
	停止时间: 10 分钟 后运行时间: 5 分钟				
最终四元梯度（短）	时间	通道 A %	通道 B %	通道 C %	通道 D %
	0 分钟	8	0	90	2
	3 分钟	8	90	0	2
	停止时间: 5 分钟 后运行时间: 5 分钟				
	二元梯度	时间	通道 A % 90% 甲醇, 10% H ₂ O, 10 mmol/L 乙酸铵		通道 B % 90% 乙腈, 10% H ₂ O, 10 mmol/L 乙酸铵
0 分钟		100		0	
4 分钟		0		100	
停止时间: 7 分钟 后运行时间: 5 分钟					
温度		30 °C			
ELSD 检测	蒸发器温度: 40 °C 雾化器温度: 40 °C 气体流速: 1.6 SLM 数据采集速率: 80 Hz 平滑: 10 (1.0 秒)				
进样	进样量: 2 µL 和 5 µL 样品温度: 25 °C 进样针清洗: 50% 异丙醇水溶液清洗 3 秒				

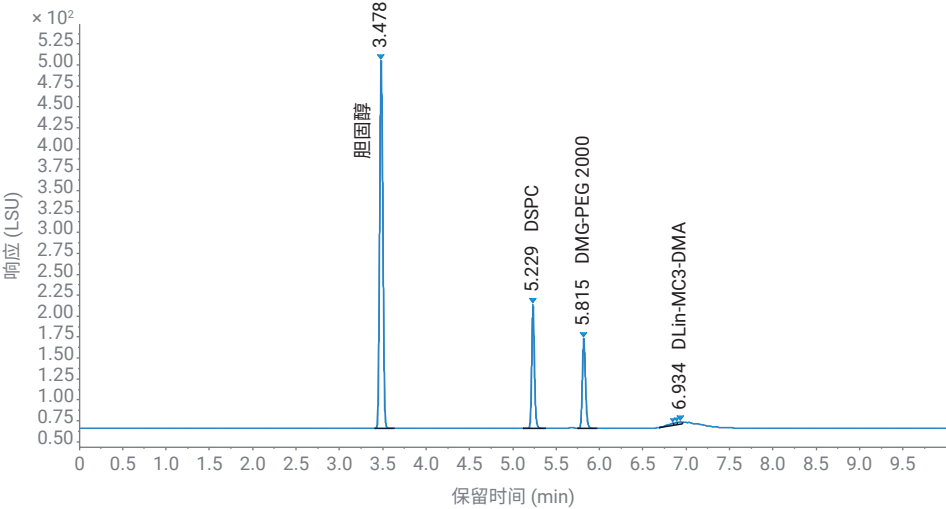


图 3. 水和 MeOH 的二元梯度，含 10 mmol/L 乙酸铵，分析四种 LNP 成分获得的结果

使用 MeOH 的梯度

在四元设置中使用 MeOH，无法洗脱所有四种脂质（图 4），因为如果要完全洗脱，大概需要 100% 的 MeOH 保持较长的时间。在四元设置中，MeOH 最高可达 90%，同时仍包含具有缓冲功能的乙酸铵和部分水以防结晶。图 4 展示了 80%–90% MeOH 的三元分离结果。即使在 90% 的 MeOH 下保持了 5 分钟，也只有两个峰从色谱柱中洗脱出来。在接下来的实验中，采用 ACN 作为更强的洗脱液，以测试是否能完全洗脱所有四种脂质成分。

使用 ACN 的梯度

图 5 展示了使用 ACN 作为洗脱液的三元梯度的结果。将梯度设置为 5 分钟内 B 从 50% 升至 90%，并保持 5 分钟。使用 ACN 时，所有四个峰都可以完全洗脱。然而，三种脂质的峰形欠佳，只有胆固醇（第一个峰）呈现高斯峰形。

使用更高的有机物含量起始条件和更平缓的梯度进行进一步的方法开发，以实现更快速的洗脱和更高的分离度。尽管实现了更快速的洗脱，但更平缓的梯度并未改善前两个峰的分​​离度。参见图 6A 至图 6C。

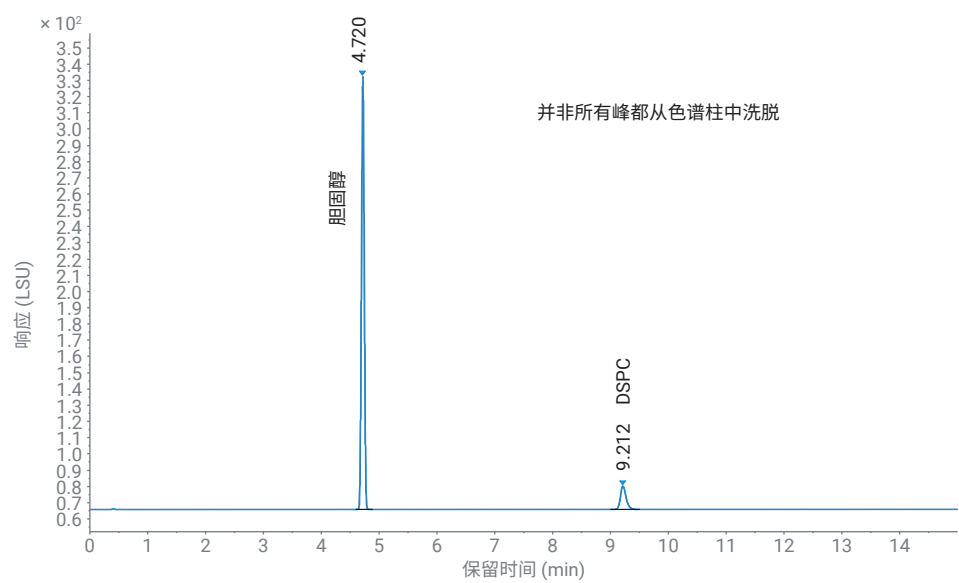


图 4. 三元梯度，MeOH 在 5 分钟内从 80% 到 90%，保持 5 分钟

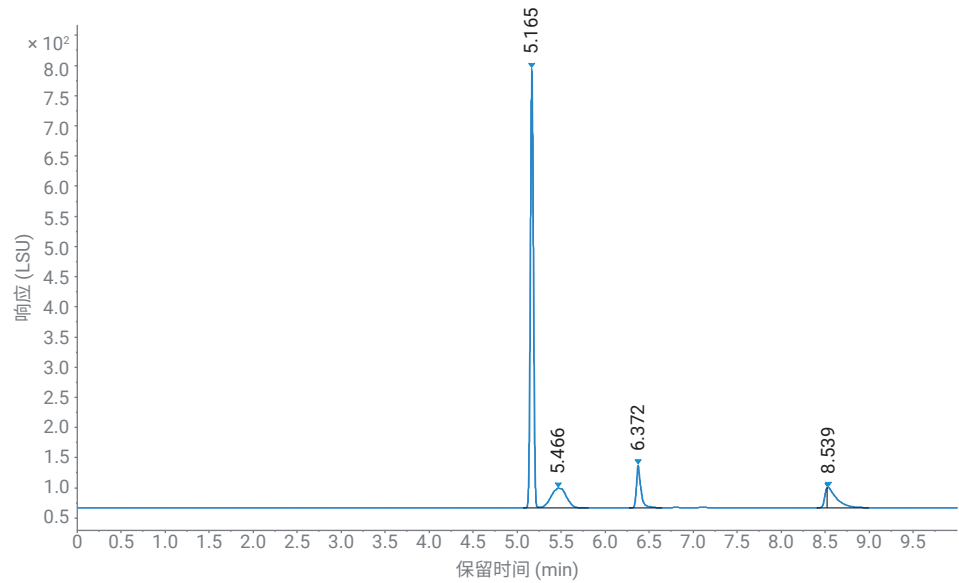


图 5. 三元梯度，B (ACN) 在 5 分钟内从 50% 到 90%，保持 5 分钟

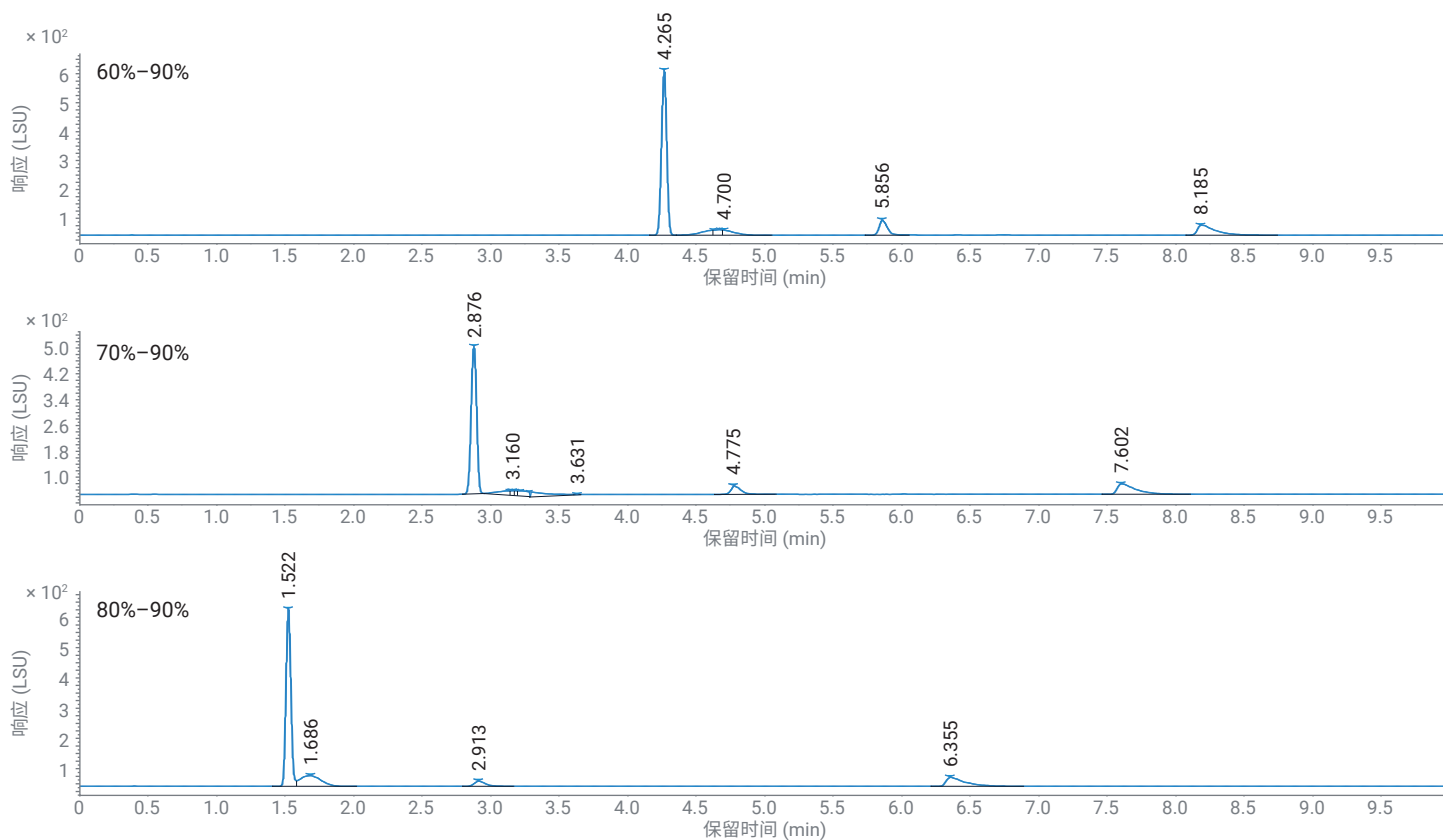


图 6. 使用 ACN 通过不同的梯度斜率洗脱四种 LNP 成分

结合 MeOH 和 ACN 的四元梯度

为了实现完全洗脱并改善峰形，本文评估了将 ACN 与 MeOH 结合的四元梯度，参见表 2（实验条件）。从 82% MeOH 到 90% MeOH，再到 90% ACN 的四元梯度使所有 LNP 成分（甚至包括可电离脂质）都实现了基线色谱分离并具有出色的峰形。七次连续运行的叠加图也表现出出色的保留时间 (RT) 精度和良好的峰面积精度（图 7 和表 3）。

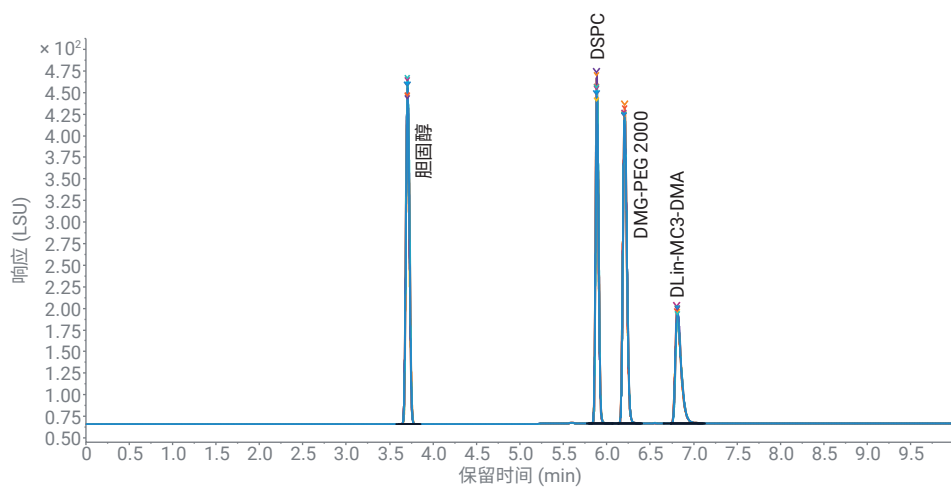


表 3. 图 7 中峰的 RSD 信息

峰	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
胆固醇	0.1	1.875
DSPC	0.054	3.236
DMG-PEG 2000	0.055	1.172
DLin-MC3-DMA	0.061	0.998

图 7. 使用 MeOH 和 ACN 的四元梯度 — 七次连续运行的叠加图

使用这一方法，在色谱柱上分析了所有四种脂质的等摩尔混合物。以 1:3 的比例稀释混合物，得到范围为 4.8625 nmol 至 2.22 pmol 的系列溶液。在信噪比 (S/N) 为 3 时，获得了出色的柱上检测限 (LOD)，范围在 0.46–8.1 pmol 之间。S/N = 10 时，柱上定量限 (LOQ) 在 1.6–27 pmol 之间。计算所有峰的峰/峰噪声。所有相关性曲线的二次曲线模型均获得了出色的结果，相关系数 (R^2) 超过 0.999，除 DSPC 为 0.995 (表 4)。

表 4. LNP 成分的 LOD、LOQ 和相关系数

峰	脂类	LOD [pmol]	LOQ [pmol]	R^2
1	胆固醇	8.1	27	0.99913
2	DSPC	2.3	7.8	0.99524
3	DMG-PEG 2000	0.46	1.6	0.99988
4	DLin-MC3-DMA	5.31	17.7	0.99963

进行进一步方法开发以获得具有更短梯度的方法，同时保持出色的峰形和分离度，这带来了第二种 MeOH/ACN 溶剂组合设置。省去了从 82% MeOH 到 90% MeOH 的线性 MeOH 梯度步骤，使用 3 分钟内从 90% MeOH 到 90% ACN 的梯度，并保持 2 分钟 (表 2)。图 8 展示了使用该短梯度分离四种 LNP 成分的结果。表 5 列出了图 8 中峰的 RSD 值。使用这种短梯度方法，所有脂质成分都获得了出色的分离度、峰形和重现性。通过将进样量从 2 μ L (长梯度方法) 增加至 5 μ L，可以提高峰面积精度。短梯度方法的另一个优点是可以在二元泵上运行，这有利于 LC/MS 和其他分析。

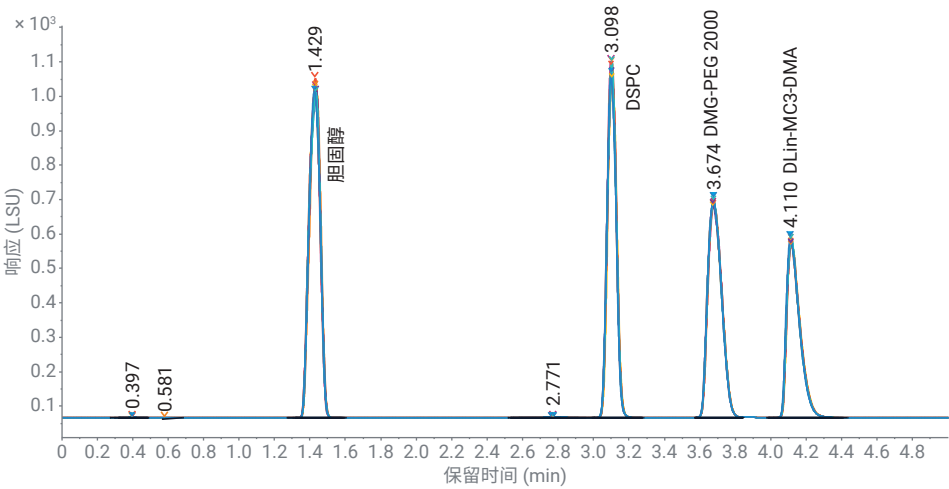


图 8. 从 90% MeOH 到 90% ACN 的短四元梯度 — 七次连续运行的叠加图

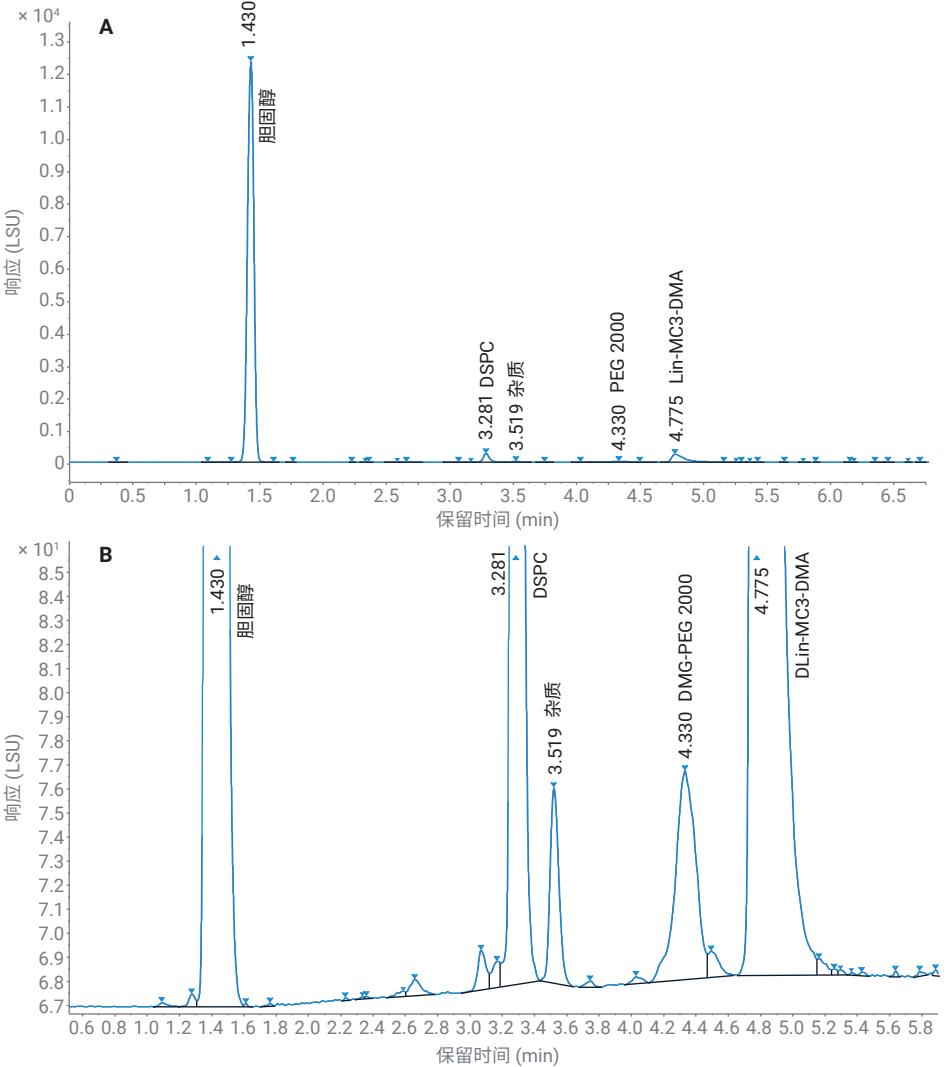


图 9. 分析与 Patisiran 类似的 LNP 样品 (A)，放大图 (B)

表 5. 图 8 中峰的 RSD 信息

峰	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
胆固醇	0.148	0.428
DSPC	0.090	1.807
DMG-PEG 2000	0.040	0.788
DLin-MC3-DMA	0.032	0.759

将四元法转换为二元法，并应用于四种 LNP 成分的样品混合物，该混合物模拟 patisiran^[1] 的 LNP 比例，DMG-PEG 2000、DLin-MC3-DMA、胆固醇和 DSPC 的比例为 1.5:50:38.5:10。这表明需要在宽动态范围内实现检测和定量，如图 9 所示。

结论

本研究表明，与 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱配合使用的四元设置是溶剂方法开发的理想选择。InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl 化学填料通过表面多孔填料颗粒提供了卓越的流体动力学特性，并且在与 LNPs 中的大分子疏水性脂质相互作用时，其疏水性略低于传统 C18。结果证明，与色谱柱配合使用时，溶剂组合是影响峰形和分离度的最关键因素。在仅使用 MeOH 或 ACN 作为强流动相的单一有机溶剂设置中，观察到脂质成分不完全洗脱 (MeOH) 或所有四个峰的峰形和分离度均不理想 (ACN)。借助四元设置，开发了一种可以同时使用有机溶剂 MeOH 和 ACN 的高分离度方法。

所开发的方法能够实现所有四种 LNP 成分的完全洗脱，并获得出色的峰形和高分离度以及高精度的保留时间和峰面积。除了具有高相关系数的出色的二次相关性之外，1290 Infinity II ELSD 的高动态范围还能够检测和定量 patisiran 样品中原始比例下的所有四种脂质成分。因此，强烈推荐 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱搭配 1290 Infinity II ELSD 用于分析 LNP 成分。

参考文献

1. Schoenmaker, L. et al. mRNA-lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability *Int. J. Pharm.* **2021**, 601
2. Evers, M. et al. Small Methods **2018**, 2
3. Kim, J. et al. Self-assembled mRNA Vaccines *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, 170, 83-112
4. Akinc, A. et al. The Onpattro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs *Nat. Nanotechnol.* **2019**, 12, 1084-1087
5. NDA 210922 ONPATRO (patisiran) Lipid Complex Injection Addendum to Drug Product Quality Review – Quality Assessment **2018**
6. Fan, Y.; Marioli, M.; Zhang K.; Analytical Characterization of Liposomes and Other Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, 5
7. A Sensitive Detection Technique for Analysis of Lipids in Liposomal Formulations Using an Agilent 1290 Infinity II ELSD (使用 Agilent 1290 Infinity II ELSD 分析脂质制剂中脂类的高灵敏度检测技术)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0965EN，**2019**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44620.0930902778

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022 年 7 月 27 日，中国出版
5994-4709ZHCN