

Vanquish core液相联合电雾式检测器（CAD）用于 mRNA疫苗中SM-102和ALC-0135等脂质检测应用

杨艳 沈国滨 冉良骥

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词：SM-102，ALC-0135，PEG 化脂质，胆固醇，DSPC，电雾式检测器（CAD），Vanquish core 液相色谱

1. 引言

由于预防新冠病毒的mRNA疫苗开发成功，让mRNA疫苗及药物成为生物药领域热点之一。mRNA在人体内稳定性较差，确保mRNA疫苗及药物发挥作用的关键技术之一就是递送载体，当前最常使用的递送载体主要由阳离子脂质、胆固醇、PEG化脂质和DSPC（1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱）等成分构成。

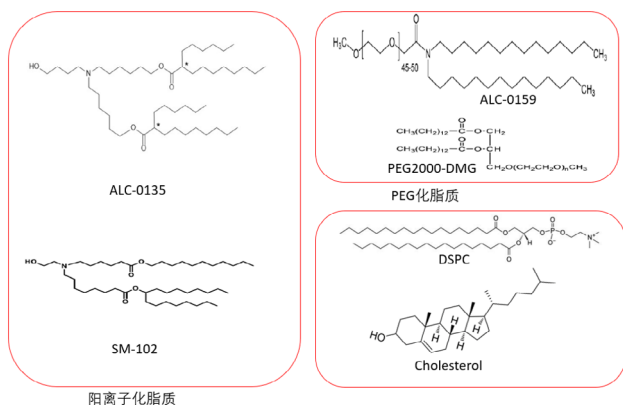


图1 胆碱结构式

美国药典USP在今年4月30日发布了“Analytical Procedures for mRNA Vaccine Quality” 2.0版本草案，该草案提出mRNA疫苗脂质表征和含量测定使用CAD检测器。文献报道^[1]流动相的pH值会影响阳离子脂质的保留时间，本实验利用Vanquish core液相和CAD电雾式检测器研究不同pH流动相对阳离子脂质的保留时间的影响及建立合适的方法进行脂质的分离。Vanquish系列液相的高压二元泵具有6个溶剂通道，分别为A1、A2、A3和B1、B2、B3，可以灵活便捷的切换流动相通道进行多种流动相组合，非常便于方法开发时流动相条件的筛选，因此本实验采用Vanquish的高压二元泵（Binary pump）进行方法开发。

2. 实验方法

2.1 仪器

Thermo Fisher Vanquish Core高效液相色谱仪

泵：Binary Pump C（P/N:VC-P10-A）

自动进样器：Split Sampler CT（P/N:VC-A12-A）

柱温箱：Column Compartment C（P/N:VC-C10-A）

CAD检测器：Vanquish CAD H（P/N:VH-D20-A）

色谱软件：变色龙Chromleon 7.3.1

2.2 试剂

甲醇（LC-MS级，Fisher）、三乙胺（HPLC级，CNW）、乙酸（LC-MS级，CNW）、去离子水（18.2 MΩ，Millipore纯水机）。

2.3 标准品

ALC-0135、SM-102、ALC-0159、PEG2000-DMG、DSPC、胆固醇，以上标准品均来自客户企业

2.4 样品

使用ALC-0135、ACL-0159、DSPC和胆固醇脂质与mRNA组装的LNPs样品，来自客户企业

2.5 标准品溶液制备和样品前处理

标准品溶液制备：配方1含有的脂质成分为SM-102、PEG2000-DMG、胆固醇和DSPC，首先分别准确称取上述物质于4个玻璃储样瓶中，用无水乙醇溶解，得到100 ppm的标准储备

溶液，然后再用无水乙醇：超纯水（85:15）进一步稀释获得 1 ppm、2 ppm、5 ppm、10 ppm、20 ppm、25 ppm 混合标准工作溶液。配方 2 含有的脂质成分为 ALC-0135、ALC-0159、胆固醇和 DSPC，配方 2 的脂质标准储备溶液和混合标准工作溶液的配制方法同配方 1。

样品前处理：样品用无水乙醇进行适当稀释

2.6 色谱条件

色谱柱：Acclaim 300Å C18 150×2.1 mm, 3.0 μm (PN:060264)

柱温：50 °C（配被动预加热器）

检测器参数：蒸发温度50 °C，采集频率5 Hz，Filter 3.6 s，PFV 1.0

进样量：10 μL

流动相：见表1

流动相梯度：见表2和表3

流速：0.4 mL/min

表1 方法开发考察的流动相条件

流动相条件	流动相A	流动相B
流动相条件1	5% TEAA-H ₂ O, TEAA的pH=4.0	5% TEAA-MeOH, TEAA的pH=4.0
流动相条件2	5% TEAA-H ₂ O, TEAA的pH=5.5	5% TEAA-MeOH, TEAA的pH=5.5
流动相条件3	5% TEAA-H ₂ O, TEAA的pH=7.0	5% TEAA-MeOH, TEAA的pH=7.0

注：TEAA缓冲液配制：配制3份10%三乙胺水（10mL三乙胺：90 mL超纯水）溶液，分别用乙酸调节pH值为4.0/5.5/7.0。

表2 流动相梯度（28分钟）

时间（min）	流速（mL/min）	流动相B（%）
0	0.4	80
10	0.4	90
15	0.4	100
23	0.4	100
23.5	0.4	80
28	0.4	80

表3 流动相梯度（20分钟）

时间（min）	流速（mL/min）	流动相B（%）
0	0.4	90
3	0.4	90
6	0.4	100
14	0.4	100
15	0.4	90
20	0.4	90

3. 实验结果

3.1 流动相pH对脂质分离的影响

相同的流动相梯度（分析时间28分钟，表2），考察不同pH对脂质分离的影响，见图2和图3。配方1含有的脂质成分为SM-102、PEG2000-DMG、胆固醇和DSPC，配方2含有的脂质成分为ALC-0135、ALC-0159、胆固醇和DSPC。两种不同配方的脂质，在pH4.0时，阳离子脂质和PEG化脂质分离度差；在pH5.5时，两种不同配方的4种脂质分离度非常好；在pH7.0时，配方1的脂质分离度良好，但是配方2的脂质，在4个脂质的浓度均为10 ppm情况下，ALC-0135和DSPC的分离度为1.77。考虑到有的脂质含量比较高，线性范围较宽，因此选择pH5.5的流动相做后续实验优化。

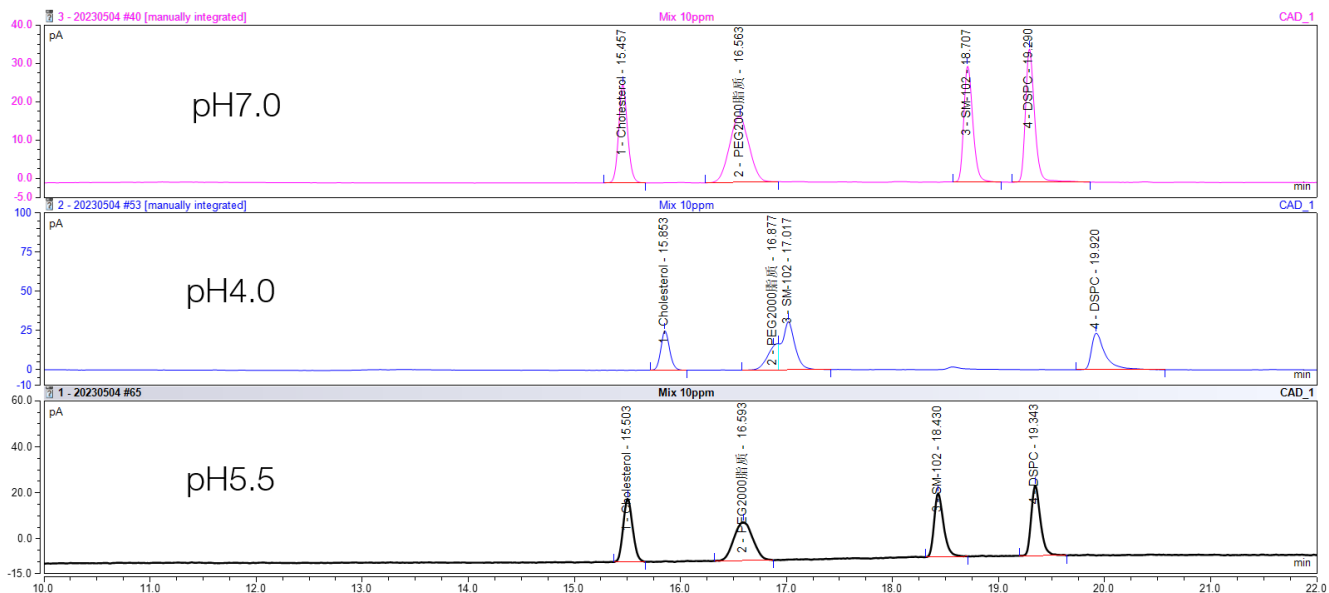


图2 配方1脂质谱图

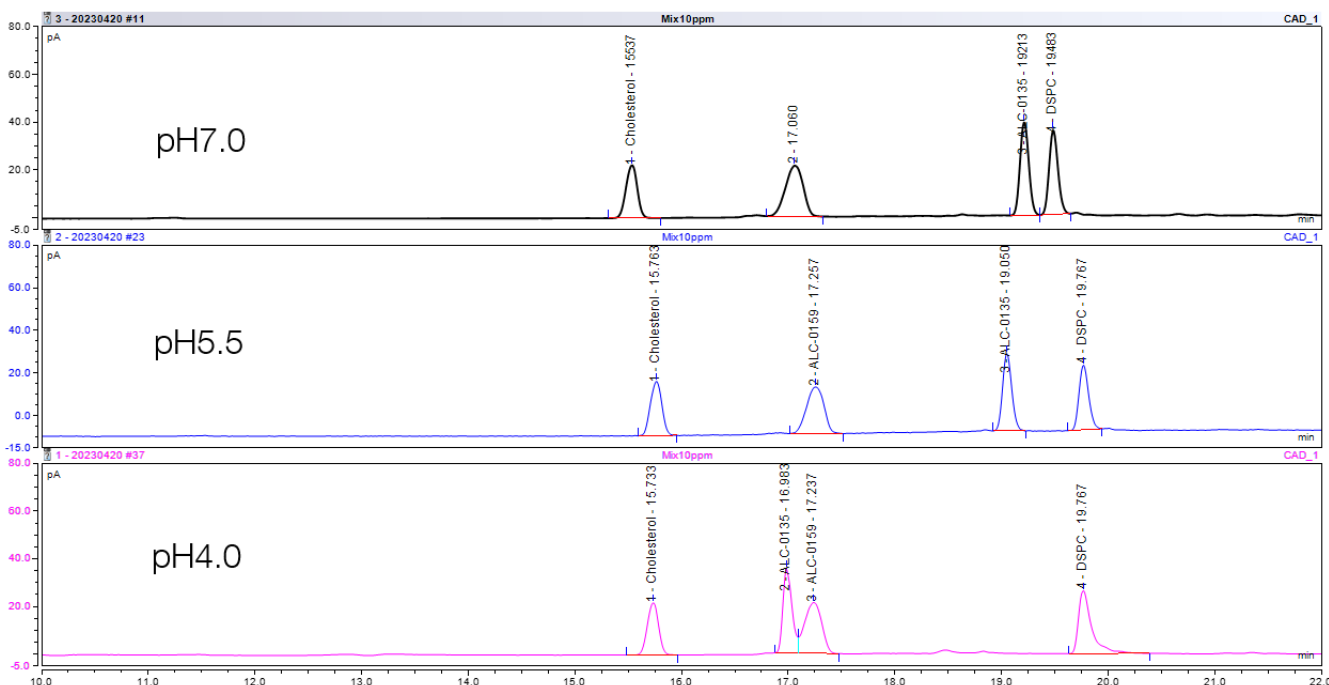


图3 配方2脂质谱图

3.2 分析梯度优化

目前分析梯度为28分钟，脂质均在15分钟后出峰，因此考虑适当缩短分析时间，提高分析效率，优化后的分析梯度（分析时间20分钟，表3），优化后的色谱图见图4。

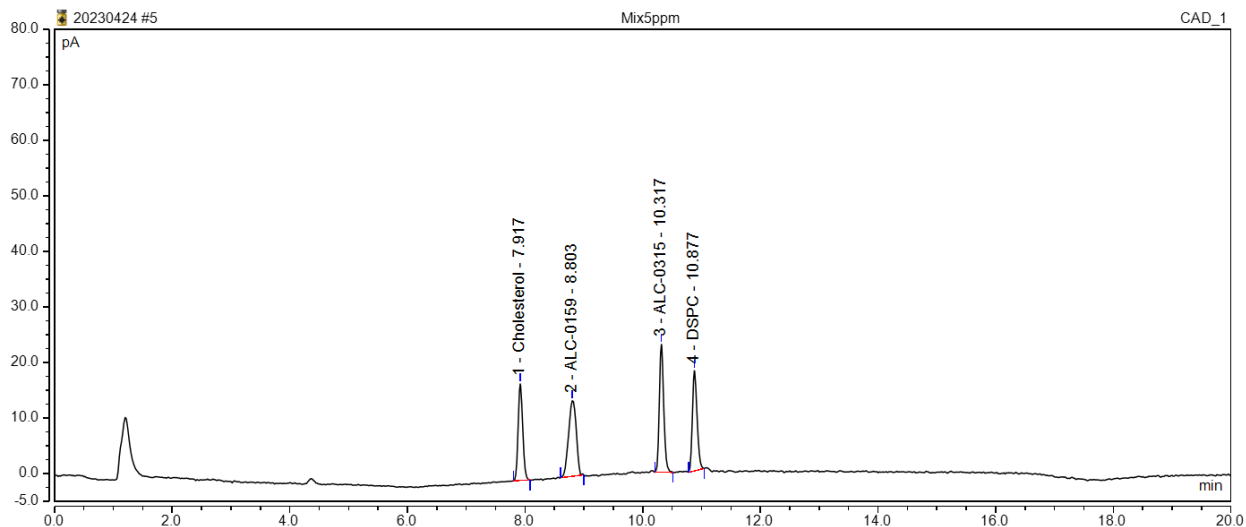


图4 配方2谱图

3.3 线性结果

配置配方2脂质的混标，线性浓度点分别为1 ppm、2 ppm、5 ppm、10 ppm、20 ppm、25 ppm，标准曲线和线性相关系数见图5。

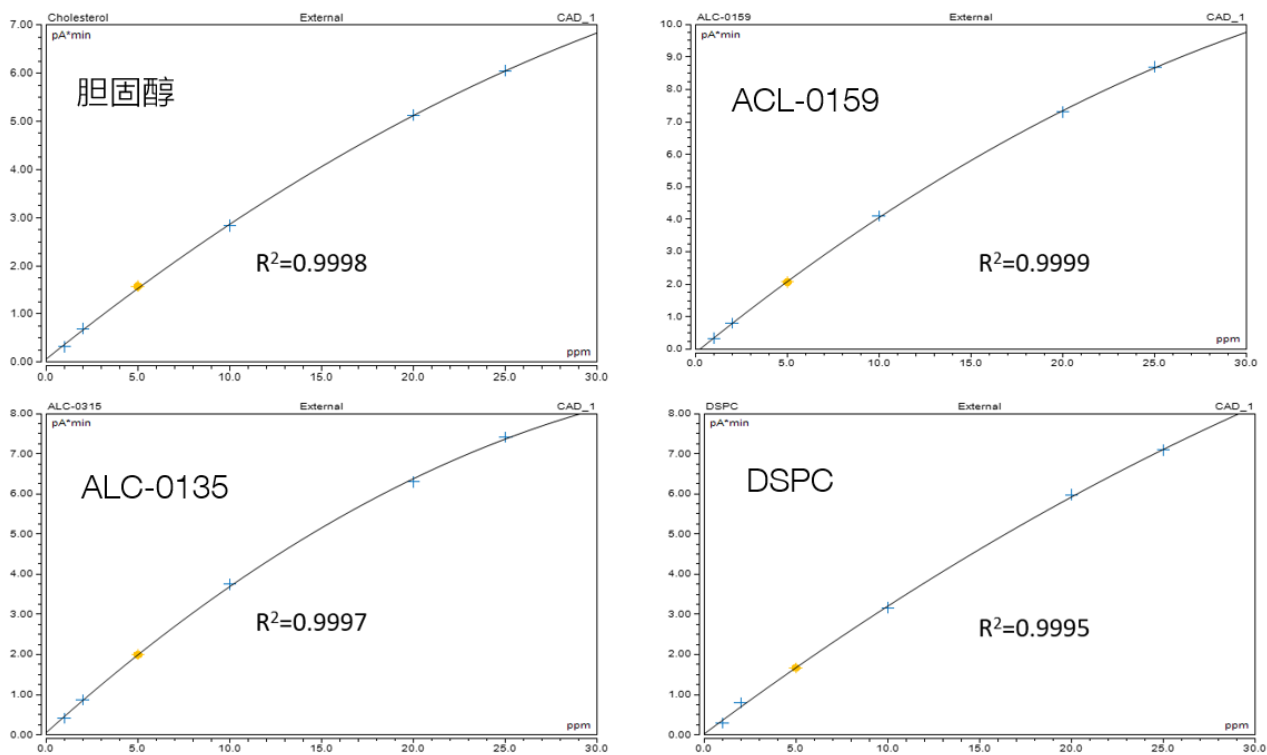


图5 配方2脂质标准曲线图

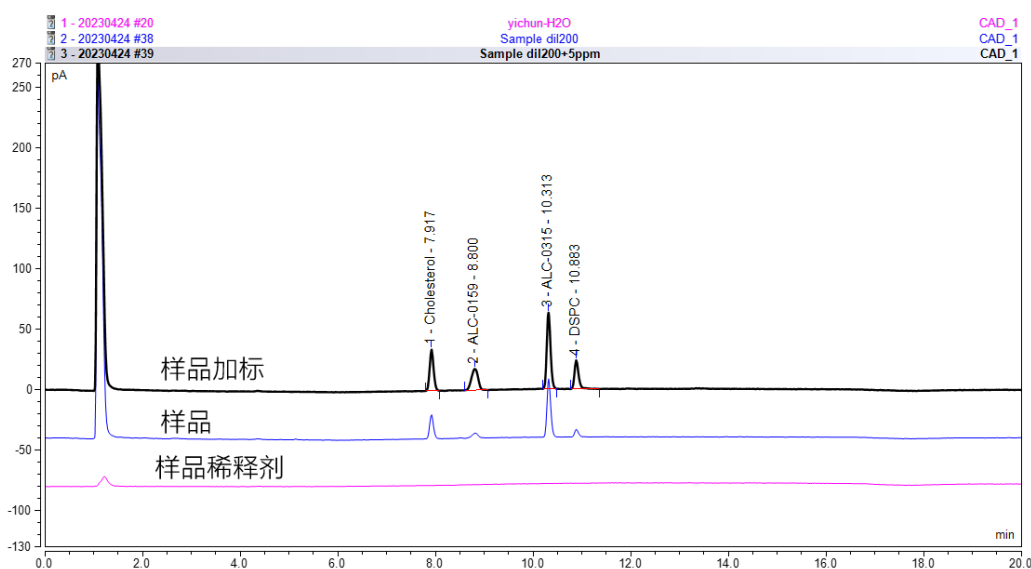
3.4 重复性和回收率

重复性：浓度均为5 ppm的脂质6针重复性结果见表4，重复性好。

表4 浓度均为5 ppm的脂质6针重复性结果

脂质体种类	保留时间RSD (%)	峰面积RSD (%)
胆固醇	0.041	1.06
ALC-0159	0.081	1.81
ALC-0135	0.024	1.84
DSPC	0.049	3.13

回收率：将样品用无水乙醇稀释适当倍数及加入标准品，使得最终样品中含加入的标准品浓度均为5 ppm，色谱结果见图6，回收率分别为：胆固醇为100.5%，ALC-0135为104.0%，ALC-0159为101.5%，DSPC为112.5%。



4. 结论

利用Vanquish的高压二元泵系统的多溶剂通道快速筛选合适的流动相条件，最终确定选用pH5.5的TEAA流动相条件来分析配方1脂质和配方2脂质。利用优化的色谱条件（分析时间20 min）进行配方2脂质的标准曲线测定、重复性、回收率测试，4种脂质在浓度1 ppm-25 ppm范围内，线性相关系数均大于0.999，保留时间和峰面积重复性良好，回收率良好。本方法可以应用于mRNA疫苗或mRNA药物中脂质的快速检测分析。若遇到阳离子脂质和PEG化脂质分离度需要优化时，可以通过调整流动相的pH值，以达到更好的分离度的目的。

参考文献

[1] Caleb Kinsey, Tian Lu, Kim Vuolo. Determination of lipid content and stability in lipid nanoparticles using ultra high-performance liquid chromatography in combination with a Corona Charged Aerosol Detector. *Electrophoresis* 2021, 0, 1-10.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

thermo scientific