

Vanquish Flex结合CAD检测器同时测定mRNA疫苗中5种脂质体

吴燕娇 杨艳 金燕

赛默飞世尔科技（中国）有限公司色谱质谱部

关键词

Vanquish Flex, CAD, 脂质体

摘要

本文通过Vanquish Flex超高效液相色谱仪结合质量通用型检测器CAD电雾式检测器建立测定mRNA疫苗中脂质体的方法。本方法灵敏度高，操作检测，线性范围宽，可以用来测定疫苗中脂质体的含量。

1. 引言

随着全球获批上市或者紧急使用的新冠疫苗不断增加，疫苗的产能也在不断增加，疫苗的种类可以分为传统灭活疫苗、腺病毒载体疫苗和mRNA疫苗。其中mRNA疫苗在全球抗击疫情战役中表现亮眼。LNPs是抗击新冠（COVID-19）疫情的重要武器—mRNA疫苗的关键成分，在有效保护mRNA并将其运输到细胞当中发挥着举足轻重的作用。

LNP主要由磷酸类脂、胆固醇、硬脂胺等组成的单层或多层双分子夹水结构，可包裹多种疫苗，并有效地将抗原送至细胞对应靶点。其作用机制与铝佐剂相似，具有储存库效应，并可以增强抗原递呈细胞（APC）对抗原的摄入。

2020年8月国家药监局药审中心发布《新型冠状病毒预防用疫苗研发技术指导原则（试行）》及新型冠状病毒预防用mRNA疫苗药学研究技术指导原则（试行）等5个指导原则。在指导原则中明确规定应明确制剂处方中每种组分的作用及含量，提供佐剂、缓冲液、盐浓度、pH值以及其他辅料的选择依据。

由上述介绍可以看出，LNP组成成分都没有紫外吸收，然而其成分的测定又成为必然。CAD电雾式检测器较传统紫外检测器、ELSD检测器等有着独特的优势。本文采用超高效液相结合CAD检测器对LNP成分进行分析检测。



图1 CAD检测器（左：Vanquish CAD系列；右：Corona Veo系列）

2. 实验方法

2.1 仪器

Vanquish Flex系列

泵：Binary Pump F

自动进样器：Split Sampler FT

柱温箱：Column Compartment H

检测器：Charged Aerosol Detector H

变色龙色谱管理软件 Chromeleon CDS 7.3

2.2 试剂与标准品

1.2.1 试剂：三乙胺、乙酸、甲醇（色谱级，Fisher公司）、去离子水（18.2 MΩ@25°C，纯水机）。

2.3 样品

LNP样品、制剂样品，DSPC、Chol、PEG以及自制脂质体均来自客户

2.4 色谱条件

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

流动相: 5%TEAA缓冲液水溶液-5%TEAA缓冲液甲醇溶液 (2:98)

柱温: 50℃ (配主动预热)

流速: 0.4mL/min

进样量: 10μL

检测器参数: 过滤常数: 3.6s, 雾化温度: 50℃, 采集频率: 5Hz

2.5 样品配置

标准品贮备液: 精密量取DSPC, Chol, PEG-lipid, 佐剂A及佐剂B各100μ置于同一小瓶中, 加甲醇稀释至浓度为50μg/ml的溶液。

分别精密量取标准贮备液5μl、10 μl、20 μl、40 μl、100 μl、200 μl稀释制成0.25、0.5、1、2、5、10μg/ml的溶液以及标准品贮备液作为线性实验溶液。

精密量取标准贮备液稀释制成0.125μg/ml的溶液作为检测限溶液。

样品: 精密量取样品溶液100μL, 加甲醇稀释至1 mL。

精密量取上述溶液10 μl, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

3. 实验结果

3.1 专属性与线性

通过不同浓度的混标溶液考察专属性与线性。

混标溶液的典型色谱图如图2所示, 结果表明5种脂质体, 该方法条件下分离效果、峰形及峰响应均良好, 且基本无基质干扰的影响。

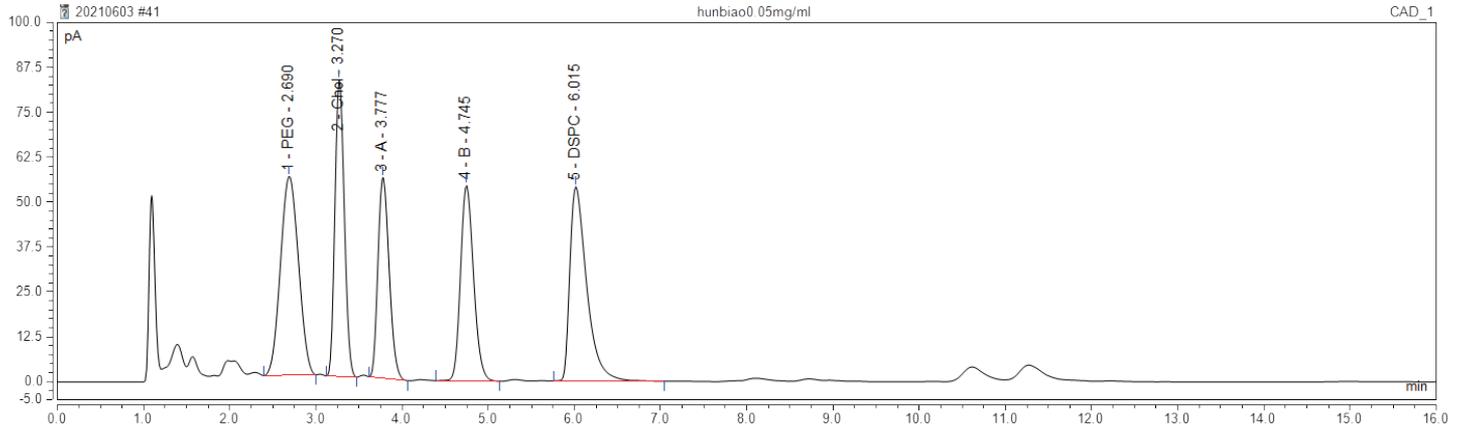
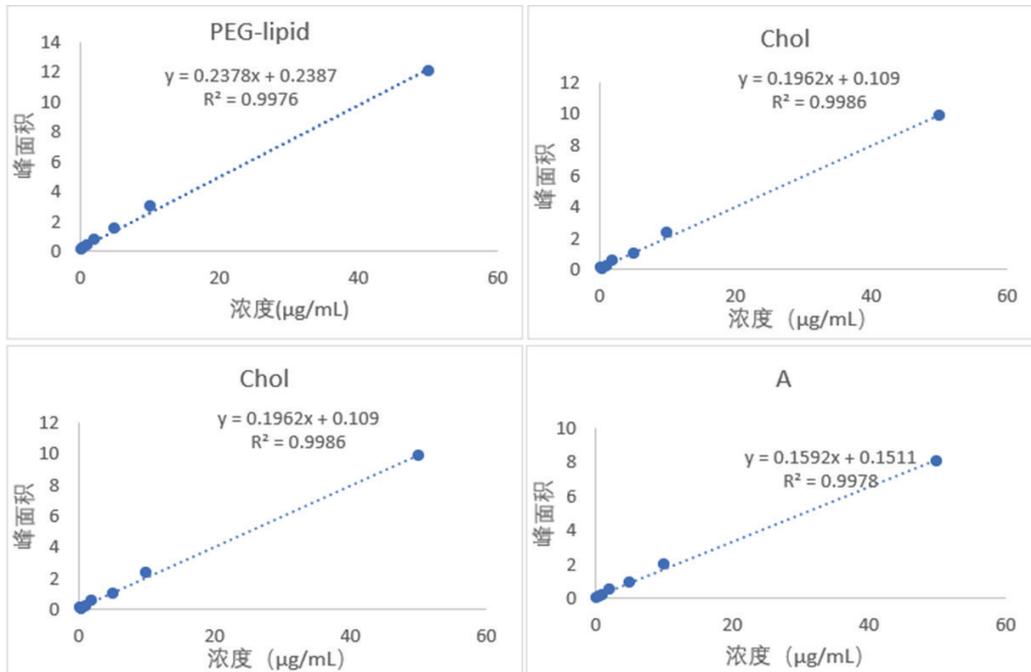
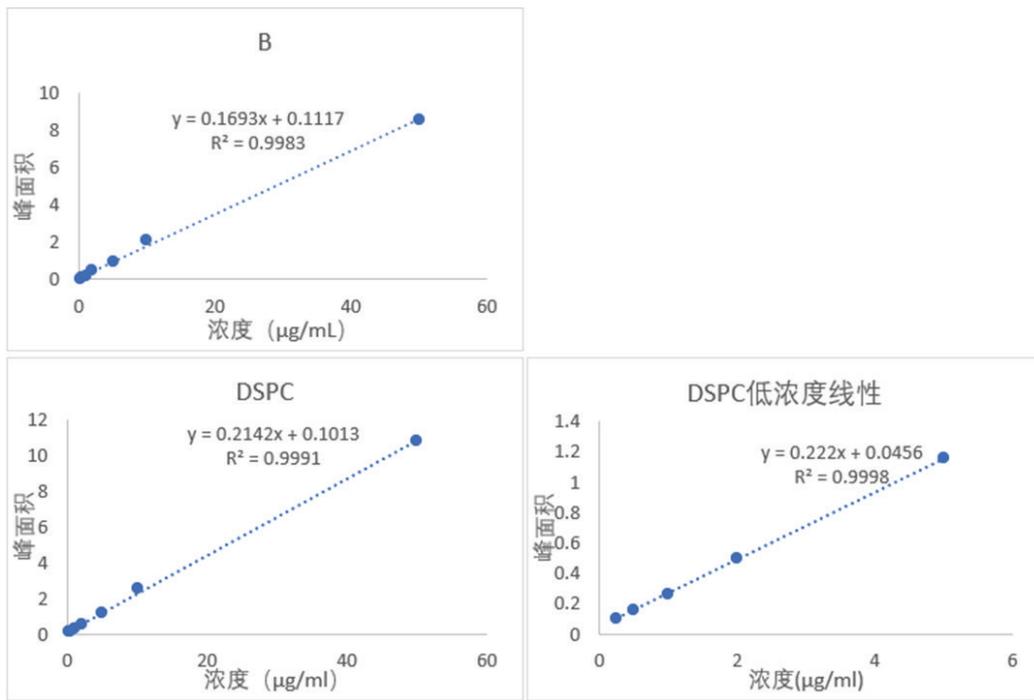


图2 系统适用性色谱图

通过采用7种不同浓度的标准校正溶液考察线性情况。结果如图2所示, 在0.25-50μg/L的浓度范围内线性良好, 线性相关系数R²均大于0.998。该校准曲线可用于mRNA疫苗中5中脂质体的分析。





选择浓度为 $0.25\mu\text{g/L}$ 的定量限溶液2进样计算方法的检测限 ($S/N=10$)，得到PEG-lipid、Chol、A、B及DSPC的定量限为 $0.25\mu\text{g/L}$ 。
 选择浓度为 $0.125\mu\text{g/L}$ 的检测限溶液进样计算方法的检测限 ($S/N=3$)，得到PEG-lipid、Chol、A、B及DSPC的检测限为 $0.125\mu\text{g/L}$ 。

3.2 实际样品测定

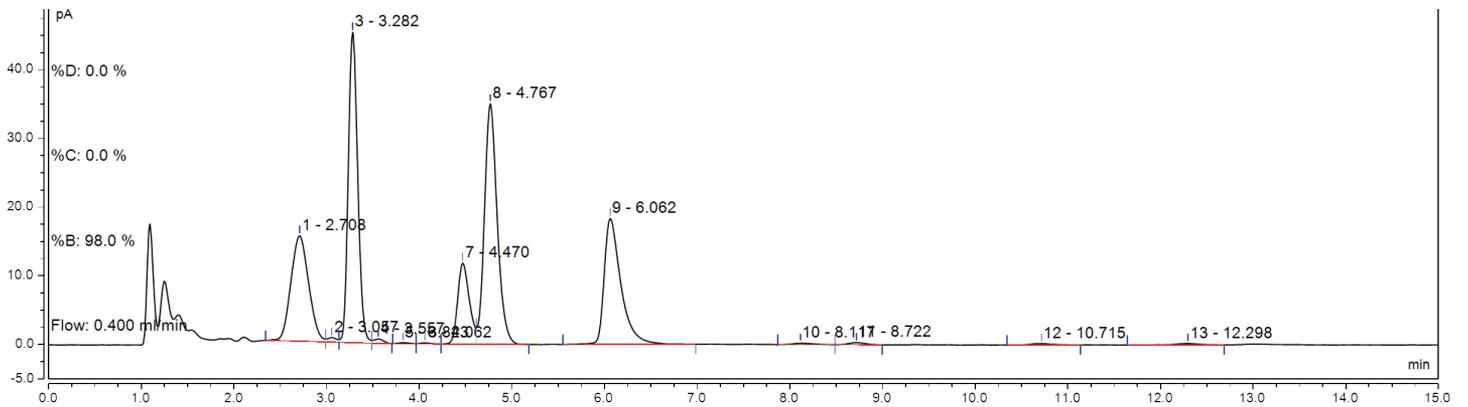


图3 制剂样品色谱图

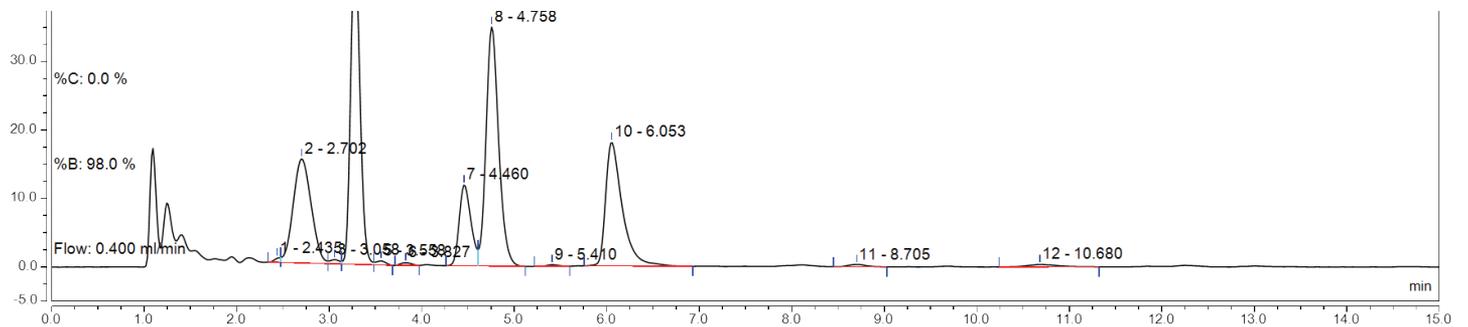


图4 LNP样品实际图

结论

本文建立了一种高效的HPLC方法，采用CAD电雾式检测器检测疫苗中的脂质体载体，灵敏度高，分离度好。样品前处理简单，样品经甲醇稀释后可直接进样分析，为疫苗行业的脂质体分析提供了一个新的思路。



赛默飞
官方微信



赛默飞色谱
和质谱中国

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC