

## 使用BioAccord™ LC-MS系统和waters\_connect™软件表征和监测脂质纳米颗粒成分中的杂质

---

Kellen DeLaney, Duanduan Han, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

脂质纳米颗粒(LNP)是核酸药物和疫苗的高效递送载体。而除了核心脂质成分外，这些脂质外壳的成分中通常还含有杂质。为了确保制剂的安全性，必须对这些杂质进行严格的筛选和表征。杂质分析是脂质原料筛选和LNP成分分析的关键，使用能够检出并且可靠鉴定微量杂质峰的仪器和信息学平台，可以明显简化分析过程。本研究证明BioAccord系统和waters\_connect软件是一种合适的解决方案，可以简化脂质原料以及LNP成分分析中杂质的分析和鉴定。

### 优势

- 使用waters\_connect信息学平台上的BioAccord LC-MS系统简化脂质杂质鉴定以及常规监测的数据采集和数据分析工作流程
- 借助waters\_connect平台上的集成式模拟碎裂工具，可以使用BioAccord LC-MS系统在数据非依赖型采集模式下鉴别和确认脂质

---

## 简介

开发脂质纳米颗粒(LNP)作为递送载体使mRNA疫苗和其他核酸药物取得了成功。这些脂质外壳用于封装和保护核酸有效载荷，即活性药物成分(API)，确保将其安全有效地递送到靶细胞。LNP主要由四种成分构成，分别是1)提供流动性的胆固醇(CHO)，2)作为辅助脂质的磷脂（二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)），3)产生亲水微胶粒外表面的聚乙二醇化脂质，以及4)可电离脂质，这是效价的主要驱动力。只要以正确的比例混合，这些脂质就能在引入的遗传物质周围自行组装，从而自发形成LNP。每一种脂质成分都可以内部合成或从第三方供应商处采购。无论来源如何，严格的分析对于原材料筛选以及LNP成分和杂质分析都至关重要。因此，我们需要可以促进脂质和杂质表征、鉴定以及监测应用的分析工具。

典型的LNP分析在上游和下游工作流程中使用不同的平台。光学工作流程通常包括紫外(UV)检测器和/或通用检测器，例如蒸发光散射检测器(ELSD)或电雾式检测器(CAD)，并且因为简单易用，通常用于下游的生产监控和QC工作流程。对于上游的表征工作流程，液质联用(LC-MS)是实现灵敏、详细分析的黄金标准。然而，在核心实验室之外的环境中，部署复杂的MS仪器可能具有挑战性。BioAccord系统旨在克服这些限制，成为一款占地面积小且易于操作和维护的台式飞行时间(ToF)质谱仪<sup>1</sup>。这款SmartMS赋能的系统增加了MS在核心实验室以外环境的易用性，包括MS专业知识匮乏和/或资源/预算有限的实验室。BioAccord MS平台具有高灵敏度，且经过精心设计，只需很少的调谐工作即可提供可重现的测定结果，从而能够筛选和检测LNP样品中的微量杂质。它能够执行MS<sup>F</sup>碎裂，这是一种数据非依赖型采集模式，当与集成式waters\_connect软件结合使用时，有助于鉴定和表征未知杂质。

本研究展示了waters\_connect信息学平台上的BioAccord系统如何以一个高效、简化的工作流程在LNP的原料筛选和成分分析中进行可靠的脂质杂质分析。

---

## 实验

本研究中的所有脂质只能用于研究和演示，并且是从商业渠道购买的。每种脂质储备液均使用甲醇制备，浓度为1 mg/mL。使用90/10的水/甲醇(v/v)稀释样品至合适的浓度。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：

ACQUITY Premier二元溶剂管理器系统

样品瓶：	TruView™最大回收样品瓶(P/N: 186005662CV)
样品瓶盖：	聚乙烯无隔膜螺旋盖(P/N: 186004169)
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH苯己基柱, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm (P/N: 186009474)
柱温：	50 °C
样品温度：	8 °C
进样体积：	3 μL
流速：	0.400 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸(v/v)的水溶液 (LCMS级)
流动相B：	0.1%甲酸(v/v)的乙腈溶液 (LCMS级)

## 梯度表

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.400	40.0	60.0	初始
6.00	0.400	10.0	90.0	6
8.00	0.400	10.0	90.0	6
8.50	0.400	40.0	60.0	6
12.00	0.400	40.0	60.0	6

## 质谱条件

质谱系统:	BioAccord
电离模式:	ESI+
采集范围:	50-2000 <i>m/z</i>
毛细管电压:	1.5 kV
锥孔电压:	30 V
碎裂锥孔电压:	100-150 V
脱溶剂气温度:	350 °C
智能数据捕获(IDC):	开

## 数据管理

使用集成了UNIFI应用程序（版本3.1.0.16）的waters\_connect信息学平台采集和处理数据。

---

## 结果与讨论

LNP制剂在投放市场前必须采取措施以筛选杂质并进行适当表征，确保所放行产品的安全性和有效性。本研究展示了如何使用BioAccord系统和waters\_connect信息学平台简化杂质分析。本文所述的案例研究是使用该工作流程在筛选原料时表征杂质，以及在成分分析中监测杂质。

### 利用内置的预测碎片离子匹配

在LNP分析工作流程中，碎片离子谱图有助于鉴别脂质纳米颗粒成分及其杂质。BioAccord仪器能够执行MS<sup>E</sup>数据非依赖型采集，在这种采集模式下，质量分析器在低能量谱图和高能量谱图之间循环，采集色谱分离过程中基本上所有化合物的母离子和碎片离子。该仪器使用能量梯度，以尽可能增加每个母离子在高能量谱图中生成的碎片离子数量。虽然这些谱图提供了丰富的信息来帮助鉴定化合物，但要以有意义的方式解析这些谱图可能非常耗时

，并且需要大量专业知识。

为了促进碎片离子谱图的解析并帮助鉴定分析物分子，可以使用waters\_connect平台中的UNIFI应用程序，它能够对已知结构进行模拟碎裂，从而将碎片离子与给定分子的预测碎片相匹配。要使用此功能，可以将结构文件以“.mol”文件的形式导入科学数据库，如图1A所示。然后在该分析的处理方法的“Target by Mass”（按质量数确定目标）部分选中标题为“Generate predicted fragments from structure”（根据结构生成预测的碎片离子）的框，即可启用模拟碎裂预测功能。具体设置如图1B所示。启用此功能后，任何碎片离子旁边都会显示相应的结构，这些碎片离子的质量数与高能谱图中组分的预测结构相匹配。这些结构可加快谱图解析过程，以快速确认成分鉴定结果。图1C和1D所示为两个分子（可电离脂质SM-102和胆固醇）的模拟碎片离子与高能谱图中的离子相匹配的示例。

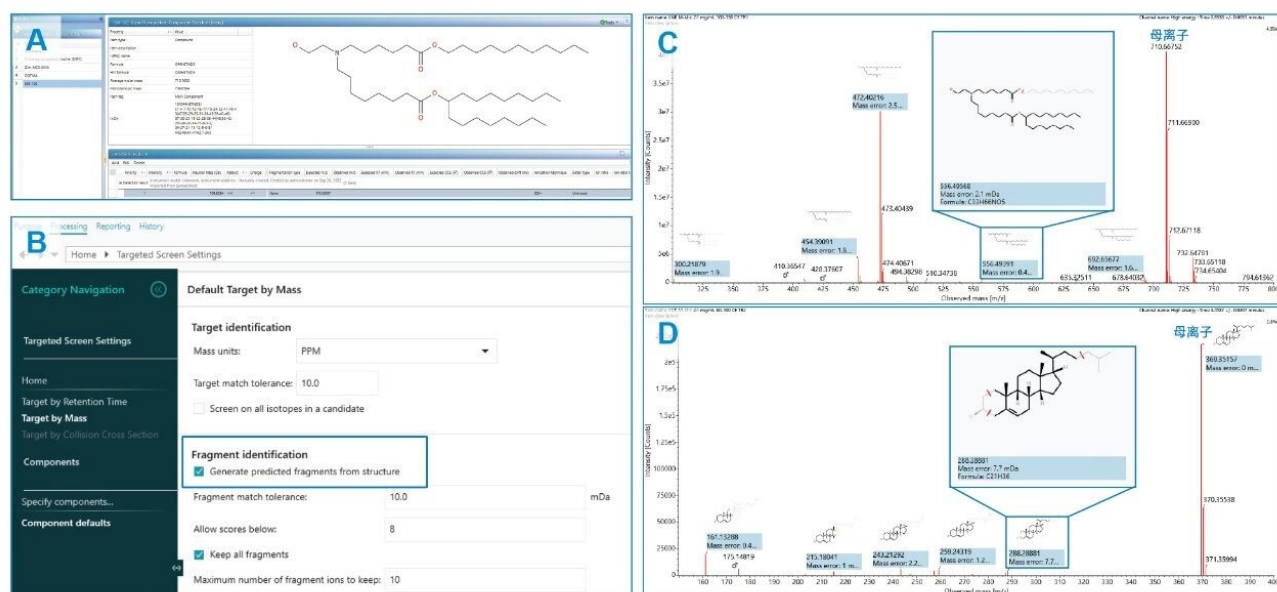


图1.在UNIFI应用程序中生成碎片离子的模拟预测结构的步骤，包括(A)在科学数据库中包含结构的.mol文件，(B)在分析方法中启用碎片离子结构预测，以及由此产生的(C) SM-102 和(D)胆固醇的碎片离子谱图。

## 原料筛选中的杂质表征

除了检测成分混合物中的杂质峰外，筛选原料中的杂质对于确保最终产品具有可接受的质量至关重要。曾有研究表明，来自不同供应商的原料，甚至是同一供应商不同批次的原料，可能具有独特的杂质概况<sup>2</sup>。额外的灵敏度以及母离子和碎片离子所提供的精确质量数信息改善了这些杂质的检测和解析，加快了工作流程。图2所示为Dlin-MC3-DMA样品在BioAccord系统上的示例，这是一种阳离子可电离脂质。检查TIC可以清楚地看到，除了3.38分

钟处的主峰之外还有多个峰。要推断性地为这些峰分配可能的鉴定结果，可以在搜索中加入主峰的预期转化。用户可以从处理方法中的常见转化列表中选择，例如氧化、还原或去饱和，如图2A所示。然后在UNIFI工作流程的化合物筛选步骤中使用每个选定转化的结果质量数。也可以选择使用碎片离子谱图信息来定位转化。通过搜索预期转化列表，可以根据母离子和碎片离子的准确质量数匹配来鉴定色谱图中的杂质峰。Review（查看）页面的Component Summary（组分概要）窗口中显示了检测到的Dlin-MC3-DMA转化列表（图2B）。图2C为Dlin-MC3-DMA筛选的基峰离子(BPI)色谱图，图中指示了各种转化。图2D和2E分别显示了其中一个氧化峰的低能量谱图和高能量谱图，并标示了母离子和碎片离子的 $m/z$ 值。

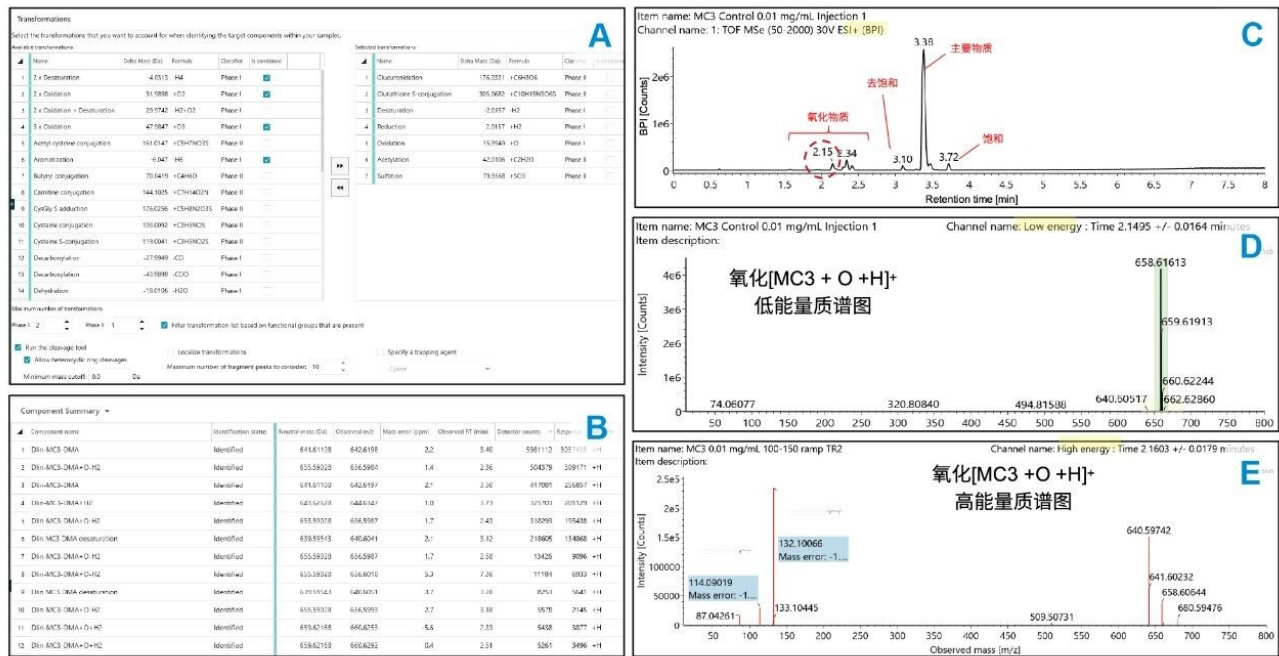


图2.使用UNIFI软件对可电离脂质Dlin-MC3-DMA进行原料筛选的结果，包括(A)选择要监测的转化，(B)检测到的转化结果列表，(C)标出了已鉴定杂质的基峰离子色谱图，(D) Dlin-MC3-DMA中氧化杂质的母离子的低能量质谱图，以及(E)同一种氧化杂质的高能量质谱图，标注了碎片离子。

为进一步解析杂质的结构，可以使用碎片离子谱图明确定位分子上的修饰。本研究以Dlin-MC3-DMA的氧化为例。该脂质可以观察到两种可能的氧化类型：1)极性头基上的胺氧化，和2)两个双键其中一个的环氧化。这些结构已添加到科学数据库中，可以在组分搜索时使用。为了改进氧化峰的分析，使用过氧化氢对Dlin-MC3-DMA样品进行氧化降解，然后在LC-BioAccord平台上分析。在模拟碎裂工具的帮助下查看碎片离子谱图可以看出氧化的实际位置，如图3所示。当使用胺氧化的结构来生成理论碎片时，几乎每个观察到的碎片离子都有匹配的结构，除此以外还



有关键碎片离子可以用于确认伯胺上的氧化位置。这些离子在图中标记为A、B和C。当使用双键环氧化结构来产生碎片离子时，不存在可能产生A或B的 $m/z$ 的碎裂。此外，标记为D的脂肪酸链碎片只能匹配氧从结构中裂解的情况。这些结果证实是胺基在发生氧化。

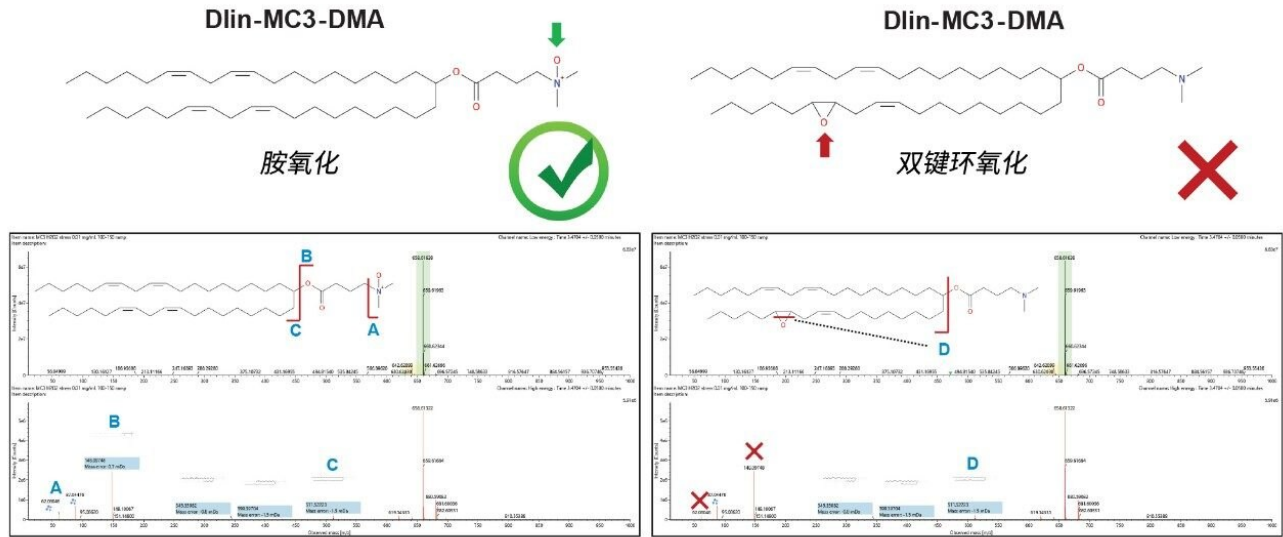


图3. *Dlin-MC3-DMA*分子上的氧化定位。两个结构都显示了可能的氧化位置，包括（左）极性头基胺基的氧化和（右）脂肪酸链中两个双键其中一个的环氧化。每个结构下方是低能量（母离子）和高能量（碎片离子）谱图，标记出根据每个结构的模拟预测匹配的碎片离子。指示氧化位置的关键碎片离子标记为A、B和C。标记为D的碎片离子与C是相同的峰，但对应于环氧化结构中不太可能的碎裂。

## LNP混合物的杂质监测

在成分分析过程中监测多个样品中的这些特征杂质时，不仅要确保脂质以适当的比例存在，在药品的开发和生产过程中能够可靠地检出任何低丰度杂质也很重要。为了便于跟踪样品中的杂质峰，可以使用项目标签来指定主要成分和先前表征的已知杂质。这些项目标签可以添加到科学数据库中，从而轻松在方法间转移。为了证明BioAccord系统检测微量杂质的能力，在四种LNP成分SM-102:CHO:DSPC:DMG-PEG 2000以1.0:0.42:0.22:0.11的比例混合的样品中加入了另一种可电离脂质DOTMA，为基峰强度的0.1%。图4A显示了分析该混合物得到的TIC色谱图。虽然与混合物中的其他成分相比，DOTMA峰看起来很低，但仍然可以被检测到，正如组分库（图4B），其中该成分已被“标记”为已知杂质（红色框），以及提取离子流色谱图（图4C）所示。这些工具有助于快速监测多个样品组中的已知杂质。

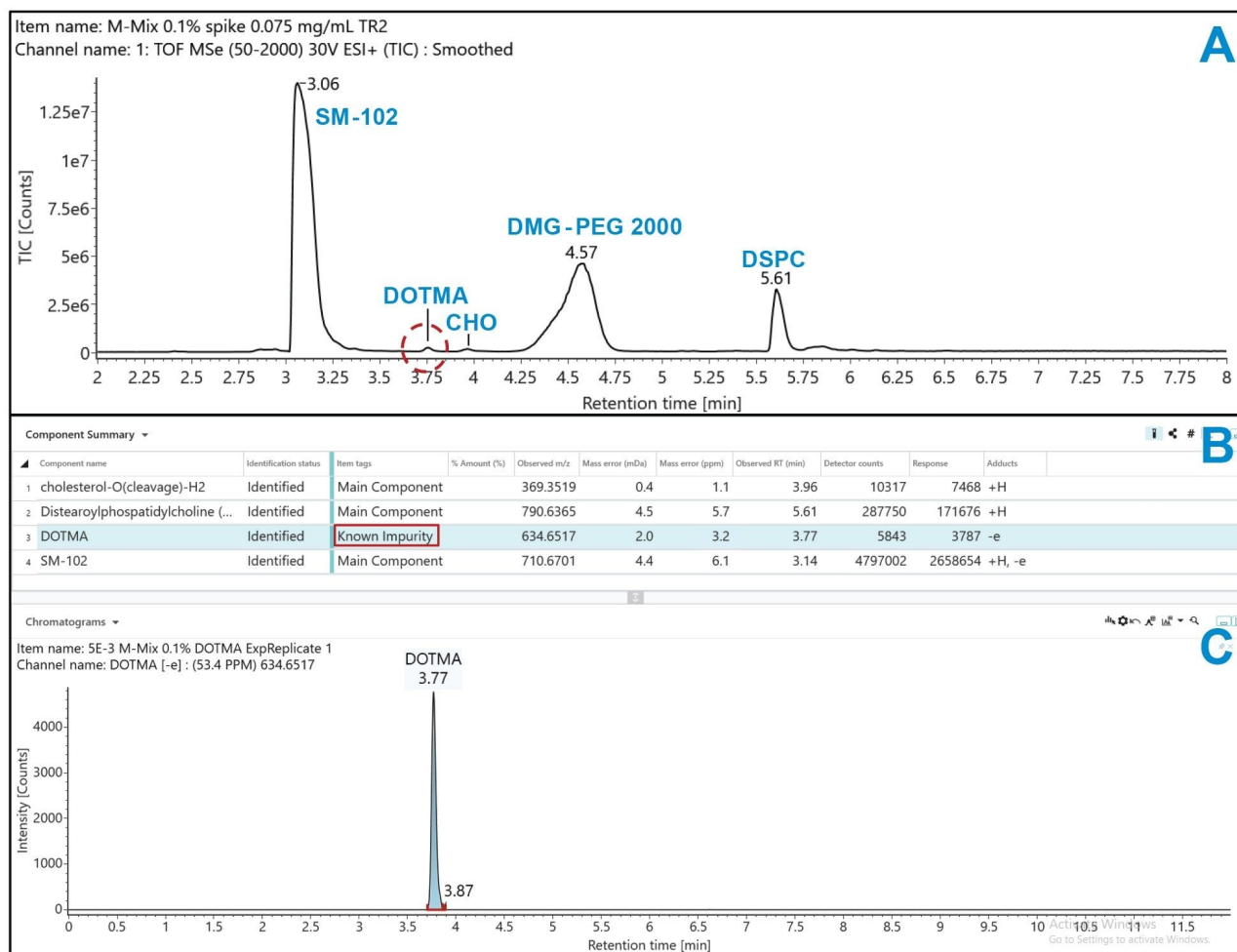


图4.UNIFI软件分析脂质纳米颗粒成分混合物的结果，包括可电离脂质SM-102、胆固醇(CHO)、聚乙二醇化脂质DMG-PEG 2000和二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)，以及加入的另一种可电离脂质DOTMA，为基峰强度的0.1%。(A)成分混合物的TIC色谱图，(B)成分列表，指示了各自的类型，以及(C) DOTMA杂质峰的提取离子流色谱图。

## 结论

在整个LNP开发和生产过程中，要确保所放行产品的安全性和有效性，必须对杂质进行严格的分析。BioAccord系统可以为原材料筛选和成分分析提供详细信息，以加快LNP样品中杂质的检测和表征。母离子和碎片离子的精确质量数数据有助于LNP谱中未知峰的灵敏检测和可靠鉴定。waters\_connect平台的UNIFI应用程序中的工具简化



了数据解析，可充分利用丰富的信息。获得的信息和开发的方法随后可以迁移到下游，以使用单四极杆MS或ELS检测器监测工作流程，帮助降低脂质纳米颗粒开发和生产的风险<sup>2,3</sup>。

---

## 参考资料

1. Isaac G, Ranbaduge N, Alden BA, Quinn C, Chen W, Plumb RS. 使用BioAccord LC-MS系统快速分析脂质纳米颗粒成分. 沃特世应用纪要, [720007296ZH](#). 2021年6月.
2. Han D, DeLaney K, Alden BA, Birdsall RE, Yu Y. 脂质纳米颗粒分析：利用MS降低风险. 沃特世应用纪要, [720007716ZH](#). 2022年9月.
3. DeLaney K, Han D, Birdsall BE, Yu Y. 改进脂质纳米颗粒成分检测的ELSD优化工作流程. 沃特世应用纪要, [720007740ZH](#). 2022年10月.

---

## 特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>>

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

720007844ZH, 2023年1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