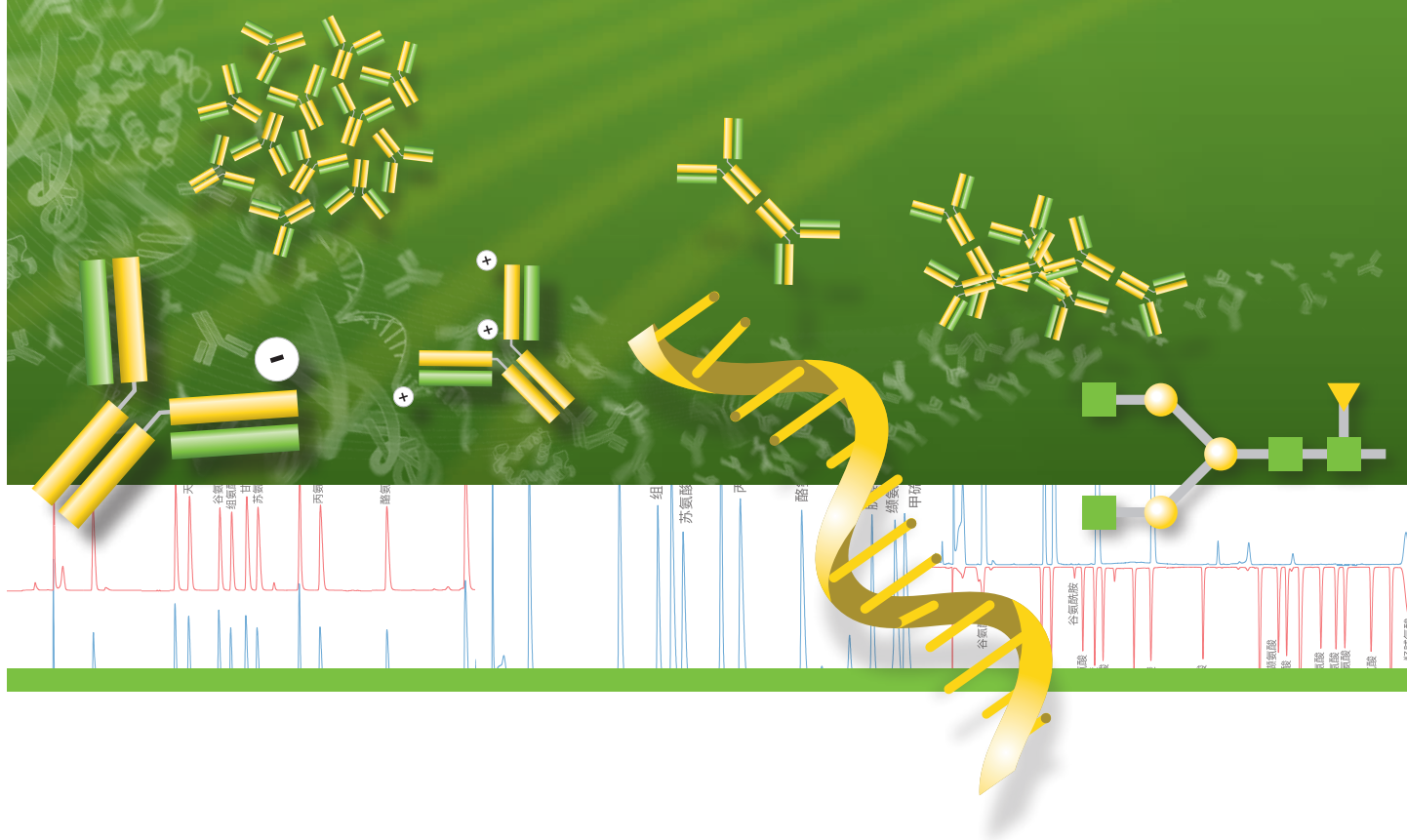


氨基酸分析操作指南

ADVANCEBIO 全程解决方案助您获得准确的分析结果



前言

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。该方案基于安捷伦最新的 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。



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 (SPP) Poroshell 技术，这种颗粒由 1.7 μm 的实心核和 0.5 μm 的多孔壳层组成。

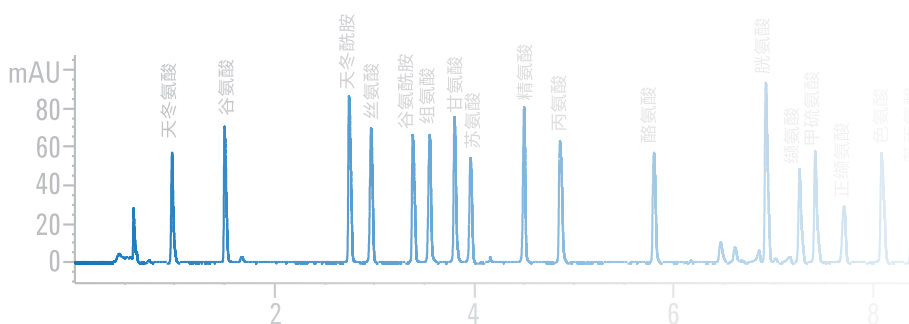


2.7 μm SPP 的柱效为亚 2 μm 全多孔颗粒的 80%-90%，而反压比后者降低了 40%-50%。与全多孔颗粒相比，SPP 具有更窄的粒度分布，这使柱床更均匀，并能减小色谱柱中的扩散。同时，较薄的多孔壳层实现了较低的传质阻力。此外，由于色谱柱中含有一个 2 μm 筛板，因此它们的抗堵塞能力与 3.5 μm 和 5 μm 色谱柱相同。

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，必须对基颗粒进行表面改性或特殊的键合改性。使用专利工艺对表面进行化学改性，形成一个有机层以避免二氧化硅在高 pH 条件下溶出。

AGILENT ADVANCEBIO AAA 色谱柱优势

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)

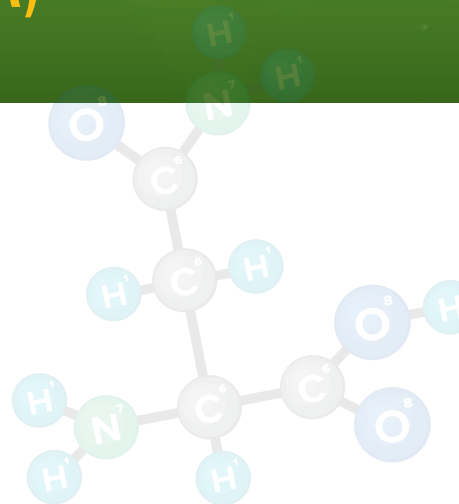
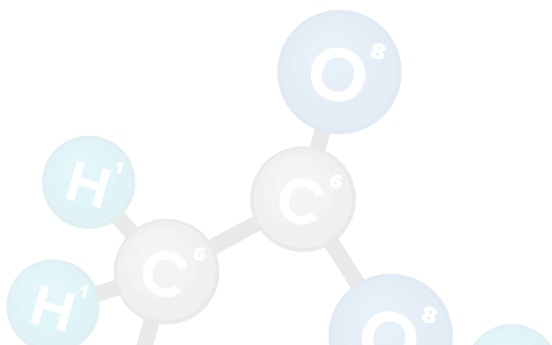
快速、灵敏而重现地实现生物样品中的氨基酸分离。



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.) 确保系统适用性
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 mM Na₂HPO₄ 和 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2

如需配制 1 L 流动相，称取 1.4 g 无水 Na₂HPO₄ 和 3.8 g Na₂B₄O₇·10 H₂O，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 H₃PO₄。该溶液在 100 mL 瓶中配制，并在 4 °C 下储存。

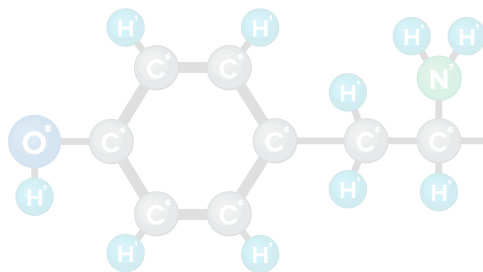
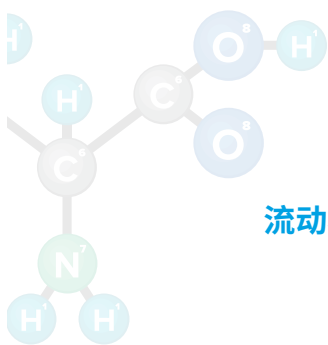
0.1 N HCl

扩展氨基酸及内标储备液在 0.1 N HCl 溶液中进行配制。如需配制 0.1 N 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 安瓿转移至 10 个微量样品瓶内插管后，其保质期同样为 7 至 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



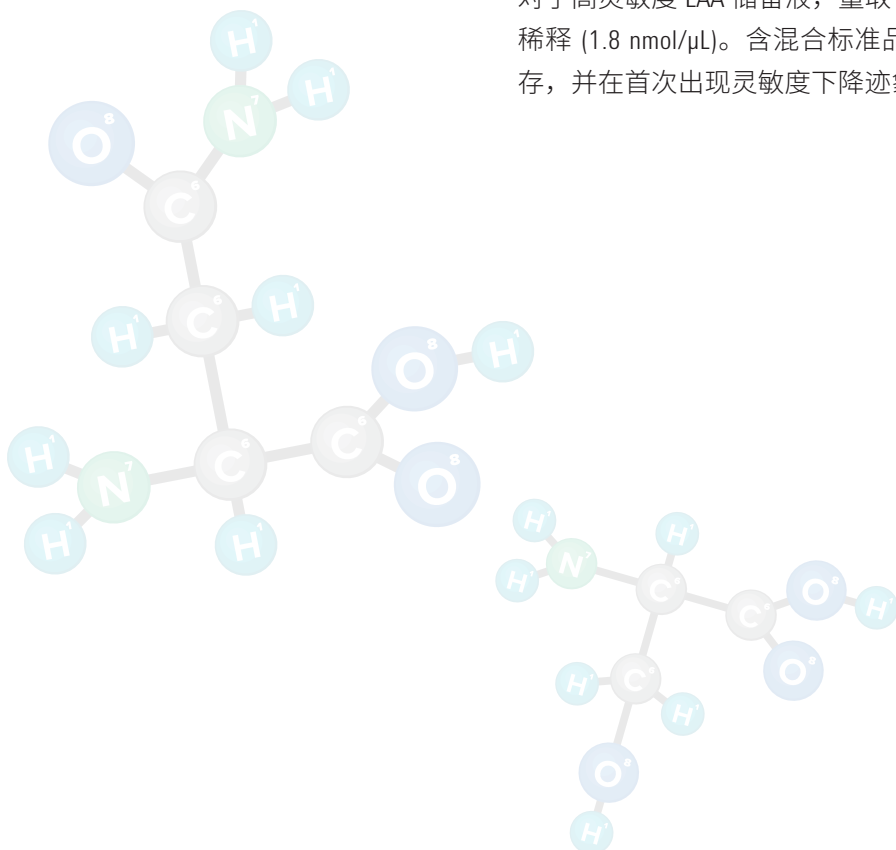
安捷伦可提供五种浓度的 17 种氨基酸 (AA) 溶液 (10 pmol/ μ L 至 1 nmol/ μ L)，用于绘制校准曲线。将每个 1 mL 的标准品安瓿 (部件号 5061-3330 至 5061-3334) 分配至锥形样品瓶内插管中，分为 100 μ L 等份。将等份标准品加盖并冷藏于 4 $^{\circ}$ C 下。

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

将称取的氨基酸置于 25 mL 容量瓶中，用 0.1 N 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/ μ L。

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/ μ L)。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 N 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/ μ L（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 $^{\circ}$ 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/ μ L、250 pmol/ μ L 和 1 nmol/ μ L 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”荧光分析中的浓度。

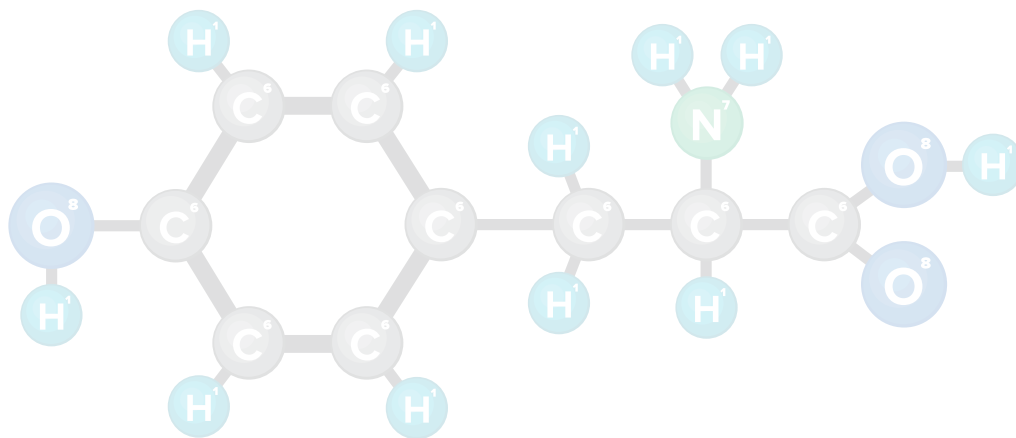
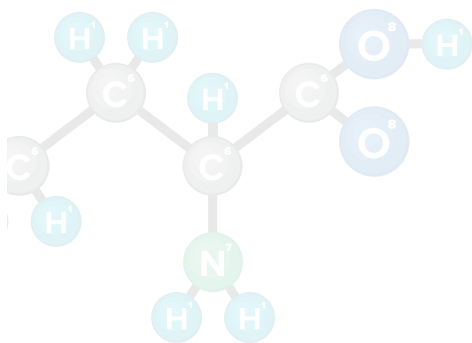
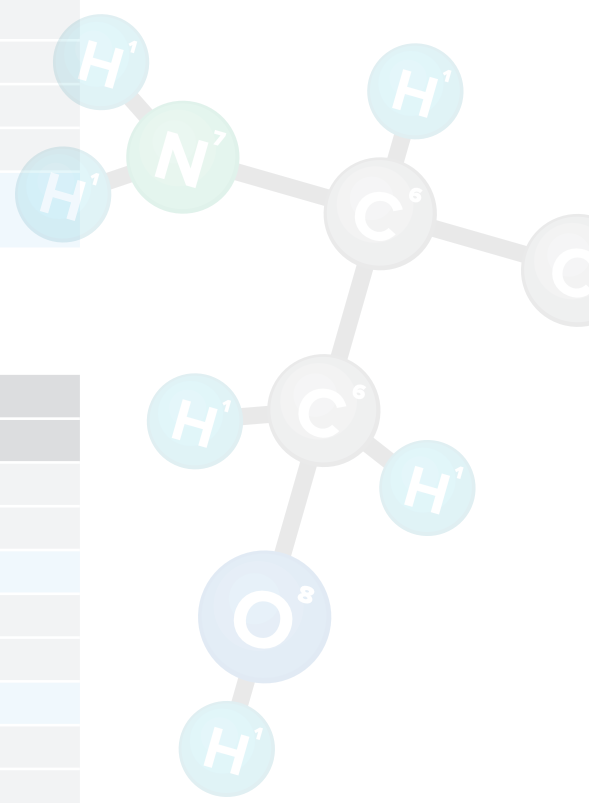


表 1. 标准灵敏度校准标样

	最终 AA 溶液的浓度 (pmol/μL)		
	900	225	90
量取 5 mL 18 nmol EAA 用水稀释	5 mL -	5 mL 15 mL	5 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 用水稀释	5 mL -	5 mL 15 mL	5 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
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 pmol 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



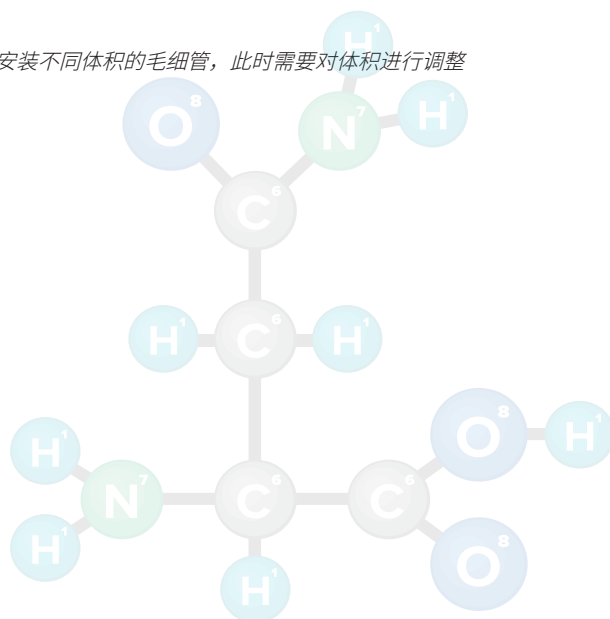
第 4 步： 进行在线衍生化

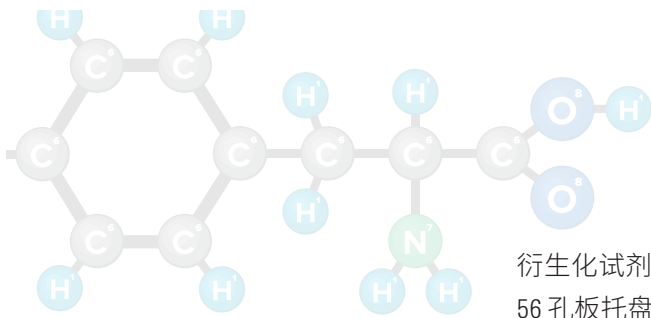


根据自动进样器型号不同，自动化在线衍生程序稍有不同。对于配备 100 μL 毛细管* 的 Agilent G1376C 孔板自动液体进样器 (WPALS)，进样程序如下：

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

*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 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

注: 请使用正确的样品瓶、密封件和泵参数

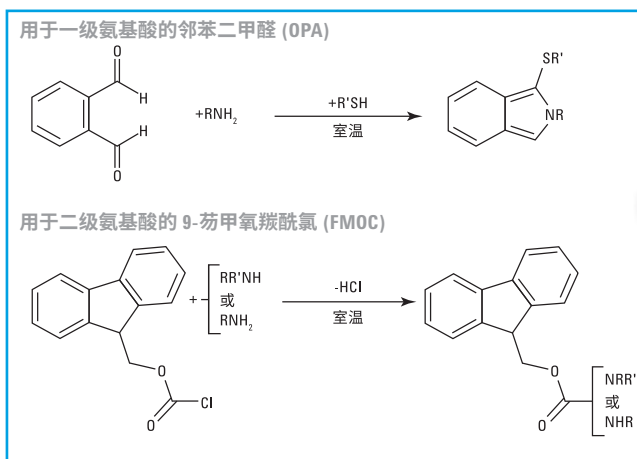
由于体积有限, 需要采用具有聚合物支脚的锥形样品瓶内插管 (图 1A) 来保存 OPA 和 FMOC 试剂。内插管与广口螺口盖 (图 1B 和图 1C) 或钳口盖样品瓶兼容。在这一程序中, 需要对 FMOC (具有高挥发性) 和 OPA (存在氧气时缓慢降解) 采用气密封垫。因此, 该流程中不得使用卡口盖样品瓶。切勿使用针对其他仪器设计的样品瓶或瓶盖, 以防自动进样器损坏。

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 μ L 下 (A, B)。



图 1. 使用 Agilent 4226A 自动进样器进行氨基酸分析的内插管、样品瓶和瓶盖: A) 锥形内插管 (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)

提升自动进样器进样精度



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 nm	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 7 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，内径 4.6 mm 色谱柱的转换发生在约 5.4 min）

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。

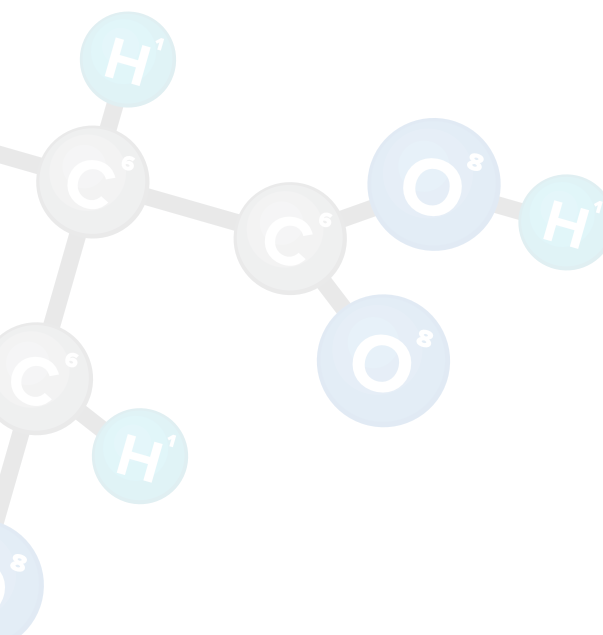
注：如果氨基酸的浓度低于 100 pmol，则建议使用荧光检测。

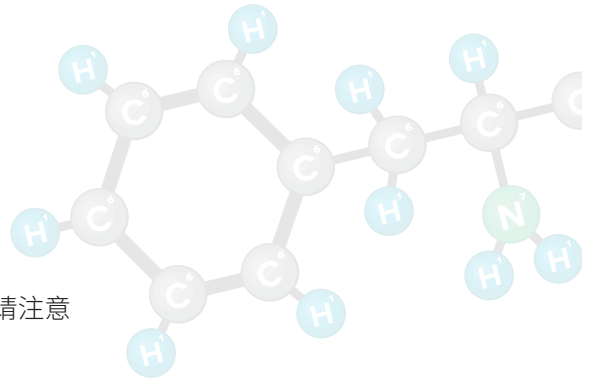
梯度程序

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

*DAD1 A, Sig=338,10 Ref=390,20 (AAA FINAL\STD WITH NAN3\1B E-0201.D)

*DAD1 A, Sig=338,10 Ref=390,20, TT (AAA FINAL\STD WITHOUT\1B G-0401.D)

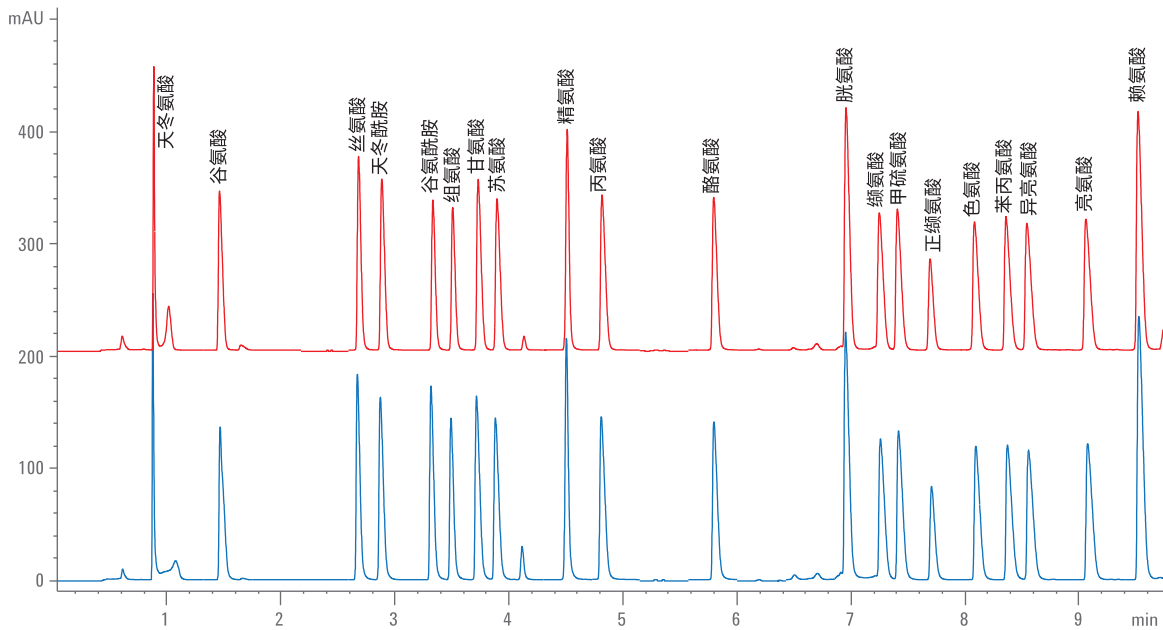
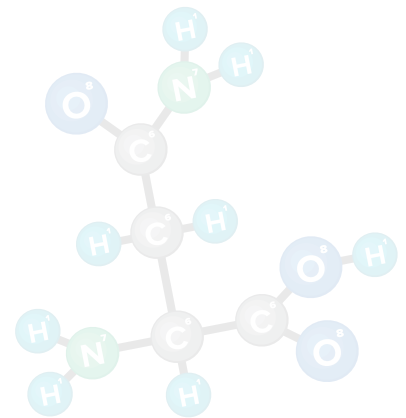


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 4.6 × 100 mm 色谱柱在流动相中含与不含 5 mM 叠氮化钠的情况下分离 20 种氨基酸标准品

注：可选择向流动相 A 中加入 5 mM 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 μm 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）。

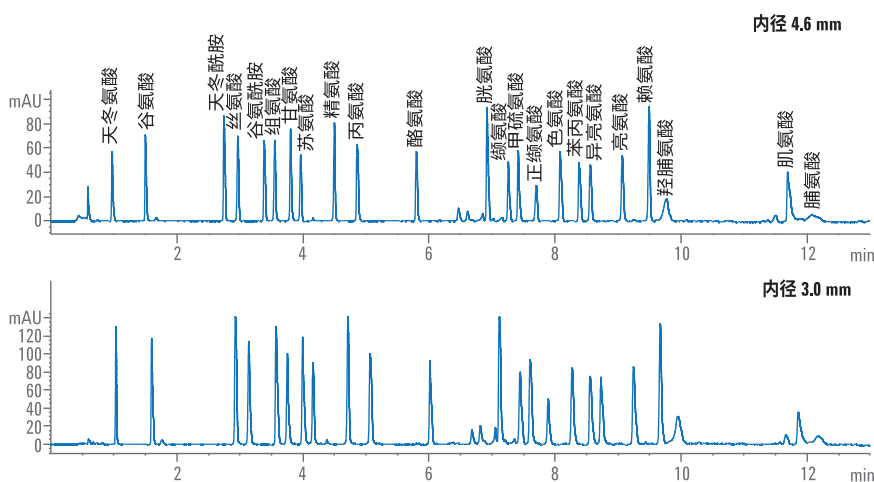
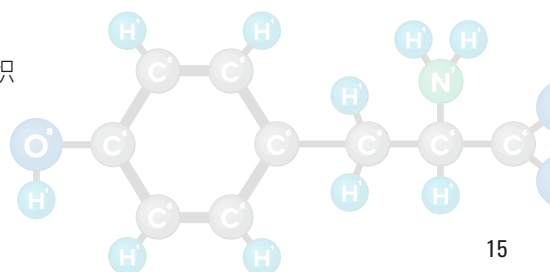


图 4. 使用氨基酸分析方法和具有不同内径的 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱分离 AA 标准品

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 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



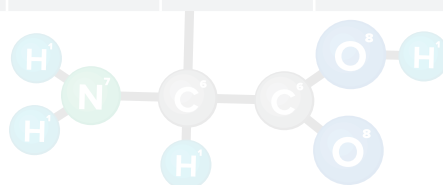
100 pmol 和 1000 pmol 分析的保留时间和峰面积精密度 (n = 6)

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 (%)	氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1. 天冬氨酸	0.851	1.270	1.066	13. 缬氨酸	7.201	0.084	2.47
2. 谷氨酸	1.428	0.973	1.850	14. 甲硫氨酸	7.363	0.073	1.82
3. 天冬酰胺	2.639	0.605	1.790	15. 正缬氨酸	7.602	0.073	1.72
4. 丝氨酸	2.835	0.629	1.820	16. 色氨酸	8.055	0.054	1.57
5. 谷氨酰胺	3.285	0.470	1.560	17. 苯丙氨酸	8.341	0.051	1.66
6. 组氨酸	3.465	0.430	1.220	18. 异亮氨酸	8.503	0.047	1.72
7. 甘氨酸	3.681	0.477	1.920	19. 亮氨酸	9.000	0.030	1.70
8. 苏氨酸	3.837	0.440	1.950	20. 赖氨酸	9.428	0.028	1.66
9. 精氨酸	4.458	0.251	2.150	21. 羟脯氨酸	9.747	0.021	4.13
10. 丙氨酸	4.764	0.280	3.060	22. 肌氨酸	10.980	0.026	1.15
11. 酪氨酸	5.762	0.128	1.650	23. 脯氨酸	11.620	0.021	4.36
12. 半胱氨酸	6.870	0.067	1.900				

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 (%)	氨基酸	平均 RT	RT RSD (%)	峰面积 RSD (%)
1. 天冬氨酸	0.837	0.151	2.60	13. 缬氨酸	7.118	0.025	2.40
2. 谷氨酸	1.400	0.512	2.19	14. 甲硫氨酸	7.281	0.025	1.78
3. 天冬酰胺	2.583	0.124	2.13	15. 正缬氨酸	7.573	0.019	1.77
4. 丝氨酸	2.772	0.114	1.74	16. 色氨酸	7.970	0.024	2.03
5. 谷氨酰胺	3.220	0.092	1.80	17. 苯丙氨酸	8.238	0.027	1.98
6. 组氨酸	3.405	0.077	1.39	18. 异亮氨酸	8.413	0.025	2.17
7. 甘氨酸	3.598	0.068	1.48	19. 亮氨酸	8.925	0.020	1.81
8. 苏氨酸	3.766	0.059	2.26	20. 赖氨酸	9.357	0.022	2.00
9. 精氨酸	4.422	0.027	1.66	21. 羟脯氨酸	9.718	0.014	3.14
10. 丙氨酸	4.685	0.031	1.87	22. 肌氨酸	10.961	0.015	5.91
11. 酪氨酸	5.695	0.034	2.04	23. 脯氨酸	11.911	0.011	2.58
12. 半胱氨酸	6.794	0.030	2.22				



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]。

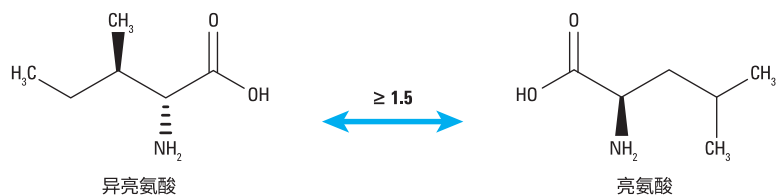
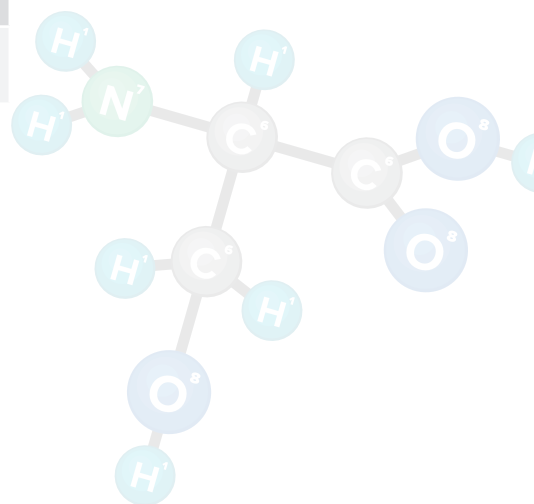


表 5. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 色谱柱和 AA 标准品进行系统适用性测试

系统适用性	AdvanceBio AAA, C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μ m	AdvanceBio AAA, C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μ m
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

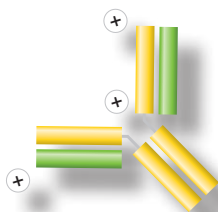
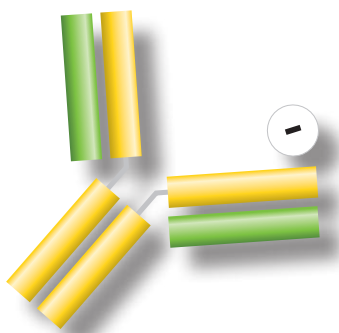
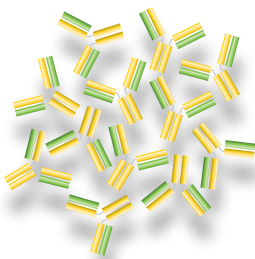


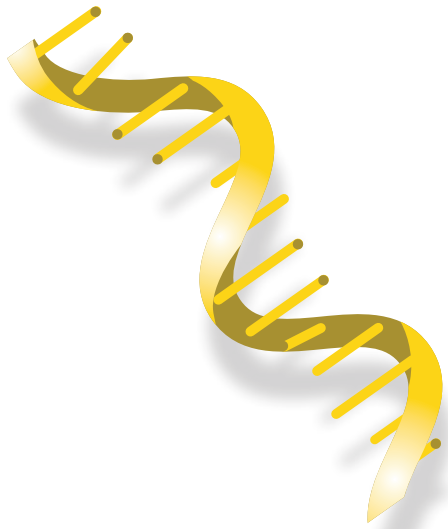
第 8 步： 优化细胞培养基和蛋白质水解产物标准品

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。

采用预柱衍生化的 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，有时通过手动离线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。

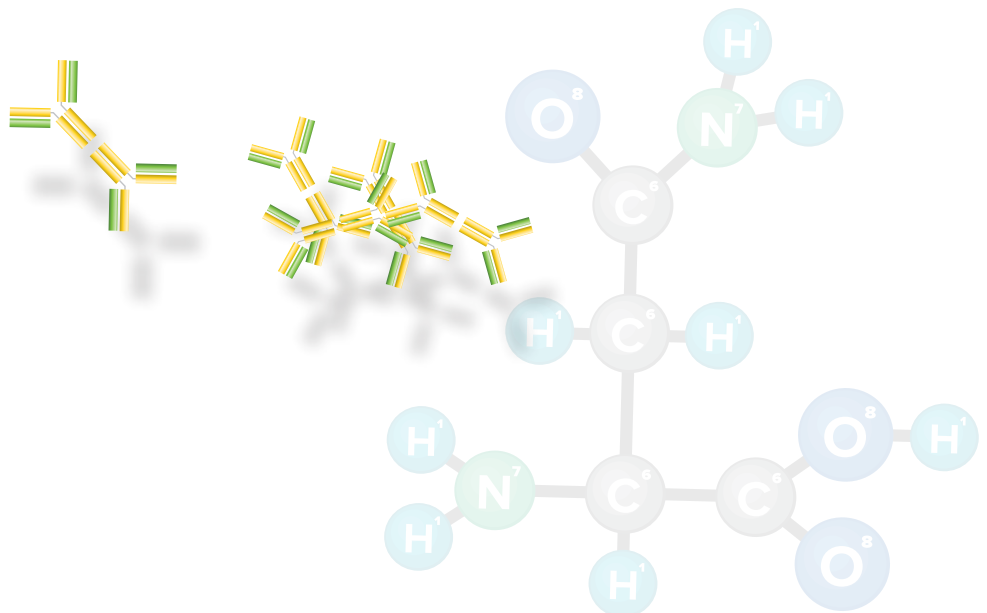
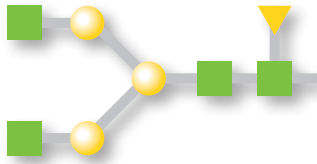




常用细胞培养基和蛋白质水解产物的氨基酸组成分析结果如图 5-图 8 所示。该分析证实，细胞培养基的氨基酸组成与其理论组成准确匹配。此类应用可用于监测和调整氨基酸组成。该分析是通过优化生产过程确保最终生物药物产品具有高质量和更高产量的重要组成部分。

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-图 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



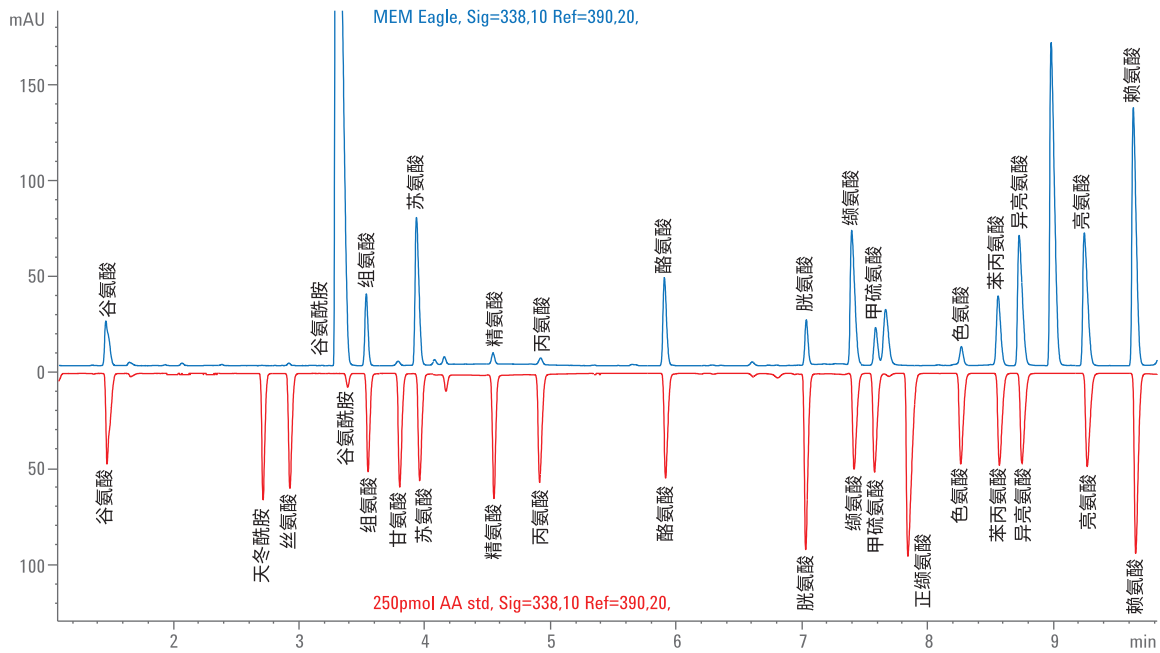


图 5. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的 Eagle MEM 培养基 (蓝色迹线) 氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

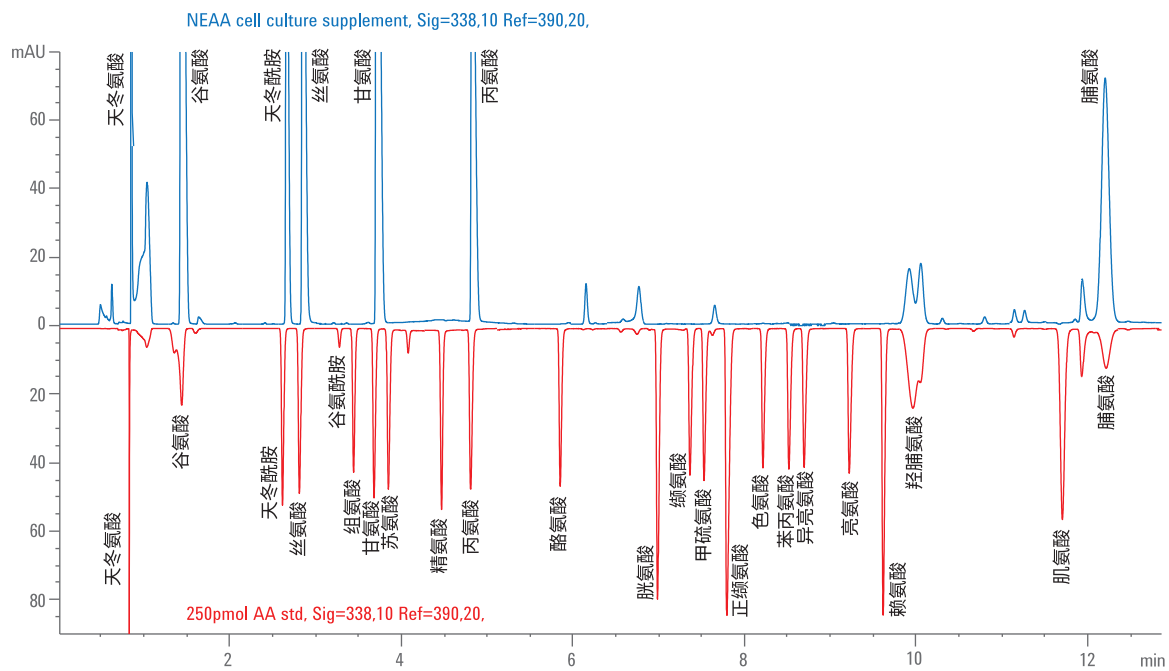


图 6. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的非必需氨基酸 (NEAA) 培养基 (蓝色迹线) 氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

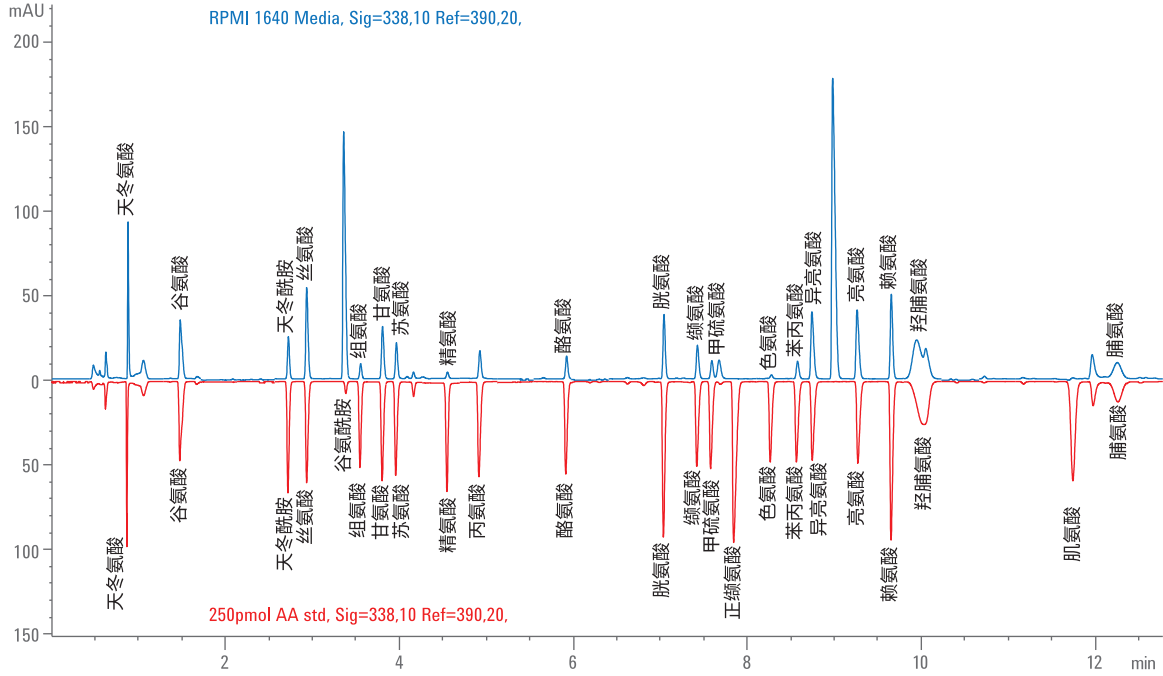


图 7. 使用 Agilent AdvanceBio AAA 解决方案进行的 RPMI 1650 培养基（蓝色迹线）氨基酸分析以及与氨基酸标准品的对比

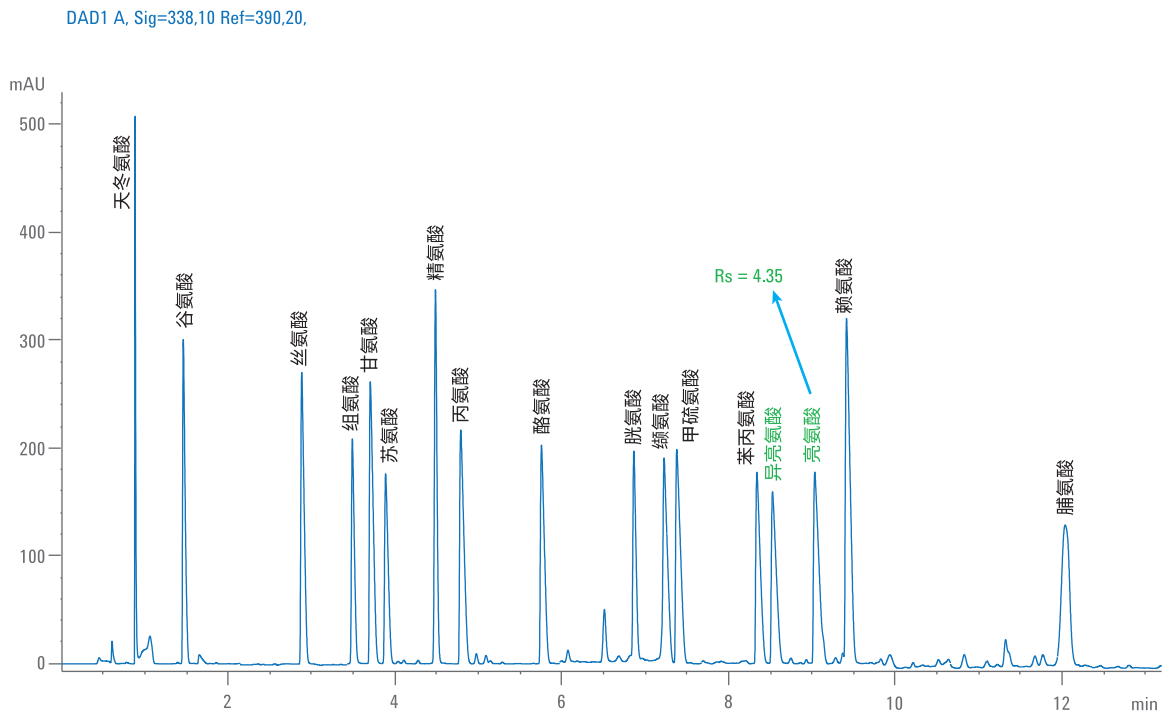


图 8. 蛋白质水解产物的氨基酸分析。利用 AdvanceBio AAA, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱得到的亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度远高于系统适用性要求的报告值

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 M 水溶液, pH 10.2, 100 mL	5061-3339
FMOC 试剂	2.5 mg/mL, 溶于乙腈中, 10 × 1 mL 安瓿	5061-3337
OPA 试剂	10 mg/mL, 溶于 0.4 M 硼酸盐缓冲液和 3-巯基丙酸中, 6 × 1 mL 安瓿	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
螺口盖样品瓶, 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



利用 AdvanceBio SEC 色谱柱可靠地执行蛋白质表征
(包括二聚体测定)。如需了解更多信息, 请访问
www.agilent.com/chem/advancebio-sec



了解更多信息:

www.agilent.com/chem/advancebioaaa

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。
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, 2017
2017 年 3 月 21 日, 中国出版
5991-7694CHCN