

使用BioAccord LC-MS系统快速分析脂质纳米颗粒成分

Giorgis Isaac, Nilini Ranbaduge, Bonnie A. Alden, Colette Quinn, Weibin Chen, Robert S. Plumb

Waters Corporation

摘要

COVID-19 mRNA疫苗近来的成功部分归功于脂质纳米颗粒(LNP)递送系统的发展。LNP中包含四种脂质成分（胆固醇、DSPC、可电离脂质和PEG化脂质），控制这些脂质的质量和纯度非常重要。我们使用ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱和BioAccord系统开发了一种简单、快速、常规的LC-MS方法，用来表征和分析LNP成分。LNP成分、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、1,2-二亚油酸-3-二甲氨基丙烷(MC3)和PEG化脂质的检出浓度为5 pg/μL，胆固醇的检出浓度为250 pg/μL。开发的方法可用于分析复杂的牛肝脂质提取物，所有主要脂质类别都能检出。该方法可以同时分析LNP中的四种脂质成分以及其他由合成过程、降解或原料污染产生的杂质。

优势

- 一种简单、快速、常规的LNP脂质成分分析方法
- 在工艺开发和质量控制环境中同时分析LNP成分和杂质
- BioAccord系统结合waters_connect信息学平台为数据采集和处理提供了精简的分析工作流程
- 在BioAccord系统上，DSPC、可电离脂质和PEG化脂质的检测限低至5 pg/μL（柱上进样量25 pg），胆固醇的检测限低至250 pg/μL（柱上进样量1.25 ng）

简介

脂质纳米颗粒(LNP)是mRNA疗法或疫苗的优选递送载体。SARS-CoV-2 mRNA疫苗临床试验近来的成功部分归功于脂质纳米颗粒递送系统的发展¹。LNP可以实现高效封装，mRNA的大小几乎不受限制，因此比其他转基因递送载体更为独特^{1,2}。就其在疫苗中的作用而言，它们具有刺激非特异性免疫系统而不诱导免疫原性的额外优势²。此外，用LNP封装mRNA可以保护mRNA免受酶攻击，还可以增强细胞摄取和表达¹。LNP通常由四种脂质组成(图1)，每种脂质都起着特定作用。LNP的主要成分为可电离/阳离子脂质，该成分通常占LNP组成的一半，可提升效价，是目前具有重要开发意义和知识产权的成分。早期临床试验中使用的LNP主要成分为1,2-二亚油酸-3-二甲氨基丙烷(Dlin-MC3-DMA (MC3))²。下一种普遍使用的脂质是胆固醇；它可以增强LNP的稳定性并促进膜融合^{3,4}。还有另外两种脂质：聚乙二醇化脂质(PEG化脂质)和磷脂(如二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC))，也称为辅助脂质。聚乙二醇(PEG)可降低聚集趋势并保护LNP免受免疫细胞的非特异性内吞作用影响。DSPC和胆固醇是天然脂质，可电离脂质和PEG化脂质是合成脂质。可电离脂质的化学结构、PEG化脂质的稳定性以及四种脂质的比例发生微小变化都会改变LNP的性质和递送效率¹。

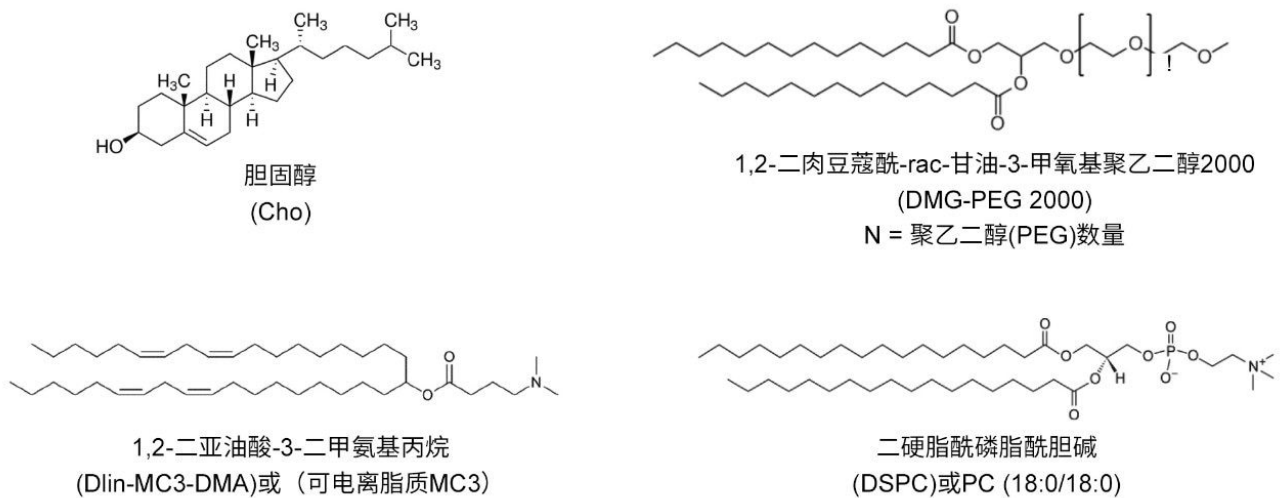


图1.研究的四种脂质纳米颗粒成分的结构

LNP所用脂质材料的鉴定和纯度都属于关键质量属性，与之几乎同等重要的是监测和定量完整原料杂质和潜在降解物。液相色谱(LC)技术可以分离复杂混合物中的脂质，质谱技术可以进一步增加鉴定结果可信度，尤其是监测可能的微量杂质和降解物时。本研究我们将介绍一种简单、快速、常规的液相色谱-质谱(LC-MS)联用方法，采用

ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱和BioAccord系统分析LNP中的脂质成分。BioAccord系统配置包含ACQUITY UPLC I-Class PLUS、ACQUITY TUV检测器和ACQUITY RDa检测器。沃特世开发出一套稳定、易用且体积小巧的LC-MS平台 - BioAccord系统，旨在提供适用于生物治疗药物和核酸分析的MS分析方法，同时可供过去无法部署LC-MS技术的机构和操作人员使用。正如此前发布的出版物所示，通过结合ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和ACQUITY RDa质谱检测器，BioAccord系统能够自动完成色谱分离和精确质量数测定并且重现性高。该系统在符合法规要求的waters_connect信息学平台下运行，是脂质纳米颗粒产品开发和商业化团队获取脂质成分结构、组成和鉴定信息的理想选择。

实验

样品描述

胆固醇、DSPC和MC3各自的脂质标准品均购自Sigma，DMG-PEG-2000购自Avanti Polar Lipids。用甲醇制备1 mg/mL的胆固醇和DMG-PEG-2000储备液。用甲醇/氯仿(1/1)制备1 mg/mL的DSPC和MC3储备液。用甲醇稀释储备液，制备每种脂质标准品或混合制品各种工作浓度的溶液。

牛肝总脂质提取物购自Avanti Polar Lipids。用氯仿/甲醇(2/1, v/v)制备5 mg/mL的提取物储备液。然后用甲醇稀释储备液，制备0.1 mg/mL的工作溶液。

液相色谱条件

LC-MS系统:	BioAccord LC-MS系统
样品瓶:	沃特世全回收UPLC样品瓶 (部件号: 186005669 CV)
色谱柱:	ACQUITY Premier CSH C ₁₈ , 2.1 × 100 mm, 1.7 μm (部件号: 186009461)
柱温:	55 °C

样品温度： 10 °C

进样体积： 5 μ L

流速： 400 μ L/min

流动相A： 含0.1%甲酸的600/390/10乙腈/水/1 M甲酸铵水溶液

流动相B： 含0.1%甲酸的900/90/10异丙醇/乙腈/1 M甲酸铵水溶液

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	50	50	初始
0.5	0.4	47	53	6
4.0	0.4	45	55	6
7.0	0.4	35	65	6
7.5	0.4	20	80	1
10.0	0.4	1	99	6
11.0	0.4	1	99	1
12.0	0.4	50	50	1

质谱条件

质谱系统:	ACQUITY RDa质谱检测器
模式:	碎裂模式下的全扫描MS (在低 (固定) 和高 (梯度) 锥孔电压下同时进行双功能通道采集)
质量范围:	50~2000 <i>m/z</i>
极性:	ESI正离子(1.5 KV)
扫描速率:	10 Hz
锥孔电压:	30 V
碎裂锥孔电压:	120-200 V

数据管理

使用waters_connect平台上运行的具有精确质量数筛查工作流程的UNIFI科学信息系统进行数据采集和处理。

结果与讨论

LC-MS方法被广泛用于分离和分析不同来源的脂质，将其归类为不同的脂质或分子类别。正相(NP)色谱和亲水作用色谱(HILIC)是分离不同类别脂质的两种常用技术，而反相(RP)色谱多用于分离同一类别但分子种类不同的脂质。使用ACQUITY Premier CSH C₁₈ RP色谱柱分离LNP脂质成分相比其他RP色谱柱可提供更高的覆盖率和分离度^{5,6}。这些脂质的紫外吸光度较低甚至没有，因此应使用替代检测器 (例如ACQUITY RDa质谱检测器) 来提高分析灵敏度。使用BioAccord系统分析通过甲醇稀释储备液得到目标浓度的混标。典型的提取离子色谱图见图2A。脂质的洗脱顺序为DMG-PEG-2000、胆固醇、可电离脂质MC3和DSPC。图2B显示了四种代表性脂质DMG-PEG-2000、胆固醇(*m/z* 369.352)、可电离脂质MC3 (*m/z* 642.627)和DSPC (*m/z* 790.618)的相应质谱图。DMG-PEG-2000的合并质谱图如图2B (上图) 所示。DMG-PEG-2000在LC-MS条件下形成铵加合物，在谱图中观察到多个电荷态 (+2、+3和+4)。

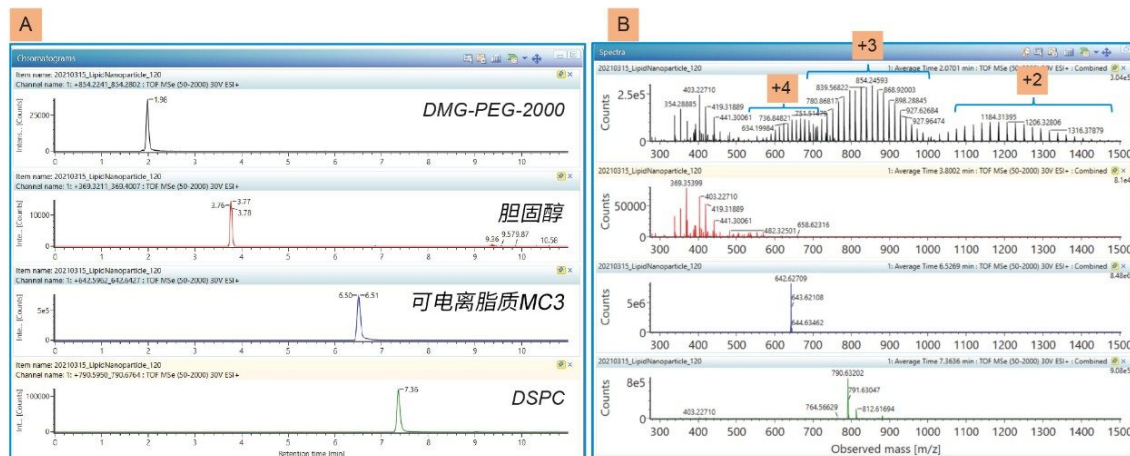


图2.(A) 正离子模式下的提取离子色谱图和(B) DMG-PEG-2000、胆固醇(m/z 369.352)、可电离脂质 MC3 (m/z 642.627)和DSPC (m/z 790.618)的相应质谱图。PEG化脂质以带38-50个聚乙二醇重复单元的+2、+3和+4多电荷系列形式存在。质谱图及其相应的色谱图采用同样的颜色编码。

为鉴定各脂质成分，我们首先在UNIFI科学库中创建了一个包含各种脂质化合物的自定义数据库（谱库）。有关如何使用UNIFI科学库创建数据库的详细步骤说明，请参阅其他文件⁷。图3显示了采用UNIFI成分分析工作流程的样品分析结果示例，包括成分概要、色谱图和质谱图。图3A为成分概要表，其中列出了通过自定义脂质LNP数据库鉴定出的所有成分。每种鉴定出的脂质的提取离子色谱图、低能量母离子谱图和相应的碎片离子谱图分别见图3 B、图3C和图3D。UNIFI将比较和匹配预期模拟碎片与实验得到的HRMS碎片，以进行结构表征。如果需要，可以单击蓝色图标检查每个碎片离子谱图，并将其发送到UNIFI科学库以创建包含碎片离子信息的自定义脂质LNP数据库。

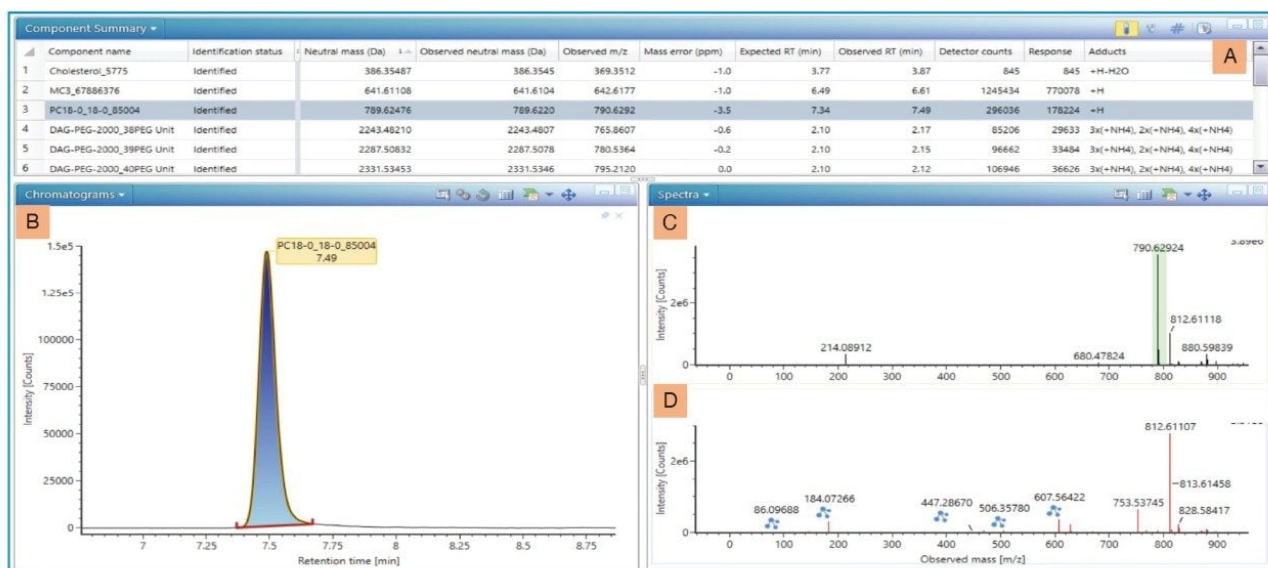


图3.成分概要图：(A)鉴定出的胆固醇、阳离子脂质MC3、DSPC和13种不同DMG-PEG-2000的脂质纳米颗粒，(B) DSPC的提取离子色谱图示例，(C) DSPC的低能量精确质量数和(D) DSPC相应的碎片离子谱图。蓝色图标表示匹配的预期模拟碎片离子与实验得出的碎片离子。

所有已鉴定脂质的结果都会显示在成分确认表（图4A）或成分图（图4B）中。图4A显示了DMG-PEG-2000、胆固醇、可电离脂质MC3和DSPC中已鉴定脂质的完整成分概要列表。在ESI正离子模式下，PEG化脂质在图4A中显示多种电荷态（+2、+3和+4）。此外，DMG-PEG-2000以不均一的多分散聚合物形式存在，并且包含长度不均匀的PEG链，范围从38到50个(CH₂CH₂O)单元不等。单分散聚合物是均一的聚合物，其中所有分子都具有相同的PEG聚合度，且m/z值相同且单一。基于PEG单元的多分散性，共鉴定出13种不同的PEG化脂质。

Component name	Identification status	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
Cholesterol_5775	Identified	386.35487	386.3545	369.3512	-1.0	3.77	3.67	845	845	+H-H2O
MC3_67886376	Identified	641.61108	641.6104	642.6177	-1.0	6.49	6.61	1245434	770078	+H
PC18-0_18-0_85004	Identified	789.62476	789.6220	790.6292	-3.5	7.34	7.49	296036	178224	+H
DAG-PEG-2000_38PEG Unit	Identified	2243.48210	2243.4807	765.8607	-0.6	2.10	2.17	85206	29633	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_39PEG Unit	Identified	2287.50832	2287.5078	780.5364	-0.2	2.10	2.15	96662	33484	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_40PEG Unit	Identified	2331.53453	2331.5346	795.2120	0.0	2.10	2.12	106946	36626	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_41PEG Unit	Identified	2375.56074	2375.5646	809.8887	1.6	2.10	2.10	112716	38467	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_42PEG Unit	Identified	2419.58696	2419.5936	824.5650	2.7	2.10	2.07	116200	40352	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_43PEG Unit	Identified	2463.61317	2463.6206	839.2407	2.9	2.10	2.05	116558	40105	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_44PEG Unit	Identified	2507.63939	2507.6484	853.9166	3.5	2.10	2.02	115456	39762	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_45PEG Unit	Identified	2551.66560	2551.6727	868.5914	2.7	2.10	2.00	110101	37981	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_46PEG Unit	Identified	2595.69182	2595.7000	883.2671	3.1	2.10	1.98	102827	35470	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_47PEG Unit	Identified	2639.71803	2639.7264	897.9426	3.1	2.10	1.96	92260	31092	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_48PEG Unit	Identified	2683.74425	2683.7498	912.6171	2.0	2.10	1.94	81179	27228	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_49PEG Unit	Identified	2727.77046	2727.7738	927.2918	1.2	2.10	1.92	69132	22560	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)
DAG-PEG-2000_50PEG Unit	Identified	2771.79668	2771.8041	941.9685	2.6	2.10	1.90	56491	17903	3x(+NH4), 2x(+NH4), 4x(+NH4)

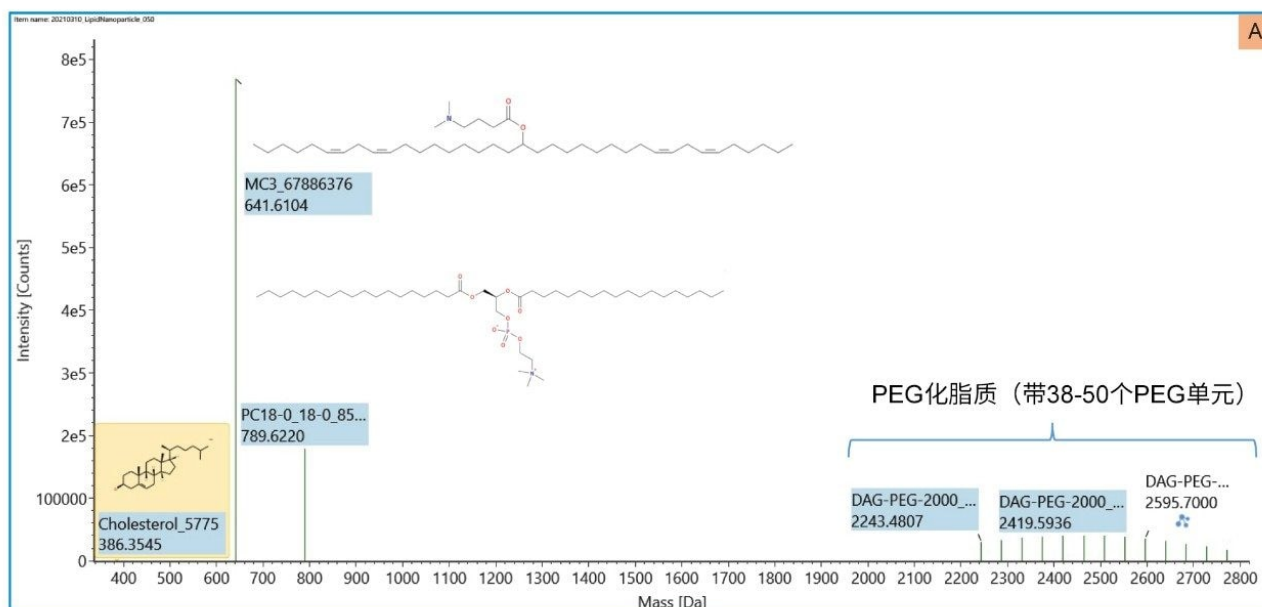


图4.(A)胆固醇、可电离脂质MC3、DSPC和DMG-PEG-2000的已鉴定脂质纳米颗粒成分概要列表。(B)四种已鉴定脂质的成分图，已标注相应的化合物名称和结构。单击蓝色图标即可查看脂质结构。

使用各脂质储备液制备浓度范围0.1-500 pg/ μ L的系列稀释液，在六个浓度水平下进行分析，评估BioAccord系统的检测限。图5显示了浓度为1、5、50、100、250和500 pg/ μ L的可电离脂质MC3的代表性概要图。可电离脂质MC3、DSPC和DMG-PEG-2000的检测下限确定为5 pg/ μ L（柱上进样量25 pg），胆固醇的检测下限为250 pg/ μ L（柱上进样量1.25 ng）。

组分: MC3_67886376

汇总依据: 响应

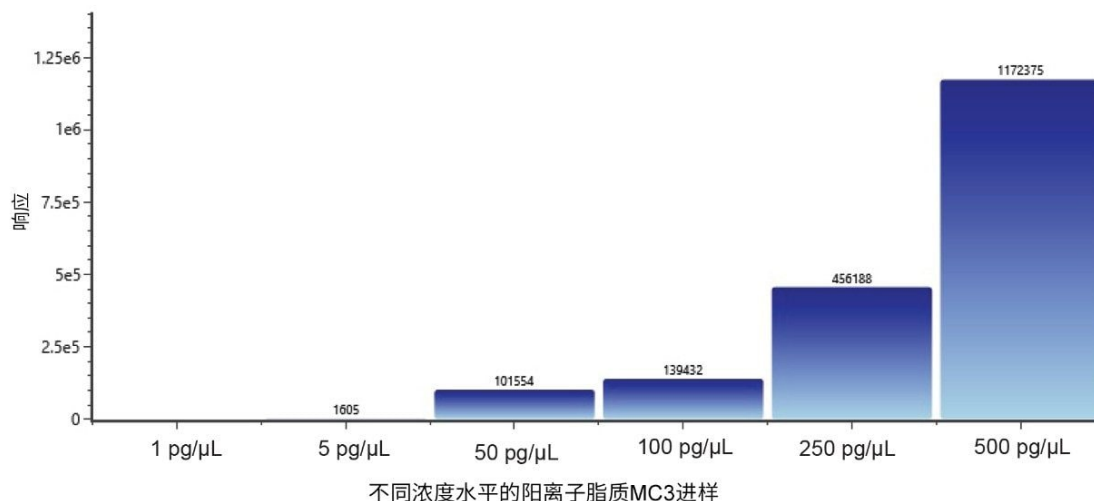


图5.直观显示不同浓度水平下可电离脂质MC3响应的概要图示例

UNIFI中的二元比较功能可直接比较未知脂质样品与参比样品的分析结果。该功能非常有用，可以用于生成脂质原料或目标产品的LC-MS图谱，以便区分类似产品，鉴别罕见杂质，或比较多个生产批次的脂质质量。用户还可以使用该功能结合提取离子色谱图（图6A）或指定质谱图（图6C和6E）来比较未知样品中各脂质的丰度和参比样品的丰度，并显示为镜像对比图。在这种二元样品比较模式中，用户可以设置特定的匹配标准（RT和质量精度），以确定未知样品和参比样品的峰需要接近到哪种程度，才能将这两个峰视为相同的脂质成分。图6A显示了进样0.1 mg/mL Avanti牛肝脂质提取物（参比）样品和进样0.1 mg/mL添加有DMG-PEG 2000和可电离脂质MC3的Avanti牛肝脂质提取物（标记为“未知”）样品得到的镜像对比色谱图。仅在未知（即加标）样品中观察到两个特有峰，保留时间分别为2.02和6.62 min，表明存在加入的DMG-PEG 2000和MC3脂质。色谱图差异图（图6B）显示了这两个仅在未知样品中鉴定出的峰。为使二元比较功能获得理想比较结果，LC-MS分析需要可重现的RT测定，且样品组中所有进样的MS响应需一致。

图6C显示了DMG-PEG 2000未知样品和参比样品合并质谱图（保留时间为2.02分钟）的二元比较结果。参比样品和未知样品之间的谱图差异图如图6D所示。仅在未知样品谱图中清楚地观察到具有+2、+3和+4电荷态的特有PEG谱图模式（图6C和6D）。同样，可电离脂质MC3的未知样品（保留时间为6.62分钟）与参比样品的二元比较如图6E所示。参比样品和未知样品之间的差异图如图6F所示。MC3 (m/z 642.601)仅存在于未知样品中，谱图差异图表明MC3为未知样品中特有（图6E和6F）。

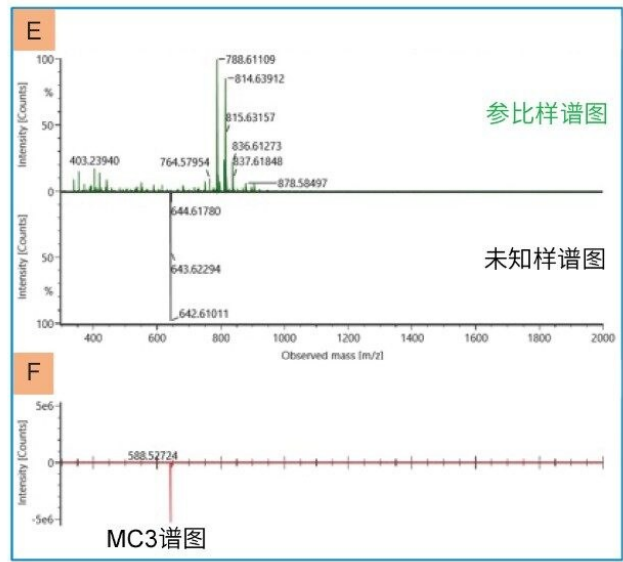
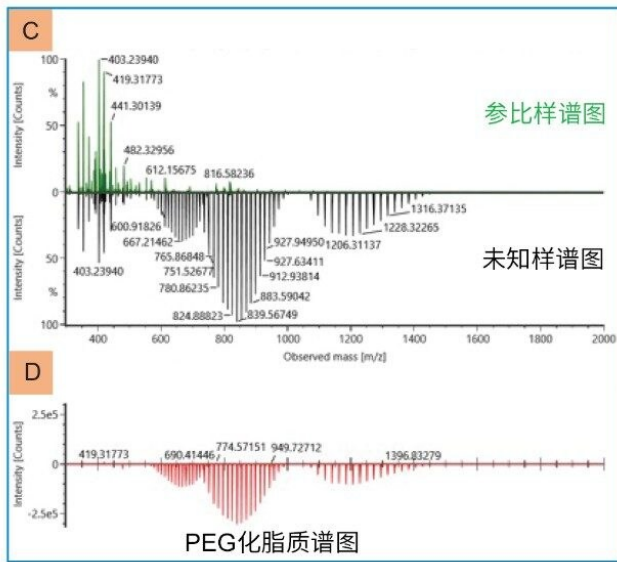
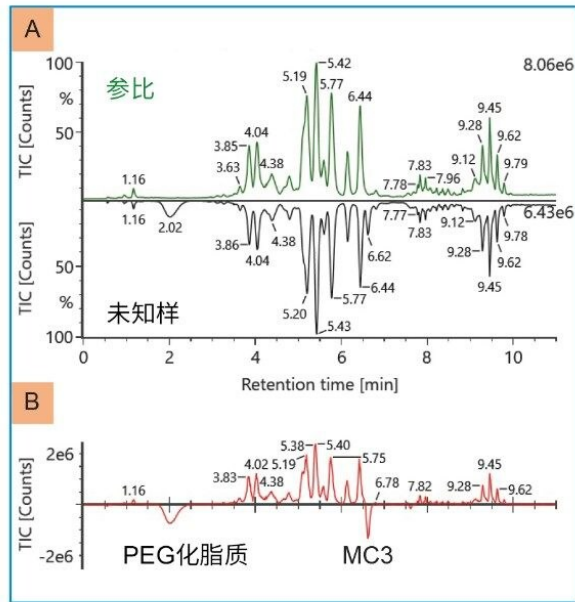


图6.(A) 0.1 mg/mL Avanti牛肝脂质提取物（上图：参比样品色谱图中的成分含量）和加标有可电离脂质MC3及DMG-PEG 2000的0.1 mg/mL Avanti牛肝脂质提取物（下图：未知样品色谱图中的成分含量）的色谱图二元比较。

(B) 参比样品和未知样品之间的色谱差异图（采用点到点扣除方法）。

(C) DMG-PEG 2000的合并质谱图二元比较（保留时间2.02 min）。

(D) 图6C中参比样品和未知样品之间的谱图差异图。

(E) 可电离脂质MC3的合并质谱图二元比较（保留时间6.62 min）。

(F) 图6E中参比样品和未知样品之间的谱图差异图。

我们采用开发的方法分析复杂牛肝提取物，以证明该方法普遍适用于分析其他类型的脂质化合物。我们使用该方法检测了所有主要的溶血磷脂、磷脂和中性脂质（图7）。结果表明，该方法可同时测定LNP组成以及LNP配制过程中因潜在降解、氧化、水解、氢化、聚集和二聚体形成而产生的任何其他杂质。

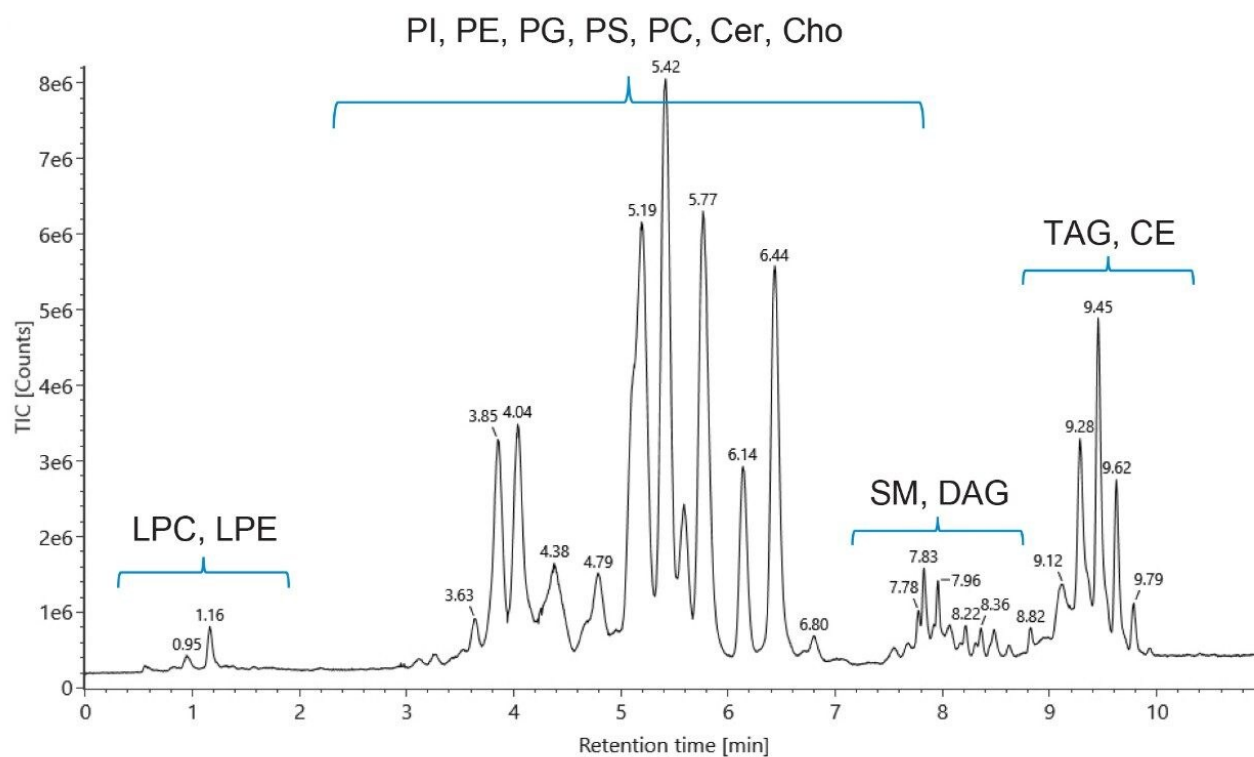


图7. Avanti Polar Lipids牛肝总脂质提取物的代表性正离子模式总离子色谱图。缩写：DAG，二酰基甘油；TAG，甘油三酯；PC，磷脂酰胆碱；PE，磷脂酰乙醇胺；PG，磷脂酰甘油；PS，磷脂酰丝氨酸；PI，磷脂酰肌醇；Cer，神经酰胺；SM，鞘磷脂；Cho，胆固醇；CE，胆固醇酯。

结论

我们开发了一种简单、快速、常规的反相LC-MS方法用于LNP成分分析，并在BioAccord系统上评估了该方法的性能，证明在工艺开发和质量控制中，该方法可以同时分析LNP成分与杂质。

参考资料

1. Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, Paige M, Gabriel Alameh M, Weissman D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines* 2021, 9, 65.
2. Hassett K., Benenato K., Jacquinet E., Lee A., Woods A., Yuzhakov O., Himansu S., Deterling J., Geilich B., Ketova T., Mihai C., Lynn A., McFadyen I., Moore M., Senn J., Stanton M., Almarsson O., Ciaramella G., and Brito L. Optimization of Lipid Nanoparticle for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2019, 15, 1–11.
3. Kauffman K., Dorkin R., Yang J., Heartlein M., DeRosa F., Mir F., Fenton O., and Anderson D. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Deliver *in Vivo* with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.* 2015, 15, 7300–7306.
4. Li W, Szoka FC. Lipid-based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery, 24(3) (2007) 438–449.
5. Isaac G, Munjoma N, Gethings L, Mullin L and Plumb R. Lipid Separation using UPLC with Charged Surface Hybrid Technology. Waters Application Note [720006959EN](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-robust-and-reproducible-reversed-phase-lipid-profiling-method-for-large-sample-sets.html) <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/a-robust-and-reproducible-reversed-phase-lipid-profiling-method-for-large-sample-sets.html>> .2020 July.
6. Damen CWN, Isaac G, Langridge J, Hankemeier T, Vreeken RJ. Enhanced Lipid Isomer Separation in Human Plasma using Reversed-Phase UPLC with Ion-Mobility/High-Resolution MS Detection. *J Lipid Res*. 2014 55(8):1772–83.
7. Mullin L, Cleland G, Graham K, Shah D, and Burgess J. Building a UNIFI Scientific Library for HRMS Screening Experiments. Waters Application Note [720004927EN](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2014/building-unifi-scientific-library-hrms-screening-experiments.html) <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2014/building-unifi-scientific-library-hrms-screening-experiments.html>> , 2014.

特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007296ZH, 2021年6月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号