

使用BioAccord™ LC-MS系统定量细胞培养基中的未衍生化氨基酸

Yun Alelyunas, Mark Wrona, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

生物工艺中准确测量细胞培养基的成分对于原料测试（批次间和多供应商采购）、培养基开发和培养过程中代谢物不断变化的消耗型培养基监测非常重要。本文展示了使用BioAccord LC-MS系统在未衍生化条件下对细胞培养基中的氨基酸(AA)进行常规定量的优势和性能。结果表明，该方法能够以三个数量级(0.01 μM~10 μM)的线性范围对AA进行定量，且具有出色的准确度和精密度。使用未标记的化合物作为内标对于响应归一化是有效的。数据表明该方法适用于原始培养基中氨基酸的质量控制以及消耗型培养基中氨基酸消耗率的测定。

优势

- 使用简单易用的BioAccord LC-MS系统对细胞培养基进行定量和定性监测
- 符合法规要求的单一信息学套装，支持数据采集、数据审查、未知物解析、报告模板和多变量数据分析

简介

我们开发出一种在BioAccord™ LC-MS系统上使用ACQUITY™ Premier HSS T3色谱柱的反相液相色谱和质谱(LC-MS)工作流程方法用于细胞培养基分析（图示1）¹。Premier系统和色谱柱的硬件设计中采用了MaxPeak™高性能

表面技术。该方法已应用于抗体生产¹、微生物发酵²以及细胞和基因治疗³中的细胞培养基监测。监测培养基成分在不同生物反应器中的变化以及在培养过程中的经时变化对培养基开发和工艺优化表现出很高的价值⁴。在方法库中的200多种化合物中，反相方法可对氨基酸(AA)进行直接的未衍生化分析，无需进行样品制备（包括衍生化）。迄今为止，在分析的所有培养基中，AA是含量最多的化合物，因为它们蛋白质生物治疗药物生产所需的必要构件。监测补料氨基酸和消耗型培养基在培养过程中的氨基酸，确保它们处于理想范围内，对于治疗效价和产品质量非常重要。本应用纪要重点介绍使用反相色谱法对未衍生化氨基酸进行的定量。



图示1. BioAccord系统/waters_connect™细胞培养基分析工作流程示意图。

实验

样品和标样制备

通过系列稀释含17种氨基酸的储备液至0.01~10 μM的浓度范围，制备外部标准曲线溶液。使用的稀释剂是1:1000稀释的Earle平衡盐(EBS)储备液(MilliporeSigma P/N: E2888)，使用0.1%的甲酸(FA)水溶液，其中含有0.1 μM 3-氯-酪氨酸作为内标。EBS的用途是模拟消耗型培养基中一般的盐条件。

内标研究中使用的样品是市售的培养基溶液IMDM (MilliporeSigma P/N: I3390)和稳定同位素标记(SIL)氨基酸标准混合物 (沃特世P/N: 186009051 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards-->

[reagents/186009051-kairos-amino-acid-internal-standard-set-100.html](https://www.waters.com/zh-cn/reagents/186009051-kairos-amino-acid-internal-standard-set-100.html))。将SIL混合物作为内标(IS)加入1:100稀释的IMDM 0.1%甲酸溶液中,使SIL最终浓度为5 μM。

LC条件

LC-MS系统	装配ACQUITY Premier BSM的BioAccord LC-MS系统
色谱柱	ACQUITY Premier HSS T3 2.1 x 150 mm (P/N 186009469)
柱温	40 °C
样品温度	6 °C
进样体积	2 μL
流速	0.25 mL/min
流动相A	0.1%甲酸的水溶液
流动相B	90%乙腈/10%异丙醇/0.1%甲酸

梯度表

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.25	100	0	6
1.5	0.25	100	0	6
6	0.25	95	5	6
9	0.25	65	35	6
14	0.25	5	95	6
17	0.25	5	95	6
17.1	0.25	100	0	6
20	0.25	100	0	6

MS条件

LC-MS系统	装配ACQUITY Premier BSM的BioAccord LC-MS系统	
电离模式	全扫描	
采集范围	小分子 (50-800 <i>m/z</i>)	
极性	正	
	毛细管电压:	1 kV
	锥孔电压:	20 V
扫描速率	5 Hz	
脱溶剂气温度	550 °C	
智能数据捕获	开	
锁定质量数校正	标准品	
信息学软件	waters_connect 3.1, 细胞培养基筛查工作流程	

结果与讨论

标准曲线

使用17 AA混合物，通过细胞培养基方法和BioAccord LC-MS平台收集氨基酸定量响应。使用EBS（用于制备培养基的平衡盐溶液）制备标准曲线标准品溶液，并在质量控制(QC)样品组的开始和结束时进样。对每种氨基酸获取基于log-log线性曲线拟合的线性响应。标准曲线数据的示例如图1所示，显示了两种同量异位化合物（异亮氨酸和亮氨酸）的色谱图、汇总响应图和标准曲线。对于这两种化合物，观察到出色的基线色谱分离和可重现的响应（表1）。观察到的线性范围为0.01~10 μM 或3个数量级的动态范围($R^2 = 0.9996$)。图2和表1总结了其余AA的标准曲线和线性范围。数据显示，大多数化合物的线性范围为0.01~10 μM 或三个数量级的动态范围($R^2 > 0.996$)。其中例外包括灵敏度较低的丙氨酸和甘氨酸，以及线性范围较窄的苏氨酸。

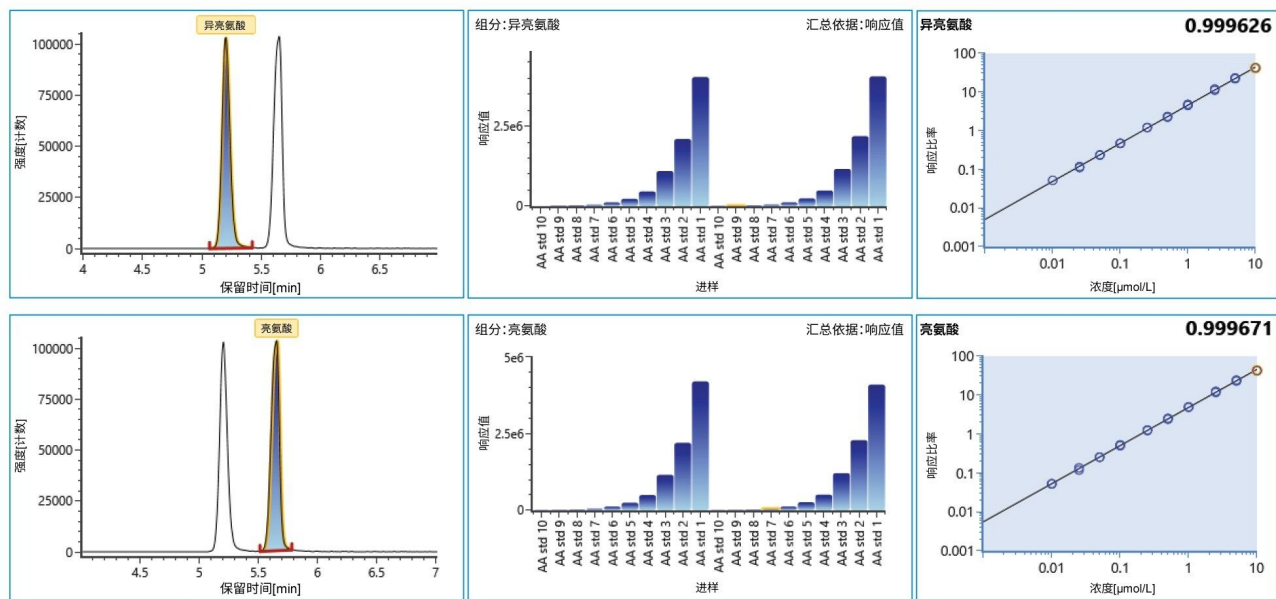


图1.亮氨酸和异亮氨酸的色谱图、响应条形图和标准曲线。

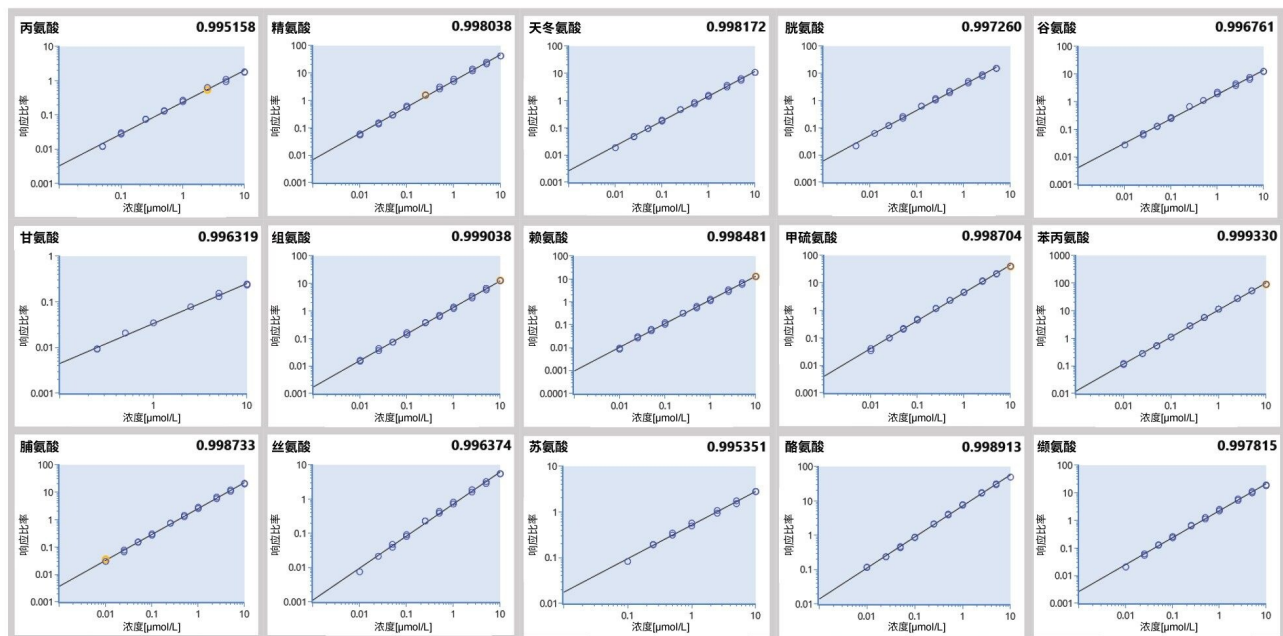


图2.氨基酸的标准曲线。使用log-log线性校准进行曲线拟合。

确定了两个QC样品（0.05 μM 的低浓度QC样品和5 μM 的高浓度QC样品）的方法准确度和精密度。表2总结了基于三次重复进样的数据。总体而言，观察到出色的准确度(85%~115%)和重现性（高浓度QC和低浓度QC下分别为<4%和<15%）。总之，该数据表明可以使用反相方法定量测定细胞培养基中的氨基酸，用于原始培养基的质量控制和/或消耗型培养基在培养过程中的定量监测。

组分名	中性质量数 (Da)	预期保留时间 (min)	质量数误差 (ppm)*	线性范围 (μM)	R^2	低浓度QC, 0.05 μM (n=3)		高浓度QC, 5 μM (n=3)	
						准确度(%)	精密度(%)	准确度(%)	精密度(%)
丙氨酸	89.0477	1.42	1.7	0.05-10	0.9951	91	9.2	93	2.2
精氨酸	174.1117	1.31	-0.4	0.01-10	0.9980	95	8.5	89	2.7
天冬氨酸	133.0375	1.42	0.1	0.01-10	0.9981	95	8.8	91	1.6
胱氨酸	240.0239	1.37	-1.7	0.005-5	0.9973	92	11.5	89	1.8
谷氨酸	147.0532	1.50	0.4	0.01-10	0.9968	92	5.8	88	1.8
甘氨酸	75.0320	1.36	3.2	0.25-10	0.9963	n/a	n/a	98	3.3
组氨酸	155.0695	1.28	1.1	0.01-10	0.9990	96	5.5	95	1.0
异亮氨酸	131.0946	5.22	3.4	0.01-10	0.9996	98	7.4	100	1.6
亮氨酸	131.0946	5.64	3.4	0.01-10	0.9997	97	3.2	101	0.9
赖氨酸	146.1055	1.23	0.8	0.01-10	0.9985	98	4.1	91	1.1
甲硫氨酸	149.0511	3.01	1.2	0.01-10	0.9987	107	4.3	97	3.5
苯丙氨酸	165.0790	8.11	1.9	0.01-10	0.9993	95	1.2	102	1.7
脯氨酸	115.0633	1.73	1.5	0.01-10	0.9987	92	7.5	93	0.6
丝氨酸	105.0426	1.38	1.2	0.01-10	0.9964	92	13.6	89	0.5
苏氨酸	119.0582	1.46	0.6	0.1-10	0.9954	n/a	n/a	87	0.6
酪氨酸	181.0739	5.64	2.2	0.01-10	0.9989	89	1.3	96	1.6
缬氨酸	117.0790	2.39	1.9	0.01-10	0.9978	99	11.7	92	1.5

*基于所有氨基酸的样品浓度5 μM 计算, 胱氨酸的样品浓度除外, 为2.5 μM 。

n/a: 低于检测限

表1. QC样品三次重复进样的线性、精密度和准确度总结。

内标注意事项

在定量生物分析中, 将内标(IS)添加到样品中进行信号归一化, 以确保尽可能高的重现性和准确度。通常需要使用相同分析物的SIL样品。图3显示了使用IS校正的示例, 显示了SIL-亮氨酸作为IS时亮氨酸100次重复进样的趋势图。亮氨酸或SIL-亮氨酸的单个图显示出进样早期的响应漂移。通过使用SIL校正, 变化显著减少, 准确度和信号重现性得以提高。

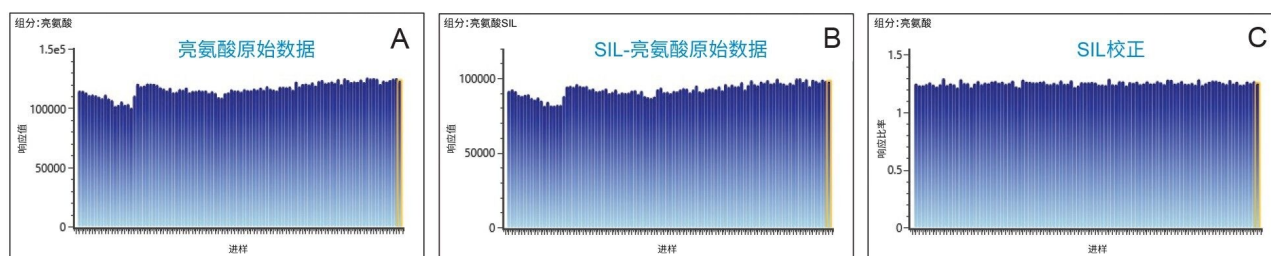


图3.100次进样的原始响应的条形趋势图。(A)亮氨酸，(B)稳定同位素标记的亮氨酸，(C)亮氨酸/SIL-亮氨酸的响应比。该图显示的原始响应的信号变化已使用内标进行校正。

本研究使用不同化合物研究了基于单个IS的响应重现性。使用的样品是基础培养基混合物IMDM，其中加标SIL氨基酸混合物，进样100次或采集数据超过35小时。100次进样的重现性计算如下：(1)无IS，(2)使用先洗脱的化合物SIL-脯氨酸(Pro)作为IS，(3)使用中间洗脱的SIL-亮氨酸(Leu)作为IS，或(4)使用后洗脱的SIL-苯丙氨酸(Phe)作为IS。

图4是使用上述IS校正计算的100次进样的%RSD汇总图。结果表明，当未校正响应时，%RSD约为5%。当使用相应的SIL化合物时，所有IS校正方法的%RSD降低至<3%，并获得理想重现性。这些数据表明，虽然特定化合物的SIL产生了预期的理想重现性，但使用结构不同的化合物作为IS是提高重现性的实用方法。在目前的原始和消耗型培养基分析中，3-氯酪氨酸已成功用作内标²⁻⁴。

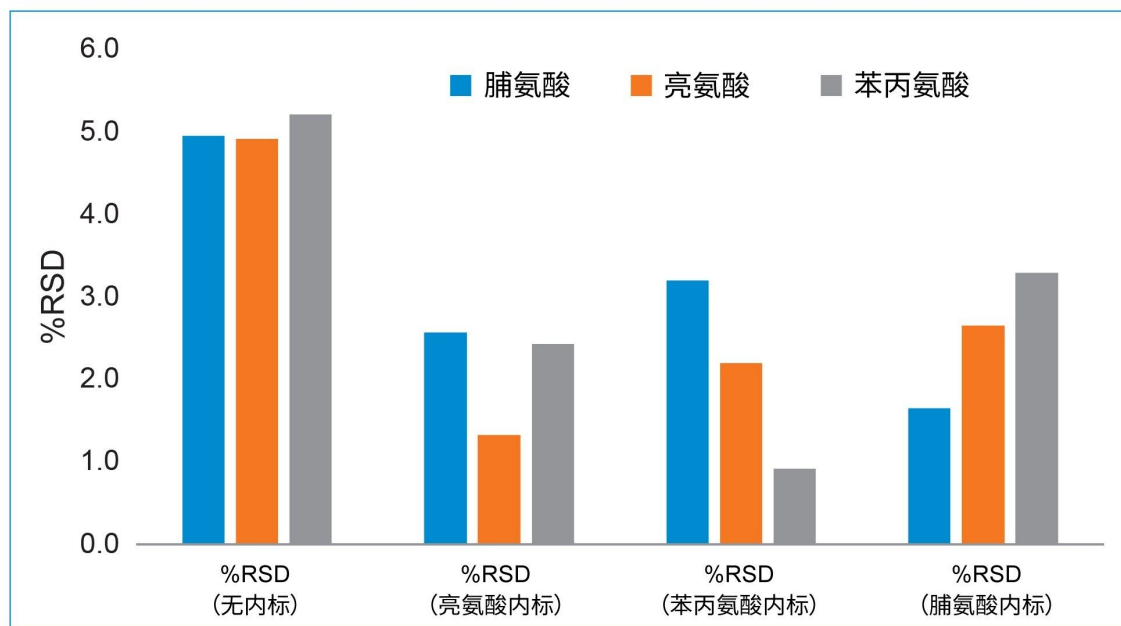


图4.使用不同化合物作为内标的%RSD汇总图。蓝色条形：脯氨酸（保留时间 = 1.73 min），橙色条形：亮氨酸（保留时间 = 5.64 min），灰色条形：苯丙氨酸（保留时间 = 8.11 min）。

结论

- 使用细胞培养基方法和BioAccord LC-MS系统成功定量了未衍生化氨基酸
- 在相关生物工艺水平上，所有氨基酸都获得了出色的准确度和重现性
- 内标研究表明，使用单一化合物作为内标可以有效地获得良好的重现性
- 当使用标准曲线标准品溶液时，该方法除了用于消耗型细胞培养基监测以支持工艺开发外，还可以用于原料测试的质量控制

参考资料

1. YW Alelyunas, MD Wrona, W Chen, 使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统监测生物工艺开发所用细胞培养基中的营养成分及代谢物, 沃特世应用纪要, [720007359ZH](#), 2021年9月.
2. YW Alelyunas, MD Wrona, YQ Yu, 使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统监测微生物培养基中的营养物和代谢物, 沃特世应用纪要, [720007485ZH](#), 2022年1月.
3. YW Alelyunas, MD Wrona, YQ Yu, 使用BioAccord LC-MS系统在细胞和基因治疗中进行细胞培养基监测, 沃特世应用纪要, [720007705ZH](#), 2022年9月.
4. YW Alelyunas, C Prochaska, C Kukla, MD Wrona, YQ Yu, 使用BioAccord™ LC-MS对自动化高通量多平行Ambr®15微生物反应器系统进行进程中培养基监测, 沃特世应用纪要, [720007581ZH](#), 2022年4月.

致谢

作者要感谢我们的同事Magnus Wetterhall和Steve Preece审阅了本篇应用纪要。

特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007766ZH, 2022年10月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号