

# Analyse nicht derivatisierter Aminosäuren mithilfe von LC/MS im Rahmen der Überwachung von Zellkulturen in Bioreaktoren

## Autoren

Jordy Hsiao, Te-Wei Chu,  
Andrew Kennedy,  
Adam Bivens und  
Anne Blackwell

## Abstract

In dieser Application Note wird eine Lösung zur LC/MS-Analyse von Aminosäuren in Fermentationsmedien dargestellt. Aufgrund der polaren Eigenschaften von Aminosäuren ist eine Analyse mit Umkehrphasen-Flüssigchromatographie schwierig. Daher werden die Aminosäuren oft derivatisiert, um die Retention zu verbessern. Die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC, „Hydrophilic Interaction Chromatography“) erlaubt dagegen den Erhalt und die Trennung von komplexen Aminosäuremischungen ohne Derivatisierung, wobei die Arbeitsabläufe ähnlich wie bei der herkömmlichen Umkehrphasen-Methodik ablaufen. Die Kombination von HILIC und Massenspektrometrie stellt eine besonders einfache und leistungsfähige Lösung für die Aminosäurenanalyse ohne Derivatisierung dar.

## Einführung

Die Überwachung einer breiten Palette an polaren Verbindungen aus Bioreaktoren und Fermentern ist eine anspruchsvolle Applikation der Chromatographie auf Basis hydrophiler Interaktionen (HILIC) in der Praxis. Dank einer Kombination aus dem Nutzen hoher pH-Werte und LC/MS-Detektionsverfahren im negativen Modus reicht eine einzige Analyse aus, um Aminosäuren, Ausgangsmaterialien und Abfallprodukte zu beobachten. Die Chemie der Agilent AdvanceBio MS Spent Media sorgt für Stabilität bei hohen pH-Werten und eignet sich hervorragend für die Trennung solcher Gemische.

Trotz der anspruchsvollen Matrix war die Reproduzierbarkeit von einer Injektion zur nächsten hervorragend. Zellkulturen aus einem Hohlfaser- und einem Rollerflaschenreaktor wurden getestet und der Verbrauch von Glucose und Aminosäuren und die Sekretion von Laktat ermittelt.

## Experimentelles

### Reagenzien und Chemikalien

Alle Reagenzien hatten einen Reinheitsgrad für HPLC oder höher. Acetonitril mit einem Ultrareinheitsgrad für LC/MS wurden bei J.T. Baker (Center Valley, PA, USA) erworben. Wasser wurde mit einem EMD Millipore Milli-Q Integral System (Darmstadt, Deutschland) aufbereitet. Ameisensäure (FA) mit einem Reinheitsgrad für Reagenzien (Best.-Nr. G2453-85060) stammte von Agilent Technologies. Ammoniumformat, Ammoniumacetat, Ammoniumhydroxid und Aminosäurestandards stammten von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DMEM-Medium stammte von Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Die Aminosäuren wurden bis zum Tag der Verwendung bei -70 °C gelagert.

### Ausrüstung und Material

- Agilent InfinityLab Fittings
  - **Säule vorne:** Agilent Quick Connect (Best.-Nr. 5067-5965)
  - **Säule hinten:** Agilent Quick Turn (Best.-Nr. 5067-5966)
- Probenflaschen mit Schraubverschluss, Braunglas, mit Beschriftungsfeld, zertifiziert, 2 ml, 100 St./Packung (Best.-Nr. 5182-0716)
- Agilent kombinierte Schraubverschlusskappe, PTFE/rote Silikonsepten (Best.-Nr. 5190-7024)
- Probenflascheneinsatz, 250 µl, deaktiviertes Glas mit Polymerfüßen (Best.-Nr. 5181-8872)

- Eppendorf-Pipetten und Mehrkanalpipette
- Ultrazentrifuge (VWR, Radnor, PA, USA)
- Vortexer und Multiröhrchen-Vortexer (VWR, Radnor, PA, USA)
- Lösemittelflaschen, HDPE (VWR, Radnor, PA, USA)
- Rollerflaschen-Bioreaktor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hohlfaser-Bioreaktor (FiberCell Systems, New Market, MD, USA)

### Geräte

- Agilent 1290 Infinity II binäre Pumpe (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Flüssigprobengeber (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II Thermostat für mehrere Säulen (G7116B)
- Kit zur ultra-niedrigen Dispersion für Agilent 1290 Infinity LC Serie (5067-5189)
- Agilent 6545 Quadrupol-Time-of-Flight (Q-TOF) Massenspektrometer
- Agilent Jet Stream Elektrospray-Ionenquelle

### Software

Agilent MassHunter Workstation-Software B.08.00

### Probenvorbereitung

Zellkulturproben wurden 1:4 mit 50 % ACN verdünnt und bei 10 000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und ohne weitere Probenvorbereitung injiziert.

### Mobile Phase

Es wurde eine Stammlösung (100 mM Ammoniumacetat in Wasser) hergestellt und mit Ammoniumhydroxid auf pH 9 eingestellt. Für die mobile Phase A wurde die Stammlösung 9:1 mit Wasser verdünnt. Für die mobile Phase B wurde die Stammlösung 9:1 mit Acetonitril verdünnt. Die Endkonzentration beider mobiler Phasen lag bei 10 mM Ammoniumacetat.

Ein längerer Kontakt der mobilen Phase mit Glasteilen führte zum Auslaugen von Ionenspezies, die die MS-Detektion störten und unterdrückten. Daher sollten mobile Phasen, die in Glasgeräten aufbewahrt werden, regelmäßig gewechselt bzw. zur Aufbewahrung in HDPE-Flaschen überführt werden.

## Gerätebedingung

HPLC-Bedingungen																	
Säule	Agilent AdvanceBio MS Spent Media, 2,1 x 150 mm (Best.-Nr. 673775-901)																
Mobile Phase A	10 % (100 mM Ammoniumacetat in Wasser bei pH = 9)/ 90 % Wasser																
Mobile Phase B	10 % (100 mM Ammoniumacetat in Wasser bei pH = 9)/ 90 % Acetonitril																
Gradient	<table> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</th><th>% B</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td><td>90</td></tr> <tr> <td>2</td><td>90</td></tr> <tr> <td>12</td><td>40</td></tr> <tr> <td>13</td><td>20</td></tr> <tr> <td>16</td><td>20</td></tr> <tr> <td>17</td><td>90</td></tr> <tr> <td>25</td><td>90</td></tr> </tbody> </table>	Zeit (min)	% B	0	90	2	90	12	40	13	20	16	20	17	90	25	90
Zeit (min)	% B																
0	90																
2	90																
12	40																
13	20																
16	20																
17	90																
25	90																
Flussrate	0,25 ml/min																
Säulentemperatur	30 °C																
Injectivolumen	1 µl																
Gesamtanalysezeit	25 Minuten																
MS-Bedingungen																	
Ionisationsmodus	ESI negativ																
Gastemperatur	200 °C																
Gasfluss	10 l/min																
Zerstäuber	40 psi																
Sheathgas-Temperatur	300°C																
Sheath-Gasfluss	12 l/Min																
Kapillarspannung	3000 V																
Nozzle Voltage	0 V																
Fragmentorspannung	125 V																
Skimmerspannung	65 V																
Oct RF Vpp	750 V																
Aufnahmeparameter	Aufnahme der Daten bei 2 GHz erweiterter dynamischer Bereich MS-Massenbereich 50–1000 m/z																

## Bioreaktorbedingungen

Parameter	Wert
Bioreaktorformate	Rollerflaschen-Bioreaktor Hohlfaser-Bioreaktor
Zelllinie	CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary)
Kulturmedien	DMEM-Kulturmedien
Temperatur	30 °C

**Tabelle 1.** Zusammensetzung der Zellkulturmatrix (DMEM-Kulturmedien).

Komponente	Konzentration (mg/l)
Glycin	30,0
L-Argininhydrochlorid	84,0
L-Cystin 2HCl	63,0
L-Glutamin	584,0
L-Histidinhydrochlorid-H <sub>2</sub> O	42,0
L-Isoleucin	105,0
L-Leucin	105,0
L-Lysinhydrochlorid	146,0
L-Methionin	30,0
L-Phenylalanin	66,0
L-Serin	42,0
L-Threonin	95,0
L-Tryptophan	16,0
L-Tyrosin-Dinatriumsalz-Dihydrat	104,0
L-Valin	94,0
Cholinchlorid	4,0
D-Calciumpantothenat	4,0
Folsäure	4,0
Niacinamid	4,0
Pyridoxinhydrochlorid	4,0
Riboflavin	0,4
Thiaminhydrochlorid	4,0
i-Inositol	7,2
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> ) (wasserfrei)	200,0
Eisennitrat (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> *9H <sub>2</sub> O)	0,1
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ) (wasserfrei)	97,67
Kaliumchlorid (KCl)	400,0
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	3700,0
Natriumchlorid (NaCl)	6400,0
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	125,0
D-Glucose (Dextrose)	4500,0
Phenolrot	15,0
Natriumpyruvat	110,0

## Ergebnisse

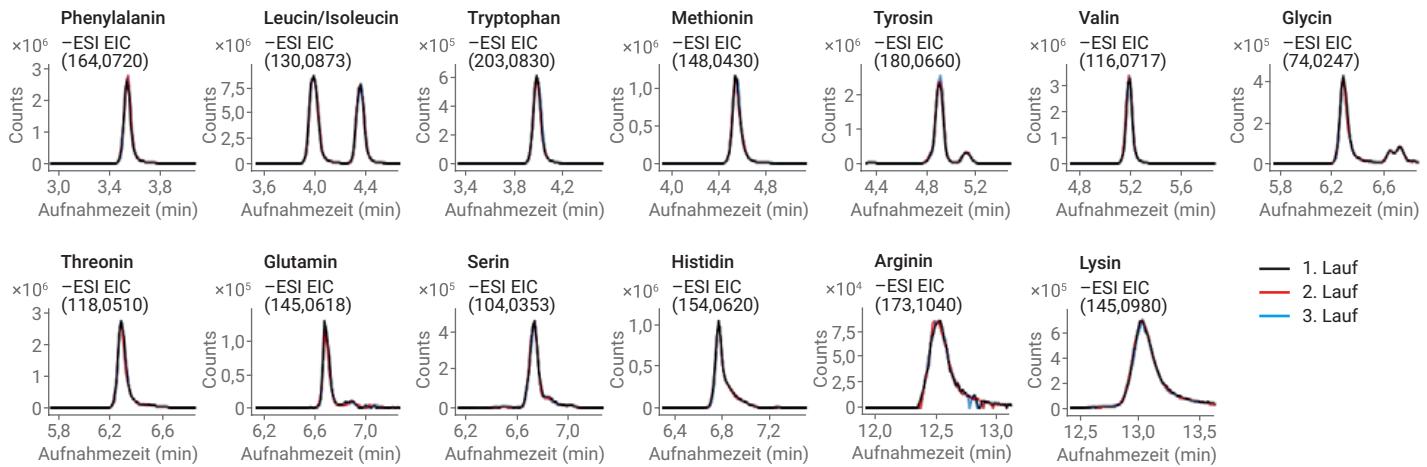


Abbildung 1. Test auf Reproduzierbarkeit.

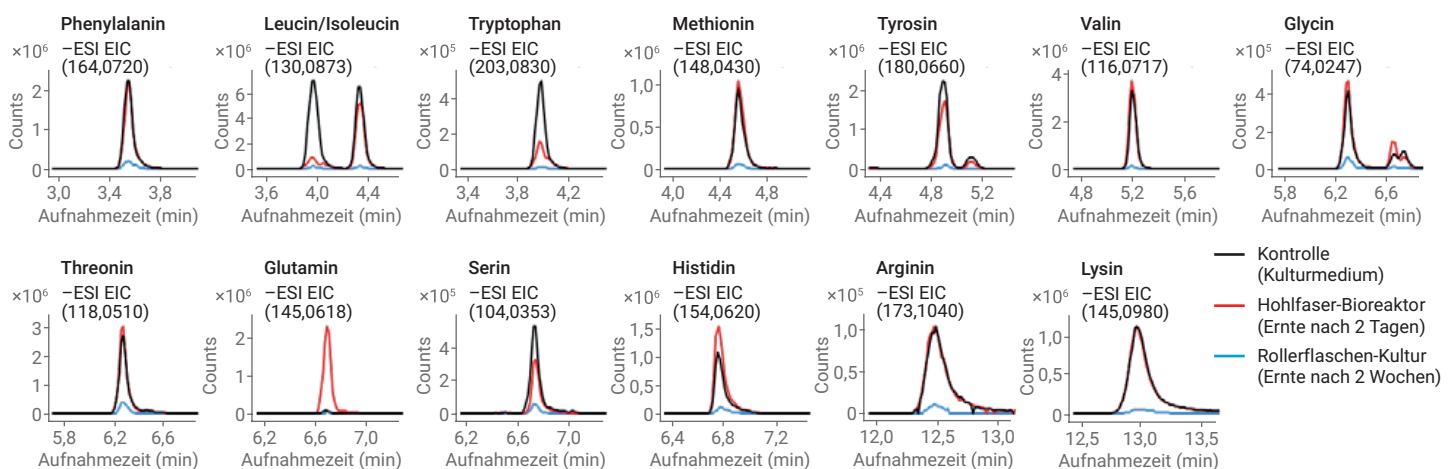


Abbildung 2. Analyse von Zellkulturmedien: Verbrauch von Aminosäuren. Im Hohlfaser-Bioreaktor wurde das Kulturmedium mit 6 mM Glutamin angereichert. Daher waren die Glutaminkonzentrationen im Hohlfaser-Bioreaktor höher als im Kontroll-Kulturmedium und im nährstoffarmen Rollerflaschen-Bioreaktor.

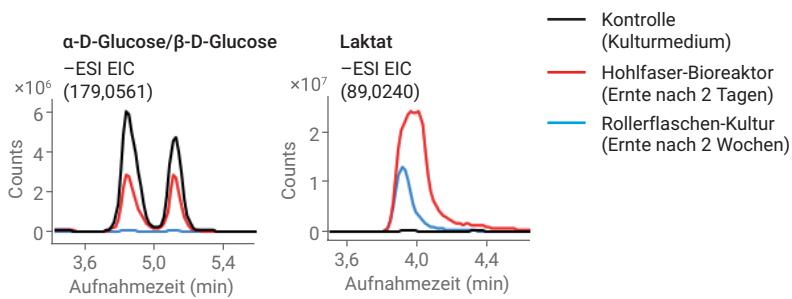


Abbildung 3. Analyse von Zellkulturmedien: Verbrauch der zugeführten Glucose und Sekretion von Laktat.

**Tabelle 2.** Retentionszeiten für Zellkulturmedien und vorherrschender Ionen jedes Analyts.

Überwachte Analyte	Retentionszeit (min)	Vorläuferion (m/z)
Phenylalanin	3,55	164,072
Laktat	3,95	89,024
Leucin	3,98	130,087
Tryptophan	3,98	203,083
Isoleucin	4,35	130,087
Methionin	4,53	148,043
D-Glucose ( <i>alpha</i> )	4,87	179,056
Tyrosin	4,91	180,066
D-Glucose ( <i>beta</i> )	5,13	179,056
Valin	5,19	116,071
Glycin	6,28	74,0247
Threonin	6,29	118,051
Glutamin	6,67	145,06
Serin	6,73	104,03
Histidin	6,75	154,062
Arginin	12,53	173,104
Lysin	13,01	145,098

## Schlussfolgerungen

Die Aminosäuren in verbrauchten Medien konnten mit HILIC-MS im negativen Ionenmodus erfolgreich analysiert werden. Die Isobare Leucin/Isoleucin, die oft Schwierigkeiten bereiten, konnten mit einer Auflösung von 1,6 bis zur Basislinie getrennt werden. Als Zwitterionen ionisieren Aminosäuren sowohl im negativen als auch im positiven Ionenmodus leicht. Hohe pH-Werte im negativen Modus hatten jedoch den Vorteil, die gleichzeitige Überwachung von Zellmedien, Ausgangsmaterialien und Zellabfallprodukten zu ermöglichen.

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

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2018  
Gedruckt in den USA, 29. Januar 2018  
5991-8816DEE

