

LIPOSZÓMÁT ALKOTÓ LIPIDEK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA HPLC-MS MÓDSZERREL

DR. EMMER JÁNOS¹, DR. LOVRITY ZITA¹,
JUHÁSZNÉ SZALAI ADRIENN¹, DR. FODOR BERTALAN¹

Összefoglalás: A liposzómák tulajdonságait elsősorban a lipidösszetétel határozza meg. A nemzetközi szakirodalom és saját kísérleteink alapján olyan egyszerű, szelektív és gyors fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszert dolgoztunk ki, amellyel a liposzómák lipid összetétele meghatározható. A fotodiódasoros, PDA detektálás mellett, tömegspektrometriás, MS detektálást is alkalmaztunk, amellyel az érzékenység és a szelektivitás növelhető volt.

Kulcsszavak: liposzóma, lipid, HPLC-MS, PDA

Bevezetés

A liposzómák foszfolipid kettősmembránnal burkolt üreges gömbök, amelyek magukba zárják a zsír- vagy vízoldható anyagokat. A szállításra használt liposzómák kettősrétege általában több összetevőből áll, tipikusan lipidekből, koleszterinből és polietilén-glikol (PEG)-lipidekből. A liposzómák tulajdonságait alapvetően a lipid összetétel határozza meg. A lipidek elválasztására és mennyiségi meghatározására a folyadékkromatográfiás módszerek a leghatékonyabbak. A normál és fordított fázisú folyadékkromatográfia egyaránt alkalmas a lipidek elválasztására. Meyer és munkatársai a lipidek közvetlen mérésére fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszert dolgoztak ki UV detektálással, 205 nm hullámhosszon [1]. Zhong és munkatársai szintén RP-HPLC elválasztást alkalmaztak kationos liposzómák lipidösszetételének meghatározására porlasztásos fényszórás (ELS) detektálással [2]. Berger munkatársaival liposzómák lipid összetételét és koncentrációját határozta meg különböző oszlopokon UV és ELS detektálással [3]. Lee és munkatársai vizsgálták a kromatográfiás oszlopok hosszának és töltetük szemcseméretének hatását a tömegspektrometriás (MS) detektálásra [4]. Sommer munkatársaival egy LC-MS módszert írt le összetett lipid rendszerek minőségi és mennyiségi elemzésére [5]. Singh és munkatársaival egy gyors izokratikus HPLC módszert dolgozott ki lipid és koleszterin meghatározására liposzómákból [6]. Willmann és munkatársai a fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát tömegspektrometriával és NMR spektroszkópiával együtt alkalmazták, így gyors elválasztást és hatékony azonosítást értek el [7]. Peterson és Cummings egy összefoglaló cikkben értékeli a kromatográfiás módszerek jelentő-

¹ Miskolci Egyetem Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék, Miskolc

ségét a foszfolipidek vizsgálatánál biológiai mintákban [8]. Bemutatják az elválasztáshoz használható töltetek fajtáit, az alkalmazható eluenseket és a detektálási módokat, valamint a kapcsolt technikákat. Abidi és munkatársai ugyancsak foszfolipidek elválasztására, fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás eljárást írnak le fluoreszcens detektálással, származékképzés után [9].

Munkánk célja olyan egyszerű és gyors fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszer kidolgozása volt, amellyel a laboratóriumban fejlesztett különböző liposzóma alapú – gyógyszer és genetikai anyagok célba juttatására alkalmas – szállítórendszerek lipidjei elválaszthatók és érzékenyen detektálhatók.

Kísérleti rész

A vizsgálatokat a Miskolci Egyetem, Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék, Analitikai és nanotoxikológiai laboratóriumában végeztük.

Készülék

A HPLC-MS rendszer (Shimadzu Corporation) a következő egységekből állt: 2 db Pumpa: LC-AD; Auto sampler: SIL-20AC HT; Oszlop termosztát: CTO-20A; Degasser: DGU-20A 3R; PDA detektor: SPD-M20A; LCMS-IT-TOF Liquid Chromatograph Mass Spectrometer.

A Shimadzu LCMS-IT-TOF egy nagyhatékonyságú folyadékkromatográfhoz (HPLC) kapcsolható hibrid tömegspektrométer (MS), az elektroporlasztásos ionizációt (ESI) ioncsapdával (IT) és repülési idő (TOF) technológiával kombináló készülék, amely így nagy tömegpontosságot és nagy tömegfelbontást ér el.

Egy LCMSsolution szoftver vezérli a készüléket és ezzel egyidejűleg adatokat gyűjt a PDA fotodiódasoros és MS detektorból. Az adatfeldolgozás és jelentések készítése ugyancsak ezzel a szoftverrel történik.

Vegyszerek

A HPLC-MS vizsgálatokhoz használt vegyszerek: Metanol: LiChrosolv hypergrade for LC-MS, Merck; Acetonitril: Chromasolv for LC-MS, Fluka; 2-Propanol: Chromasolv for LC-MS, Fluka; Hangyasav: a. r., Acidum 2 Kft.; Ammónium-formiát: HPLC grade, Fluka; TFA (trifluor ecetsav): Chromasolv for HPLC, Fluka. Az oldatkészítéshez használt nagytisztaságú vizet (szervesanyag mentes, $R > 12\text{M}\Omega$) Zeneer Up 900 Water Purification System (Human Corporation) készülékkel állítottuk elő. A NOF Corp., Japan szállította a standard lipideket: 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC),

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP). A felhasznált koleszterin (CHOL) (Sigma-Aldrich) tisztasága $\geq 99\%$ volt.

Minta

A standard lipidekből 500 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk metanollal. A törzsoldatból a kalibrációhoz szükséges töménységű vizsgálati oldatokat hígítottunk az eluenssel.

Vizsgálati módszer

A vizsgálati módszer fejlesztéséhez fordított fázisú, héjszerkezetű, töltetes oszlopot használtunk. A héjszerkezetű töltetek előnye a teljesen porózus töltetekkel szemben a csökkentett diffúziós úthossz, amely gyorsabb anyagátadást, keskenyebb csúcsokat, ezáltal jobb felbontást biztosít. A héjszerkezetű töltetekkel hasonló tényérszámok érhetőek el lényegesen alacsonyabb nyomáson, mint UHPLC-vel 2 μm alatti, teljesen porózus szemcsékkel.

Eluensként az alábbi oldószerkelegyeket próbáltuk ki, különböző ionpárképző anyagokkal:

Acetonitril – Metanol – Víz (0,1% Ammónium-formiát),

Víz (0,1% hangyasav) – Acetonitril,

Víz (0,15% TFA) – Acetonitril,

Víz (0,15% TFA) – 2-Propanol(0,05% TFA),

Víz (0,1% hangyasav) – 2-Propanol (0,1% hangyasav)

A legjobb elválasztás megtalálásához az izokratikus és gradiens elúciót lehetőségét is vizsgáltuk, különböző áramlási sebességekkel. Mivel a lipidek fényelnyelése az UV és látható tartományban gyenge, ezért a PDA detektálás mellett az érzékenyebb és szelektívebb MS detektálást választottuk. A kísérletek alapján az alábbi körülmények között értük el a megfelelő elválasztást és a mennyiségi meghatározásra is alkalmas detektálást.

HPLC-ESI-MS vizsgálati körülmények

Az elkészített lipid vizsgálati oldatokból 1 μl -t injektáltunk a készülék automata mintaadagolójának segítségével. A HPLC elválasztáshoz SunShell C18 fordított fázisú oszlopot használtunk. A méréseket az alábbi körülmények között végeztük.

Oszlop : SunShell C18; 3,0 mm \times 150 mm; 2,6 μm

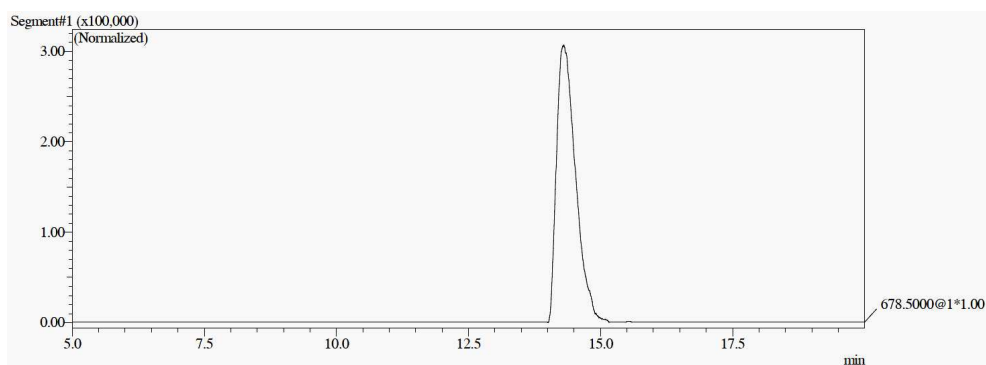
Eluens A : Víz (0,1% hangyasav)

Eluens B : 2-Propanol (0,1% hangyasav)

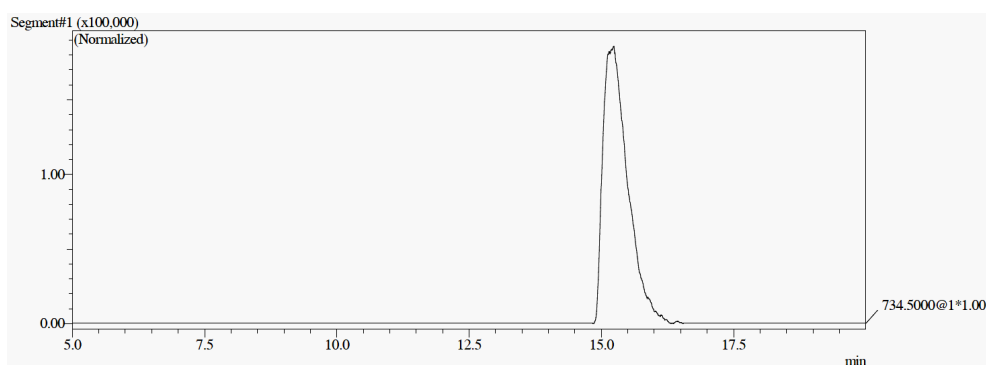
Gradiens elúció : 50% B (0–1 min) \rightarrow 100% B (8–16 min) \rightarrow 50% B (19–20 min)

Áramlási sebesség : 0,2 ml/min
Injektált térfogat : 1 μ l
Oszlop hőmérséklete : 40 °C
Ionizáció módja : ESI(+)
Porlasztó gáz sebessége : 1,5 l/min
Szárító gáz nyomása : 50 kPa
Mintafeszültség : +4,5 kV
CDL hőmérséklet : 200 °C
BH hőmérséklet : 200 °C
PDA detektor : 190–500 nm

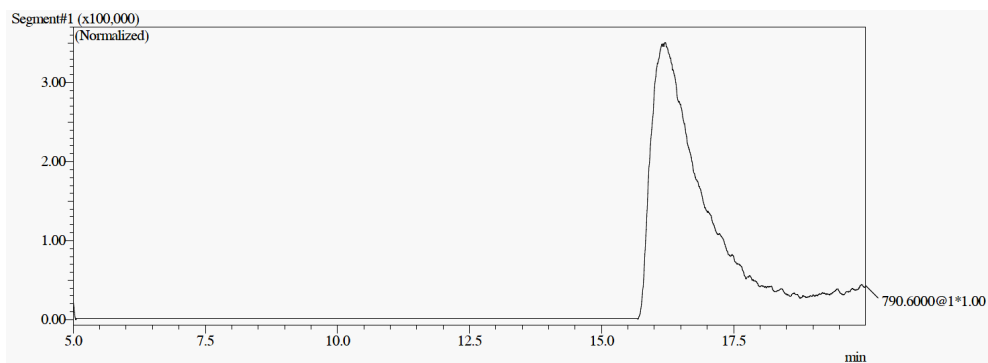
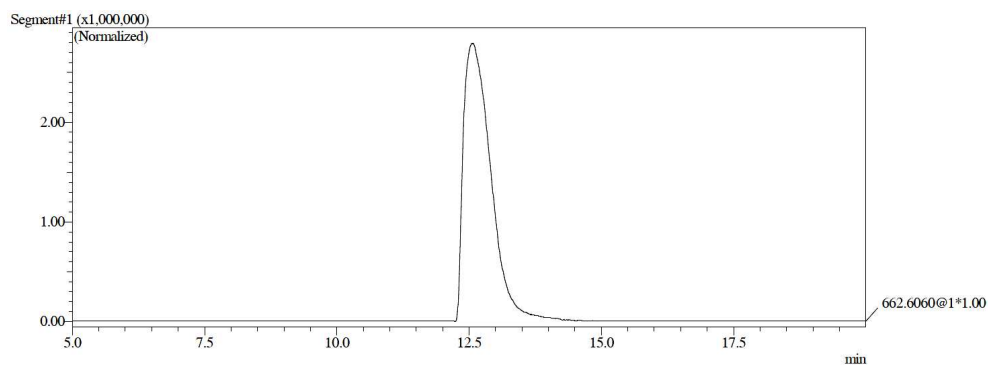
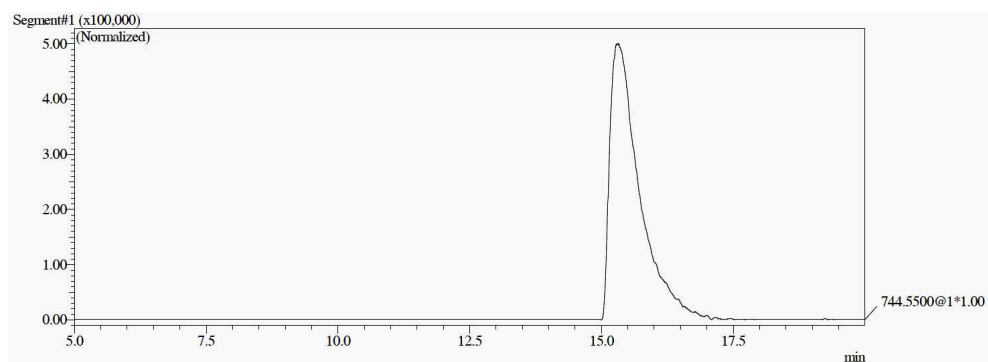
Mérési eredmények és következtetések

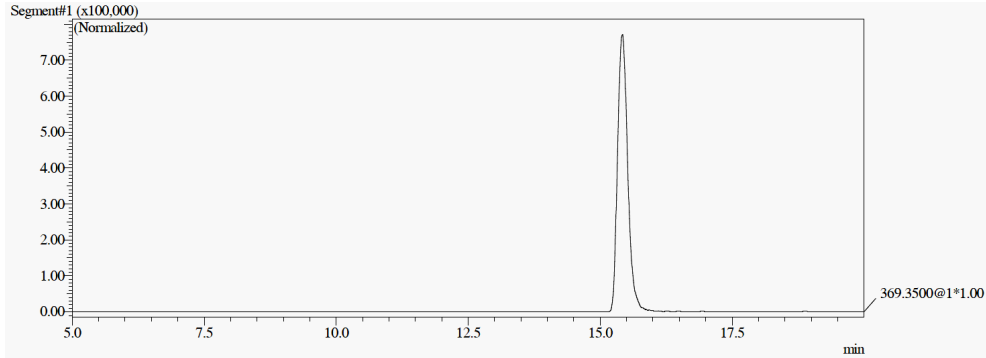
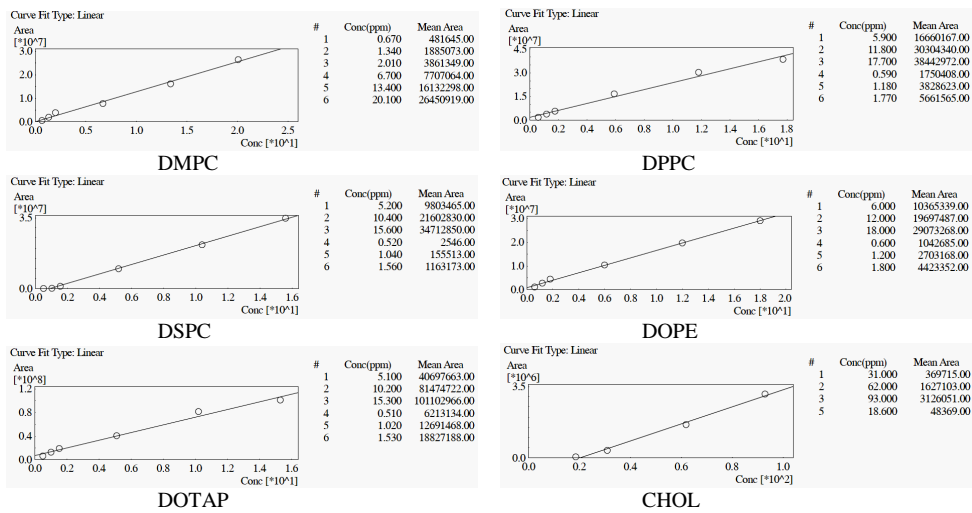


1. ábra. DMPC extrahált $[M+H]^+$ tömeg kromatogramja



2. ábra. DPPC extrahált $[M+H]^+$ tömeg kromatogramja

3. ábra. DSPC extrahált $[M+H]^+$ tömeg kromatogramja4. ábra. DOTAP extrahált $[M+H]^+$ tömeg kromatogramja5. ábra. DOPE extrahált $[M+H]^+$ tömeg kromatogramja

6. ábra. CHOL extrahált $[M-OH]^+$ tömeg kromatogramja

7. ábra. Kalibrációs grafikonok

Az adatfeldolgozás és a jelentések készítése az LCMSsolution szoftverrel történt. Az 1–6. ábrák mutatják a lipidek extrahált MS kromatogramjait.

A kromatogramokból megállapítható, hogy a DOPE és a koleszterin nem választható el ezzel a módszerrel és a DPPC is csak részlegesen válik el a DOPE-től és a koleszterintől (átlagos retenciós idők $RT_{DOPE} = 15,331$ min, $RT_{CHOL} = 15,393$ min, $RT_{DPPC} = 15,181$ min). Szelektív MS detektálással az egyes lipidek (DOPE $[M+H]^+ = 744,55$ m/z, CHOL $[M-OH]^+ = 369,35$ m/z, DPPC $[M+H]^+ = 734,50$ m/z) azonosíthatók és a mennyiségük mérhető.

A mennyiségi meghatározáshoz minden egyes lipidre, standard anyagokkal kalibrációt készítettünk. A 7. ábrán a különböző lipidek kalibrációs diagramjai láthatók. A mérési pontokra egyenest illesztettünk. A regressziós egyenesek jellemzőit az 1. táblázat mutatja.

1. Táblázat

Regressziós egyenesek jellemzői

Jellemzők \ Lipid	DMPC	DPPC	DSPC	DOPE	DOTAP	CHOL
Merekség, m	1274249	2190680	2329594	1572582	6516641	41819,77
Tengelymetszet, b	28503,85	1890494	-2085216	838506,9	6942832	846271,8
Korrelációs együttható, R ²	0,991	0,985	0,999	0,998	0,985	0,992

A táblázat adataiból megállapítható, hogy a korrelációs együttható (R²) értéke a különböző anyagokra 0,985 és 0,999 között változik, ami jó illeszkedést mutat.

2. Táblázat

A mérések néhány minőségi jellemzője

Jellemzők \ Lipid	DMPC	DPPC	DSPC	DOPE	DOTAP	CHOL
Retenciósi idő átlag, min	14,296	15,181	16,170	15,331	12,591	15,393
Relatív szórás, RSD %	0,13	0,28	0,81	0,15	0,20	0,14
Mérések száma (n)	(15)	(15)	(12)	(6)	(6)	(11)
Kimutatási határ DL, ppm	0,31	1,96	0,86	1,11	1,38	3,18
Alsó méréshatár QL, ppm	0,93	5,92	2,63	3,37	4,21	9,66
Lineáris tartomány, ppm	1–20	6–25	3–25	4–25	5–20	10–100

A 2. táblázat adataiból megállapítható, hogy a retenciósi idők jól reprodukálhatók. A különböző lipidekre a relatív szórás, RSD % 0,13 és 0,85 között változik. A kimutatási határ, DL 0,31 ppm és 3,18 ppm tartományba esik, ami a megfelelő érzékenységet mutatja. Az alsó méréshatár, QL a mennyiségi meghatározás szempontjából fontos jellemző. Ennek értéke 0,93 ppm és 9,66 ppm között van, ami a liposzómák lipid tartalmának méréséhez megfelelő. A táblázat utolsó sora azt a lineáris tartományt mutatja, amely koncentráció értékeken belül a módszer mennyiségi meghatározásra alkalmas.

Összegzés

Munkánk során olyan egyszerű, szelektív és gyors fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (RP-HPLC) módszert dolgoztunk ki, amellyel a liposzómák lipid összetétele meghatározható. Vizsgáltuk a módszer néhány minőségi jellemzőjét is. A módszer továbbfejleszthető és így alkalmassá tehető más ösz-

szetett lipidkeverékek összetételének és esetleges bomlástermékeik meghatározására.

Köszönetnyilvánítás

Jelen munka a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként – az Új Magyarország Fejlesztési Terv keretében – az Európai Unió rész támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Köszönetünket fejezzük ki Kacsmarik Sándornénak és Szálkai Istvánnénak a kísérleti munka előkészítése során nyújtott segítségükért, valamint Balatoni Enikőnek, aki a közlemény szerkesztésében segítette munkánkat.

Irodalomjegyzék

- [1] Meyer, O., Roch, O., Elmlinger, D. et al.: *Direct lipid quantitation of cationic liposomes by reversed-phase HPLC in lipoplex preparation process*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000, 50, 353–356.
- [2] Zhong, Z., Ji, Q., Zhang, J. A.: *Analysis of cationic liposomes by reversed-phase HPLC with evaporative light-scattering detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 51, 947–951.
- [3] Berger, N., Sachse, A., Bender, J. et al.: *Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics*. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 223, 55–68.
- [4] Lee, J. Y., Lim, S., Moon M. H.: *Effects of Column Length and Particle Diameter on Phospholipid Analysis by Nanoflow Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*. Mass Spectrometry Letters, 2011, 2 (3), 65–68.
- [5] Sommer, U., Herscovitz, H. Welty., F. K. et al.: *LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures*. Journal of Lipid Research, 2006, 47, 804–814.
- [6] Singh, R., Ajagbe, M., Bhamidipati, S. et al.: *A rapid isocratic high-performance liquid chromatography method for determination of cholesterol and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine in liposome-based drug formulations*. Journal of Chromatography A, 2005, 1073, 347–353.
- [7] Willmann, J., Thiele, H., Leibfritz, D.: *Combined Reversed Phase HPLC, Mass Spectrometry, and NMR Spectroscopy for a Fast Separation and Efficient Identification of Phosphatidylcholines*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2011, Article ID 385786, 8 pages, doi:10.1155/2011/385786.
- [8] Peterson, B. L., Cummings, B. S.: *A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples*. Biomedical Chromatography, 2006, 20, 227–243.
- [9] Abidi, S. L., Mounts, T. L., Rennick, K. A.: *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of phospholipids with fluorescence detection*. Journal of Chromatography, 1993, 639, 175–184.