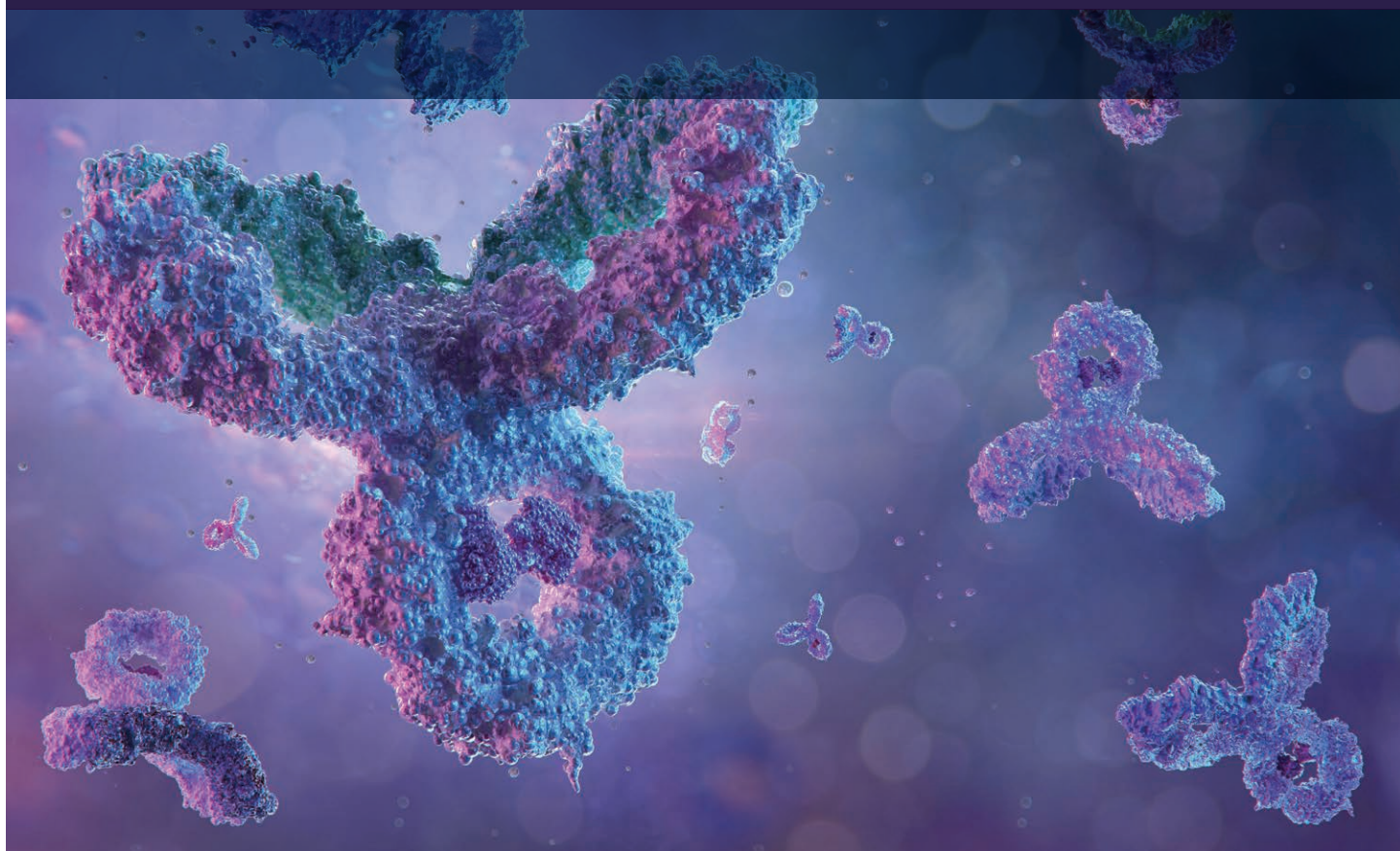


安捷伦生物色谱柱

氨基酸分析

应用文集



目录

背景	2
入门指南	3
AdvanceBio 全程解决方案助您获得准确的分析结果 — 氨基酸分析 操作指南 — 5991-7694CHCN	4
精选应用简报	23
细胞培养基和蛋白质水解产物标准品中氨基酸组分的测定 — 5991-7922EN	23
使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动化氨基酸分析 — 5991-5571EN	33

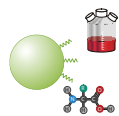
氨基酸分析

背景

确定蛋白质的氨基酸组成是一种成熟的技术，该技术与其他技术一起使用以确认正确的结构。在分析之前，通常利用酸水解使蛋白质水解成氨基酸。氨基酸也是用于制备重组蛋白质的细胞培养基中的关键成分。通常需要监测发酵反应期间各种氨基酸的消耗量，因此可能会使用相同的色谱方法。

氨基酸本身属于两性离子，并具有各种侧链，其中包括中性基团、疏水性基团、亲水性基团、酸性基团和碱性基团。它们还缺少合适的 UV 发色团，使得分离和检测这 20 种左右的天然存在的氨基酸非常具有挑战性。安捷伦推出了一种独特的氨基酸分析方法，该方法结合了柱前衍生化，采用 Multisampler 的液体处理功能并与反相分离相结合，可实现所有常见氨基酸的基线分离。

为进行柱前衍生化，首先在高 pH 条件下在硼酸盐缓冲液中中和样品，以确保各种氨基酸的氨基端被中和。然后伯胺与邻苯二甲醛 (OPA) 进行反应，仲胺（脯氨酸、羟脯氨酸等）与 9-芴甲基氯甲酸酯 (FMOC-Cl) 进行反应。这使得能够通过反相色谱进行后续分离，但是实现基线分离所需的高 pH 条件意味着最新的 pH 稳定柱能够提供更长的色谱柱寿命。



氨基酸和细胞培养基分析

小分子色谱 (< 150 Å)

提供稳定的高分离度分离

AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 柱 包含样品衍生化的 LC/UV 或 LC/FLD 分析

属性	优势
出色的分离度	更可靠的结果
耐高 pH 的 C18 固定相	更长的色谱柱寿命
兼容 HPLC 和 UHPLC	更高的灵活性

AdvanceBio MS Spent Media 不含样品衍生化的 LC/MS 分析

属性	优势
HILIC 液相色谱分离/质谱检测	一种适用于多种代谢物的方法
无需样品衍生化	使用任意 LC/MS 系统
PEEK 内衬的不锈钢色谱柱硬件	优异的峰形和回收率

入门指南

AdvanceBio 氨基酸分析试剂盒将分析所需的所有试剂和校准标准品组合至单一部件号 5190-9426。如果需要，各个组件也可以单独订购。后文的操作指南包含有关流动相配制、在自动进样器中设置自动化在线氨基酸衍生化以及液相色谱方法的详细说明。

AdvanceBio 氨基酸分析柱使用了 C18 硅胶颗粒填料，该填料经过化学改性，具有高 pH 稳定性。氨基酸分离在高 pH 条件下效率更高，并且这种改善相比于之前的氨基酸分析解决方案显著延长了色谱柱在这些流动相条件下的使用寿命。为了尽可能发挥这一改进的优点，注意切勿将色谱柱储存在流动相 A 中。短期储存应置于流动相 B 中；长期储存应置于 50% 乙腈中。该色谱柱可承受在梯度过程中短时间暴露于碱性 pH，但是长时间暴露于高 pH 下仍将缩短色谱柱寿命。

氨基酸分析：操作指南

AdvanceBio 全程解决方案助您获得准确的分析结果

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 全程解决方案将 Agilent InfinityLab 系列液相色谱仪和色谱柱技术的优势与成熟的柱前衍生化相结合，有助于优化工作流程效率。它是 AdvanceBio 系列产品中的一员，旨在为蛋白质、抗体、偶合物、新生物实体和生物药物的完整表征提供一致、卓越的性能。

这一完善的单供应商解决方案（包括化学品/标准品、色谱柱和应用支持）可实现快速、灵敏的自动化氨基酸分析。该方案基于最新的 InfinityLab 系列液相色谱仪和色谱柱技术。Agilent 1290/1260 Infinity II 样品瓶进样器的自动化在线衍生化省略了繁琐的手动操作流程，能够提供可重现的反应结果。AdvanceBio AAA 色谱柱的分析速度和分离度与亚 2 μm 色谱柱相当，而反压仅为亚 2 μm 色谱柱的 50%，并减少了色谱柱堵塞问题。

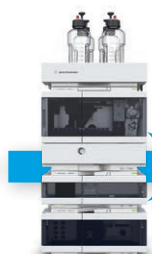
AdvanceBio AAA 溶液由用于氨基酸衍生化的经过验证的邻苯二甲醛/9-芴甲氧羰酰氯 (OPA/FMOC) 试剂发展而来。这些试剂与 AdvanceBio AAA 色谱柱和标准品结合，提供了一种兼具分析速度和灵敏度的理想氨基酸定量和定性分析方法。根据本文所述的方案使用时，AdvanceBio AAA 溶液能够帮助用户分离通常存在于蛋白质/肽水解产物中的氨基酸。



专业应用和技术支持



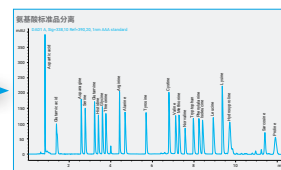
**AdvanceBio AAA 试剂
和标准品**
即拆即用



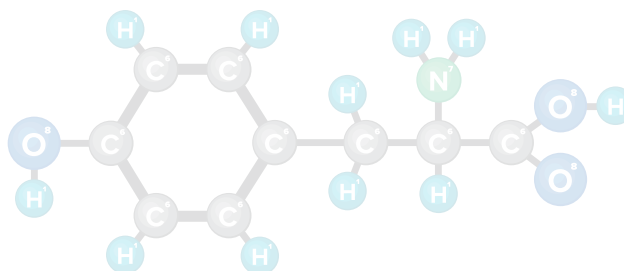
**安捷伦分析型液相
色谱系统**
高效的液相色谱
解决方案



AdvanceBio AAA 色谱柱
快速、稳定的氨基酸分离



快速、可靠的数据

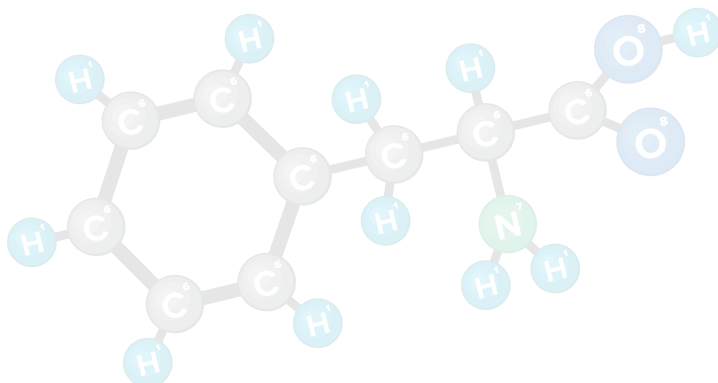
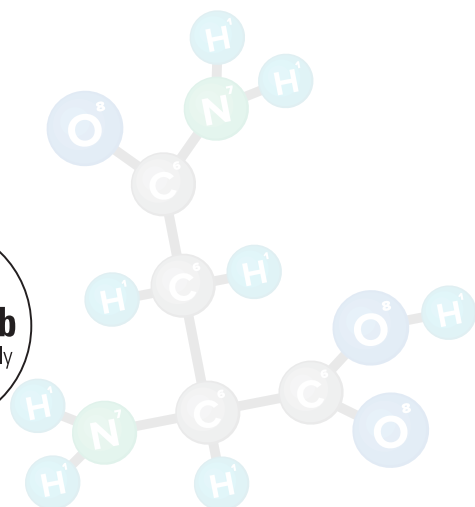
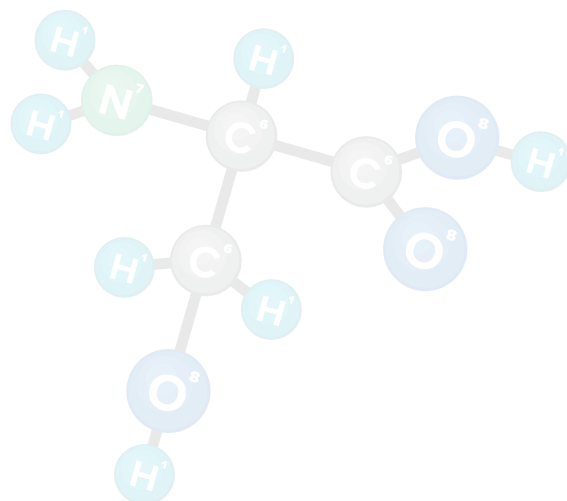
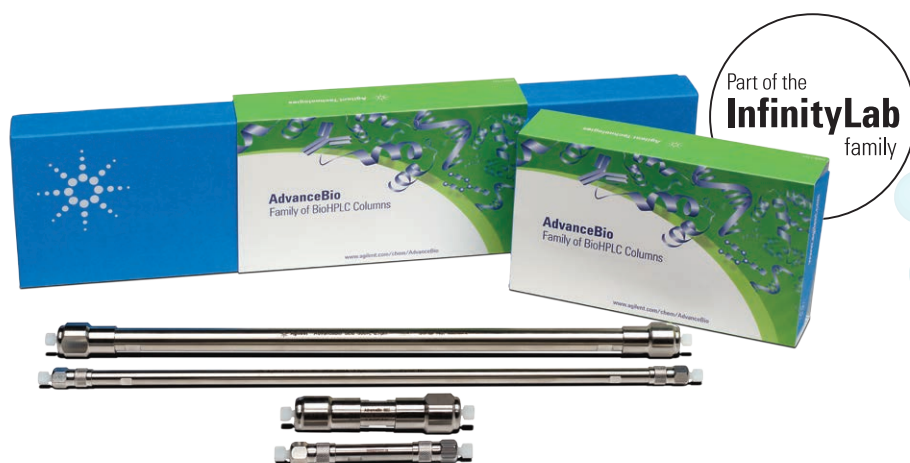


AdvanceBio AAA 色谱柱：表面多孔填料 (SPP) 技术

AdvanceBio AAA 色谱柱基于安捷伦创新的 2.7 μm 表面多孔颗粒填料 (SPP) Poroshell 技术，这种颗粒填料由 1.7 μm 的实心核和 0.5 μm 的多孔壳层组成。

2.7 μm SPP 的柱效为亚 2 μm 全多孔颗粒填料的 80%–90%，而反压比后者降低了 40%–50%。与全多孔颗粒填料相比，SPP 具有更窄的粒径分布，这使柱床更均匀，并能减小色谱柱中的扩散。同时，较薄的多孔壳层实现了较低的传质阻力。此外，由于色谱柱中含有一个 2 μm 筛板，因此它们的抗堵塞能力与 3.5 μm 和 5 μm 色谱柱相同。

直到目前，所有二氧化硅型 SPP 材料在 pH 较高的缓冲液（包括磷酸盐缓冲液）中的寿命仍然有限。为获得更长的寿命，必须对基础颗粒填料进行表面改性或特殊的键合改性。使用独特工艺对表面进行化学改性，形成一个有机层以避免硅胶在高 pH 条件下溶解。



AdvanceBio AAA 色谱柱：表面多孔填料 (SPP) 技术

AdvanceBio AAA 色谱柱可确保氨基酸分析获得优异的选择性。

快速稳定的氨基酸分离

- 具有亚 2 μm 色谱柱的速度和分离度，反压最多降低 50 %
- 采用 2 μm 筛板，使色谱柱对“脏”样品的耐受性更强
- 独特的化学改性，具有高 pH 稳定性和更长的色谱柱寿命
- 保护柱选件可延长色谱柱寿命，减少您的运行成本

效率始终如一，分析信心十足

- 能够在 600 bar 和 5 mL/min 下运行，具有更高的速度和更高分离度
- 具有进样器编程功能，可实现自动化在线衍生化
- 基于二极管阵列技术的高灵敏度紫外检测，在同步多波长检测中具有出色的灵敏度
- 在鉴定和峰纯度分析中可选用全谱检测
- 可灵活用于其他 LC 或 UHPLC 应用，与 HPLC 完全兼容

安捷伦检测器 — 检测灵活性高

多波长检测器：

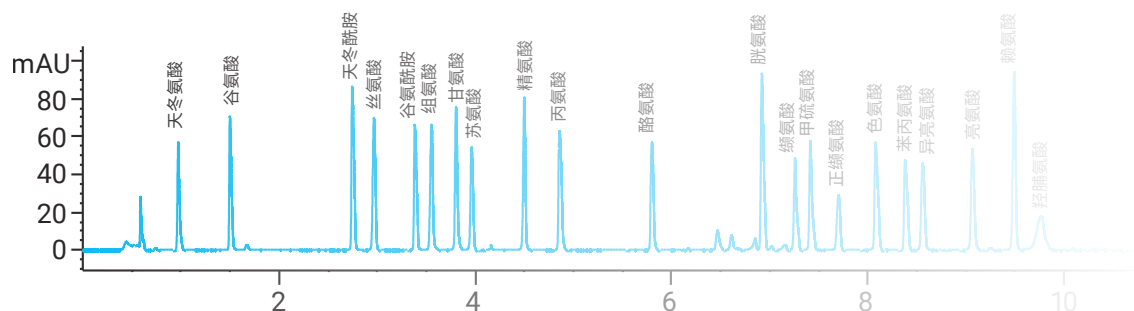
在同步多波长检测中具有出色的灵敏度。

提供光谱数据的二极管阵列检测器：

在鉴定和峰纯度分析中具有更高的选择性和更小的基质效应。

荧光检测器：

在多信号模式下，在飞摩尔范围内具有卓越的灵敏度。



提升您的分析信心：

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA)

快速、灵敏而重现地实现生物样品中的氨基酸分离

AAA 分析步骤

1. 配制 HPLC 流动相
2. 配制氨基酸标准品
3. 配制内标 (ISTD) 储备液
4. 进行在线衍生化
5. 设置检测参数
6. 运行高通量常规分析
7. 按照欧洲药典 (Ph. Eur.) 确定的系统适用性
8. 优化细胞培养基和蛋白质水解产物标准品

如需了解如何信心十足地分析氨基酸的更多信息，请访问

www.agilent.com/chem/advancebioaaa



第 1 步：

配制 HPLC 流动相

流动相 A：

10 mmol/L Na_2HPO_4 和 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，pH 8.2

如需配制 1 L 流动相，称取 1.4 g 无水 Na_2HPO_4 和 3.8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ，将其溶于 1 L 水中。用 1.2 mL 浓盐酸将 pH 调节为 8.4 左右，然后加入数滴酸，并将最终 pH 调节为 8.2。在调节 pH 之前充分搅拌，使硼酸盐晶体完全溶解。用 0.45 μm 再生纤维素膜（部件号 3150-0576）进行过滤。

流动相 B：

乙腈:甲醇:水 (45:45:10, v:v:v)

所有流动相溶剂均为 HPLC 级。

流动相 A 的消耗速率高于流动相 B，因此，建议每配制 1 L 流动相 B，则相应地配制 2 L 流动相 A。

进样稀释剂

进样稀释剂为 100 mL 流动相 A 和 0.4 mL 浓 H_3PO_4 。该溶液在 100 mL 瓶中配制，并在 4 °C 下储存。

0.1 mol/L HCl

扩展氨基酸及内标储备液在 0.1 mol/L HCl 溶液中进行配制。如需配制 0.1 mol/L HCl，将 4.2 mL 浓盐酸 (36%) 加入盛有部分水的 500 mL 容量瓶中。混合，并用水定容至刻度。在 4 °C 下储存。

衍生化试剂

衍生化试剂（硼酸盐缓冲液、OPA 和 FMOC）由安捷伦提供，是即拆即用的溶液。只需将这些试剂从其容器中转移至自动进样器样品瓶中即可。推荐的安全预防措施包括：

- OPA 包装于惰性气体保护下的安瓿中，以防氧化。打开后，OPA 的保质期为 7 至 10 天左右。建议将 100 μL 的等份 OPA 转移至微量样品瓶内插管中，并储存在冰箱中。每天更换一次 OPA 自动进样器微量样品瓶
- FMOC 在干燥空气下可保持稳定，但在湿气下可发生降解。应当以 100 μL 的等份将其转移至微量样品瓶内插管中，并储存于冰箱内。与 OPA 类似，将打开的 FMOC 安瓿瓶转移至 10 个微量样品瓶内插管后，其保质期同样为 7–10 天左右
- 可以将硼酸盐缓冲液转移至不含样品瓶内插管的 1.5 mL 自动进样器样品瓶中。每三天更换一次

第 2 步：

配制氨基酸标准品

安捷伦可提供五种浓度的 17 种氨基酸 (AA) 溶液 (10 pmol/μL–1 nmol/μL)，用于绘制校准曲线。在 4 °C 下储存溶液。

如需配制扩展氨基酸 (EAA) 储备液，称取：

- 59.45 mg 天冬酰胺
- 59.00 mg 羟脯氨酸
- 65.77 mg 谷氨酰胺
- 91.95 mg 色氨酸

将称取的氨基酸置于 25 mL 容量瓶中，用 0.1 mol/L HCl 填充一半体积，并振摇或超声直至溶解。然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度为 18 nmol/μL。

对于高灵敏度 EAA 储备液，量取 5 mL 该标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释 (1.8 nmol/μL)。含混合标准品的溶液在室温下不稳定。需要将其冷冻保存，并在首次出现灵敏度下降迹象时将其丢弃。



第 3 步：

配制内标 (ISTD) 储备液

对于一级氨基酸 ISTD 储备液，称取 58.58 mg 正缬氨酸置于 50 mL 容量瓶中。对于二级氨基酸，称取 44.54 mg 肌氨酸置于同一 50 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 填充容量瓶一半，并振摇或超声直至溶解。最后用水定容至刻度，使每种氨基酸的最终浓度为 10 nmol/μL (标准灵敏度)。对于高灵敏度 ISTD 储备液，量取 5 mL 标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释。每种氨基酸的高灵敏度 ISTD 的最终浓度为 1 nmol/μL。在 4 °C 下储存。

根据实验需要，使用两到五种标样绘制校准曲线。在“标准灵敏度”分析中，通常使用 100 pmol/μL、250 pmol/μL 和 1 nmol/μL 绘制三点校准曲线。

如果加入内标或其他氨基酸 (如扩展氨基酸)，则应按下表进行操作。表 1 列出紫外分析中通常使用的“标准灵敏度”浓度。表 2 列出通常用于“高灵敏度”荧光分析的浓度。

表 1. 标准灵敏度校准标样

	最终 AA 溶液的浓度 (pmol/μL)		
	900	225	90
量取 5 mL 18 nmol EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用水稀释	-	15 mL	45 mL
稀释后的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
量取 5 mL 稀释后的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
量取 100 μL EAA-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
对于 1 nmol AA，加入	900 μL	-	-
对于 250 pmol AA，加入	-	900 μL	-
对于 100 pmol AA，加入	-	-	900 μL
含 EAA 和 500 pmol/μL ISTD 的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

表 2. 高灵敏度校准标样

	最终 AA 溶液的浓度 (pmol/μL)		
	90	22.5	9
量取 5 mL 1.8 nmol EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用水稀释	-	15 mL	45 mL
稀释后的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
量取 5 mL 稀释后的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 1 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
高灵敏度 EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
量取 100 μL EAA-ISTD 混合液	100 μL	100 μL	100 μL
对于 100 nmol AA, 加入	900 μL	-	-
对于 25 pmol AA, 加入	-	900 μL	-
对于 10 pmol AA, 加入	-	-	900 μL
含 EAA 和 50 pmol/μL ISTD 的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL



第 4 步：

进行在线衍生化

根据自动进样器型号不同，自动化在线衍生程序稍有不同。对于配备 100 μL 毛细管* 的 Agilent G7129A 孔板自动液体进样器 (WPALS)，进样程序如下：

1. 从硼酸盐样品瓶（部件号 5061-3339）中吸取 2.5 μL
2. 从样品瓶中吸取 1.0 μL
3. 在清洗口，将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4. 等待 0.2 分钟
5. 从 OPA 样品瓶（部件号 5061-3335）中吸取 0.5 μL
6. 在清洗口，以默认速度将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7. 从 FMOC 样品瓶（部件号 5061-3337）中吸取 0.4 μL
8. 在清洗口，以默认速度将 4.4 μL 混合液混合 10 次
9. 从进样稀释剂样品瓶中吸取 32 μL
10. 在清洗口，将 20 μL 混合液混合 8 次
11. 进样
12. 等待 0.1 分钟
13. 阀切换至旁路

* 注：其他型号的自动进样器可能安装不同体积的毛细管，此时需要对体积进行调整

衍生化试剂和样品的位置取决于分析人员和 ALS 样品盘配置。使用配备 2 × 56 孔板托盘的 G7129A (部件号 G2258-44502) 时, 位置为:

- 样品瓶 1: 硼酸盐缓冲液
- 样品瓶 2: OPA
- 样品瓶 3: FMOC
- 样品瓶 4: 进样稀释剂
- P1-A-1: 样品

注: 请使用正确的样品瓶、密封件和泵参数

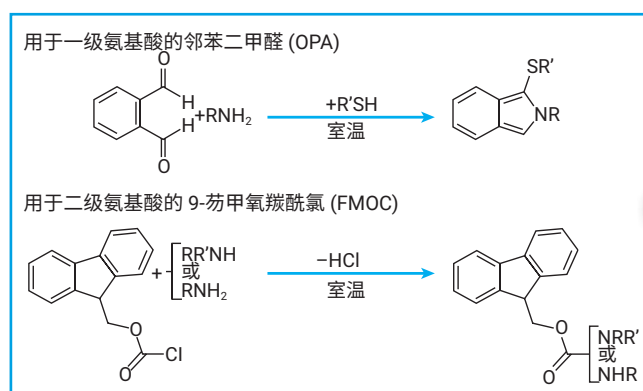
由于体积有限, 需要采用具有聚合物支脚的锥形样品瓶内插管 (图 1A) 来保存 OPA 和 FMOC 试剂。内插管与广口螺口盖 (图 1B 和图 1C) 或钳口盖样品瓶兼容。在这一程序中, 需要对 FMOC (具有高挥发性) 和 OPA (存在氧气时缓慢降解) 采用气密密封垫。因此, 该流程中不得使用卡口盖样品瓶。切勿使用针对其他仪器设计的样品瓶或瓶盖, 以防自动进样器损坏。

所有方法的泵参数包括压缩系数 ($\times 10^{-6}$ bar) A: 40, B: 80, 在最小进样量 20 μL 下 (A, B)。



图 1. 使用 Agilent 4226A 自动进样器进行氨基酸分析的內插管、样品瓶和瓶盖: A) 锥形內插管 (安捷伦部件号 5181-1270), B) 棕色广口瓶 (安捷伦部件号 5182-0716), 和 C) 螺口盖 (安捷伦部件号 5182-0721)

利用自动进样器提高精密度



自动添加试剂

提高精密度
无需手动操作



图 2. OPA 和 FMOC 的在线衍生化: 反相分离极性氨基酸并采用紫外和荧光检测器进行检测

第 5 步：

设置检测参数

柱温箱 (TCC)

左侧和右侧温度均应设置为 40 °C。当温度处于 ± 0.8 °C 以内时进行分析。

二极管阵列检测器 (DAD)

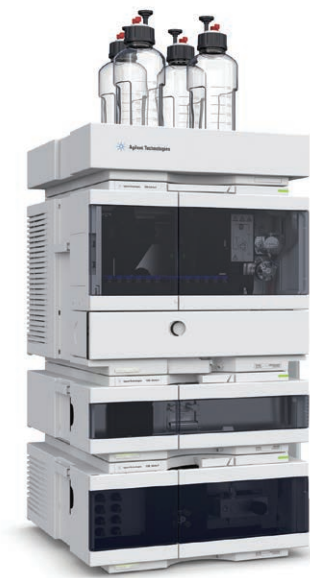
信号 A: 338 nm	带宽 10 nm	参比波长 390 nm	带宽 20 nm
信号 B: 262 nm	带宽 16 nm	参比波长 324 nm	带宽 8 nm
信号 C*: 338 nmix	带宽 10 nm	参比波长 390 nm	带宽 20 nm

* 如果按照下列说明进行操作，则无需信号 C

如需在一幅色谱图中同时检测 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸，必须在最后洗脱的 OPA 衍生化氨基酸（赖氨酸，标准品中的峰 20）和第一个洗脱的 FMOC 衍生化氨基酸（羟脯氨酸，标准品中的峰 21）之间切换检测器波长。

通过首先采集两个通道（信号 A 338 nm，用于检测 OPA 衍生化氨基酸；信号 B 262 nm，用于检测 FMOC 衍生化氨基酸），即可使用 DAD 确定适当的转换点。如此可确定在运行过程中切换波长的最佳时间点。可使用单个通道进行后续运行，采用检测器时间表功能，在适当的时间处设定从 338 nm 至 262 nm 的波长切换程序。在洗脱 OPA-赖氨酸和 FMOC-羟脯氨酸之间正好可以进行这一切换，从而能够在一幅色谱图中同时检出 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸。

所有色谱柱均使用 > 0.01 分钟的峰宽设置。



荧光检测

FLD 应始终作为液流中的最后一个检测器模块，以免损坏压敏流通池（最高耐压 20 bar）。

峰宽 0.01 min，停止时间 18 min（根据需要调整）

激发波长 340 nm；发射波长 450 nm；滤光片波长 390 nm（默认滤光片）

时间表信号：

0.00 min 激发波长 340 nm，发射波长 450 nm；增益（根据需要）

5.53 min 激发波长 260 nm，发射波长 325 nm；

PMT 增益 10（根据需要；在赖氨酸和羟脯氨酸之间进行转换）

为确定荧光检测 (FLD) 所需的转换点，需要执行两次单独的运行：首先使用激发波长 340 nm、发射波长 450 nm 检测 OPA 衍生化氨基酸，其次使用激发波长 260 nm、发射波长 325 nm 检测 FMOC 衍生化氨基酸。使用检测器时间表功能，OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸可在一幅色谱图中得到检测。该功能在最后洗脱的 OPA 衍生化氨基酸（赖氨酸，标准品中的峰 20）之后和第一个洗脱的 FMOC 衍生化氨基酸（羟脯氨酸，标准品中的峰 21）之前的适当点处设置波长切换程序。

注：如果氨基酸的浓度低于 100 pmol，则建议使用荧光检测。

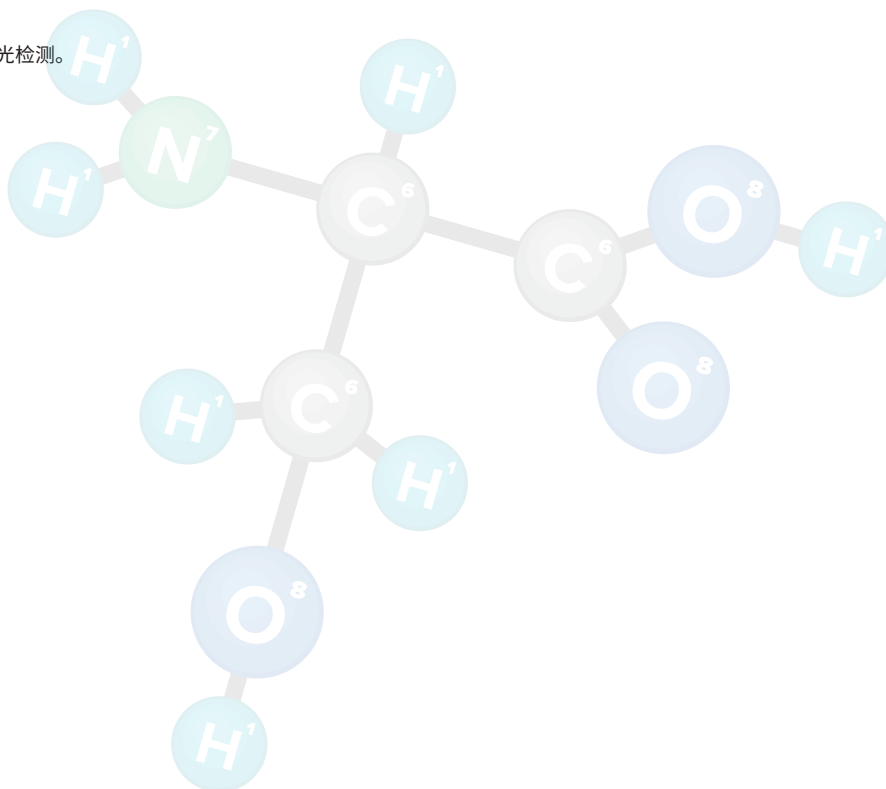


梯度程序

时间 (min)	%B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	结束

流速： 4.6 mm 内径的色谱柱采用 1.5 mL/min；3 mm 内径的色谱柱采用 0.62 mL/min。

进样量：1 μ L，进样针在进样口清洗 7 s。



典型分离

使用 AdvanceBio AAA 色谱柱分离 20 种氨基酸得到的结果

如图 3 所示。

请注意下列参数：

- 无论流动相中是否含 NaN_3 ，氨基酸的洗脱曲线不变
- NaN_3 仅用作抑制细菌/真菌生长的防腐剂
- 强烈推荐使用 0.45 μm 过滤器对流动相进行过滤。注：
如果氨基酸的浓度低于 100 pmol，则建议使用荧光检测

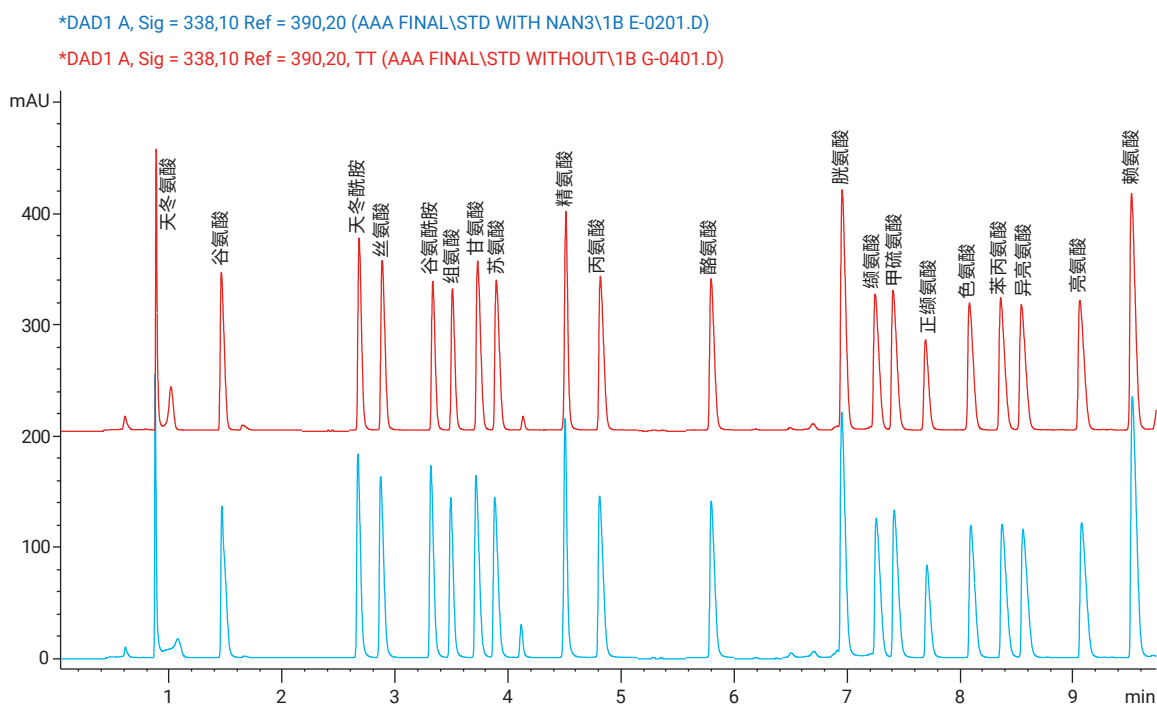


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱，在流动相中含与不含 5 mmol/L 叠氮化钠的情况下分离 20 种氨基酸标准品

注：可选择向流动相 A 中加入 5 mmol/L 叠氮化钠 (NaN_3)，以防止微生物生长并延长缓冲液的保质期。

第 6 步：

运行高通量氨基酸分析

图 4 中的色谱图显示出在高通量应用中使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱可获得的典型常规标准灵敏度。这些分离采用配备 AdvanceBio AAA 100 mm, 2.7 μ m 不同内径的色谱柱以及 DAD 检测器的 Agilent 1260 Infinity II HPLC 二元系统完成。一次运行可在 20 分钟内完成（包括重新平衡），并获得足够高的分离度。在 338 nm 下监测一级氨基酸（1–20，经 OPA 衍生化），同时在 262 nm 下监测二级氨基酸（21–23，经 FMOC 衍生化）。

用 OPA 对图 4 中的前 20 种氨基酸（一级氨基酸）进行衍生化。用 FMOC 对后三种氨基酸（羟脯氨酸、肌氨酸和脯氨酸）进行衍生化。从 338 nm 至 265 nm 的可编程波长切换发生在赖氨酸（峰 20）洗脱之后，羟脯氨酸（峰 21）洗脱之前。

- 该方法可轻松扩展至不同色谱柱尺寸
- 在这种情况下，方法的唯一变化是根据色谱柱内径改变流速数值
- 将小体积热交换器与较短的红色管线配套使用，以尽可能减小柱外体积

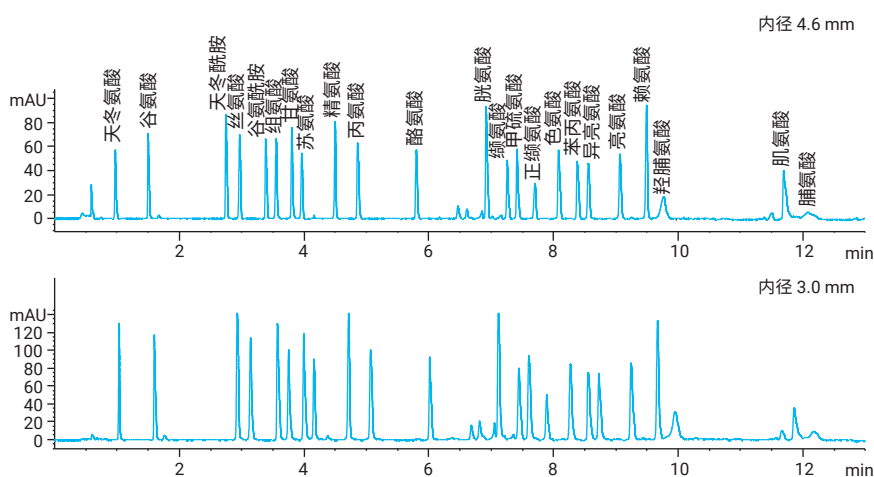


图 4. 使用氨基酸分析方法和具有不同内径的 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱分离 AA 标准品



100 pmol 和 1000 pmol 分析的保留时间和峰面积 精密度 (n = 6)

表 3. 使用 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱分离氨基酸 (100 pmol) 得到的保留时间和峰面积精密度 (重复测定六次)

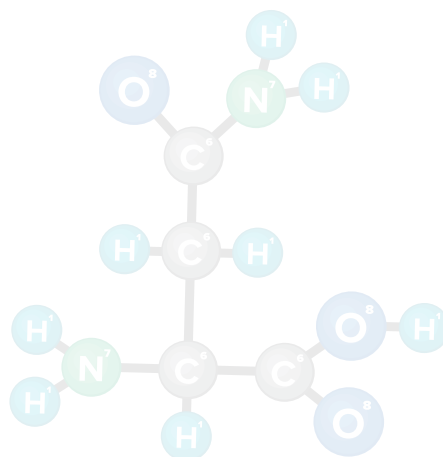
氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	0.851	1.270	1.066
2.谷氨酸	1.428	0.973	1.850
3.天冬酰胺	2.639	0.605	1.790
4.丝氨酸	2.835	0.629	1.820
5.谷氨酰胺	3.285	0.470	1.560
6.组氨酸	3.465	0.430	1.220
7.甘氨酸	3.681	0.477	1.920
8.苏氨酸	3.837	0.440	1.950
9.精氨酸	4.458	0.251	2.150
10.丙氨酸	4.764	0.280	3.060
11.酪氨酸	5.762	0.128	1.650
12.胱氨酸	6.870	0.067	1.900

氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
13.缬氨酸	7.201	0.084	2.47
14.甲硫氨酸	7.363	0.073	1.82
15.正缬氨酸	7.602	0.073	1.72
16.色氨酸	8.055	0.054	1.57
17.苯丙氨酸	8.341	0.051	1.66
18.异亮氨酸	8.503	0.047	1.72
19.亮氨酸	9.000	0.030	1.70
20.赖氨酸	9.428	0.028	1.66
21.羟脯氨酸	9.747	0.021	4.13
22.肌氨酸	10.980	0.026	1.15
23.脯氨酸	11.620	0.021	4.36

表 4. 使用 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱分离氨基酸 (1000 pmol) 得到的保留时间和峰面积精密度 (重复测定六次)

氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	0.837	0.151	2.60
2.谷氨酸	1.400	0.512	2.19
3.天冬酰胺	2.583	0.124	2.13
4.丝氨酸	2.772	0.114	1.74
5.谷氨酰胺	3.220	0.092	1.80
6.组氨酸	3.405	0.077	1.39
7.甘氨酸	3.598	0.068	1.48
8.苏氨酸	3.766	0.059	2.26
9.精氨酸	4.422	0.027	1.66
10.丙氨酸	4.685	0.031	1.87
11.酪氨酸	5.695	0.034	2.04
12.胱氨酸	6.794	0.030	2.22

氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
13.缬氨酸	7.118	0.025	2.40
14.甲硫氨酸	7.281	0.025	1.78
15.正缬氨酸	7.573	0.019	1.77
16.色氨酸	7.970	0.024	2.03
17.苯丙氨酸	8.238	0.027	1.98
18.异亮氨酸	8.413	0.025	2.17
19.亮氨酸	8.925	0.020	1.81
20.赖氨酸	9.357	0.022	2.00
21.羟脯氨酸	9.718	0.014	3.14
22.肌氨酸	10.961	0.015	5.91
23.脯氨酸	11.911	0.011	2.58



第 7 步：

按照欧洲药典确保系统适用性

欧洲药典 (Ph. Eur.) 规定了对氨基酸及氨基酸混合物的定性和定量组成的要求。还规定了允许的杂质要求。氨基酸制造商在欧洲经销其产品之前，在法律上有义务证明其氨基酸可满足这些指标要求。

亮氨酸 (Leu) 是一种支链 α-氨基酸，通过发酵工艺进行生产。在该工艺过程中，异亮氨酸可作为副产物生成。欧洲药典规定亮氨酸与异亮氨酸的分离度不得小于 1.5^[1]

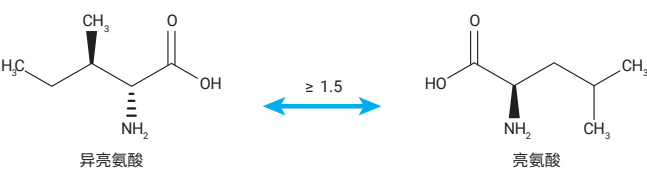


表 5. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱和 AA 标准品进行系统适用性测试

系统适用性	AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	AdvanceBio AAA, C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm
亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度 (≥ 1.5)	4.5	4.6

参考文献：

1. 欧洲药典 9.0 (2.2.56) 氨基酸分析

第 8 步：

优化细胞培养基和蛋白质水解产物标准品

细胞培养广泛用于生产生物药物及其他生物活性化合物。细胞培养基的组成会影响所需产物的产率和结构，因此需要精心优化。细胞培养基通常由氨基酸、维生素、碳水化合物、无机盐以及不同的肽、蛋白质及其他化合物的混合物组成。在细胞生长时，它们消耗营养物质，并释放出目标生物药物与废物。氨基酸可用作蛋白质的结构单元以及多种代谢途径的中间体。因此，通常将氨基酸加入细胞培养基中，以满足细胞的营养要求。

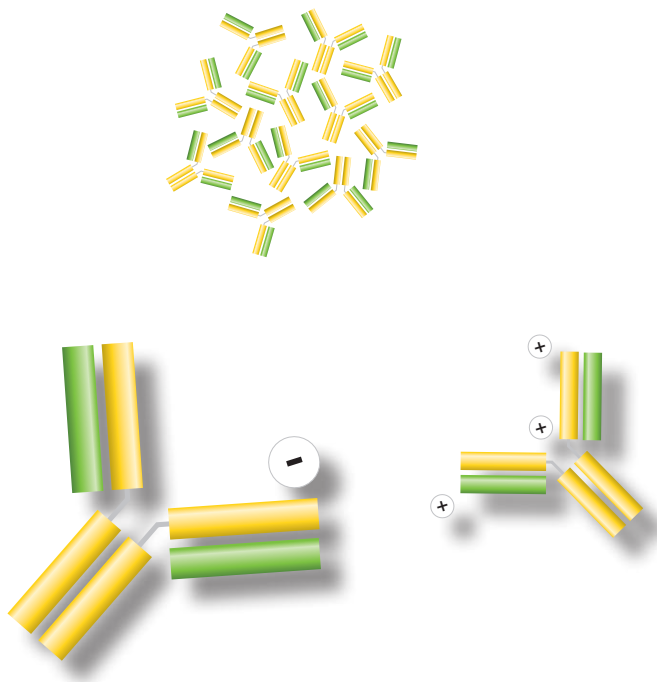
培养细胞中氨基酸流量的测定值是这些细胞代谢速率和健康状态的重要指标。它也可以用作剩余可用碳和氮养料的指标。在肝细胞和肝癌细胞系中尤其如此，其中广泛的糖原异生、尿素生成和蛋白质合成可能会消耗比其他细胞类型更多的氨基酸。

采用柱前衍生化的 HPLC 是一种分析氨基酸的标准技术。在 HPLC 分离与紫外或荧光检测中，有时通过离线手动方式完成溶液中游离氨基酸的柱前衍生化。离线衍生化的直观缺点在于，操作人员技能、能力和实验室技术可能成为误差来源；需要额外的样品处理；需要额外的时间；并提高了污染的风险。自动化在线衍生大大减少了这些误差来源，有助于提高精密度并节省时间。耐用的高分离度 HPLC 方法包括在线衍生化，相比离线方法，可提高工作效率。

常用细胞培养基和蛋白质水解产物的氨基酸组成分析结果如图 5-8 所示。该分析证实，细胞培养基的氨基酸组成与其理论组成准确匹配。此类应用可用于监测和调整氨基酸组成。该分析是通过优化生产过程确保最终生物药物产品具有高质量和高产量的重要组成部分。

下列细胞培养基用于采用 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱，通过氨基酸分析方法进行组成分析（图 5-8）。

1. 最低限度基础 Eagle 培养基 (MEM) M4655: L-精氨酸、L-胱氨酸、L-谷氨酰胺、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-缬氨酸
2. 非必需氨基酸 (NEAA) 细胞培养基补充剂 M7145: L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸、L-脯氨酸和 L-丝氨酸
3. RPMI 1640 R0083: L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-胱氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、羟基-L-脯氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸和 L-缬氨酸



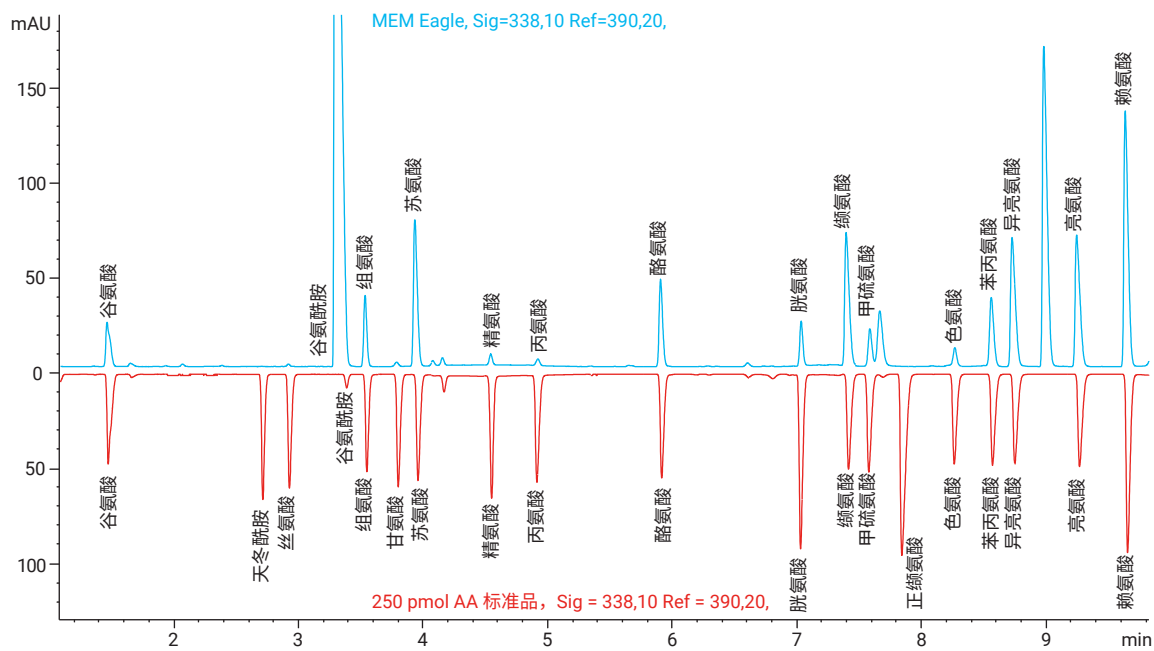


图 5. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的 Eagle MEM 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

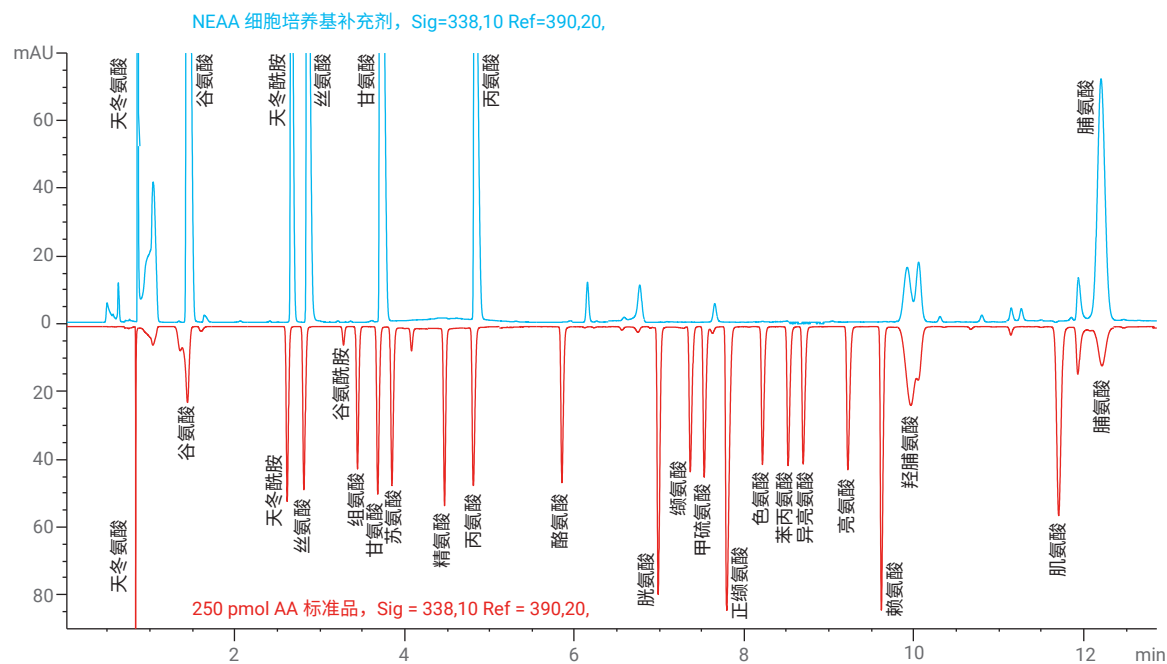


图 6. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的非必需氨基酸 (NEAA) 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

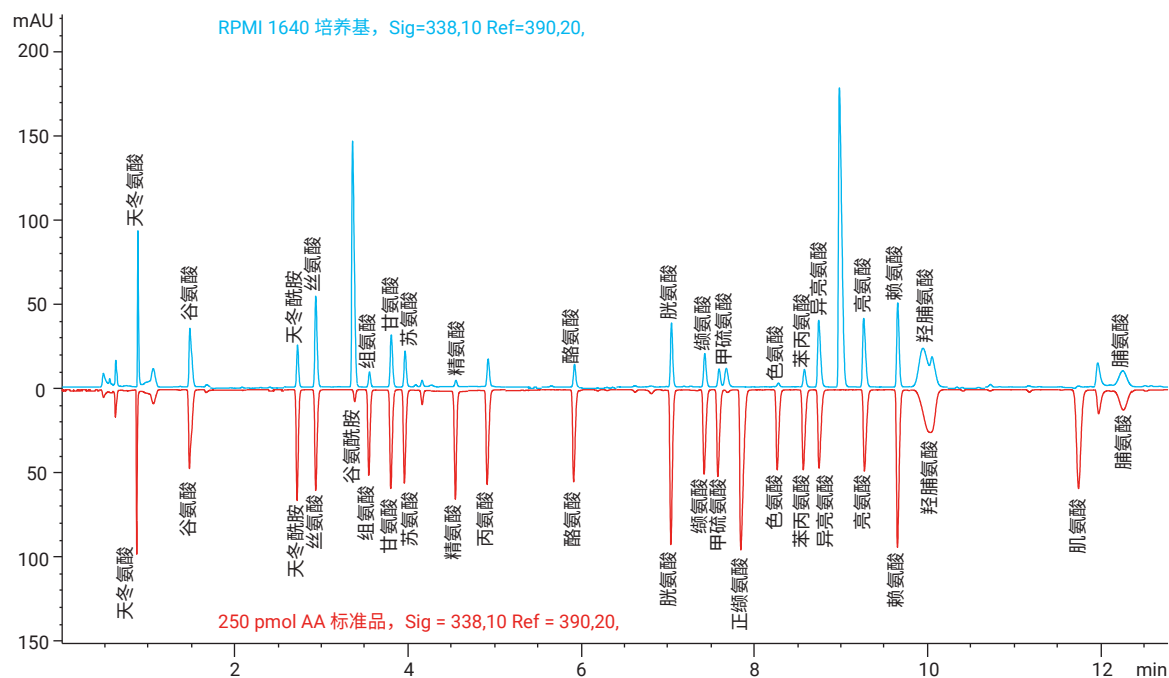


图 7. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的 RPMI 1650 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

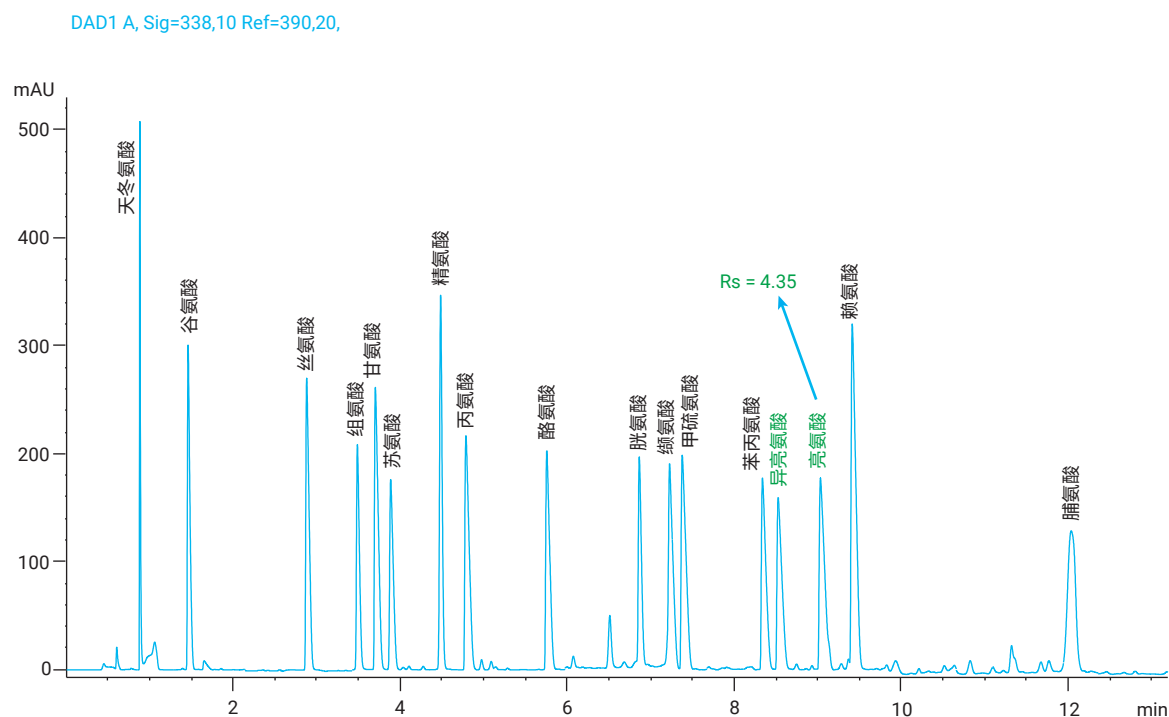


图 8. 蛋白质水解产物的氨基酸分析。利用 AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱得到的亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度远高于系统适用性要求的报告值

维护和故障排除

Agilent AdvanceBio AAA 解决方案包括技术和应用支持。推荐下列维护和故障排除小技巧，以确保您的 InfinityLab 系列液相色谱仪平稳运行。

日常维护：

- 更换自动进样器托盘中的衍生化试剂、硼酸盐缓冲液、氨基酸标准品和清洗用水
- 重新校准保留时间和响应因子
- 使用系统适用性报告检查色谱柱和保护柱性能
- 每两天将流动相 A 和 B 更换为新配制的溶剂

故障排除：

色谱分离度差

- 保护柱失效
- 分析柱损坏
- 由于连接管线过长引起柱后谱带展宽
- 务必使用较短的红色管线与小体积热交换器，以尽可能减小柱外体积

色谱图强度低

- OPA 试剂变质
- FMOC 试剂变质
- 甘氨酸污染



订购信息

色谱柱、备件和化学品	规格	部件号
AdvanceBio AAA 液相色谱柱	4.6 × 100 mm, 2.7 μm	655950-802
AdvanceBio AAA 保护柱	4.6 × 5 mm, 2.7 μm, 3/包	820750-931
AdvanceBio AAA 液相色谱柱	3.0 × 100 mm, 2.7 μm	695975-322
AdvanceBio AAA 保护柱	3.0 × 5 mm, 2.7 μm, 3/包	823750-946
硼酸盐缓冲液	0.4 mol/L 水溶液, pH 10.2, 100 mL	5061-3339
FMOC 试剂	2.5 mg/mL, 溶于乙腈, 10 × 1 mL 安瓿瓶	5061-3337
OPA 试剂	10 mg/mL, 溶于 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液和 3-巯基丙酸, 6 × 1 mL 安瓿瓶	5061-3335
二硫代二丙酸 (DTDPA) 试剂	5 g	5062-2479
内插管, 带聚合物支脚	250 μL, 100/包	5181-1270
样品瓶, 螺口盖, 棕色, 带书写签	2 mL, 经认证, 100/包	5182-0716
螺口盖, 绿色, PTFE/白色硅橡胶隔垫	100/包	5182-0721
螺口样品瓶, 透明, 平底	用于液相色谱, 6 mL, 经认证, 100/包	9301-1377
螺口盖	用于 6 mL 样品瓶, 100/包	9301-1379
隔垫	用于 6 mL 样品瓶, 100/包	9301-1378
AA 标准品	1 nmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3330
AA 标准品	250 pmol, 10/包	5061-3331
AA 标准品	100 pmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3332
AA 标准品	25 pmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3333
AA 标准品	10 pmol/μL, 10 × 1 mL	5061-3334
氨基酸补充剂试剂盒		5062-2478

如需了解有关专为生物分子表征设计的 Agilent AdvanceBio 系列创新产品的更多信息, 请访问 www.agilent.com/chem/advancebio



细胞培养基和蛋白质水解产物标准品 中氨基酸组分的测定

Agilent AdvanceBio 氨基酸分析解决方案

作者

M. Sundaram Palaniswam
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究介绍了一种使用 Agilent AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 解决方案与吸光度检测分析细胞培养基中一级氨基酸的方法。使用在线进样器程序利用 OPA 和 FMOC 进行衍生化可缩短样品前处理时间，并且相比于传统离线方法获得了更高的重现性。采用系统适用性测试以及保留时间和峰面积精密度研究证实了该解决方案在常规分析中的有效性。AdvanceBio AAA 解决方案为细胞培养基中的所有氨基酸提供了灵敏的高分离度分离。此外，还给出了用于定性分析的氨基酸的检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 和线性结果。

前言

氨基酸是蛋白质的基本结构单元。它们构成了细胞的所有蛋白质类物质，包括细胞骨架以及酶、受体和信号分子的蛋白质组分。此外，氨基酸还用于细胞生长和维持。细胞培养基在生物制药行业中发挥着重要作用。由细胞培养基提供的大部分氨基酸会参与到可能影响培养细胞命运的细胞通路中。在补料分批和灌注培养中，鉴定最佳的氨基酸浓度非常重要。因此，通过鉴定宿主细胞生长和产物生产对培养基中氨基酸的需求，可以简化氨基酸补充策略的设计。

采用柱前衍生化的 HPLC 常用于分析氨基酸。在 HPLC 分离与紫外或荧光检测中，有时通过离线手动方式完成溶液中游离氨基酸的柱前衍生化。离线衍生化的一些直接缺点在于操作者技能、能力和实验室技术会成为误差的来源。其他缺点包括需要额外的样品操作、需要额外的时间并且污染风险较高。自动化在线衍生大大减少了这些误差来源，有助于提高精密度并节省时间。因此，稳定的高分离度 HPLC 方法包括在线衍生化，相比离线方法，可提高工作效率。使用 HPLC 自动进样器的进样器编程实现一致的自动化 OPA 衍生化，并采用高效的 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱，可得到一种非常适用于细胞培养基的快速、可重现的氨基酸分析方法。该方法非常便捷，因为仅需将细胞培养基样品转移至自动进样器样品瓶进行分析。AdvanceBio AAA 色谱柱的选择性和流动相梯度可实现 23 种氨基酸的高分离度分离。

材料与方法

仪器

使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行分析，该系统配备 Agilent 1290 Infinity 二元泵输送系统 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)、Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C) 和 Agilent 1290 Infinity DAD (G4212A)。

试剂、样品与材料

用于组成分析的细胞培养基，即最低限度基础 Eagle 培养基 (M4655)、必需氨基酸 (M7145)、RPMI 1640 (R0083)、 Na_2HPO_4 和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ，均购自 Sigma-Aldrich。蛋白质水解产物购自 Fisher Scientific。所用的乙腈和甲醇购自 Lab-Scan (曼谷，泰国)。HPLC 级高纯水来自 Milli Q 水纯化系统 (Millipore Elix 10 型，美国)。

色谱柱

Agilent AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 655950-802)

配制 HPLC 流动相

流动相 A，包含 10 mmol/L Na_2HPO_4 和 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，pH 8.2。流动相 B，包含乙腈、甲醇和水 (45:45:10, v:v:v)。由于流动相 A 的消耗速率快于流动相 B，因此方便的做法是每配制 1 L 流动相 B 时配制 2 L 流动相 A。

进样稀释剂

进样稀释剂为 100 mL 流动相 A 与 0.4 mL 浓磷酸，在 4 °C 下储存于 100 mL 瓶中。为配制 0.1 mol/L HCl，将 4.2 mL 浓盐酸 (36%) 加入 500 mL 容量瓶中，该容量瓶中预先加入部分水，混合，然后加水定容至刻度。然后使用该溶液配制扩展氨基酸和内标储备液。储存于 4 °C 下。

Agilent AdvanceBio AAA 标准品和试剂盒 (部件号 5190-9426)，包括：

部件号	组分
5061-3339	硼酸盐缓冲液：0.4 mol/L 水溶液，pH 10.2，100 mL
5061-3337	FMOC 试剂，2.5 mg/mL，溶于乙腈，10 × 1 mL 安瓿瓶
5061-3335	OPA 试剂，10 mg/mL，溶于 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液和 3-巯基丙酸，6 × 1 mL 安瓿瓶
5062-2479	二硫代二丙酸 (DTDPA) 试剂，5 g
5061-3330	氨基酸标准品，1 nmol/ μL ，10 × 1 mL
5061-3331	氨基酸标准品，250 pmol，10/包
5061-3332	氨基酸标准品，100 pmol/ μL ，10 × 1 mL
5061-3333	氨基酸标准品，25 pmol/ μL ，10 × 1 mL
5061-3334	氨基酸标准品，10 pmol/ μL ，10 × 1 mL
5062-2478	氨基酸补充剂试剂盒，各 1 g

衍生化试剂

衍生化试剂（硼酸盐缓冲液、OPA 和 FMOC）是由安捷伦提供的现成溶液，并将其从容器中转移至自动进样器样品瓶中。预防措施包括：

- OPA 包装于惰性气体保护下的安瓿瓶中，以防氧化。打开后，OPA 的保质期约为 7–10 天。因此，将 100 µL 的等份 OPA 转移至微量样品瓶内插管中，并冷藏保存。然后每天更换一次 OPA 自动进样器微量样品瓶。每个安瓿瓶可连续使用 10 天（1 个样品瓶/天）
- FMOC 在干燥空气下可保持稳定，但在湿气下可发生降解。因此，将 FMOC 以 100 µL 等分转移至微量样品瓶内插管中，并冷藏保存。将打开的 FMOC 安瓿瓶转移至 10 个微量样品瓶内插管中后可持续使用 10 天
- 将硼酸盐缓冲液转移至不含样品瓶内插管的 1.5 mL 自动进样器样品瓶中，并且每 3 天更换一次

氨基酸标样的配制

- 安捷伦提供五种浓度的 17 种氨基酸溶液（10 pmol/µL–1 nmol/µL），用于绘制校准曲线。将每 1 mL 安瓿瓶的标准品按 100 µL 分装于锥形样品瓶内插管中，并储存于 4 °C 下
- 称取 59.45 mg 天冬酰胺、59.00 mg 羟脯氨酸、65.77 mg 谷氨酰胺和 91.95 mg 色氨酸加入 25 mL 容量瓶中，配制扩展氨基酸 (EAA) 储备液。用 0.1 mol/L HCl 填充至容量瓶一半，振摇或超声处理直至氨基酸溶解。然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度达到 18 nmol/µL
- 对于高灵敏度 EAA 储备液，量取 5 mL 该标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释 (1.8 nmol/µL)。包含扩展标准品的溶液在室温下不稳定，需要将其冷冻保存，并在首次出现灵敏度下降迹象时将其丢弃

内标 (ISTD) 储备液

对于一级氨基酸 ISTD 储备液，称取 58.58 mg 正缬氨酸置于 50 mL 容量瓶中。对于二级氨基酸，称取 44.54 mg 肌氨酸置于同一 50 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 将该容量瓶填充一半，振摇或超声直至溶解，然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的最终浓度为 10 nmol/µL（标准灵敏度）。对于高灵敏度 ISTD 储备液，量取 5 mL 标准灵敏度溶液，用 45 mL 水进行稀释，并储存于 4 °C 下。

根据实验需要，使用两到五种标样绘制校准曲线。在“标准分析灵敏度”分析中，通常使用 100 pmol/µL、250 pmol/µL 和 1 nmol/µL 绘制三点校准曲线。如果加入内标或其他氨基酸（如扩展氨基酸），则应按下表进行操作。表 1 列出紫外分析中通常使用的“标准分析灵敏度”浓度。

表 1. 用于完整和还原态 mAb 分析的色谱参数

	最终 AA 溶液的浓度 (pmol/µL)		
	900	225	90
量取 5 mL 18 nmol EAA	5 mL	5 mL	5 mL
用水稀释		15 mL	45 mL
稀释后的 EAA 混合液	5 mL	20 mL	50 mL
量取 5 mL 稀释后的 EAA 混合液	5 mL	5 mL	5 mL
加入 10 nmol ISTD 溶液	5 mL	5 mL	5 mL
EAA-ISTD 混合液	10 mL	10 mL	10 mL
量取 100 µL EAA-ISTD 混合液	100 µL	100 µL	100 µL
对于 1 nmol AA，加入：	900 µL	–	–
对于 250 pmol AA，加入：	900 µL	–	
对于 100 pmol AA，加入：	–	–	900 µL
含 EAA 和 500 pmol/µL ISTD 的最终 AA 溶液	1 mL	1 mL	1 mL

在线衍生

根据自动进样器型号不同，自动化在线衍生程序稍有不同。对于 Agilent G4226A 孔板自动液体进样器 (WPALS)，进样程序如下：

1. 从硼酸盐样品瓶（部件号 5061-3339）中吸取 2.5 μL
2. 从样品瓶中吸取 1.0 μL
3. 在清洗口，将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4. 等待 0.2 分钟
5. 从 OPA 样品瓶（部件号 5061-3335）中吸取 0.5 μL
6. 在清洗口，以默认速度将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7. 从 FMOC 样品瓶（部件号 5061-3337）中吸取 0.4 μL
8. 在清洗口，以默认速度将 4.4 μL 混合液混合 10 次
9. 从进样稀释剂样品瓶中吸取 32 μL
10. 在清洗口，将 20 μL 混合液混合 8 次
11. 进样
12. 等待 0.1 分钟
13. 阀切换至旁路

衍生化试剂和样品的位置取决于分析人员和 ALS 样品盘配置。使用配备 2 \times 56 孔板托盘的 G1367C（部件号 G2258-44502）时，位置为：

- 样品瓶 1：硼酸盐缓冲液
- 样品瓶 2：OPA
- 样品瓶 3：FMOC
- 样品瓶 4：进样稀释剂
- P1-A-1：样品

柱温箱 (TCC)

左侧和右侧温度均设置为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。在温度处于 ± 0.8 $^{\circ}\text{C}$ 以内时进行分析。

二极管阵列检测器 (DAD)

信号 A： 338 nm，带宽 10 nm，参比波长 390 nm，带宽 20 nm。

信号 B： 262 nm，带宽 16 nm，参比波长 324 nm，带宽 8 nm。

信号 C： 338 nm，带宽 10 nm，参比波长 390 nm，带宽 20 nm。

为了在一幅色谱图中检测 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸，需要切换检测器波长。在最后洗脱的 OPA 衍生化氨基酸（赖氨酸，标准品中的峰 20）和第一个洗脱的 FMOC 衍生化氨基酸（羟脯氨酸，标准品中的峰 21）之间进行切换。

使用 DAD，可以通过首先采集两个通道来确定适当的转换点。信号 A 338 nm，用于检测 OPA 衍生化氨基酸；信号 B 262 nm，用于检测 FMOC 衍生化氨基酸。根据该分析确定在运行过程中切换波长的最佳时间点。然后使用单个通道进行后续运行，利用检测器时间表功能，在 OPA-赖氨酸洗脱和 FMOC-羟脯氨酸洗脱之间适当的时间处设定从 338 nm 至 262 nm 的波长切换程序。这种切换可以在一幅色谱图中检测 OPA 和 FMOC 衍生化氨基酸。所有色谱柱均使用 > 0.01 分钟的峰宽设置：

线性、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 测定

例如，使用扩展氨基酸 (EAA) 储备溶液、天冬酰胺 (59.45 mg)、谷氨酰胺 (65.77 mg) 和色氨酸 (91.95 mg) 进行线性、LOD 和 LOQ 测定。称取这些标准品，加入 25 mL 容量瓶中，用 0.1 N HCl 填充一半体积，然后混合或超声直至溶解。然后用水将容量瓶定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度为 18 nmol/ μL 。

在这些标准氨基酸浓度为 0.9–1000 pmol/ μL 的范围内研究线性。配制三份适当的 AA 标准溶液，进样到色谱仪中。由校准函数估算 LOD 和 LOQ。LOD 和 LOQ 分别按 3 (SD(a)/b) 和 10 (SD(a)/b) 计算，其中 SD(a) 是截距的标准偏差，b 是校准函数的斜率。

梯度程序	
时间 (min)	%B
0	2
0.35	2
13.4	57
13.5	100
15.7	100
15.8	2
18	结束
流速：4.6 mm 内径时为 1.5 mL/min	

表 3. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱 (n = 6) 分离氨基酸 (1000 pmol) 得到的保留时间和峰面积精度 (重复测定六次)

氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	0.151	2.60	13.缬氨酸	0.025	2.4
2.谷氨酸	0.512	2.19	14.甲硫氨酸	0.025	1.78
3.天冬酰胺	0.124	2.13	15.正缬氨酸	0.019	1.77
4.丝氨酸	0.114	1.74	16.色氨酸	0.024	2.03
5.谷氨酰胺	0.092	1.8	17.苯丙氨酸	0.027	1.98
6.组氨酸	0.077	1.39	18.异亮氨酸	0.025	2.17
7.甘氨酸	0.068	1.48	19.亮氨酸	0.020	1.81
8.苏氨酸	0.059	2.26	20.赖氨酸	0.022	2
9.精氨酸	0.027	1.66	21.羟脯氨酸	0.014	3.14
10.丙氨酸	0.031	1.87	22.肌氨酸	0.015	5.01
11.酪氨酸	0.034	2.04	23.脯氨酸	0.011	2.58
12.半胱氨酸	0.030	2.22			

根据欧洲药典 (Ph. Eur.) 确定的系统适用性

欧洲药典 (Ph. Eur.) 规定了对氨基酸及氨基酸混合物的定性和定量组成的要求。还规定了允许的杂质要求。氨基酸制造商在欧洲经销其产品之前，在法律上有义务证明其氨基酸可满足这些指标要求。亮氨酸 (Leu) 是一种支链 α-氨基酸，通过发酵工艺生产 (图 2)。在该工艺过程中，异亮氨酸可作为副产物得到。欧洲药典规定亮氨酸与异亮氨酸的分离度不得小于 1.5^[1]。

测定三种氨基酸的十个浓度点，重复三次。三种标准氨基酸在测试范围内显示出良好的线性。峰面积响应遵循等式 $y = mx + C$ ，其中截距 C 在 95% 置信区间内为零，相关系数的平方 (R²) 始终大于 0.99。图 3 显示了所评估浓度范围内天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸的线性曲线。

使用 UV 检测得到的 LOD 和 LOQ 分别为 0.9 pmol 和 3.8 pmol，表明该方法的灵敏度很高。表 5 所示为天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸的 LOD 和 LOQ 测定值。

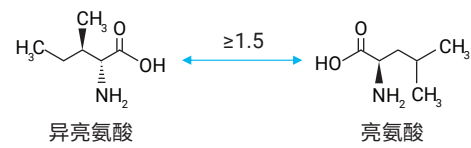


图 2. 异亮氨酸与亮氨酸的化学关系

表 4. 使用 AdvanceBio AAA 色谱柱和 AA 标准品进行系统适用性测试

	Agilent AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	Agilent AdvanceBio AAA, C18, 3 × 100 mm, 2.7 μm
系统适用性		
亮氨酸与异亮氨酸之间的 分离度 (≥ 1.5)	4.5	4.6

表 5. 三种氨基酸的 LOD 和 LOQ

天冬酰胺		谷氨酰胺		色氨酸	
浓度 (pmol)	信噪比	浓度 (pmol)	信噪比	浓度 (pmol)	信噪比
0.9 (LOD)	5.3	0.9 (LOD)	3.0	0.9 (LOD)	4.5
1.9 (LOQ)	10.8	3.8 (LOQ)	13.8	3.8 (LOQ)	20.5

结果与讨论

高通量常规分析

图 1 中的色谱图显示了高通量氨基酸分离应用中实现的标准分析灵敏度。该色谱图采用配备 Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪，通过氨基酸分析方法和 DAD 检测获得。一次运行可在 18 分钟内完成（包括再平衡），并获得足够高的分离度。在 338 nm 下监测一级氨基酸（1–20，经 OPA 衍生化），如图 1 所示，同时在 262 nm 下监测二级氨基酸（21–23，经 FMOC 衍生化）。

保留时间和峰面积的精密度 (n = 6)

表 2 和表 3 为氨基酸方法重复分析六次后 100 和 1000 pmol 浓度下所有氨基酸的平均保留时间和峰面积的 RSD 值。所有氨基酸峰的保留时间 RSD（包括早洗脱峰 1）均小于 1.2%，显示出优异的梯度重现性。峰面积 RSD 小于 5%，表明进样精度较高。RSD 值体现出氨基酸分析方法的稳定性和精度。

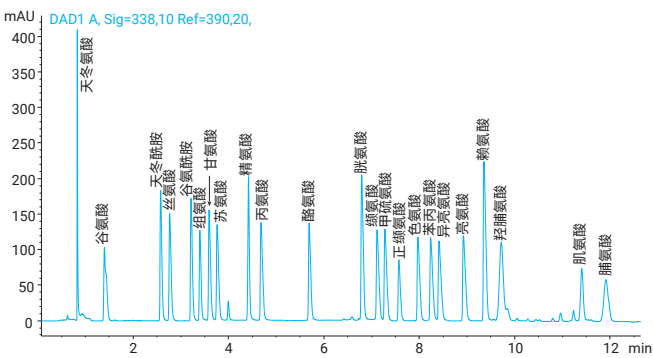


图 1. 使用氨基酸分析方法和 AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分离氨基酸标准品 (1 nmol)

表 2. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱分离氨基酸 (100 pmol) 得到的保留时间和峰面积精度 (n = 6)

氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)	氨基酸	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1.天冬氨酸	1.270	1.066	13.缬氨酸	0.084	2.47
2.谷氨酸	0.973	1.85	14.甲硫氨酸	0.073	1.82
3.天冬酰胺	0.605	1.79	15.正缬氨酸	0.073	1.72
4.丝氨酸	0.629	1.82	16.色氨酸	0.054	1.57
5.谷氨酰胺	0.470	1.56	17.苯丙氨酸	0.051	1.66
6.组氨酸	0.430	1.22	18.异亮氨酸	0.047	1.72
7.甘氨酸	0.477	1.92	19.亮氨酸	0.03	1.7
8.苏氨酸	0.440	1.95	20.赖氨酸	0.028	1.66
9.精氨酸	0.251	2.15	21.羟脯氨酸	0.021	4.13
10.丙氨酸	0.280	3.06	22.肌氨酸	0.026	1.15
11.酪氨酸	0.128	1.65	23.脯氨酸	0.021	4.36
12.半胱氨酸	0.067	1.9			

细胞培养基和蛋白质水解产物标准品的氨基酸分析

我们分析了常用细胞培养基补充剂的氨基酸组成。这些标准品包括：最低限度基础 Eagle 培养基 (MEM)、非必需氨基酸 (NEAA)、RPMI 1640 R0083、蛋白质水解产物标准品。然后将结果与氨基酸标准品进行比较。图 4 和表 7 所示为培养基和氨基酸标准品的氨基酸组成叠加图。

显然，通过该方法测定的细胞培养基补充剂氨基酸组成与其理论组成准确匹配。此外，观察到蛋白质水解产物标准品中异亮氨酸和亮氨酸基线分离的分离度因子为 4.35，在满足这些组分的法规要求方面表现明显优于其他厂商的色谱柱。此类应用可用于监测和调节氨基酸组成，是通过优化生产过程确保最终生物药物产品具有高质量和高产量的重要组成部分。

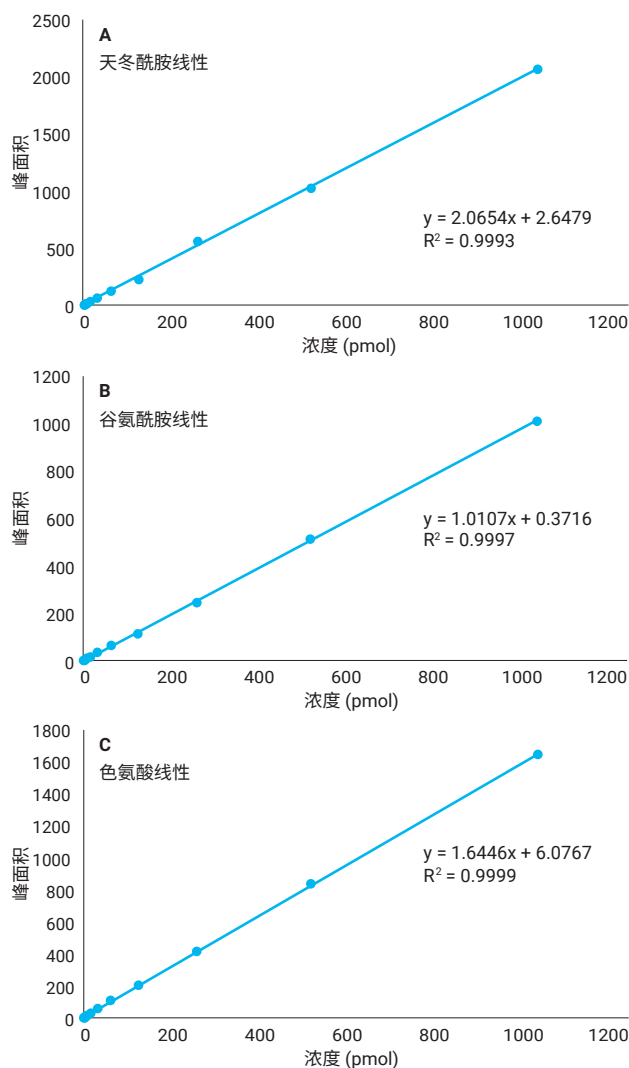


图 3. 浓度范围为 0.9–1000 pmol 的 10 个标准浓度天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸的线性曲线，显示出出色的线性相关系数值

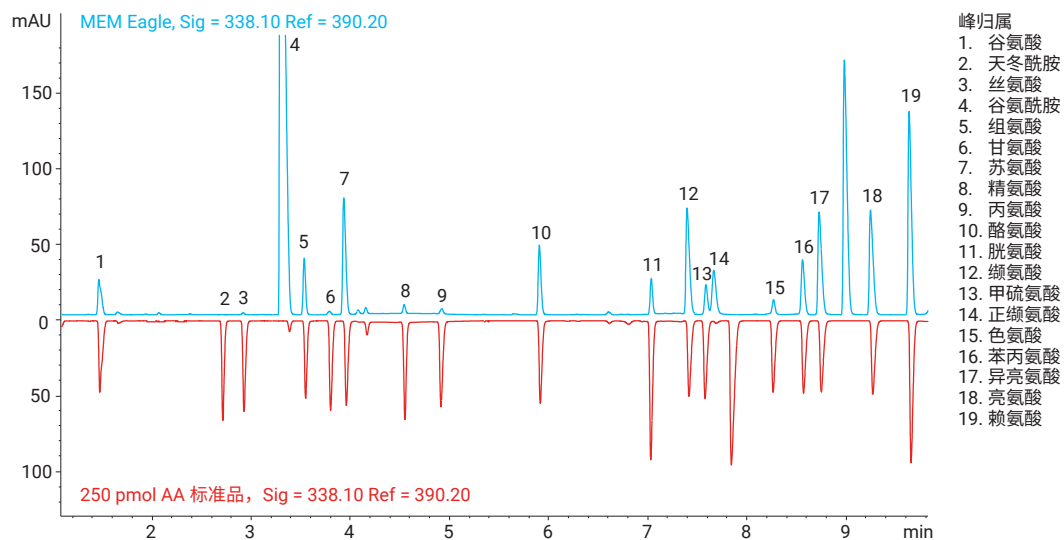


图 4. MEM 培养基的氨基酸分析结果（蓝色迹线）和 AA 标准品分析结果（红色迹线）的镜像

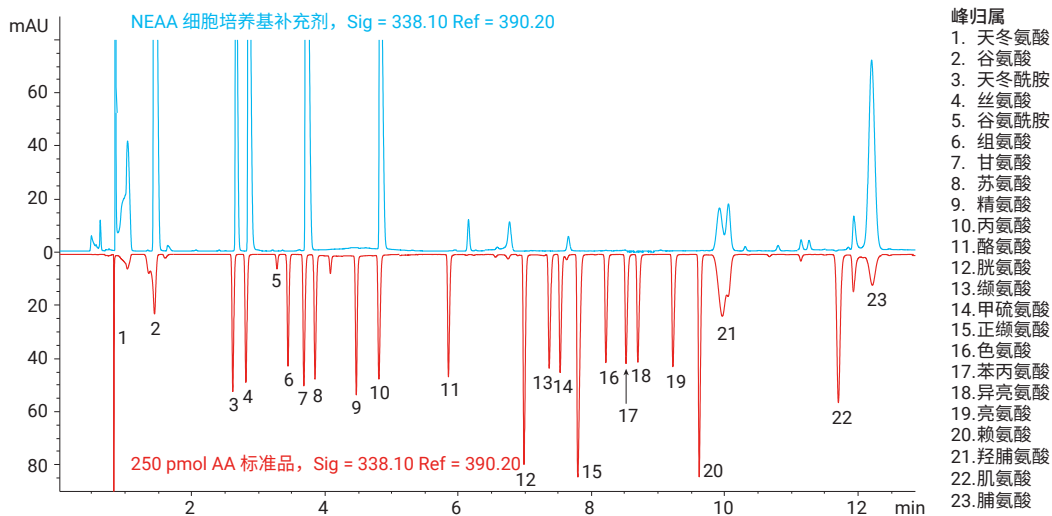


图 5. NEAA 培养基的氨基酸分析结果（蓝色迹线）和 AA 标准品分析结果（红色迹线）的对比

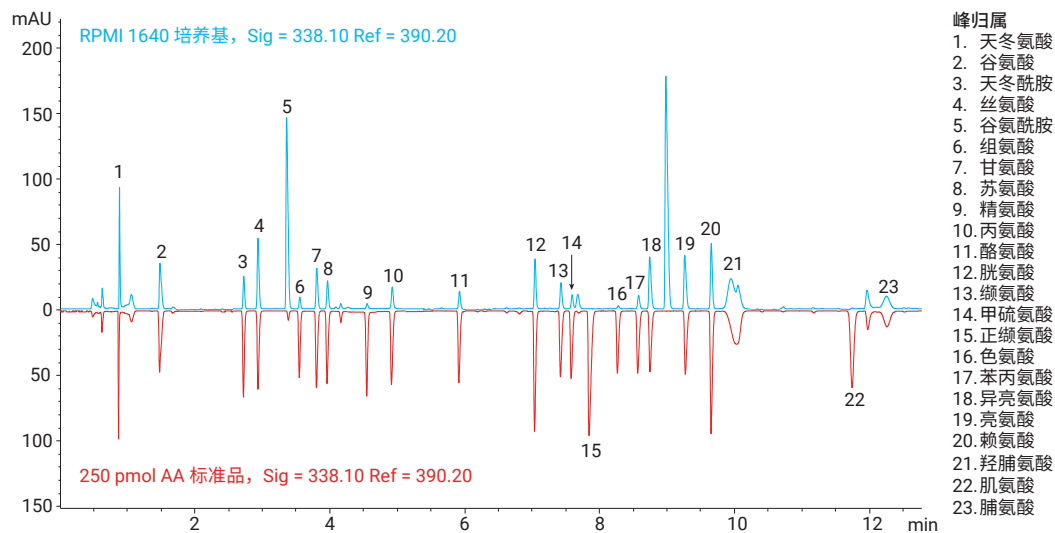


图 6. RPMI 1650 培养基的氨基酸分析结果（蓝色迹线）和 AA 标准品分析结果（红色迹线）的对比

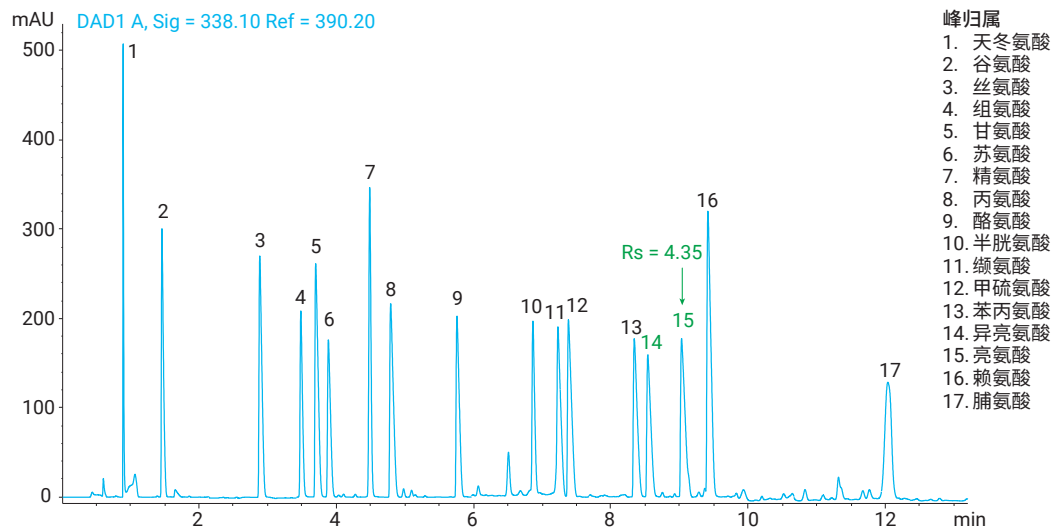


图 7. 蛋白质水解产物标准品的氨基酸分析利用 Agilent AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱得到的亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度远高于这对化合物系统适用性要求的报告值

结论

氨基酸分析是表征蛋白质和肽基产品的重要方法。研究生物工艺中氨基酸的作用有助于更好地理解培养策略，提高产品的产量和质量。此外，通过确定的氨基酸组成，可以确认样品身份并衡量样品纯度。本应用简报介绍了几种用于分析氨基酸的安捷伦工具。我们首先使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪和 Agilent AdvanceBio AAA 试剂盒，使用 OPA/FMOC 试剂进行氨基酸的自动在线衍生化。然后使用 AdvanceBio AAA 液相色谱柱分离衍生化氨基酸，从而快速、灵敏、可重现地实现氨基酸的分离。该方法具有优异的峰面积和 RT 精度，并能满足系统适用性要求。三种氨基酸浓度范围为 0.9 pmol–1 nmol 的 10 个标准浓度的线性曲线显示出出色的线性相关系数值，表明该方法可以实现准确定量。氨基酸的 LOD 和 LOQ 分别为 0.9 pmol 和 3.8 pmol，表明该方法的灵敏度很高。此外，该方法能够分离和检测细胞培养基和蛋白质水解产物标准物中的氨基酸。通过该方法测定的氨基酸组成与其理论组成呈良好相关性。

参考文献

1. 欧洲药典 9.0 (2.2.56) 氨基酸分析

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问 www.agilent.com。

使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动氨基酸分析

作者

William Long
安捷伦科技公司

摘要

在本应用简报中，将之前使用 3.5 和 1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱开发的自动预柱 OPA/FMOC 氨基酸方法扩展至包括 2.7 μm Agilent Poroshell HPH-C18 表面多孔色谱柱。该色谱柱具有良好的使用寿命，并可以轻松转换至不同的色谱柱规格，这两个特性在本研究中均有体现。此外，本文还介绍了该色谱柱在发酵产物中的应用。

前言

表面多孔颗粒填料 (SPP) 技术基于具有实心核和表面多孔外壳的颗粒开发。这种颗粒具有 1.7 μm 的实心核和 0.5 μm 的多孔外壳。总粒径约为 2.7 μm 。2.7 μm 表面多孔颗粒填料的柱效为亚 2 μm 全多孔颗粒填料的 80%–90%，而反压比后者降低了 40%–50%。与全多孔颗粒填料相比，表面多孔颗粒填料具有更窄的粒度分布，这使柱床更均匀，并能减小色谱柱中的扩散。同时，较薄的多孔壳层实现了较低的传质阻力。因此，较高流速下的柱效损失极小^[1]。此外，由于色谱柱中含有一个 2 μm 筛板，因此它们的抗堵塞能力与 3.5 μm 和 5 μm 色谱柱相同。直到目前，所有二氧化硅型 SPP 材料在 pH 较高的缓冲液（包括磷酸盐缓冲液）中的寿命仍然有限。为获得更长的寿命，必须通过表面改性或特殊的键合改性对基颗粒填料进行保护。使用独特工艺对 Agilent Poroshell HPH-C18 颗粒的表面进行化学改性，形成一个有机层以避免硅胶在高 pH 条件下溶解。HPLC 色谱柱和仪器的持续改进带来了改进 HPLC 方法的机遇。一种久经验证的邻苯二甲醛/9-苄基甲基氯甲酸酯 (OPA/FMOC) 衍生氨基酸方法原本是在 HP 1090 系列 HPLC 系统上开发，之后针对 Agilent 1100 系列进行过更新，现在又借助 Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱和表面多孔 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱得到了进一步的发展^[2-8]。

实验部分

配制 HPLC 流动相

流动相 A 含有 10 mmol/L Na_2HPO_4 、10 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 5 mmol/L NaN_3 ，pH 8.2。为配制 1 L 流动相，称取 1.4 g 无水 Na_2HPO_4 和 3.8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ，将其溶于 1 L 水中，加入 32 mg NaN_3 。用 1.2 mL 浓盐酸将 pH 调节为 8.4 左右，然后加入数滴酸，将 pH 调节为 8.2。在调节 pH 之前充分搅拌，使硼酸盐晶体完全溶解。用 0.45 μm 再生纤维素膜（部件号 3150-0576）进行过滤。流动相 B 含有乙腈:甲醇:水 (45:45:10, v:v:v)。所有流动相溶剂均为 HPLC 级。流动相 A 的消耗速率高于流动相 B，因此，每配制 1 L 流动相 B，应配制 2 L 流动相 A 为宜。

进样稀释剂为 100 mL 流动相 A 和 0.4 mL 浓 H_3PO_4 ，盛装在 100 mL 瓶中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。

如需配制 0.1 mol/L HCl，将 4.2 mL 浓盐酸 (36%) 加入盛有部分水的 500 mL 容量瓶中。混合，并用水定容至刻度。此溶液用于制备扩展氨基酸及内标储备液。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存

衍生化试剂（硼酸盐缓冲液、OPA 和 FMOC）由安捷伦提供，是即拆即用的溶液。只需将它们从容器中转移至自动进样器样品瓶中即可。安全预防措施包括：

- OPA 包装于惰性气体保护下的安瓿中，以防氧化。打开后，OPA 的保质期为 7 至 10 天左右。建议将 100 μL 的等份 OPA 转移至微量样品瓶内插管中。标示名称和日期，加盖并冷藏。每天更换一次 OPA 自动进样器微量样品瓶。每个安瓿可连续使用 10 天
- FMOC 在干燥空气下可保持稳定，但在湿气下可发生降解。也应以 100 μL 的等份将其转移至微量样品瓶内插管中。标示名称和日期，盖紧并冷藏。与 OPA 类似，将打开的 FMOC 安瓿转移至 10 个微量样品瓶内插管后，可连续使用 10 天（每天一瓶）
- 可以将硼酸盐缓冲液转移至不含样品瓶内插管的 1.5 mL 自动进样器样品瓶中。每三天更换一次

氨基酸标样的配制

安捷伦提供五种浓度的 17 种氨基酸溶液 (10 pmol/ μL –1 nmol/ μL)，用于绘制校准曲线。将每个 1 mL 的标准品安瓿（部件号 5061-3330 至 5061-3334）分配至锥形样品瓶内插管中，分为 100 μL 等份。将等份标准品加盖并冷藏于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下。如需配制扩展氨基酸 (EAA) 储备液，称取 59.45 mg 天冬酰胺、59.00 mg 羟脯氨酸、65.77 mg 谷氨酰胺、91.95 mg 色氨酸，加入 25 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 填充容量瓶一半，并振摇或超声直至溶解。用水定容至刻度，使每种氨基酸的总浓度为 18 nmol/ μL 。对于高灵敏度 EAA 储备液，量取 5 mL 该标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释 (1.8 nmol/ μL)。含混合标准品的溶液在室温下不稳定。需要将其冷冻保存，并在首次出现灵敏度下降迹象时将其丢弃。

对于一级氨基酸 ISTD 储备液，称取 58.58 mg 正缬氨酸置于 50 mL 容量瓶中。对于二级氨基酸，称取 44.54 mg 肌氨酸置于同一 50 mL 容量瓶中。用 0.1 mol/L HCl 填充容量瓶一半，并振摇或超声直至溶解，然后用水定容至刻度，使每种氨基酸的最终浓度为 10 nmol/ μL （标准灵敏度）。对于高灵敏度 ISTD 储备液，量取 5 mL 标准灵敏度溶液，并用 45 mL 水进行稀释。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。根据实验需要，使用两到五种标样绘制校准曲线。在标准灵敏度分析中，通常使用 100 pmol/ μL 、250 pmol/ μL 和 1 nmol/ μL 绘制三点校准曲线。

泵参数

所有方法的泵参数包括压缩系数 ($\times 10^{-6}$ bar) A: 35, B: 80, 在最小进样量 20 μL 下 (A, B)。

在线衍生

根据自动进样器型号不同, 自动化在线衍生程序稍有不同。对于 Agilent G1376C 孔板自动液体进样器 (WPALS), 进样程序如下:

1. 从硼酸盐样品瓶 (部件号 5061-3339) 中吸取 2.5 μL
2. 从样品瓶中吸取 1.0 μL
3. 在清洗口, 将 3.5 μL 混合液混合 5 次
4. 等待 0.2 分钟
5. 从 OPA 样品瓶 (部件号 5061-3335) 中吸取 0.5 μL
6. 在清洗口, 以默认速度将 4.0 μL 混合液混合 10 次
7. 从 FMOC 样品瓶 (部件号 5061-3337) 中吸取 0.4 μL
8. 在清洗口, 以默认速度将 4.4 μL 混合液混合 10 次
9. 从进样稀释剂样品瓶中吸取 32 μL
10. 在清洗口, 将 20 μL 混合液混合 8 次
11. 进样
12. 等待 0.1 分钟
13. 阀切换至旁路

衍生化试剂和样品的位置取决于分析人员和 ALS 样品盘配置。使用配备 2×56 孔板托盘的 G1367C (部件号 G2258-44502) 时, 位置为:

- 样品瓶 1: 硼酸盐缓冲液
- 样品瓶 2: OPA
- 样品瓶 3: FMOC
- 样品瓶 4: 进样稀释剂
- P1-A-1: 样品

柱温箱 (TCC)

左侧和右侧温度设置为 40 °C。当温度处于 ± 0.8 °C 以内时进行分析。使用的散热器请参见表 5。

二极管阵列检测器 (DAD)

信号 A: 338 nm, 带宽 10 nm, 参比波长 390 nm, 带宽 20 nm

信号 B: 262 nm, 带宽 16 nm, 参比波长 324 nm, 带宽 8 nm

信号 C: 338 nm, 带宽 10 nm, 参比波长 390 nm, 带宽 20 nm

DAD 编程为在赖氨酸洗脱之后, 羟脯氨酸洗脱之前, 切换至 262 nm, 带宽 16 nm, 参比波长 324 nm, 带宽 8 nm。通过检查峰 20 和 21 之间的信号 A 和 B 时间来确定信号 C, 然后选择合适的波长切换点。确定切换时间并编程到方法中之后, 信号 A 和 B 是可选的。

所有色谱柱均使用 > 0.01 分钟的峰宽设置。

结果与讨论

如图 1 所示，使用相同的色谱条件时，分离结果非常接近。两根色谱柱上混合物的洗脱顺序相同，如图 2 所示，Eclipse Plus C18 和 Poroshell HPH-C18 的氨基酸样品保留时间高度相关，相关系数为 0.997。从色谱图中可以看出，Poroshell HPH-C18 色谱柱的保留时间略短。存在一些显著的色谱差异。因此，使用 Poroshell HPH-C18 时，亮氨酸和赖氨酸的分离较好，而赖氨酸和羟脯氨酸与肌氨酸/脯氨酸的分离较差。正如之前应用简报中的建议，可以改变色谱法以增强所需峰对的分度。

图 1 中的条件

参数	值																
色谱柱：	Agilent Poroshell HPH C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm（部件号 695975-702）或 Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 × 100 mm, 3.5 μm（部件号 959961-902）																
流速：	1.5 mL/min																
梯度：	<table><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr><tr><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>0.35</td><td>2</td></tr><tr><td>13.4</td><td>57</td></tr><tr><td>13.5</td><td>100</td></tr><tr><td>15.7</td><td>100</td></tr><tr><td>15.</td><td>8 2</td></tr><tr><td>18</td><td>结束</td></tr></table>	时间 (min)	%B	0	2	0.35	2	13.4	57	13.5	100	15.7	100	15.	8 2	18	结束
时间 (min)	%B																
0	2																
0.35	2																
13.4	57																
13.5	100																
15.7	100																
15.	8 2																
18	结束																

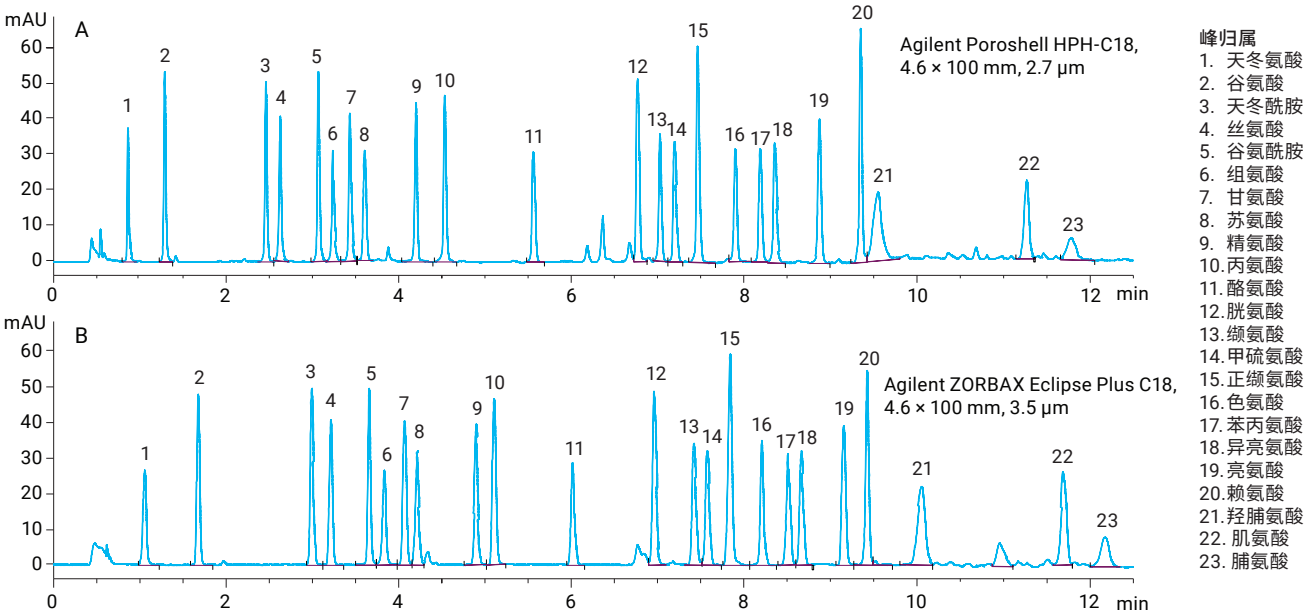


图 1. 使用氨基酸方法对比 Agilent Poroshell HPH C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱

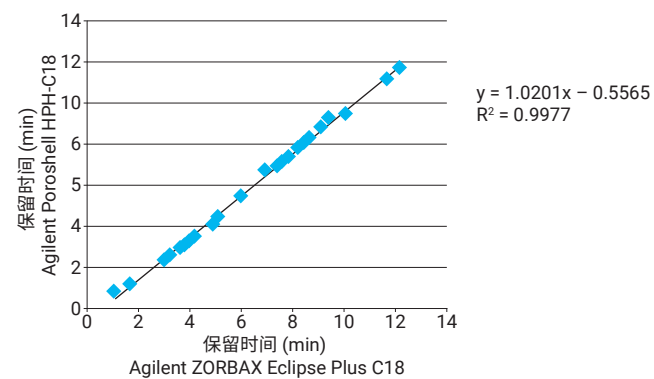


图 2. Agilent Poroshell HPH-C18 和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的保留时间相关性

色谱柱规格

该方法可轻松扩展至不同色谱柱尺寸。本次研究了三种色谱柱规格。所有色谱柱的长度均为 100 mm，内径分别为 4.6 mm、3.0 mm、2.1 mm，如图 3 所示。本研究方法的唯一变化是流速的改变。表 1 列出了整个过程中使用的梯度程序。流速根据色谱柱的直径变化。4.6 mm × 100 mm 色谱柱使用的流速为 1.5 mL/min。3 mm 和 2.1 mm 色谱柱的流速分别为 0.62 mL/min 和 0.21 mL/min。对于所有情况，均将小体积热交换器与较短的红色管线配套使用，以尽可能减小柱外体积。使用配备低扩散加热和管线的 Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱系统，柱压为大约 175 bar。我们观察到，随着色谱柱内径从大到小，所有分析物的保留时间均略有增加（选择性未改变）。这是由于梯度延迟时间增加所致。随着流速随色谱柱内径从大到小的变化而降低，梯度延迟体积保持不变，因此梯度到达色谱柱所需的时间延长。通过增减液相色谱系统的梯度延迟体积（增加或减少泵和色谱柱进样口之间的毛细管长度/直径/体积），可以减小或消除各种色谱柱内径之间的保留时间差异。

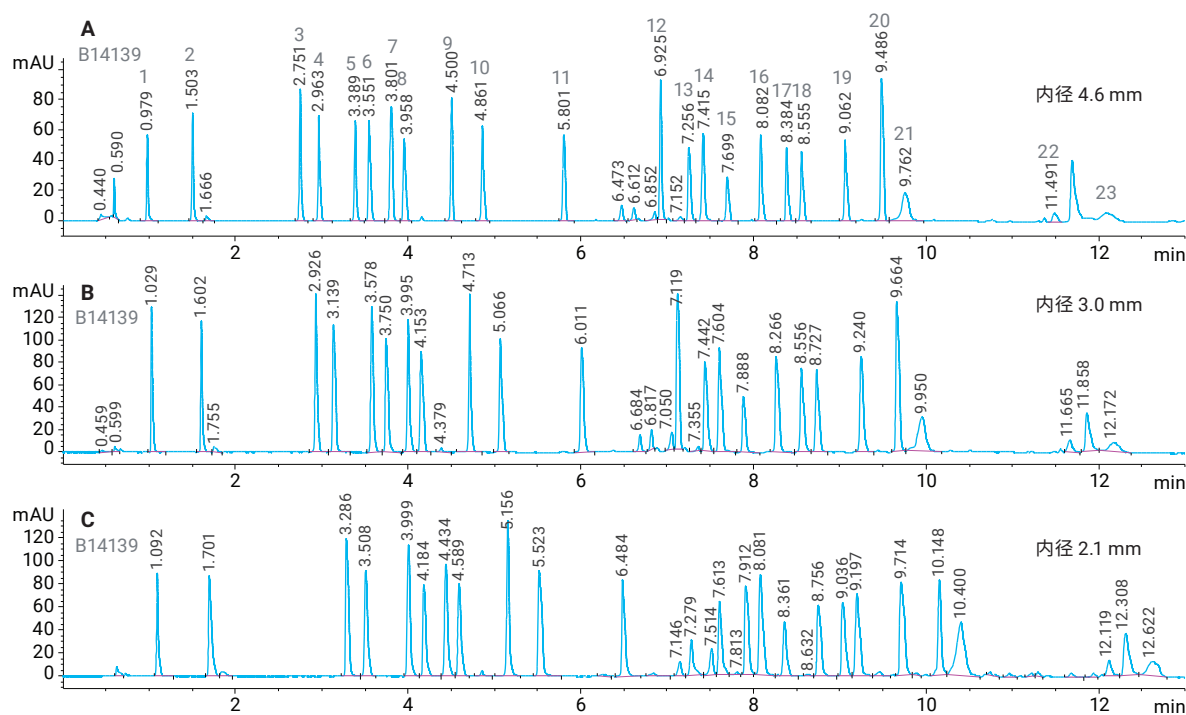


图 3. 使用氨基酸方法对比不同内径的 Agilent Poroshell HPH-C18 100 mm 色谱柱

批间变异性

批间重现性也是方法开发中的一个重要因素。在采用一种方法之前，建议采取的早期验证步骤之一是使用至少三个不同批次的色谱柱检查方法性能。

遵循良好的验证实践，对装填生产批次不同颗粒填料，规格分别为 4.6×100 mm、 3.0×100 mm、 2.1×100 mm 的三根色谱柱进行检验。图 4A–C 所示是这三组的叠加图。从图 4A 中可以看出，在使用 4.6×100 mm 色谱柱进行的氨基酸分离中，所有化合物均获得了良好的峰形和基线分离形状。洗脱顺序没有明显变化，批间重现性良好。图 4A 中可以看到保留时间有轻微变化，但 *k'* 保持不变。然而，波长切换时间必须有轻微变化，因为这关系到亮氨酸和羟脯氨酸的洗脱时间。由图 4B 和图 4C 可见，内径较小的色谱柱也表现出类似的重现性。

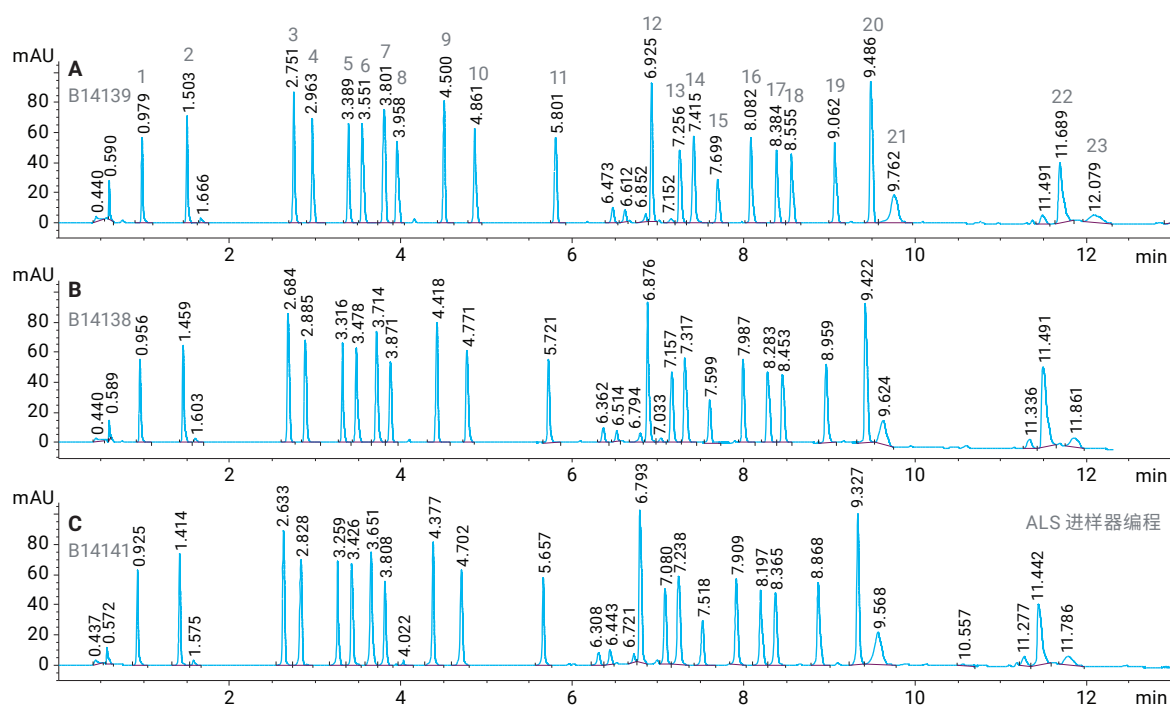


图 4A. 使用三个批次的 Agilent Poroshell HPH-C18, 4.6×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ (部件号 695975-702) 分离氨基酸和内标

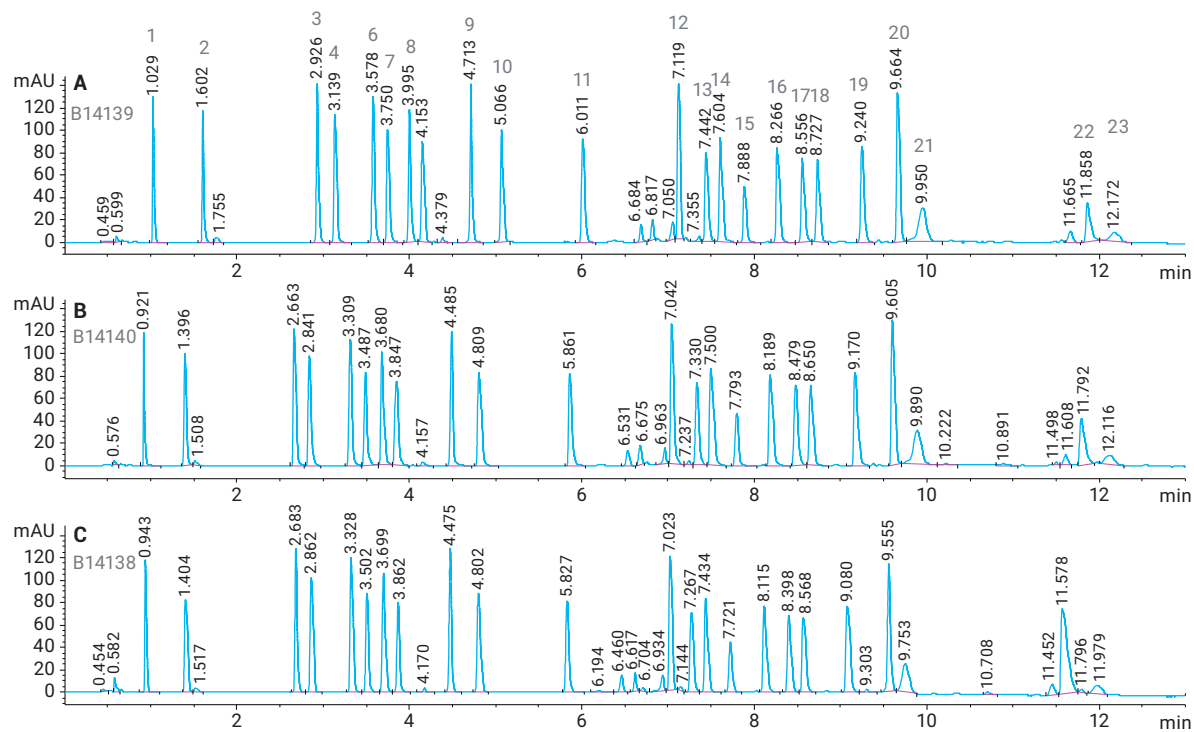


图 4B. 使用三个批次的 Agilent Poroshell HPH-C18, 3 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-502) 分离氨基酸和内标

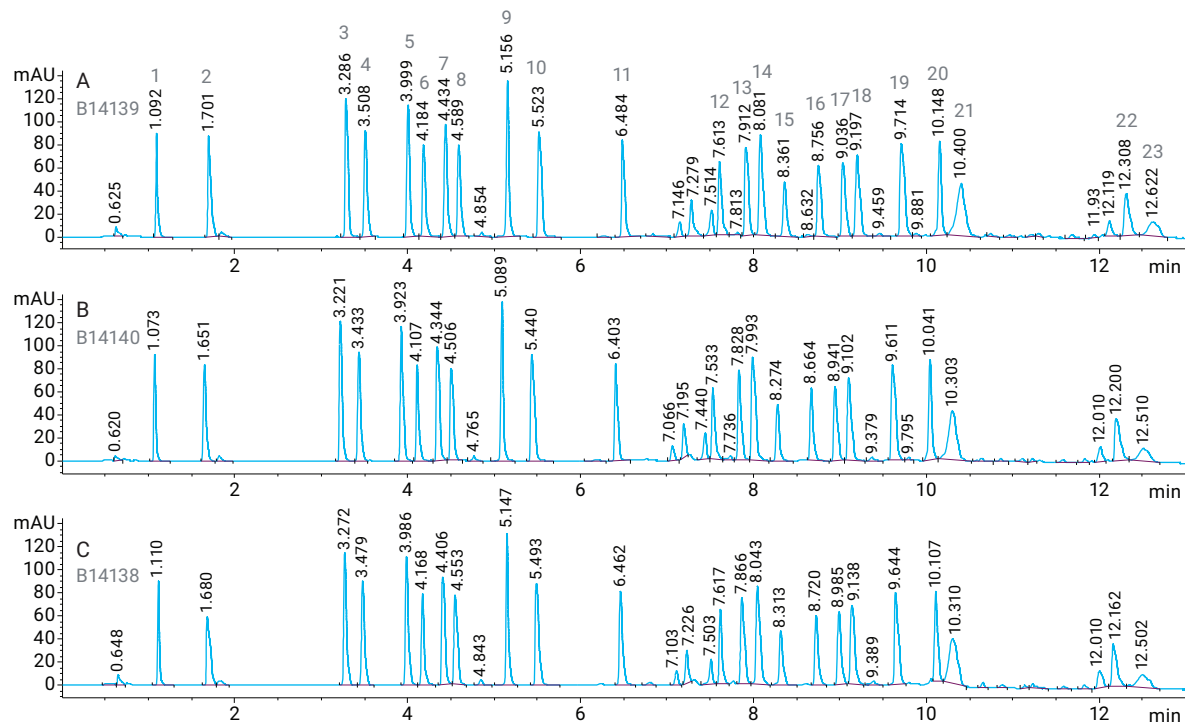


图 4C. 使用三个批次的 Agilent Poroshell HPH-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-702) 分离氨基酸和内标

使用寿命

色谱柱的使用寿命是色谱分析人员分析氨基酸样品时的重要考虑因素。大多数硅胶柱在长期暴露于这些条件之后都会失效。Kirkland 等人^[9] 以及 Tindall 和 Perry^[10] 讨论了硅胶柱在磷酸盐缓冲液中使用寿命缩短的可能原因，双方都认为色谱柱的使用寿命不长。

有两种方法可以在高 pH 条件下保持硅胶 HPLC 色谱柱的稳定性。一种方法是采用类似 Agilent ZORBAX Extend C18 色谱柱的特殊键合相。该色谱柱使用双配位键合以防止硅胶在高 pH 条件下发生溶解。在高 pH 条件下保持稳定性的另一种方法是对硅胶自身进行改性，以降低其溶解性。Poroshell HPH 颗粒填料的表面使用独特工艺进行了化学改性，形成有机层以避免硅胶在高 pH 条件下溶解^[11]。

图 5 是四张色谱图的叠加图。分别制备一瓶 4 L 的流动相 A 和 B。使用一根 2.1 × 100 mm 色谱柱进行系列寿命测试，在四周时间内运行 500 次分析。在该系列测试中，每周使用新鲜开封的氨基酸混标和试剂进行约 102 次进样。序列结束后，用 100% B 流动相冲洗色谱柱 40 分钟，然后关闭仪器。以这种方式运行该方法 3.5 天，然后在不进行分析的情况下将色谱柱存放 3.5 天。这模拟了实验室的典型做法，即长时间运行样品后，将色谱柱清洗并储存。原始氨基酸定量方法建议将色谱柱储存在 100% 流动相 B 中，这也是许多经常运行氨基酸分析的成功实验室常见的做法。我们进行了实际的使用寿命研究，标准品进样超过 500 次，每个序列结束后关闭并储存，如此使用一个月后，色谱柱显示出优异的使用寿命。从图 5 中可以看出，17 种氨基酸样品的分离度没有损失，只观察到轻微的保留时间偏移。

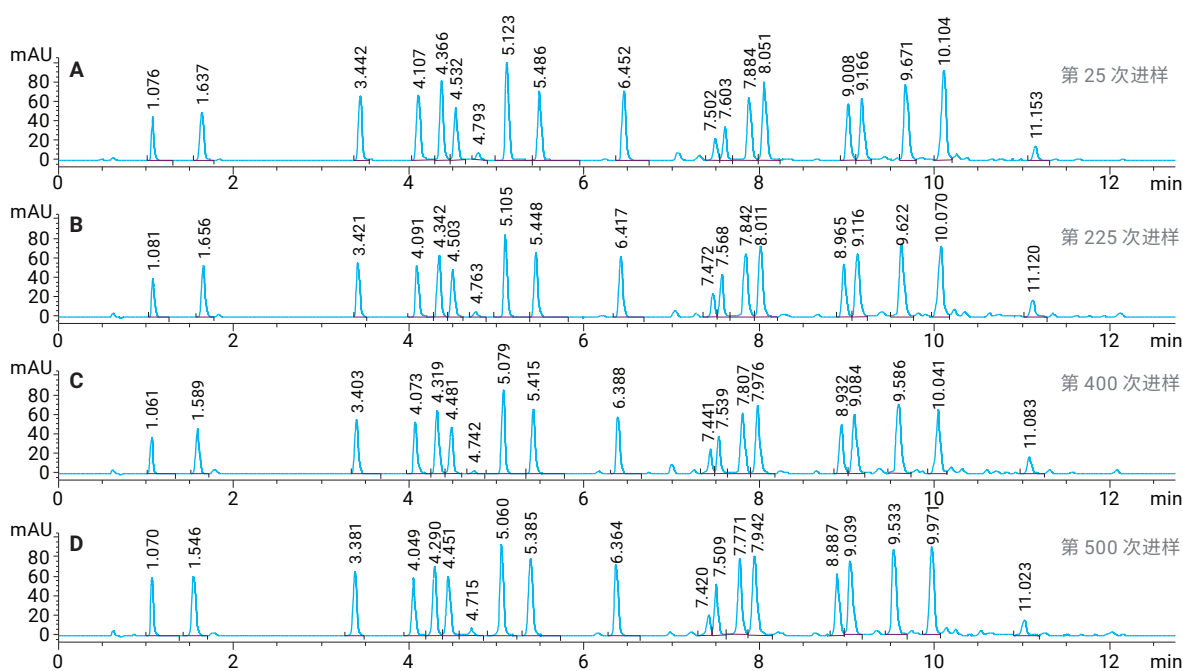


图 5. 色谱柱使用寿命测试，使用 Agilent Poroshell HPH-C18 2.1 × 100 mm 色谱柱运行氨基酸分析方法

结论

Agilent Poroshell HPH-C18 的选择性与全多孔 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 相近。这样就可以实现氨基酸方法等现有方法的轻松转换。在本研究中，虽然可以通过改变梯度来提高选定氨基酸的分离度，但未对色谱条件进行任何改变。大多数情况下，Poroshell HPH-C18 的保留性略低于全多孔 Eclipse Plus C18。使用 4.6×100 mm、 3.0×100 mm 和 $2.1 \text{ mm} \times 100$ mm 色谱柱对方法进行研究。建议使用小体积色谱柱加热器。总共研究了四个批次的颗粒填料，只需要稍微改变波长切换时间。我们进行了实际的使用寿命研究，标准品进样超过 500 次，每个序列结束后关闭并储存，如此使用一个月后，色谱柱显示出优异的使用寿命。

参考文献

1. Wang, X.; Barber, W. E.; Long, W. J. Applications of superficially porous particles: High Speed, high efficiency or both? *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1228, 72-88
2. Schuster, R.; Apfel, A. A new technique for the analysis of primary and secondary amino acids; Application note, Hewlett-Packard Publication number 5954-6257, **1986**
3. Schuster, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **1988**, 431, 271-284
4. Henderson, Jr., J. W.; Ricker, R. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Woodward, C. 快速、准确、灵敏、重现性高的 HPLC 氨基酸分析方法；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5980-1193CHCN，**2000**
5. Woodward, C.; Henderson, Jr., J. W.; Todd Wielgos, T. 用亚 $2 \mu\text{m}$ 反相 (RP) 色谱柱进行快速氨基酸分析 (AAA)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5989-6297CHCN，**2007**
6. Gratzfeld-Huesgen, A. Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC (使用 Agilent 1100 系列 HPLC 对蛋白质水解产物进行灵敏可靠的氨基酸分析)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5968-5658EN，**1999**
7. Greene, J.; Henderson, Jr., J. W.; Wikswo, J. P. Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection (使用带自动衍生化的 HPLC 结合吸光度检测快速准确地测定细胞氨基酸流量)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-3283EN，**2009**
8. Henderson Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals (采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱的改进氨基酸分析方法，适合多种安捷伦液相色谱仪和分离目的)；应用简报，安捷伦科技有限公司，出版号 5990-4547EN，**2010**
9. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 797, 111-120
10. Tindall, G. W.; Perry, R. L. Explanation for the enhanced dissolution of silica column packing in high pH phosphate and carbonate buffers. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 988, 309-312
11. Anon. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with Hig pH stable Poroshell HPH chemistries (使用高 pH 稳定的 Poroshell HPH 键合固定相延长色谱柱在药物分析中的使用寿命)；技术概述，安捷伦科技有限公司，出版号 5991-5022EN，**2014**

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278

400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

DE44321.5251851852

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 4 月 30 日，中国出版
5994-0033ZHCN