

超高效液相色谱法同时测定细胞培养液中 17 种游离氨基酸浓度

胡 妍¹, 梅文枫^{2*}

(1. 福建医科大学公共技术中心, 福建 福州 350122; 2. 福建医科大学研究生院, 福建 福州 350122)

摘要: 建立柱前衍生-超高效液相色谱同时测定高表达程序性死亡蛋白-1 (programmed death protein-1, PD-1) 抗体的细胞株培养液中 17 种游离氨基酸浓度的方法, 根据浓度检测结果, 对表达抗 PD-1 抗体的细胞株进行氨基酸代谢分析。使用 6-氨基喹啉-*N*-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯 (6-aminoquinoline-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC) 作为衍生剂, 将不同浓度的氨基酸标准品或细胞株培养液中的游离氨基酸转化为稳定的紫外衍生物, 采用 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱梯度洗脱分离, 流速为 0.7 mL·min⁻¹, 柱温 55 °C, 进样量为 1 μL, 在紫外检测器检测波长为 260 nm 的条件下进行检测, 使用外标法计算氨基酸浓度, 并对高表达抗 PD-1 抗体的细胞株培养液中游离氨基酸浓度进行测定, 根据细胞培养周期内氨基酸浓度变化进行代谢分析。结果表明, 柱前衍生-超高效液相色谱法能在 11 min 内将 17 种氨基酸进行完全分离, 在 0.75~500 μmol·L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好 (相关系数 $R^2 \geq 0.9993$), 检测限为 0.1~0.3 μmol·L⁻¹, 定量限为 0.3~1 μmol·L⁻¹, 建立的方法具有快速、重现性高的优点, 氨基酸代谢分析显示, 蛋氨酸、异亮氨酸和亮氨酸可能为细胞株生长和表达限制性成分。建立的柱前衍生-超高效液相色谱法快速、准确, 可用于同时检测细胞培养液中 17 种游离氨基酸浓度的变化。

关键词: 超高效液相色谱法; 氨基酸; 代谢分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1301-06

Simultaneous determination of 17 kinds of free amino acid concentrations in cell culture medium by UPLC

HU Yan¹, MEI Wen-feng^{2*}

(1. Public Technology Service Center, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China; 2. The Graduate School of Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China)

Abstract: To establish an ultra high performance liquid chromatography coupled with pre-column derivatization method for simultaneous determination of 17 kinds of free amino acid concentrations in CHO cell which expressed high levels of programmed death protein-1 (PD-1) antibody, and its amino acid metabolism was analyzed by this method. Using 6-aminoquinoline-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) as a derivatization reagent, the free amino acids in different concentrations of amino acid standards or cell lines were transformed into stable UV-absorbent compounds, which were separated by gradient elution through ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column. The flow rate was set at 0.7 mL·min⁻¹, the column temperature at 55 °C, the loading amount of sample at 1 μL, the UV detection wavelength at 260 nm, and then the free amino acid concentration in cell lines which expressed PD-1 antibody was determined by external standard method. According to the changes of amino acids concentration during the process of cell culture, the amino acid metabolism was analyzed. The results showed that pre-column derivatization high performance liquid chromatography could completely separate 17 kinds of amino acids within 11 minutes, has good linear relationship ($R^2 \geq 0.9993$) in the range of 0.75-500 μmol·L⁻¹, the

收稿日期: 2022-10-26; 修回日期: 2023-02-07.

基金项目: 福建省中青年教育科研项目 (JAT220085); 福建医科大学启航基金项目 (2017XQ1021).

*通讯作者 Tel: 15705906497, E-mail: meiwenfeng@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1125

limits of detection was 0.1–0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the limits of quantitative was 0.5–1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The established method is quickly and reproducibility. Amino acid metabolism revealed that methionine, isoleucine and leucine may be the restrictive factors of expression for cell line. This method can be used for detection changes of free amino acid concentration in cell line.

Key words: ultra high performance liquid chromatography; amino acid; metabolism analysis

癌症的治疗是人类持续努力并不断取得进展的过程。在过去的200年间,癌症的治疗方法已有多次突破,从早期的化疗到随后的靶向治疗,再到目前的以生物分子为主的精准治疗,这给众多的肿瘤患者带来希望^[1]。与传统化学药物相比,抗肿瘤单克隆抗体显示出更强的特异性和更好的治疗效果,抗体药物的出现也在逐步地改变肿瘤治疗局面^[2,3]。尤其是当单克隆抗体从最初的鼠源抗体发展为人源化抗体后^[4],该类药物已成为目前最具潜力的抗肿瘤药物^[5-7]。

程序性死亡因子1 (programmed death protein-1, PD-1) 单抗是当今肿瘤领域最热门的药物之一, PD-1/PD-L1 通路的研究引领了肿瘤治疗由传统的放化疗向免疫治疗领域方向性的变革^[8]。抗PD-1抗体能阻止PD-L1与PD-1结合,激活人体自身的免疫系统,从而杀死肿瘤细胞^[9-12]。经过20多年的研发,抗PD-1单抗相关的临床试验显示,抗PD-1抗体能激活免疫系统识别并杀灭不同类型的肿瘤,且具有毒性低、副反应少以及抗癌谱广等特点^[13],两款抗PD-1抗体—Opdivo和Keytruda已在2014年得到美国FDA批准用于肿瘤临床治疗^[14-16]。

在生物制药领域,通常选用中国仓鼠卵巢细胞(CHO)作为宿主细胞,来大规模生产单抗^[17]。氨基酸是刺激细胞生长的重要组分,培养CHO的过程中会消耗或者释放氨基酸,在培养基中须及时调整氨基酸浓度,使细胞的密度、活率在培养周期内都能达到符合要求的水平,因此,在细胞生长过程中需监测培养液中氨基酸浓度的变化,找出培养过程中的营养限制性成分^[18],再选用合适的培养基和添加补料的方式,可以提

高细胞培养液中单抗的表达量^[19]。

目前,实验室测定氨基酸浓度的方法有很多种,常见的有全自动氨基酸仪法、毛细管电泳法、液相色谱-质谱串联法、高效液相色谱法等^[20-22],前三种方法技术成本较高、不易普及,高效液相色谱法操作简单,成本较低,应用范围广,常用于实验室常规检测。超高效液相色谱(UPLC)是从高效液相(HPLC)基础上发展起来的新色谱技术,与HPLC方法相比,UPLC方法具有节约时间、分辨率更高、溶剂使用更少等特点^[23,24]。

由于氨基酸的分子质量较小,极性较强,没有发色基团,不利于直接检测。通过衍生试剂给氨基酸添加发色基团更有利于检测。目前常用的衍生剂有邻苯二酐(OPA)^[25]、异硫氰酸苯酯(PITC)^[26]、氯甲酸苄甲酯(FMOC-Cl)^[27]、6-氨基喹啉-*N*-羟基琥珀酰亚胺活化环氨基甲酸酯(6-aminoquinoline-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)^[28]等,其中OPA不与二级氨基酸反应;PITC、FMOC-Cl都能与一级、二级氨基酸反应,但需要去除剩余溶剂再进行色谱分析,且PITC样品中痕量的PITC会缩短分析柱寿命,FMOC-Cl生成多种衍生产物影响测定;AQC能通过一步反应与一级、二级氨基酸反应生成稳定的衍生氨基酸与副产物-*N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)(图1A),过量的AQC则水解成6-氨基喹啉(6-aminoquinoline, AMQ), NHS不被色谱柱保留,AMQ对氨基酸含量测定无影响,衍生产物单一、稳定,具有很强的紫外吸收和荧光吸收,衍生过程操作简单,反应快速且特效,成为近几年应用较为广泛的氨基酸柱前衍生剂之一。

综上所述,本研究拟建立了一种以AQC为柱前衍

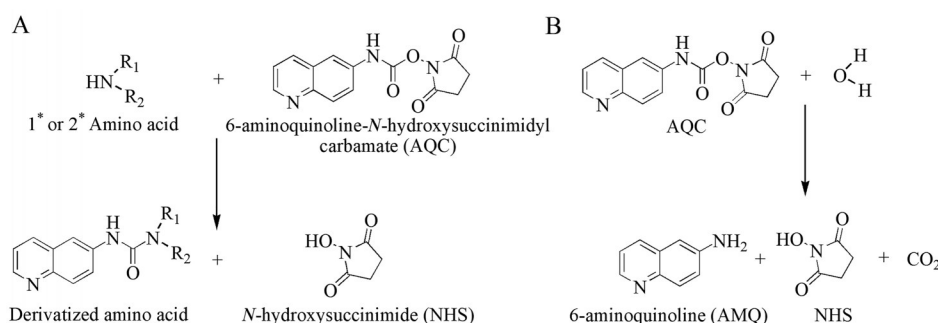


Figure 1 Chemical equation of 6-aminoquinoline-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) and 1° or 2° amino acid (A), chemical equation of AQC and H₂O (B)

生试剂的超高效液相色谱同时测定细胞培养液中17种游离氨基酸浓度的方法,并用于细胞培养液中游离氨基酸浓度测定,根据氨基酸浓度检测结果,对细胞进行氨基酸代谢分析,可为优化细胞培养基的配比提供理论依据,对提高抗PD-1抗体的表达量具有指导意义。

材料与amp;方法

仪器与试剂 Waters UPLC H-class bio system 超高效液相色谱仪,包括四元泵、自动进样器、四通道柱温箱,紫外检测器,Empower 3 色谱工作站(Waters 公司,美国);Forma371 型 CO₂ 培养箱(Thermo Scientific 公司,美国);Milli-Q 纯水机(Millipore 公司,美国);Vortex 3 涡旋振荡器(IKA 公司,德国);烘箱(GZX-9146MBE 型,上海博迅生物科技股份有限公司);超声波清洗机(SB25-12D 型,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

实验材料 实验所用宿主细胞为LONZA 公司的GS 基因敲除的CHOK1SV GS-KO (GS-CHO) 细胞,表达抗人PD-1 抗体的重组GS-CHO 细胞株由实验室自行构建,抗体重链、轻链表达质粒转染宿主细胞,经有限稀释法及后续活力、表达量测试筛选得到1 株表达量高、细胞活力好的单克隆命名为122;AccQ.Fluor™ 衍生试剂包,包含硼酸盐缓冲液、AQC 粉末和乙腈(Waters 公司,美国);氨基酸水解标准品,包含17 种氨基酸,其中胱氨酸浓度为1.25 mmol·L⁻¹,其余16 种氨基酸浓度为2.5 mmol·L⁻¹、醋酸盐-磷酸盐缓冲液(Waters 公司,美国),乙腈(色谱纯,Fluka, 美国),HyCell CHO 培养基(HyClone 公司,美国)。

色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);流速为0.7 mL·min⁻¹;柱温55 °C,进样量为1 μL;紫外检测波长为260 nm,流动相A:醋酸盐-磷酸盐缓冲液,流动相B:10%乙腈,流动相C:水,流动相D:乙腈,梯度洗脱条件如表1 所示。

衍生试剂的配制 取装有定量AQC 粉末的小瓶,

加入1 mL 乙腈,涡旋振荡,55 °C 加热5 min 溶解,制成3 mg·mL⁻¹ 的衍生剂,-20 °C 保存。

样品溶液的制备 取不同培养天数的细胞培养液,10 000×g 的转速离心10 min,将细胞培养液上清液用纯水稀释20 倍,作为样品溶液。

氨基酸标准品/样品溶液氨基酸衍生化的制备 吸取10 μL 标准品/样品溶液注入6 mm × 50 mm 样品管底部,再加入70 μL 硼酸盐缓冲液涡旋混合,吸取20 μL 衍生剂至样品管中,立即涡旋混合几秒钟,置于55 °C 烘箱中加热10 min,将衍生后的氨基酸标准品/样品溶液转移至带有内衬管的液相小瓶中。

方法学考察

系统适用性实验 取氨基酸标准品溶液、高表达抗PD-1 抗体的细胞培养液,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依次进行分离分析。

线性 用水将氨基酸标准品进行倍比稀释,制得胱氨酸1.25~500 μmol·L⁻¹,其他氨基酸0.75~250 μmol·L⁻¹ 共7 个浓度的溶液,按照氨基酸衍生化方法制得标准品溶液,采用设定的色谱条件进行分析,以峰面积为纵坐标,对应的氨基酸浓度为横坐标,进行线性回归,计算线性回归方程和相关系数。

检测限和定量限 将氨基酸工作标准品进行不断稀释,以信噪比=3 时的进样浓度为检测限,以信噪比=10 时的进样浓度为定量限。

精密性 取衍生后的氨基酸标准品溶液重复进样6 次,计算17 种氨基酸标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)。

重复性 准确移取细胞培养液6 份,10 000×g 的转速离心10 min,将培养液上清液用纯水稀释20 倍后,按照样品溶液氨基酸衍生化方法制得上样溶液,按照色谱条件进行分离,计算17 种氨基酸峰保留时间和面积的RSD 值。

溶液稳定性实验 取表达抗PD-1 抗体的细胞培养液上清,10 000×g 的转速离心10 min,取培养液上清液用纯水稀释20 倍,按照样品溶液氨基酸衍生化的方法制得上样溶液,分别于0、2、4、6、8 h 进样,每次重复3 次,计算这15 针样品17 个氨基酸峰面积的平均RSD,以考察溶液的稳定性。

氨基酸代谢分析 在细胞培养周期内的14 天,每天固定时间吸取细胞培养液,-20 °C 保存,培养周期结束后,培养液恢复至室温后10 000×g 的转速离心10 min,取培养液上清液用纯水稀释20 倍,按照样品溶液氨基酸衍生化的方法制得上样溶液。按照色谱条件测定1~14 天内17 种氨基酸浓度的变化。

Table 1 Gradient elution conditions of mobile phase. A: Acetate - phosphate buffer; B: Acetonitrile solution (10%); C: Water; D: Acetonitrile; NA: Not available

Step No.	Time /min	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0.00	10.0	0.0	90.0	0.0	NA
2	0.29	9.9	0.0	90.1	0.0	11
3	5.49	9.0	80.0	11.0	0.0	7
4	7.10	8.0	15.6	57.9	18.5	6
5	7.3	8.0	15.6	57.9	18.5	6
6	7.69	7.8	0.0	70.9	21.3	6
7	7.99	4.0	0.0	36.3	59.7	6
8	8.59	4.0	0.0	36.3	59.7	6
9	8.68	10.0	0.0	90.0	0.0	6
10	10.20	10.0	0.0	90.0	0.0	6

结果

1 方法学考察

1.1 系统适应性 氨基酸标准品和细胞培养液上清液中游离氨基酸分离色谱图如图2A、B所示,均在相同保留时间的位置出现17个氨基酸峰,其中AMQ峰为衍生剂AQC水解产生的试剂峰,不影响氨基酸峰的测定。17个峰对称性好,半胱氨酸与赖氨酸的分离度为1.75,其余峰之间分离度均远大于1.5,符合中国药典中高效液相色谱法的系统适应性实验要求。

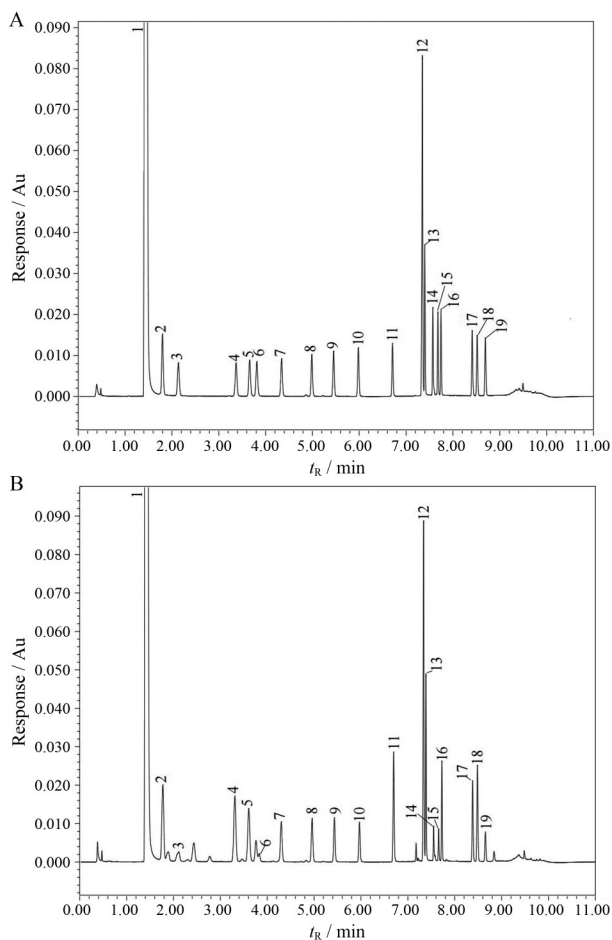


Figure 2 Ultra performance liquid chromatography (UPLC) chromatograms of mixed amino acids standard (A), and free amino acids of cell line (B). 1: AMQ; 2: NH_3 ; 3: Histidine (His); 4: Serine (Ser); 5: Arginine (Arg); 6: Glycine (Gly); 7: Aspartic acid (Asp); 8: Glutamic acid (Glu); 9: Threonine (Thr); 10: Alanine (Ala); 11: Proline (Pro); 12: Cysteine (Cys); 13: Lysine (Lys); 14: Tyrosine (Tyr); 15: Methionine (Met); 16: Valine (Val); 17: Isoleucine (Ile); 18: Leucine (Leu); 19: Phenylalanine (Phe)

1.2 线性关系 随着氨基酸工作标准品浓度增大,17种氨基酸峰的峰面积也随之增大,将浓度与峰面积之间进行线性拟合,得17种氨基酸的 $R^2 \geq 0.9993$,线性关系良好。

1.3 检测限和定量限 当信噪比 = 3时,半胱氨酸检测限为 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其余16种氨基酸检测限为 $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;当信噪比 = 10时,半胱氨酸定量限为 $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其余16种氨基酸定量限为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,灵敏度高。

1.4 精密度和重复性 精密度检测实验结果显示,17种氨基酸标准品的保存时间RSD为0.03%~0.3%,峰面积RSD为0.45%~0.98%,仪器精密度好。细胞培养液上清液中,17种氨基酸的保存时间RSD为0.18%~0.90%,峰面积RSD为0.42%~1.21%,方法重复性高。

1.5 溶液稳定性 根据溶液稳定性考察方法,每隔2 h重复进样3次,8 h内总计15次,经计算,这15次实验17种氨基酸峰面积的平均RSD为1.12%,小于2%,说明样品溶液稳定。

2 氨基酸代谢分析

将1~14天的细胞培养液按照样品制备方法和氨基酸衍生化方法制得上样溶液,按照建立的方法进行浓度测定,结果如图3所示,CHO细胞12种必需氨基酸浓度曲线(图3A)和比消耗速率(图3B)显示,蛋氨酸比消耗速率比其他必需氨基酸更高,且在对数生长期消耗最快;亮氨酸和异亮氨酸分别在第9天和第11天耗竭,由于补料中不含亮氨酸,细胞培养后期无法检出亮氨酸浓度。蛋氨酸、异亮氨酸在培养基已含有的情况下,仍在细胞培养后期耗竭,说明这两种必需氨基酸为生长和(或)抗体表达限制性成分。非必需氨基酸中(图3C、D),天冬氨酸及谷氨酸在第8天(对数生长期)都消耗至较低浓度,在细胞培养的维持期和衰亡期保持稳定的比消耗速率。丙氨酸在第4~8天不断积累,从第9天开始,丙氨酸从生成转换为消耗模式,浓度逐步降低。甘氨酸和丝氨酸在培养后期有短暂的生成积累。

讨论

本实验使用AQC作为衍生剂,将高表达抗PD-1抗体细胞株培养液中的游离氨基酸转化为稳定的衍生物,经UPLC快速分离,能在11 min内完全分离细胞株培养液中17种氨基酸。在色谱柱分离样品的0.29~7.10 min中,四元溶剂泵梯度曲线从11变至6,梯度变化快,将乙腈先稀释10倍配成流动相B,基线波动更小,浓度梯度更稳定,更有利于待分析氨基酸与培养液中保留时间相近(如 t_R 1.890 min, t_R 2.435 min)的氨基酸干扰峰分开,本实验在筛选高产量细胞株时,选用5种不同培养基组合进行培养,不同培养基收获的细胞上清均用水稀释20倍,与衍生剂反应后,培养基继续被稀释10倍,培养基中氨基酸经AQC柱前衍生后,极性明显降低,能在色谱柱上获得较好的保留;培养基中干

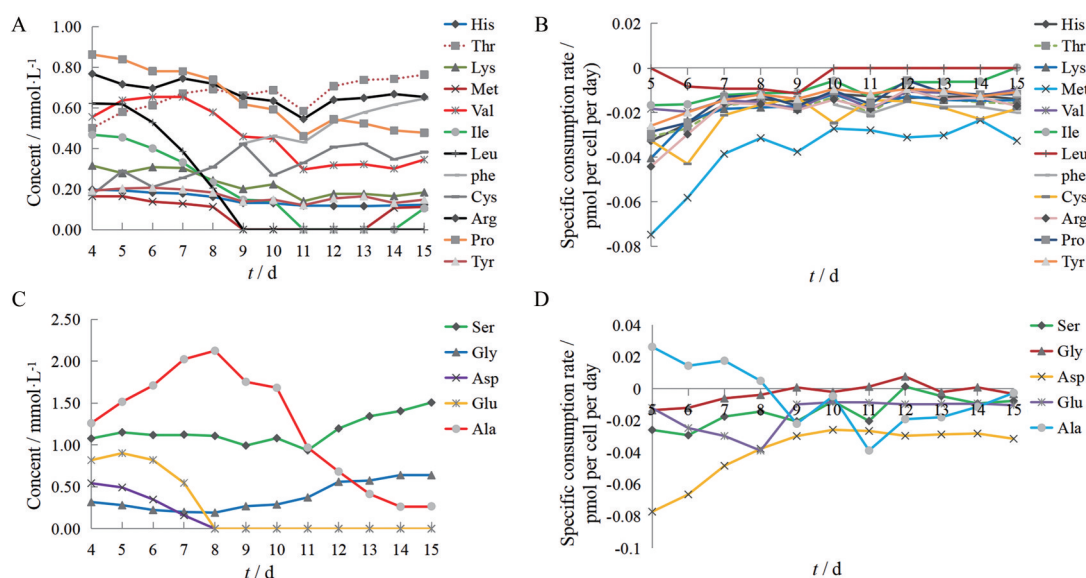


Figure 3 Consumption of essential amino acids and non-essential amino acids. A: Changes of essential amino acids concentrations; B: Specific consumption rate of essential amino acids; C: Changes of non-essential amino acids concentrations; D: Specific consumption rate of non-essential amino acids

扰物质不被衍生, 或者衍生后的干扰物质因极性因素不被色谱柱保留, 或者在 260 nm 没有吸收峰, 衍生化操作过程使得培养基的基质效应显著降低; 因 AQC 与未质子化的伯胺基或者仲胺基反应, pH 低于 6 不利于衍生反应, 本实验所选用的培养基组合 pH 均呈中性, 不影响 AQC 与氨基酸反应, 因此不同组成成分的培养基基质不影响氨基酸浓度的测定。本实验建立了柱前衍生-超高效液相色谱同时测定表达 PD-1 抗体的细胞株培养液中 17 种游离氨基酸浓度的方法, 并对检测方法进行了方法学验证, 实验结果表明, 氨基酸在各自浓度范围内线性关系良好, 灵敏度高, 仪器精密度和重现性、溶液稳定性均符合药典要求, 建立的浓度检测方法具有快速、稳定的优点, 为细胞培养周期内细胞培养液中游离氨基酸浓度测定提供了可靠的检测方法。17 种氨基酸代谢分析显示, 蛋氨酸、异亮氨酸和亮氨酸在细胞培养周期内消耗迅速, 说明这 3 种氨基酸可能为细胞株生长或 (和) 表达的限制性成分, 在后续细胞培养过程中, 可在培养基中添加这几种氨基酸, 根据氨基酸浓度检测结果优化氨基酸的添加量。糖酵解途径产物丙酮酸在转氨酶作用下生成丙氨酸, 所以在细胞培养前期有丙氨酸积累, 积累的丙氨酸在细胞培养后期重新转化为丙酮酸进入三羧酸循环, 其在细胞培养后期处于消耗状态。通过对氨基酸代谢进行分析, 可为优化细胞培养基的配比提供理论依据, 对提高抗 PD-1 抗体的表达量具有指导意义。

作者贡献: 胡妍主要进行了本文分析方法建立、实验数

据分析处理、撰写文章及对文章进行修改等; 梅文枫主要进行氨基酸代谢分析提供实验思路, 对文章的撰写及修改提供建议和指导。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Santhosh S, Kumar P, Ramprasad V, et al. Evolution of targeted therapies in cancer: opportunities and challenges in the clinic [J]. *Future Oncol*, 2015, 11: 279-293.
- [2] Oldham RK, Dillman RO, Oldham RK, et al. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 1774-1777.
- [3] Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, et al. Monoclonal antibody successes in the clinic [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1073-1078.
- [4] Wang W, Singh S, Zeng DL, et al. Antibody structure, instability, and formulation [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96: 1-26.
- [5] Dugger SA, Platt A, Goldstein DB, et al. Drug development in the era of precision medicine [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 183-196.
- [6] US FDA. CDER therapeutic biologic products. CDER billable biologic product list (2016) [EB/OL]. 2016-11-05 [2022-10-26]. <http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/DrugInnovation/default.htm>.
- [7] Reichert JM. Antibodies to watch in 2016 [J]. *MAbs*, 2016, 8: 197-204.
- [8] Aspeslagh S, Matias M, Palomar V, et al. In the immunoncology era, is anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy modifying the sensitivity to conventional cancer therapies? [J]. *Eur J*

- Cancer, 2017, 87: 65-74.
- [9] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death [J]. EMBO J, 1992, 11: 3887-3895.
- [10] Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor [J]. Immunity, 1999, 11: 141-151.
- [11] Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion [J]. Nat Med, 1999, 5: 1365-1369.
- [12] Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the Pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation [J]. J Exp Med, 2000, 192: 1027-1034.
- [13] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti - PD-1 antibody in cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 366: 2443-2454.
- [14] Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1(MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates [J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 3167-3175.
- [15] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 366: 2455-2465.
- [16] Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, et al. Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2015, 33: 2004-2012.
- [17] Sharker SM, Rahman A. A review on the current methods of Chinese hamster ovary (CHO) cells cultivation for the production of therapeutic protein [J]. Curr Drug Discov Technol, 2021, 18: 354-364.
- [18] Pérez-Rodríguez S, Ramírez-Lira MJ, Trujillo-Roldán MA, et al. Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells [J]. Bioengineered, 2020, 11: 463-471.
- [19] Power DN, Wang YF, Fratz-Berilla EJ, et al. Real-time quantification and supplementation of bioreactor amino acids to prolong culture time and maintain antibody product quality [J]. Biotechnol Prog, 2019, 35: e2894.
- [20] Huang XL, HE XF, YANG Q, et al. Determination of 17 amino acids in the dried Rhizome of *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel from different habitats [J]. Food Sci (食品科学), 2021, 42: 255-261.
- [21] Tian X, Wang JJ, Qin HB, et al. Determination of 17 kinds of free amino acids in different Huangjiu products by UPLC [J]. Liquor Mak Sci Technol (酿酒科技), 2019, 11: 74-78.
- [22] Che LL, Li WH, Lin BQ. Determination methods and application of amino acids [J]. Amino Acids Biot Resour (氨基酸和生物资源), 2011, 33: 39-42.
- [23] Gumustas M, Kurbanoglu S, Uslu B, et al. UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters [J]. Chromatographia, 2013, 76: 1365-1427.
- [24] Nováková L, Matysová L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis [J]. Talanta, 2006, 68: 908-918.
- [25] Soto OR, Me´ndez AE, Gala´n VJ, et al. Quantitative analysis of neuroactive amino acids in brain tissue by liquid chromatography using fluorescent pre-column labeling with *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-cysteine [J]. Biomed Chromatogr, 1994, 8: 114-118.
- [26] Hariharan M, Naga S, Vannoord T. Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection with precolumn derivatization using phenyl isothiocyanate [J]. J Chromatogr, 1993, 621: 15-22.
- [27] Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist J. Determination of amino acids with 9-fluoroenylmethyl-chloroformate and reverse phase high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr, 1983, 282: 609-618.
- [28] Cohen SA, Michaud DP. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1993, 211: 279-287.