

高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器测定 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺

LC-345

摘要： 本文采用岛津高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器建立了 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺的定量方法。该方法中，聚乙烯亚胺在 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内线性良好，线性相关系数为 0.9994。精密度实验中，2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD 为 0.13%，峰面积 RSD 为 2.29%。分析实际 siRNA 制剂样品，定量准确度为 95.1~102.7%。实验结果表明，该方法能快速准确地定量分析 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺。

关键词： ELSD-LT III 聚乙烯亚胺 siRNA

siRNA (Small interfering RNA)，小干扰核苷酸，是小核酸药物的一种，是与小分子药物、抗体药物完全不同的全新药物类别，药物构成为核苷酸序列，药物作用于 mRNA，通过基因沉默抑制靶蛋白的表达，从而实现治疗疾病的目的，是生物制药创新的战略性前沿领域。

siRNA 在体内不稳定，易被体内核酸酶降解，同时 siRNA 分子结构较大，且带负电荷，穿透细胞膜的难度较大，因此需要借助递送系统进入细胞并起作用。目前常用的递送载体可以分为病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率高，但是制备及纯化困难，携带基因容量小，且具有潜在致病性。非病毒载体具

有安全性、低毒性、低免疫原性等优点，被认为是比病毒载体更理想的 siRNA 递送载体。在众多非病毒递送载体中，聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 是目前研究较广泛的非病毒载体之一。

PEI 是一种阳离子聚合物，一般来说，分子量越大，转染活性越高，但毒性也越强，因此，能否准确、高灵敏度地检出 PEI 在相关产品中的含量对产品的安全性和质量控制意义重大。PEI 带大量正电荷，分子量较大，本次实验中 PEI 分子量约为 4 万，在一般反相色谱系统上没有保留，且 PEI 没有显著的紫外吸收基团，所以本文采用离子对反相色谱系统结合蒸发光检测器检测 PEI，灵敏度高、线性范围广、重复性好。

■ 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱仪 LC-40B XR，配置信息如下：

系统控制器：CBM-40lite

输液泵：LC-40B XR

柱温箱：CTO-40C

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.114

自动进样器：SIL-40C XR

脱气机：DGU-4003

检测器：ELSD-LT III

1.2 分析条件

色谱柱：岛津 PEI 专用色谱柱

进样体积：10 μL

检测器：ELSD-LT III

增益：Wide

雾化气压力：360 KPa

洗脱方式：梯度洗脱，B 相起始浓度为 20%，时间程序如表 1 所示。

流动相：离子对试剂

流速：1.0 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

漂移管温度：60 $^{\circ}\text{C}$

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
5	泵	B.Conc	80
8	泵	B.Conc	80
8.1	泵	B.Conc	20
15	控制器	Stop	

1.3 标准品及样品配制

标准品储备液：称取标准品适量，用超纯水溶解稀释成 1 mg/mL；

标准溶液：取适量对照品储备液，用超纯水逐级稀释，配制浓度为：1、2、5、10、20、50、100 μg/mL 的标准溶液。

样品溶液制备：采用碱性溶液溶解样品，用超纯水稀释分别稀释 12.5、40 和 250 倍，得到不同浓度样品后上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液色谱图

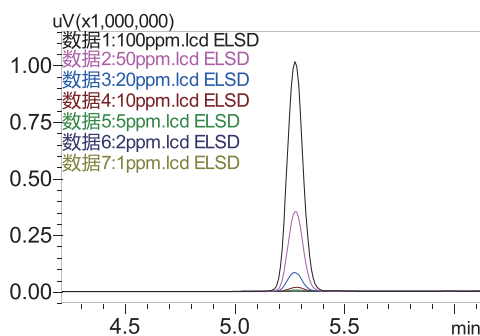


图 1 PEI 色谱图 (浓度 1~100 μg/mL)

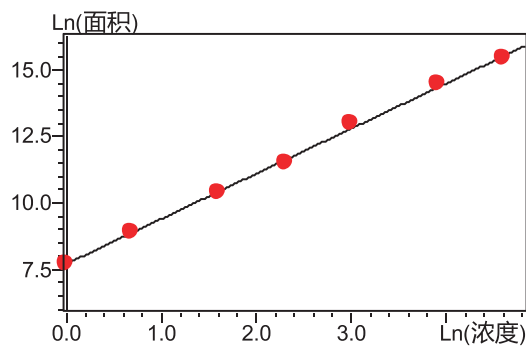


图 2 PEI 校准曲线

2.2 校准曲线

按 1.2 中的分析条件测定标准溶液，浓度为 1~100 μg/mL，以浓度的对数为横坐标，峰面积的对数为纵坐标，采用外标法建立对数校准曲线，校准曲线如图 2 所示，线性关系为 $\text{Ln}Y = 1.69913 \times \text{Ln}X + 7.71015$ ，线性相关系数 r 为 0.9994，准确度为 94.3~109.1%。

ELSD-LT III 具有独创的动态范围扩展功能，线性范围广，且无需根据样品浓度优化增益值，可直接将增益设置为 wide 模式，此时，低浓度样品灵敏度高，高浓度样品不易饱和。

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件，将浓度为 2 μg/mL 的标准溶液重复分析 6 次，计算得到 PEI 保留时间 RSD 为 0.13%，峰面积 RSD 为 2.29%，具体见下表 2。

表 2. 精密度实验结果

No	1	2	3	4	5	6	RSD%
保留时间	5.275	5.275	5.292	5.283	5.275	5.283	0.13
峰面积	9,606	9,657	9,790	9,920	9,713	9,267	2.29

2.4 样品含量测定

按照 1.3 中处理方法对 siRNA 制剂样品进行处理，处理后样品理论浓度分别为 4、25、80 μg/mL，重复测试 3 次，定量结果准确度分别为 102.7%、98.4%、95.1%，测量准确度高。样品色谱图如图 3 所示，定量具体结果如表 3 所示。

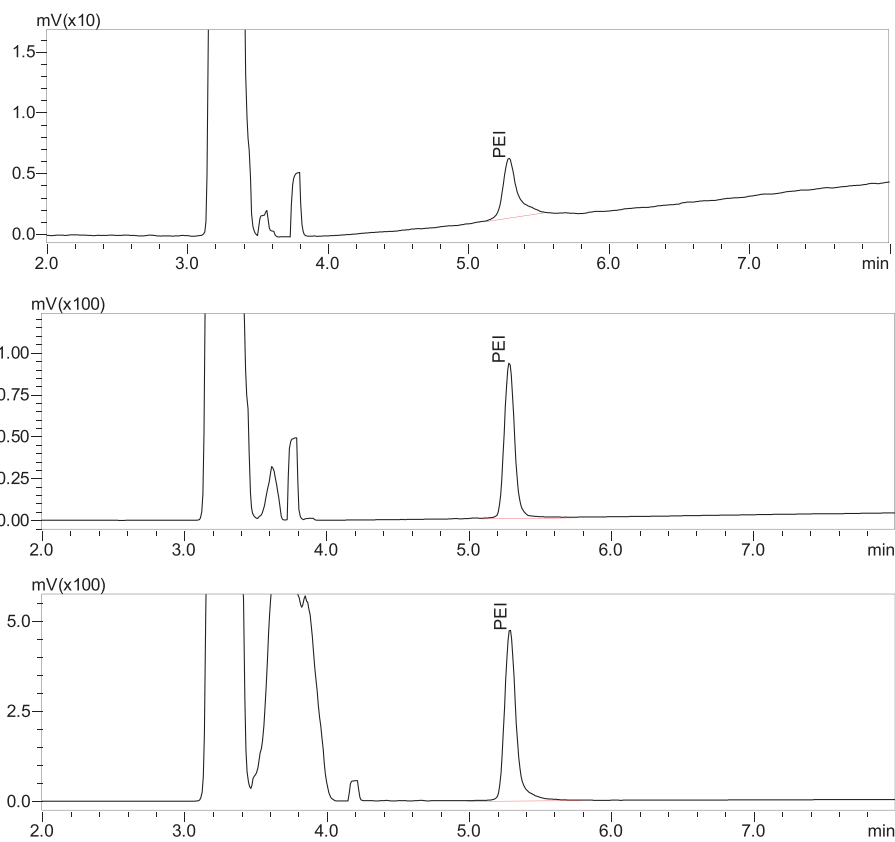


图3 样品色谱图 (理论浓度: 上-4 µg/mL, 中-25 µg/mL, 下-80 µg/mL)

表3 样品中 PEI 定量结果 (n=3)

No.	理论浓度 (µg/mL)	测试浓度 (µg/mL)	定量准确度 (%)	RSD (%)
1	4	4.11	102.70%	2.20%
2	25	24.6	98.40%	0.92%
3	80	76.07	95.10%	1.01%

■ 结论

本文采用岛津高效液相色谱仪联合蒸发光散射检测器建立了 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺的定量方法。该方法中, 聚乙烯亚胺在 1~100 µg/mL 线性范围内线性良好, 线性相关系数为 0.9994。精密度实验中, 2 µg/mL 标准溶液保留时间 RSD 为 0.13%, 峰面积 RSD 为 2.29%。分析实际样品, 定量准确度为 95.1~102.7%。实验结果表明, 该方法能快速准确地定量分析 siRNA 递送介质聚乙烯亚胺。

岛津应用云

