

超高效液相色谱法测定细胞培养液中游离氨基酸浓度

田燕*, 王英超, 王雅萍

(山东威高瑞生医疗器械有限公司, 威海 250014)

摘要: **目的** 探讨基于超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)法, 对细胞培养液中游离氨基酸浓度的测定方法。**方法** 采用 UPLC 技术, 结合优化的样品处理方法, 对细胞培养液中游离氨基酸进行高效、精准的测定。**结果** 该 UPLC 法能够快速、可靠地测定细胞培养液中的游离氨基酸浓度, 为生物制药工业中细胞培养监控与优化提供了有效手段。**结论** 对氨基酸浓度的准确测定, 不仅有助于更好地了解细胞培养液中关键营养成分的动态变化, 还为生产过程中的工艺优化提供了重要数据支持。

关键词: 超高效液相色谱法; 氨基酸; 细胞培养液; 代谢分析

Determination of free amino acid concentration in cell culture medium by ultra performance liquid chromatography

TIAN Yan*, WANG Ying-Chao, WANG Ya-Ping

(Shandong Weigao Ruisheng Medical Equipment Co., Ltd., Weihai 250014, China)

ABSTRACT: Objective: This study aims to explore a method for determining the concentration of free amino acids in cell culture media based on ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** Researchers used UPLC technology combined with optimized sample processing Methods to efficiently and accurately determine free amino acids in cell culture medium. **Results** The research results indicate that the UPLC method can quickly and reliably determine the concentration of free amino acids in cell culture medium, providing an effective means for monitoring and optimizing cell culture in the biopharmaceutical industry. **Conclusion** Accurate determination of amino acid concentration not only helps to better understand the dynamic changes of key nutrients in cell culture media, but also provides important data support for process optimization in the production process.

KEY WORDS: ultra high performance liquid chromatography; amino acids; cell culture medium; metabolism analysis

0 引言

细胞培养液作为生物反应器中的关键介质, 其中的游离氨基酸浓度对于细胞生长、代谢生产目标蛋白质具有重要影响。因此, 准确测定细胞培养液中游离氨基酸的浓度, 对于生产过程的监控和优化至关重要。传统的氨基酸测定

方法存在分析周期长、灵敏度低等问题, 超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)以其高分辨率、高灵敏度和短分析时间的特点, 成为生物制药领域中游离氨基酸浓度测定的理想选择。在这一背景下, 为有效解决上述问题, 提升细胞培养液内的游离氨基酸浓度测定效率及其测定质量, 本研究旨在借助 UPLC 技术, 通过

*通讯作者: 田燕, 博士, 工程师, 研究方向为能源资源与环境地球化学。E-mail: 79786646@qq.com

*Corresponding author: TIAN Yan, Ph.D, Shandong Weigao Ruisheng Medical Equipment Co., Ltd., Weihai 250014, China. E-mail: 79786646@qq.com

优化分析方法, 实现对细胞培养液中游离氨基酸浓度的快速、准确测定。希望通过本次的研究, 可以对超高效液相色谱法的合理应用提供一定参考, 以此来进一步提升细胞培养液中的游离氨基酸测定效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

为了确保实验结果的准确性与可靠性, 研究人员采用了 Waters UPLC T-class bios system 液相色谱仪器。该仪器由四元泵、自动进样器以及紫外检测器等原件构成, 其中四元泵用于输送流动相, 通常是溶液, 通过色谱柱, 通过精确的控制, 可以在极短的时间内实现高压梯度, 提供了高效的溶剂梯度洗脱; 自动进样器用于将待分析的样品引入液相色谱系统, 以进行分离。该设备紫外检测器用于检测样品中吸收紫外光的成分, 常用于生物分析中检测蛋白质、核酸等生物分子。可以自动进行多个样品的进样, 提高分析的通量和减少人工操作的误差。四元泵能够精确控制流动相的流量和比例, 确保样品在色谱柱中的分离效果^[1]。自动进样器有效降低了手动操作所产生的误差, 提高了实验的可重复性和准确性。而紫外检测器则可以对样品进行实时监测, 为实验提供及时可靠的数据。

除了 Waters UPLC T-class bios system 之外, 本研究还使用了其他多种实验设备。例如, Thermo Scientific 公司提供的 Forme377 型 CO 培养箱, 该设备能够模拟细胞生长的环境, 为实验提供稳定、可控的培养条件。研究人员

还使用了 Milli-Q 纯水机来制备高纯度的水, 保证实验所需的试剂和溶剂的质量。同时, 采用 Vertex 4 涡旋振荡器来混合样品和试剂, 使得样品能够充分反应, 提高实验的灵敏度和准确性。

1.2 实验材料

本研究需要准备特定的细胞, 这些细胞是实验的基础, 因为它们具有独特的基因表达和功能, 对于研究特定的问题非常重要^[2]。除了上述细胞外, 实验还需要使用一些衍生试剂。本次研究选择了 AceQ.FluorTML 衍生试剂包, 它包含硼酸缓冲液、AQD 粉末和乙腈等成分。

1.3 色谱条件

在实验过程中, 将流速设定为 0.7 mL/min, 确保柱子的压力稳定, 避免因流速波动而影响分离效果。同时, 将柱温设定在 60°C, 有助于提高化合物的溶解度和扩散系数, 优化分离效果。进样量方面, 采用 1 μ L 的进样体积, 这一微小的进样量可以减少样品的稀释程度, 降低杂质的干扰, 提高检测的灵敏度和特异性。在紫外检测波长的选择上, 采用 240 nm 的波长。这一波长对于许多氨基酸和蛋白质具有较强的吸收特性, 能够提供较高的检测灵敏度。

流动相的选择对于色谱分离至关重要。本研究采用 A-醋酸盐-磷酸盐缓冲液、B-10%乙腈、C-水、D-乙腈的组合^[3]。这种组合既考虑了化合物的极性和酸性/碱性性质, 又考虑了分离的效率和溶剂的兼容性, 梯度洗脱条件如下(详见表 1)。

表 1 流动相条件
Table 1 Mobile phase conditions

时间/min	A(%)	B(%)	C(%)	D(%)	曲线
0.00	10.1	0.0	90.3	0.0	NA
0.28	9.8	0.2	90.1	0.1	12
5.47	9.1	80.2	11.2	0.2	8
7.11	8.2	15.8	57.8	18.6	7
7.3	8.4	15.8	57.8	18.6	7
7.68	7.9	0.2	0.2	21.4	7
7.96	4.2	0.2	0.1	57.8	7
8.57	4.2	0.1	0.0	59.7	7
8.69	10.3	0.1	0.1	0.0	7
10.22	10.2	0.0	0.1	0.2	7

注: A: 乙酸-磷酸盐缓冲液; B: 乙腈溶液(10%); C: 水; D: 乙腈

1.4 氨基酸标准品/样品溶液氨基酸衍生化的制备

在氨基酸分析中, 标准品或样品的制备是至关重要的

第一步。为了保证结果的准确性和可靠性,研究人员必须遵循一系列严格的步骤。首先,从储存的标准品或样品中吸取 12 μL 溶液,并将其注入一个 4 mm \times 60 mm 的样品管底部。这一步需要使用精确的移液器,以避免体积误差。向样品管中加入 75 μL 的硼酸盐缓冲液,并进行涡旋混合,以确保溶液充分混合。在此基础上,吸取 25 μL 的衍生剂加入样品管中^[4]。衍生剂的作用是标记氨基酸分子,使其更适合后续的 UPLC(超高效液相色谱)分析。再次进行涡旋混合后,将样品管放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中加热 15 分钟。这个加热过程有助于促进衍生反应的进行,使氨基酸分子与衍生剂充分结合。

2 方法学考察

(1) 系统适用性实验。本次研究中,相关研究人员使用了氨基酸标准品溶液,以及高表达抗 PD-1 抗体的细胞培养液进行实验。按照游离氨基酸衍生化方法制备上样溶液,采用设定的色谱条件进行分离分析,通过这种方式确保系统对标准品和实际细胞培养液样品的有效应用。

(2) 线性回归实验。通过水将氨基酸标准品倍比稀释,得到不同浓度的溶液。制备标准品溶液,按照设定的色谱条件进行分析,并以峰面积为纵坐标,氨基酸浓度为横坐标进行线性回归。通过计算线性回归方程和相关系数,确定方法的线性动态范围和灵敏度。

(3) 检测限和定量限实验。对氨基酸工作标准品进行不断稀释,以信噪比为 3 时的进样浓度为检测限,信噪比为 10 时的进样浓度为定量限,确保方法在低浓度下的可靠性。

(4) 精密度实验。取衍生后的氨基酸标准品溶液,重复上述步骤 8 次,计算氨基酸标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),以验证方法的稳定性。

(5) 溶液稳定性实验。溶液稳定性实验用于考察样品溶液在一定时间内的稳定性^[5]。取表达抗 PD-1 抗体的细胞培养液上清,按照样品溶液氨基酸衍生化的方法制备上样溶液,不同时间点进行进样,每次重复 3 次,评估样品在一定时间内的稳定性。

(6) 氨基酸代谢分析。在细胞培养周期内的 14 d 中,每天固定时间吸取细胞培养液,进行冷冻保存^[6]。培养周期结束后,培养液恢复至室温后进行离心,用纯水稀释 20 倍,按照样品溶液氨基酸衍生化的方法制备上样溶液,通过这种方式深入了解细胞培养过程中氨基酸代谢的动态变化。

3 结果与分析

3.1 线性分析

线性关系实验的结果表明,随着氨基酸工作标准品浓度的增加,17 种氨基酸峰的峰面积呈线性增加^[7]。通过对浓度与峰面积进行线性拟合,得到 17 种氨基酸的相关系数(R)均大于等于 0.9993,表明线性关系良好。这说明所采用的 UPLC 方法在测定不同浓度范围内的氨基酸时,具有可靠的线性响应,为准确定量提供了基础。

3.2 检测限和定量限

在检测限和定量限实验中,使用信噪比为 3 和信噪比为 10 来评估方法的灵敏度。结果显示,半胱氨酸的检测限为 0.2 $\mu\text{mol/L}$,其他 16 种氨基酸的检测限为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[8]。在信噪比为 10 时,半胱氨酸的定量限为 0.3 $\mu\text{mol/L}$,其他 16 种氨基酸的定量限为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。这表明本研究所采用的方法对氨基酸具有高灵敏度,能够在较低浓度范围内准确检测和定量目标物质^[9]。

3.3 精密度和重复性

精密度实验结果显示,对于 17 种氨基酸标准品,保存时间的相对标准偏差(RSD)在 0.02%~0.2%之间,而峰面积的 RSD 在 0.55%~0.88%之间。在细胞培养液上清液中,17 种氨基酸的保存时间 RSD 为 0.19%~0.91%,峰面积 RSD 为 0.44%~1.25%,这表明仪器具有良好的精密度。

3.4 溶液稳定性

溶液稳定性实验结果表明,每隔 2.5 小时重复进样 4 次,10 小时内总计 16 次的实验中,17 种氨基酸峰面积的平均 RSD 为 1.13%,小于 2%^[10]。这表明样品溶液具有良好的稳定性,说明方法在短时间内样品处理过程中变化较小。这对于长时间实验或需要多次进样的实验提供了保证,确保结果的准确性与可靠性。

3.5 氨基酸代谢

经本次实验结果显示,在通过实验样品溶液氨基酸衍生化方法制备了上样溶液之后,其氨基酸代谢可按照三类进行划分,第一类是快速消耗的氨基酸,包括 Ile、Thr、Leu、His、Arg 等;第二类是缓慢消耗的氨基酸,包括 Met、Val、Phe、Tyr、Ser 等;第三类是积累的氨基酸,包括 Pro、Ala、Glu、Asp 等。

4 讨论与结论

细胞培养液中游离氨基酸浓度的准确测定, 对于了解细胞代谢状态、优化培养条件以及生物制品生产的质量控制至关重要^[11]。本研究采用超高效液相色谱(UPLC)结合 AQC 作为衍生剂, 成功地实现了对高表达抗 PD-1 抗体的细胞株培养液中 17 种游离氨基酸的测定^[12]。

在实验方法设计方面, 选择 AQC 以及 UPLC 分离技术, 使得在短短 11 min 内完成了对细胞株培养液中 17 种氨基酸的全面分离^[13]。四元溶剂泵梯度曲线的调整进一步保证了在 0.28~7.11 min 内的有效分离, 为后续的含量测定奠定了基础。

在样品处理和分离优化方面, 通过培养基的筛选和干扰物质的降低, 样品的处理过程经过 AQC 柱前衍生后, 使得样品的极性明显降低, 为在色谱柱上获得较好的保留提供了条件。这一过程的设计巧妙地减小了干扰物质, 在衍生化过程中的基质效应, 有效提高了测定的准确性^[14]。

在分析方法验证方面, 通过建立柱前衍生-超高效液相色谱的方法, 成功测定了表达 PD-1 抗体的细胞株培养液中 17 种游离氨基酸的浓度。验证结果表明, 各种氨基酸在其浓度范围内具有良好的线性关系, 且方法具有高灵敏度。仪器的精密度和重现性、溶液的稳定性符合药典要求, 确保了测定结果的可信度与可重复性, 这一方法的快速和稳定性为实际应用提供了便利^[15]。

本次研究中, 通过对 17 种氨基酸的代谢分析, 揭示了蛋氨酸、异亮氨酸和亮氨酸在细胞培养周期内的迅速消耗情况, 可能为细胞生长或抗 PD-1 抗体表达的限制性成分。此外, 糖酵解途径产物丙酮酸的变化在转氨酶作用下生成丙氨酸, 前期积累后期消耗, 对优化培养基配比具有指导意义, 为提高生产效率提供了有益信息。

综上所述, 本研究通过对 UPLC 法在细胞培养液中游离氨基酸浓度测定的深入研究, 成功建立了一套稳定、快速的测定方法。该方法在实验设计、样品处理、分析方法验证以及氨基酸代谢分析等方面, 均展现出卓越的优势。这一研究为细胞培养液中氨基酸浓度测定提供了可靠手段, 同时为生物制品生产中的质量控制和培养条件优化提供了重要参考, 具有广泛的应用前景。

参考文献

[1] 朱徐东, 朱娜, 严斐霞, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术结合多元统计学方法分析乳香醋炙前后化学成分[J]. 中药材, 2023, (12): 2980-2988.

- [2] 董颖, 曹振宇, 苗丽文, 等. 生物组织中 10 种蟾蜍毒素的 UPLC-MS/MS 检测[J]. 刑事技术, 2023, (1): 1-8.
- [3] 史雪敬, 陈彦羽, 蔡思怡, 等. 基于线粒体形态特征与 UPLC-Triple-TOF/MS 整合分析的人参/三七心肌保护物质辨析研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 7, 1-11.
- [4] 王莉, 宋程, 唐蔚. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证探讨健脾消癌方治疗结肠直肠癌作用机制[J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(3): 1-8.
- [5] 乔亚玲, 宋霞, 刘亚蓉, 等. 基于 UPLC 指纹图谱与抗氧化增效关系的枸杞子质量标志物研究[J/OL]. 中国现代中药, 1-12[2023-12-27]
- [6] 陈永艳, 吕佳, 张岚, 等. UPLC-MS/MS 法测定水中 135 种农药及代谢产物[J]. 中国给水排水, 2023, 39(20): 143-154.
- [7] 韩鸿萍, 徐顺连, 曹佳佳, 等. UPLC-TQD-MS/MS 分析青海川贝母药材中的生物碱[J]. 化学研究与应用, 2023, 35(10): 2364-2369.
- [8] 张阿琴, 朱静, 谷巍, 等. 基于 UPLC-MS/MS 的茅苍术地上部分黄酮类成分分析研究[J]. 饲料研究, 2023, 46(20): 109-113.
- [9] 曹阳, 戴国梁, 王一清, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和 HPLC 的苍术-香附醇提液主要化学成分分析[J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(19): 1736-1743.
- [10] 雷梦颖, 黄欣, 姜心蕊, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学探讨双虎肿痛宁酊剂镇痛潜在作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(18): 2492-2498.
- [11] 徐蓉. 组织特异性游离氨与氨基酸的氮代谢途径及机制研究[D]. 江苏: 扬州大学, 2020.
- [12] 谢丽, 蹇爱荣, 贾斌. 贮藏温度对 CCM1 细胞培养液中游离氨基酸浓度的影响[J]. 化学与生物工程, 2009, (2): 69-72.
- [13] 李永恩, 罗健, 伏广农, 等. 鹿茸细胞培养液对水培叶菜产量及品质的影响[J]. 农业工程技术, 2021, (28): 16-21.
- [14] 蓝明扬, 赵郁光, 陆伟贤, 等. 两种按蚊细胞的游离氨基酸代谢的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, (4): 64-65.
- [15] 胡德辉, 杨建明, 常全忠, 等. 李氏 5 号水提液在兴奋性氨基酸损伤神经元中的保护作用[J]. 第一军医大学学报, 2005, (10): 1295-1298.

(责任编辑: 吴华)

作者简介

田燕, 博士, 工程师, 研究方向: 能源资源与环境地球化学。
E-mail: 79786646@qq.com