

在生物制药领域利用液相色谱进行细胞培养基分析



工艺理解和工艺控制对于生产一致的生物治疗产品至关重要，而该过程的一个重要方面是细胞培养条件，包括细胞可用的营养物质和代谢物。细胞培养基的组成对于产品产量以及用于生产生物治疗药物的细胞的健康和存活至关重要。细胞培养基中的添加剂还可能影响生物治疗药物的关键属性，例如糖基化模式。

分析速度通常是氨基酸分析的一项重要要求，相关人员愈发希望直接在生物反应器上进行在线监测，以便快速做出决策^[1]。重现性、稳定性和色谱柱使用寿命也是氨基酸分析中面临的常见挑战，安捷伦提供两种解决方案以不同的方式应对这些挑战。

AdvanceBio 氨基酸分析柱和试剂盒可生成高度可靠且可重现的结果。氨基酸衍生化在液相色谱的自动进样器中自动完成，避免了手动样品前处理带来的差异以及前处理与分析之间的任何延迟导致的样品降解。为了将氨基酸有效保留在反相色谱柱上并通过 UV 或荧光进行检测，必须进行衍生化。AdvanceBio 氨基酸分析柱是一种反相色谱柱，其经过特殊处理，在氨基酸分离首选的高 pH 条件下可以保护色谱柱，从而获得稳定、使用寿命更长的色谱柱。

安捷伦的第二种氨基酸分离解决方案 AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱适用于与质谱 (MS) 检测配合使用的 HILIC 分离。这种替代保留方法无需进行衍生化, 并且只需单一方法即可进行更全面的细胞培养基分析。可以从生物反应器中取出样品, 在短暂离心以沉淀各种细胞碎片后立即进行分析。HILIC 方法开发面临着独特的挑战, 但通过遵循下文的最佳实践, 可以获得稳定且可靠的结果。

为培养基消耗分析选择工作流程取决于各种分析需求, 在某些情况下还取决于偏好:

- **MS 检测是否可用或是否为首选?**
如果是, HILIC-MS 能够监测各种分析物。如果只能进行 UV 或荧光检测, 则建议使用反相法进行氨基酸分析
- **仅需要监测氨基酸, 还是需要监测其他细胞培养基组分?**
如果需要监测其他营养物质或细胞废物 (例如, B 族维生素、糖、核苷酸、多胺或乳酸), 则使用 HILIC-MS 开发多重检测方法以同时检测氨基酸和这些代谢物, 可能更有效。如果只需要分析氨基酸, 那么使用氨基酸衍生化的反相 LC/UV 方法可以满足您的需求
- **您倾向于进行氨基酸衍生化还是不进行衍生化?**
如果不考虑其他情况, 这可以作为选择采用样品衍生化的反相 LC/UV 或 LC/FLD 或不采用衍生化的 HILIC-MS 的基础

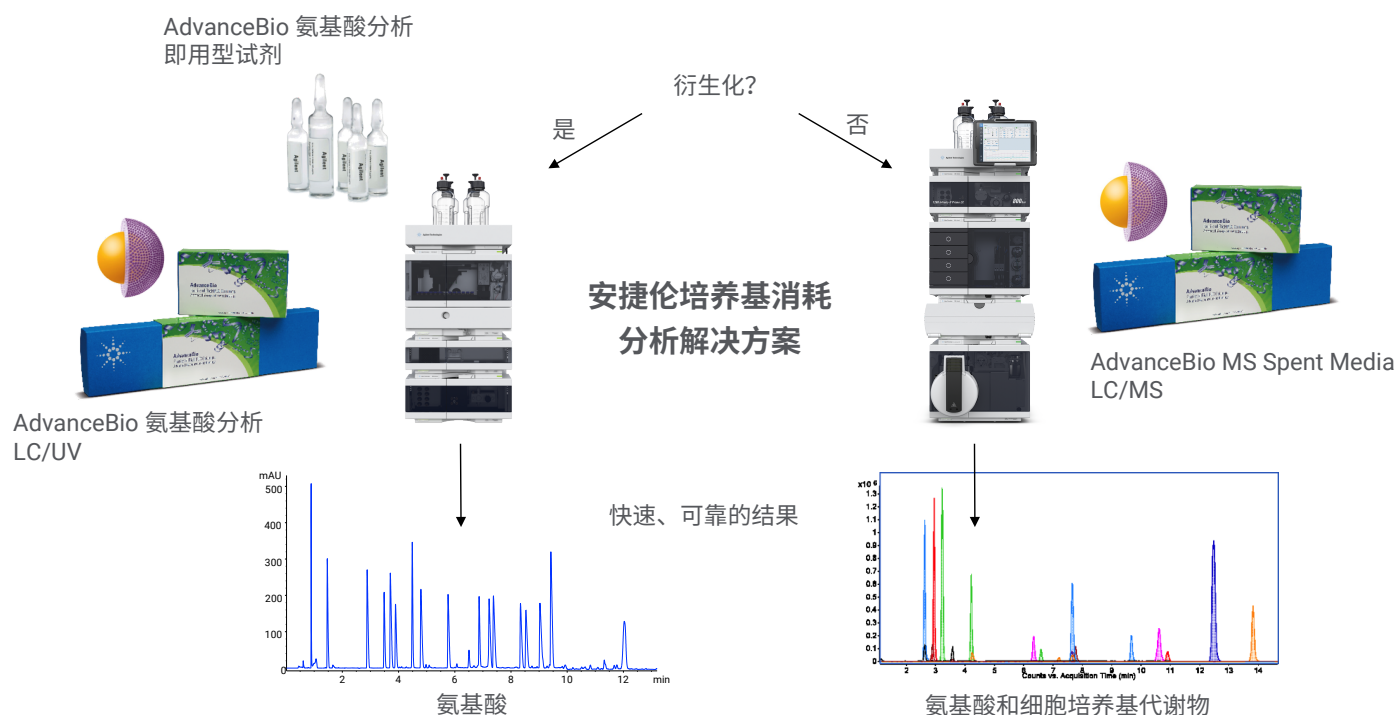


图 1. 培养基消耗分析工作流程的选择取决于必须监测的分析物、样品衍生化的偏好以及可用的检测器

氨基酸高效分析的最佳实践

样品前处理

- 离心取自生物反应器的样品，以沉淀各种颗粒物
- 对于标记的氨基酸，应每天更换衍生生化试剂、硼酸盐缓冲液和氨基酸标准品
- 对于 HILIC 分离，用乙腈稀释样品以获得理想的色谱峰形。有关样品溶剂和进样量对色谱峰形影响的进一步讨论，请参见 [HILIC 方法开发技术概述^{\[2\]}](#)

色谱分离 — 常规

- 将流速变化斜率从默认值降至 1 mL/min 及以下。流速逐渐增大有助于延长色谱柱寿命，并防止压力突然过高。在安捷伦软件中，可以在 LC 泵控制的“高级”部分找到此设置
- 在 LC 方法中设置最大压力限值以匹配色谱柱的最大限值（此处推荐的所有色谱柱均为 600 bar）。这对于 LC 最大耐压能力超过色谱柱的所有情况均至关重要

色谱分离 — 反相

- 每周重新校准保留时间和响应因子
- 通过选择几种性能指标（例如亮氨酸与异亮氨酸之间的分离度）并定期跟踪来监测色谱柱和保护柱的性能
- 避免在衍生化过程中使用最大混合速度，以防止自动进样器过度磨损

切勿将色谱柱置于流动相 A 中（表 1：10 mmol/L Na₂HPO₄ 和 10 mmol/L Na₂B₄O₇，pH 8.2），即使仅仅过夜也不行！对于短期储存，务必使用流动相 B（表 1：乙腈、甲醇和水（45/45/10, v/v/v））。长期储存时，请将色谱柱储存于 50/50 乙腈/水中。

色谱分离 — HILIC

- 氨基酸对金属不敏感，但其他分析物（例如含磷酸根分子或多胺）可能对液相色谱系统中存在的金属非常敏感。为了分析其他非氨基酸化合物，建议考虑使用生物惰性液相色谱，或者用 PEEK 代替金属管线，用塑料代替玻璃溶剂瓶，或遵循 [HILIC 方法开发技术概述^{\[2\]}](#) 中介绍的去活方案，尽可能减少样品流路中存在的金属。AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱具有带 PEEK 内衬的不锈钢硬件，是一种无金属流路
- 建议使用储备缓冲液制备 HILIC 流动相，如 AdvanceBio MS Spent Media [用户指南^{\[3\]}](#) 和以下样品方法中所述。这样可以尽可能减少盐在乙腈中的溶解度问题，并提高流动相 A 和 B 之间离子强度的一致性
- 应控制流动相 pH，以确保一致的色谱柱化学作用，从而实现可重现的分离。在所选缓冲体系缓冲容量 (pK_a ± 1) 内的流动相 pH 下操作，将获得更出色的重现性
- 样品基质的含水量越高，则进样量应越小，以避免峰分裂
- 与反相色谱柱相比，HILIC 色谱柱在进样之间需要更长的时间进行再平衡。充分的再平衡对于重现性至关重要。始终保持 > 3% 的 H₂O，以维持固定相上的水层。考虑从仍能保留最低极性分析物的最高水相百分比开始梯度，以便更快地实现再平衡

质谱

- 请勿在 MS 检测中使用含磷酸盐的缓冲液!
- 选择挥发性缓冲液 (例如乙酸铵或甲酸铵) 进行 MS 检测。请注意, 使用含甲酸盐的流动相时, 无法检测甲酸盐, 对于醋酸盐也是如此
- 在目标保留时间之外, 将液相色谱流路切换到废液, 特别是对于在方法结束时进行高含量有机溶剂冲洗的过程, 如果可能, 请在空体积洗脱时这样操作
- 使用 HPLC 级或更高级别的溶剂
- 建立质谱仪离子源的定期清洁程序

入门指南

衍生化氨基酸的反相分析

本操作指南^[4] 详细介绍了使用自动化衍生化和 LC/UV 或荧光分析进行的氨基酸分析。本指南包含有关标样制备、自动进样器程序设定以执行样品衍生化以及色谱方法的说明

| 参数 | 值 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|---|----------|----|---|---|------|---|------|----|------|-----|------|-----|------|---|----|----|
| 色谱柱 | AdvanceBio 氨基酸分析 4.6 × 100 mm 或 3.0 × 100 mm | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 仪器 | Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速 | 4.6 mm 内径柱, 1.5 mL/min 3 mm 内径柱, 0.62 mL/min | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流动相 A | 10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ 和 10 mmol/L Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 8.2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流动相 B | 乙腈、甲醇和水 (45/45/10, v/v/v) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 梯度 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <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>15.8</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>结束</td> </tr> </tbody> </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 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 柱温 | 40 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 检测器 | 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 | | | | | | | | | | | | | | | | |

表 1. 使用 AdvanceBio 氨基酸分析柱对标记氨基酸进行反相分析的液相色谱方法

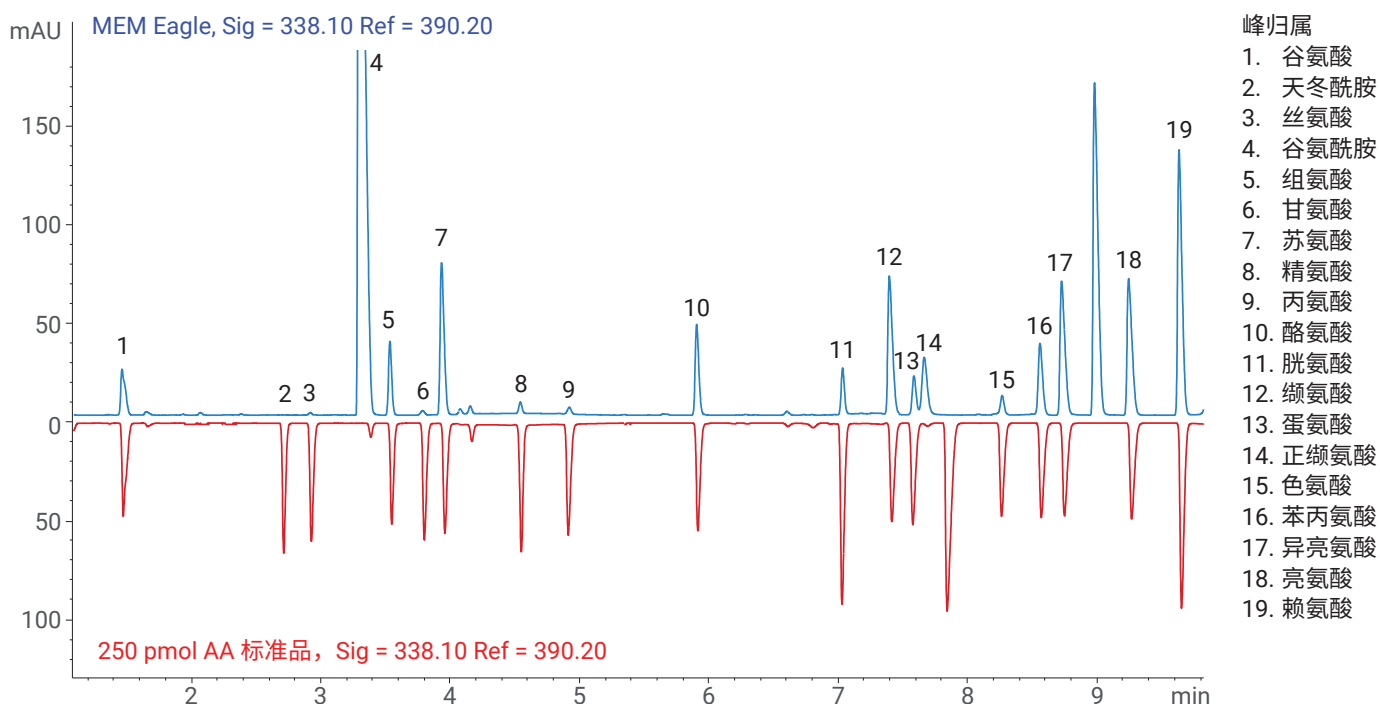


图 2. 使用 AdvanceBio 氨基酸分析柱分离 OPA 和 FMOC 标记的氨基酸的示例^[5]

未衍生化氨基酸的 HILIC 分析

除氨基酸以外，还同时分析其他各种代谢物的样品方法如下所示。重点关注氨基酸的样品分析方法，请参见相应的[应用简报](#)^[6] 或[产品样本](#)^[7]。

| 参数 | 值 | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--|----------|----|---|-----|----|----|----|----|----|----|------|-----|----|-----|
| 色谱柱 | AdvanceBio MS Spent Media, 2.1 × 100 mm | | | | | | | | | | | | | | |
| 仪器 | Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统 | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速 | 0.5 mL/min | | | | | | | | | | | | | | |
| 流动相 | 低 pH，正离子模式质谱检测： A = 10% 200 mmol/L 甲酸铵水溶液 pH 3，90% 水 B = 10% 200 mmol/L 甲酸铵水溶液 pH 3，90% 乙腈 最终盐浓度为 20 mmol/L。 | | | | | | | | | | | | | | |
| 梯度 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>21.1</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>28</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> | 时间 (min) | %B | 0 | 100 | 10 | 75 | 20 | 20 | 21 | 20 | 21.1 | 100 | 28 | 100 |
| 时间 (min) | %B | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 75 | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | 20 | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | 20 | | | | | | | | | | | | | | |
| 21.1 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| 28 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| 柱温 | 40 °C | | | | | | | | | | | | | | |
| 检测器 | Agilent 6230 TOF | | | | | | | | | | | | | | |

表 2. 使用 AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱对氨基酸和其他细胞培养基分析物进行 HILIC 分析的液相色谱方法

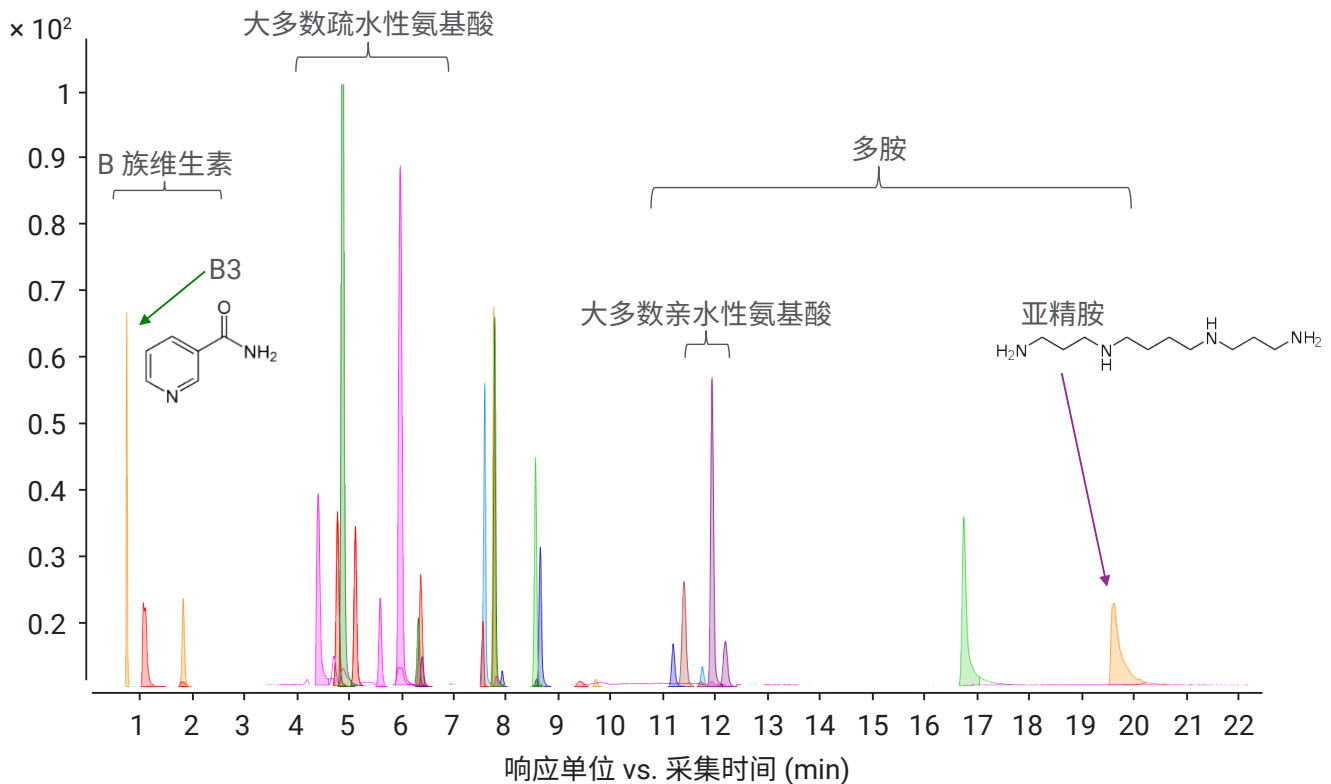


图 3. 使用 AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱分离样品中的氨基酸、B 族维生素和 多胺，并通过 TOF 检测^[6]

轻松挑选和订购信息

要从安捷伦在线商城订购下表中列出的商品，请单击“我的列表 #”标题链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。然后输入您需要的产品数量，将产品添加至购物车并继续结算。您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。

如果这是您首次使用“收藏产品”，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。但是，如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。您也可以通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品。

| 描述 | 货号 |
|---|------------|
| 我的列表 1: AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 柱 | |
| AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 液相色谱柱, 3.0 × 100 mm | 695975-322 |
| AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 液相色谱柱, 4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm | 655950-802 |
| AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 保护柱, 3.0 × 5 mm, 3/包 | 823750-946 |
| AdvanceBio 氨基酸分析 (AAA) 保护柱, 4.6 × 5 mm, 3/包 | 820750-931 |
| 我的列表 2: AdvanceBio MS Spent Media 分析柱 | |
| AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm | 679775-901 |
| AdvanceBio MS Spent Media, 100 Å, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm | 675775-901 |
| AdvanceBio MS Spent Media, 100 Å, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm | 673775-901 |
| 我的列表 3: AdvanceBio AAA 标准品和试剂 | |
| AdvanceBio 氨基酸试剂盒; 1–250 pmol/μL | 5190-9426 |
| 硼酸盐缓冲液 100 mL | 5061-3339 |
| FMOC 试剂, 2.5 mg/mL (基质为乙腈), 10 × 1 mL | 5061-3337 |
| 二硫代二丙酸, 5 g | 5062-2479 |
| AA 标准品, 1 nmol/μL, 10 × 1 mL | 5061-3330 |
| AA 标准品, 250 pmol/μL, 10 × 1 mL | 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 |
| 我的列表 4: HPLC 备件 | |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头组件 (用于色谱柱入口连接) | 5067-5965 |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接毛细管, MP35N, 0.12 × 105 mm (生物惰性, 用于 Quick Connect 快速连接接头) | 5500-1578 |
| Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接毛细管, SS, 0.12 × 105 mm (用于 Quick Connect 快速连接接头) | 5500-1173 |
| Agilent InfinityLab Quick Turn 接头 (用于色谱柱出口连接) | 5067-5966 |
| Agilent InfinityLab Quick Turn 毛细管, MP35N, 0.12 × 280 mm (用于 Quick Turn 接头) | 5500-1596 |
| Agilent InfinityLab Quick Turn 毛细管, SS, 0.12 × 280 mm (用于 Quick Turn 接头) | 5500-1230 |
| 用于 Quick Turn 接头的安装工具 | 5043-0915 |

| 描述 | 货号 |
|---|-------------|
| 我的列表 5: 样品容器 | |
| 高回收率样品瓶, 螺口, 带固定内插管, 透明, 300 μ L 内插管体积, 100/包。样品瓶规格: 12 \times 32 mm (12 mm 瓶盖) | 5188-6591 |
| 瓶盖, 螺口, 蓝色, PTFE/红色硅橡胶隔垫, 100/包瓶盖尺寸: 12 mm | 5182-0717 |
| 样品瓶, 钳口/卡口, 聚丙烯, 250 μ L, 1000/包。样品瓶规格: 12 \times 32 mm (11 mm 瓶盖) * | 5190-3155 |
| 瓶盖, 卡口, 透明, PTFE/硅橡胶/PTFE 隔垫, 100/包瓶盖尺寸: 11 mm (用于 5190-3155) | 5182-0566 |
| InfinityLab 96 孔板/0.5 mL, 30/包 | 5043-9310 |
| InfinityLab 微孔板密封垫, 50/包 | 5042-1389 |
| 我的列表 6: 溶剂和添加剂 | |
| InfinityLab LC/MS 级超纯水, 1 L | 5191-4498 |
| InfinityLab LC/MS 级超纯乙腈, 1 L | 5191-4496 |
| 甲酸, 5 mL | G2453-85060 |
| InfinityLab 去活剂添加剂, 25 mL | 5191-3940 |
| InfinityLab 去活剂添加剂, 50 mL | 5191-4506 |
| 我的列表 7: 溶剂过滤 | |
| InfinityLab 溶剂过滤组件 | 5191-6776 |
| InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L | 5191-6781 |
| 尼龙滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μ m, 100/包 | 5191-4341 |
| 再生纤维素滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μ m, 100/包 | 5191-4340 |
| 溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 μ m | 5041-2168 |
| 我的列表 8: 溶剂处理 | |
| InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖启始工具包 | 5043-1222 |
| InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L | 9301-6524 |
| InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L | 9301-6526 |
| 溶剂瓶, 透明, 2 L | 9301-6342 |
| 溶剂瓶, 棕色, 2 L | 9301-6341 |
| InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶 | 5043-1339 |
| InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖 | 5043-1221 |
| 带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g | 5043-1193 |

参考文献:

1. Online Amino Acid Analysis for Spent Media Control (用于培养基消耗控制的在线氨基酸分析)
[5994-4931EN](#)
2. 亲水相互作用色谱方法开发和故障排除
[5994-9271ZHNCN](#)
3. Agilent AdvanceBio MS Spent Media Column User Guide (Agilent AdvanceBio MS Spent Media 色谱柱用户指南)
[820120-015](#)
4. 氨基酸分析操作指南
[5991-7694CHCN](#)
5. Determination of Amino Acid Composition of Cell Culture Media and Protein Hydrolysate Standard (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](#)
6. 利用未衍生化氨基酸的 LC/MS 分析进行生物反应器细胞培养监测
[5991-8816ZHNCN](#)
7. Agilent AdvanceBio workflows for spent media analysis (用于培养基消耗分析的 Agilent AdvanceBio 工作流程)
[5991-8817EN](#)
8. Analysis of Underivatized Amino Acids and Metabolites in Cell Culture Media by HILIC-LC/MS (利用 HILIC-LC/MS 分析细胞培养基中的未衍生化氨基酸和代谢物)
[ASMS 2018 MP-566](#)

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

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

DE42995938

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，2022
2022年11月30日，中国出版
5994-5515ZHCN

