

# Agilent 1290 Infinity II ELSD를 이용한 Lipid nanoparticle의 조성 분석

## 저자

유재영  
한국애질런트테크놀로지스 (주)

## 개요

mRNA 백신에 사용되는 기술인 Lipid nanoparticle (이하 LNP)는 Lipid류, Cholesterol 등으로 구성되어 있습니다. 일반적으로 흡광단(Chromophore)을 갖지 않는 LNP의 구성요소는 Evaporative light scattering detector(ELSD)로 정량이 가능합니다.

이에 Agilent 1290 Infinity II ELSD를 통한 LNP의 구성요소에 대한 정량분석법을 개발하였습니다. 5 $\mu$ M~1000 $\mu$ M 범위에서의 직선성과 낮은 농도의 정량한계, 2% 이내의 반복성이 확인되었으며, 강제분해산물에 대한 특이성이 확인되었습니다.



## 실험

### 표준물질 및 시약

SM-102는 BroadPharm에서 구매하였고, DMG-PEG2000, DSPC, Cholesterol은 Sigma-Aldrich에서 구매하였습니다. HPLC 분석에 사용된 Acetonitrile, methanol은 B&J에서, ethanol은 Fisher에서, ammonium formate는 Sigma-Aldrich에서 각각 구매하였습니다.

### 표준액 조제방법

1) SM-102, DMG-PEG2000, DSPC, Cholesterol 표준품을 아래의 분량에 따라 에탄올에 녹여 LNP 혼합물로서 10mM의 농도로 조제하여 표준원액으로 하였습니다.

표 1. 표준원액 농도.

화합물	분자량(g/mol)	몰 비율(%)	몰농도(mM)	농도(mg/L)
SM-102	710.2	50	5	3551.0
DMG-PEG2000	2509.2	1.5	0.15	376.4
DSPC	790.1	10	1	790.1
Cholesterol	386.7	38.5	3.85	1488.8
합계	-	100	10	-

- 2) 각 표준원액 2mL씩을 취하여 에탄올을 넣어 10mL로 하여 2mM LNP 표준원액을 조제하였고, 이를 에탄올로 희석하여 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000µM 표준액으로 하였습니다.
- 3) 따로, 각 표준원액 100µL와 0.1M HCl 100µL를 넣어 60°C에서 24시간 가열한 뒤, 실온으로 식혀 0.1M NaOH 100µL로 중화시키고 에탄올 700µL를 넣어 산분해물용액으로 하였고, 각 표준원액 100µL와 0.1M NaOH 100uL를 넣어 60°C에서 24시간 가열한 뒤, 실온으로 식혀 0.1M HCl 100µL로 중화시키고 에탄올 700µL를 넣어 알칼리분해물 용액으로 하였고, 각 표준원액 100µL와 0.2% 과산화수소수 100µL를 넣어 60°C에서 24시간 가열한 뒤, 실온으로 식혀 에탄올 800µL를 넣어 산화분해물용액으로 하였습니다.

## 분석 기기 및 조건

표 2. 비오틴의 HPLC 분석조건.

파라미터	값																					
기기	1260 Infinity II HPLC / 1290 Infinity II ELSD (Cooled)																					
컬럼	Poroshell CS-C18 2.7µm, 2.1 x 100mm																					
유속	0.6mL/min																					
컬럼 온도	40°C																					
주입량	5µL																					
샘플러 온도	4°C																					
ELSD 조건	Evaporator temperature 80°C Nebulizer temperature 80°C Gas flow rate 1.6 SLM																					
이동상	A: 5mM Ammonium formate in D.W.: Acetonitrile : Methanol = 25 : 35 : 40 B: 5mM Ammonium formate in Methanol : Ethanol = 60 : 40																					
그라디언트	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>35.1</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>42</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table>	시간(분)	%A	%B	0	85	15	1	85	15	30	0	100	35	0	100	35.1	85	15	42	85	15
시간(분)	%A	%B																				
0	85	15																				
1	85	15																				
30	0	100																				
35	0	100																				
35.1	85	15																				
42	85	15																				

## 결과

### 크로마토그램

SM-102, DMG-PEG2000, DSPC 및 Cholesterol의 크로마토그램은 다음과 같습니다.

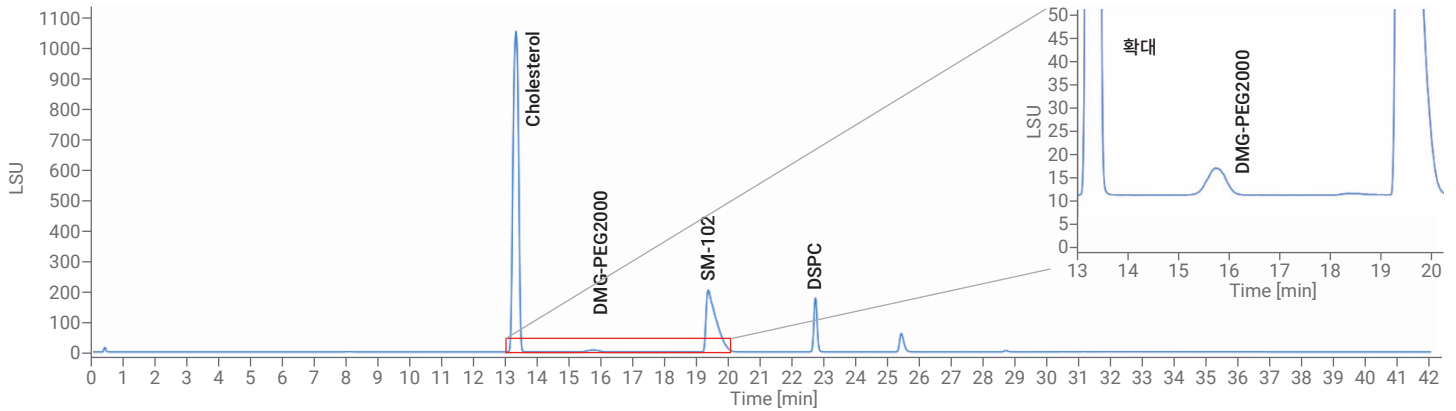


그림 3. LNP 1000µM 표준액의 크로마토그램.

### 검량범위 및 직선성

각 물질에 대한 직선성을 확인하기 위하여 5~1000µM 농도의 LNP 표준액에 대한 검량선은  $r^2$  값이 모두 0.99 이상으로 좋은 직선성이 확인되었습니다.

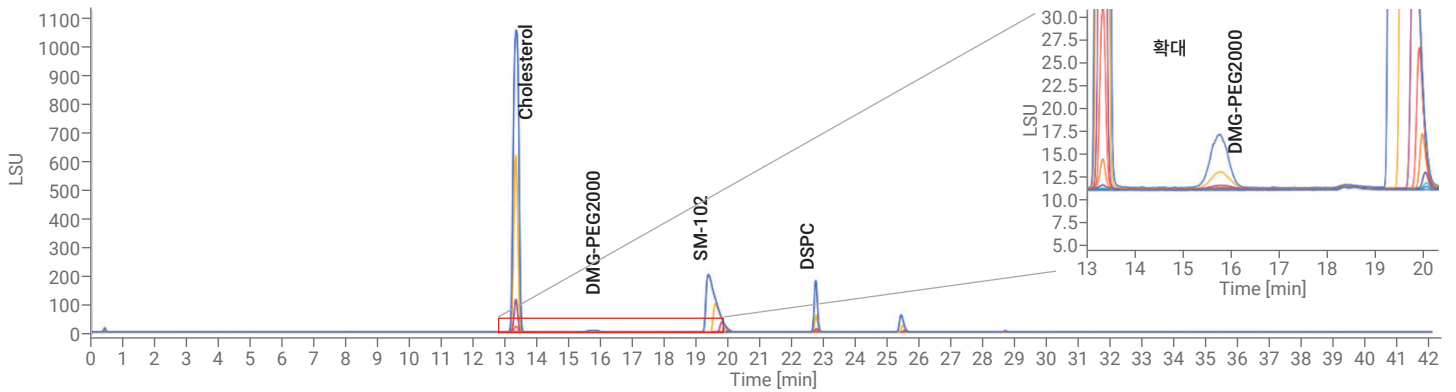


그림 4. LNP 표준액의 농도별(5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000µM) 크로마토그램 겹쳐보기.

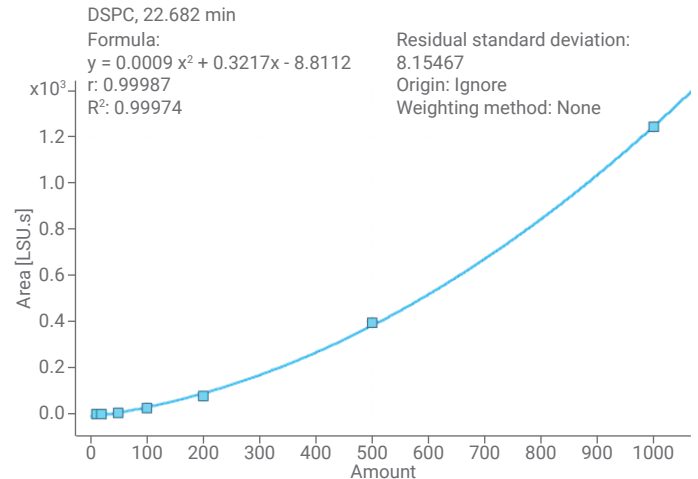
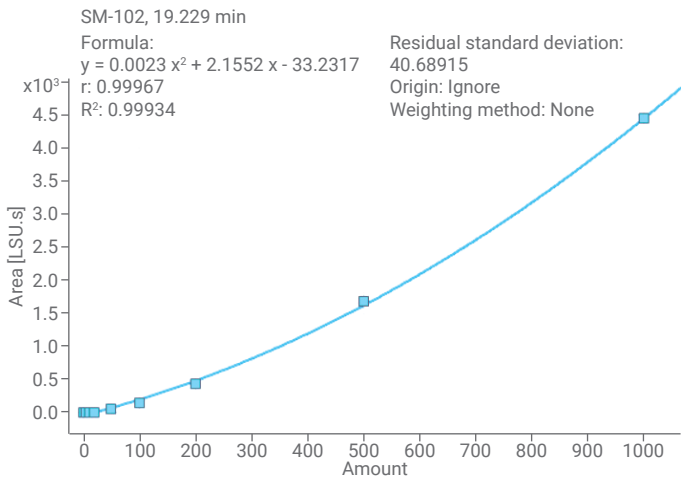
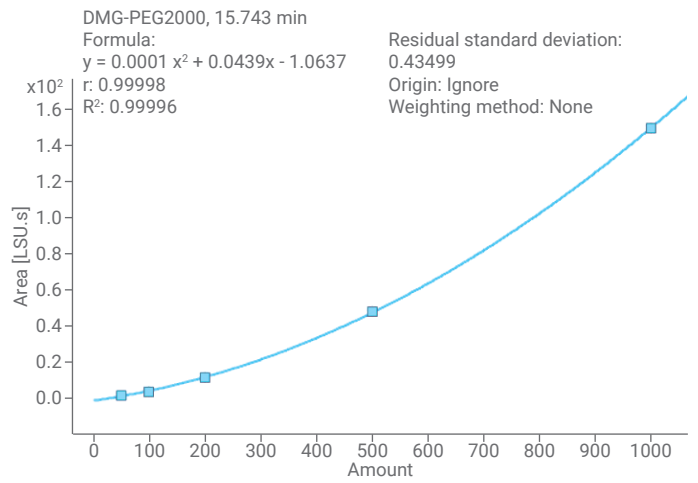
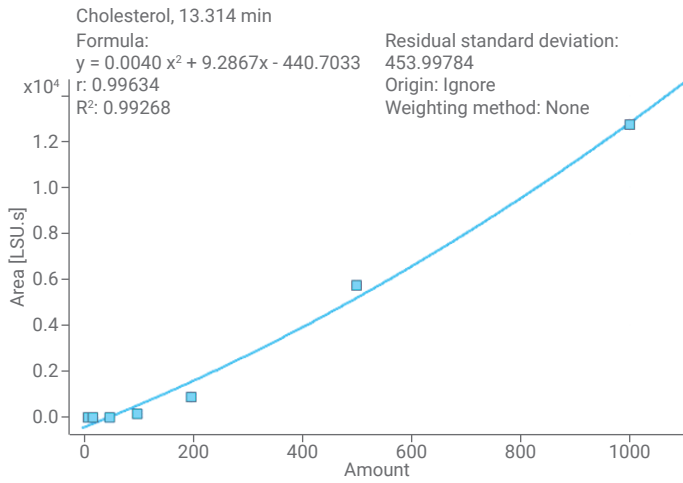


그림 5. Cholesterol, DMG-PEG2000, SM-102, DSPC의 검량선.

### 정량한계

정량한계를 산출하기 위하여 표준액에서 확인되는 피크의 신호대잡음비를 확인하였습니다. 각 표준액에서의 물질별 농도와 신호대잡음비(Signal to noise)는 다음과 같습니다. 신호대잡음비 10 부근의 각 성분의 농도를 확인한 결과, Cholesterol은 약 1.5mg/L, DMG-PEG2000은 약 3.8mg/L, SM-102는 약 1.8mg/L, DSPC는 약 0.8mg/L로 확인되어, 높은 감도를 나타내는 것을 확인할 수 있었습니다.

표 3. LNP 각 성분의 농도별 신호대잡음비 결과.

화합물		1μM	5μM	10μM	20μM	50μM	100μM	200μM	500μM	1000μM
Cholesterol	농도(mg/L)	0.15	0.74	1.49*	2.98	7.44	14.89	29.78	74.44	148.88
	신호대잡음비	-	-	12.7*	27.0	213.8	1554.5	10451.9	35973.3	84680.2
DMG-PEG2000	농도(mg/L)	0.04	0.19	0.38	0.75	1.88	3.76*	7.53	18.82	37.64
	신호대잡음비	-	-	-	-	4.4	12.0*	37.3	106.3	467.2
SM-102	농도(mg/L)	0.36	1.78*	3.55	7.10	17.76	35.51	71.02	177.55	335.10
	신호대잡음비	-	25.6*	57.3	111.4	386.8	1200.5	3151.2	5801.3	16125.7
DSPC	농도(mg/L)	0.08	0.40	0.79*	1.58	3.95	7.90	15.80	39.51	79.01
	신호대잡음비	-	-	9.8*	19.7	77.5	285.9	1044.9	3386.0	14406.3

\* 신호대잡음비가 약 10일때의 농도와 신호대잡음비 결과

신호대잡음비 산출에 사용한 수식은 아래와 같습니다.

$$\text{신호대잡음비(Signal to Noise)} = \frac{2H}{h}$$

H: 피크의 높이

h: 노이즈의 높이

### 반복성

LNP 1000µM 표준액을 6회 반복 측정 한 결과, 네 개 물질 모두 상대표준편차 2% 이내로 확인되었습니다.

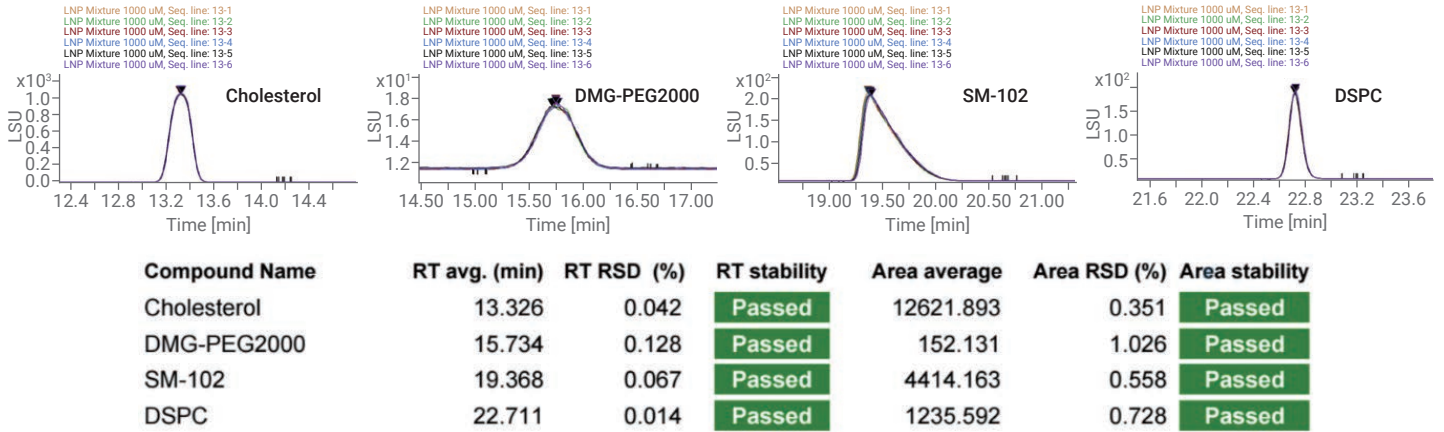


그림 6. LNP 1000µM.표준액의 6회 반복 측정 결과.

## 순도시험

유연물질의 유래와 잠재적 발생 가능성을 확인을 위해 각 성분을 LNP 최종 조성으로써 1000 $\mu$ M의 해당량이 되도록 넣고 각각 0.1M HCl, 0.1M NaOH, 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 60°C에서 24시간 처리하여 동일한 시험방법으로 분석하였습니다. Ionizable lipid인 SM-102는 산, 염기, 산화 조건에서 다수의 분해산물이 확인되었고, Helper lipid인 DSPC는 염기 조건에서 주 분해산물이 관찰되었습니다.

위 분석방법을 통해 각 물질에서 기인한 유연물질을 확인하기에 충분함을 확인할 수 있었습니다.

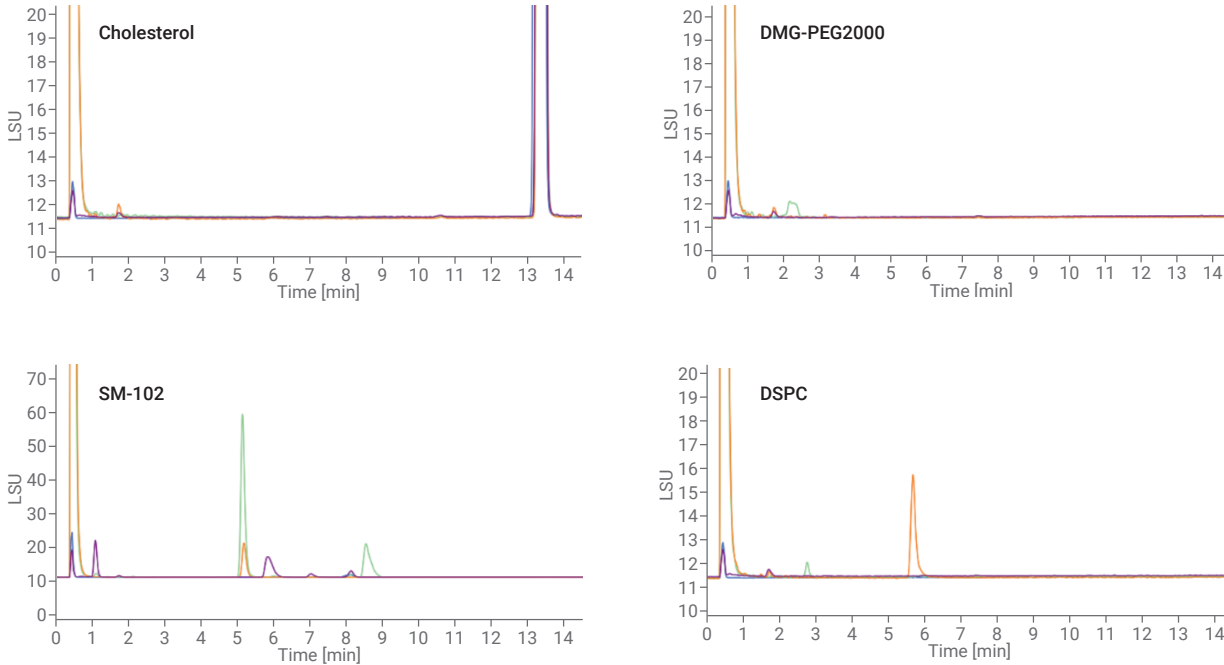


그림 7. Cholesterol, DMG-PEG2000, SM-102, Cholesterol 1000 $\mu$ M 해당량의 강제분해산물 확인 결과(— Control, — 0.1M HCl, — 0.1M NaOH, — 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

## 결론 및 고찰

Agilent 1260 Infinity II HPLC와 1290 Infinity II ELSD를 이용해 5~1000 $\mu$ M의 농도에 해당하는 Lipid nanoparticle의 표준액을 분석했을 때, 아래와 같이 좋은 직선성, 정량한계, 반복성 결과를 확인하였습니다. 따라서, 상기 시험방법을 통해 LNP 구성성분을 정량하는 데 있어, 신뢰도 있는 결과를 얻을 수 있다는 점이 검증되었습니다.

표 4. 분석 결과 요약.

	직선성( $r^2$ )	정량한계(mg/L)	반복성(%RSD)
Cholesterol	0.99268	1.49	0.351
DMG-PEG2000	0.99996	3.76	1.026
SM-102	0.99934	1.78	0.558
DSPC	0.99974	0.79	0.728

그리고, 안정성이 좋지 않은 SM-102에 대하여, 산, 염기, 산화 조건에서 확인되는 유연물질이 잘 분리되는 것을 확인할 수 있었습니다. 이를 통해 mRNA-LNP 제제의 안정성 연구에 활용할 수 있을 것으로 예상합니다.

## 참고 문헌

1. Kelsey L. Et al. Lipid nanoparticle-mediated delivery of mRNA therapeutics and vaccines, Trends in Molecular Medicine, June 2021, Vol. 27, No. 6.
2. Schoenmaker L. Et al. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. International Journal of Pharmaceutics, 601, 2021.
3. Meredith. P. Et al. A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems. Nature Communications, 2021, 12:6777.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE41451727

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2022  
2022년 2월 20일, 한국에서 발행  
5994-4624KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

