

# LCMS-8060 细胞培养基上清液分析方法包测定上清液成份

## LCMSMS-256

**摘要：** 本文使用细胞培养基上清液分析方法包对不同时间点的酿酒酵母菌发酵液进行了成分测定。利用方法包中的条件对发酵液中的 101 种成份进行了半定量分析，使用方法包中的内标物 2- 异丙基苹果酸对酵母菌过程中所涉及的相关代谢产物的组分的结果进行了半定量分析。该分析结果为酵母菌代谢产物含量的变化提供了量化的参考依据。

**关键词：** 三重四极杆质谱 细胞培养基上清液分析方法包 酿酒酵母菌

酒精发酵过程是一个复杂的生物代谢过程，在这个过程中有酵母菌种类和能量的变化，代谢产物的含量的变化，能量代谢导致温度的变化等。这些变化可以直接影响酵母菌的生长代谢，从而对酒精发酵产生影响，以此影响葡萄酒的风味。酒精发酵过程中有许多连续反应和中间代谢产物，化学反应主要分为糖分子的裂解、丙酮酸的分解和甘油发酵三个过程。在酒精发酵过程中除

了产生 CO<sub>2</sub>、乙醇和热量外，酵母还可以利用 5%~8% 的糖产生一系列其他的化合物，即酒精发酵副产物，这些代谢副产物对葡萄酒的风味和口感有重要影响。本文利用岛津细胞培养基上清液分析方法包对酿酒酵母菌的代谢产物进行了半定量分析，为该方面的研究提供了量化的数据支持。

### 实验部分

#### 1.1 仪器和试剂

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 液相条件

色谱柱：见细胞培养基上清液分析方法包

流动相：见细胞培养基上清液分析方法包

流速：0.35 mL/min

柱温：40℃

进样量：1 μL

洗脱方式：见细胞培养基上清液分析方法包

##### 质谱条件

离子化模式：ESI(+/-)

加热气：空气 10.0 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

接口温度：300℃

DL 温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

监控的化合物信息：见表 1

表1 细胞培养方法包中102种化合物列表

| 编号 | 化合物名                  | 类别  | 编号 | 化合物名                         | 类别  | 编号  | 化合物名                       | 类别  |
|----|-----------------------|-----|----|------------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|
| 1  | 2-Isopropylmalic acid | 内标  | 35 | Ornithine                    | 氨基酸 | 69  | Deoxycytidine              | 核苷酸 |
| 2  | Gluconic acid         | 糖类  | 36 | Oxidized glutathione         | 氨基酸 | 70  | Guanine                    | 核苷酸 |
| 3  | Glucosamine           | 糖类  | 37 | Phenylalanine                | 氨基酸 | 71  | Guanosine                  | 核苷酸 |
| 4  | Hexose (Glucose)      | 糖类  | 38 | Pipecolic acid               | 氨基酸 | 72  | Guanosine monophosphate    | 核苷酸 |
| 5  | Sucrose Carbohydrate  | 糖类  | 39 | Proline                      | 氨基酸 | 73  | Hypoxanthine               | 核苷酸 |
| 6  | Threonic acid         | 糖类  | 40 | Serine                       | 氨基酸 | 74  | Inosine                    | 核苷酸 |
| 7  | 2-Aminoadipic acid    | 氨基酸 | 41 | Threonine                    | 氨基酸 | 75  | Thymidine                  | 核苷酸 |
| 8  | 4-Aminobutyric acid   | 氨基酸 | 42 | Tryptophan                   | 氨基酸 | 76  | Thymine                    | 核苷酸 |
| 9  | 4-Hydroxyproline      | 氨基酸 | 43 | Tyrosine                     | 氨基酸 | 77  | Uracil                     | 核苷酸 |
| 10 | 5-Glutamylcysteine    | 氨基酸 | 44 | Valine                       | 氨基酸 | 78  | Uric acid                  | 核苷酸 |
| 11 | 5-Oxoproline          | 氨基酸 | 45 | homocysteine                 | 氨基酸 | 79  | Uridine                    | 核苷酸 |
| 12 | Alanine               | 氨基酸 | 46 | L-Homoserine                 | 氨基酸 | 80  | Xanthine                   | 核苷酸 |
| 13 | Alanyl-glutamine      | 氨基酸 | 47 | 4-Aminobenzoic acid          | 维生素 | 81  | Xanthosine                 | 核苷酸 |
| 14 | Arginine              | 氨基酸 | 48 | Ascorbic acid                | 维生素 | 82  | Penicillin G               | 抗生素 |
| 15 | Asparagine            | 氨基酸 | 49 | Ascorbic acid<br>2-phosphate | 维生素 | 83  | 2-Aminoethanol             | 其他  |
| 16 | Aspartic acid         | 氨基酸 | 50 | Biotin                       | 维生素 | 84  | 2-Ketoisovaleric acid      | 其他  |
| 17 | Citrulline            | 氨基酸 | 51 | Choline                      | 维生素 | 85  | 3-Methyl-2-oxovaleric acid | 其他  |
| 18 | Cystathionine         | 氨基酸 | 52 | Cyanocobalamin               | 维生素 | 86  | 4-Hydroxyphenyllactic acid | 其他  |
| 19 | Cysteine              | 氨基酸 | 53 | Ergocalciferol               | 维生素 | 87  | Citric acid                | 其他  |
| 20 | Cystine               | 氨基酸 | 54 | Folic acid                   | 维生素 | 88  | Ethylenediamine            | 其他  |
| 21 | Glutamic acid         | 氨基酸 | 55 | Folinic acid                 | 维生素 | 89  | Fumaric acid               | 其他  |
| 22 | Glutamine             | 氨基酸 | 56 | Lipoic acid                  | 维生素 | 90  | Glyceric acid              | 其他  |
| 23 | Glutathione           | 氨基酸 | 57 | Niacinamide                  | 维生素 | 91  | Histamine                  | 其他  |
| 24 | Glycine               | 氨基酸 | 58 | Nicotinic acid               | 维生素 | 92  | Isocitric acid             | 其他  |
| 25 | Glycyl-glutamine      | 氨基酸 | 59 | Pantothenic acid             | 维生素 | 93  | Lactic acid                | 其他  |
| 26 | Histidine             | 氨基酸 | 60 | Pyridoxal                    | 维生素 | 94  | Malic acid                 | 其他  |
| 27 | Isoleucine            | 氨基酸 | 61 | Pyridoxine                   | 维生素 | 95  | O-Phosphoethanolamine      | 其他  |
| 28 | Kynurenine            | 氨基酸 | 62 | Riboflavin                   | 维生素 | 96  | Putrescine                 | 其他  |
| 29 | Leucine               | 氨基酸 | 63 | Tocopherol acetate           | 维生素 | 97  | Pyruvic acid               | 其他  |
| 30 | Lysine                | 氨基酸 | 64 | Adenine                      | 核苷酸 | 98  | Succinic acid              | 其他  |
| 31 | Methionine            | 氨基酸 | 65 | Adenosine                    | 核苷酸 | 99  | 3-OxoPrGSH                 | 其他  |
| 32 | Methionine sulfoxide  | 氨基酸 | 66 | Adenosine<br>monophosphate   | 核苷酸 | 100 | 3-OxoPrMCA                 | 其他  |
| 33 | N-Acetylaspartic acid | 氨基酸 | 67 | Cytidine                     | 核苷酸 | 101 | ACR-Cys                    | 其他  |
| 34 | N-Acetylcysteine      | 氨基酸 | 68 | Cytidine monophosphate       | 核苷酸 | 102 | ACR-Hcy                    | 其他  |

### 1.3 内标液的配制

称取内标物 2- 异丙基苹果酸适量，用纯水配制成浓度为 0.5 mmol/L 的工作溶液备用。

### 1.4 样品前处理方法

取 500  $\mu$ L 发酵液初步离心 ( 室温, 3000 rpm, 1 min), 取 300  $\mu$ L 上清至进样小瓶中, 从中取 100  $\mu$ L 至另一离心管中加入 20  $\mu$ L 内标溶液, 加入 200  $\mu$ L 乙腈, 充分振匀, 室温 15000 rpm、15 min 再次离心。取 100  $\mu$ L 上清加入 900  $\mu$ L 超纯水充分振匀后再用超纯水稀释 10 倍, 上样分析。

■ 结果讨论

2.1 酵母菌上清液分析色谱图

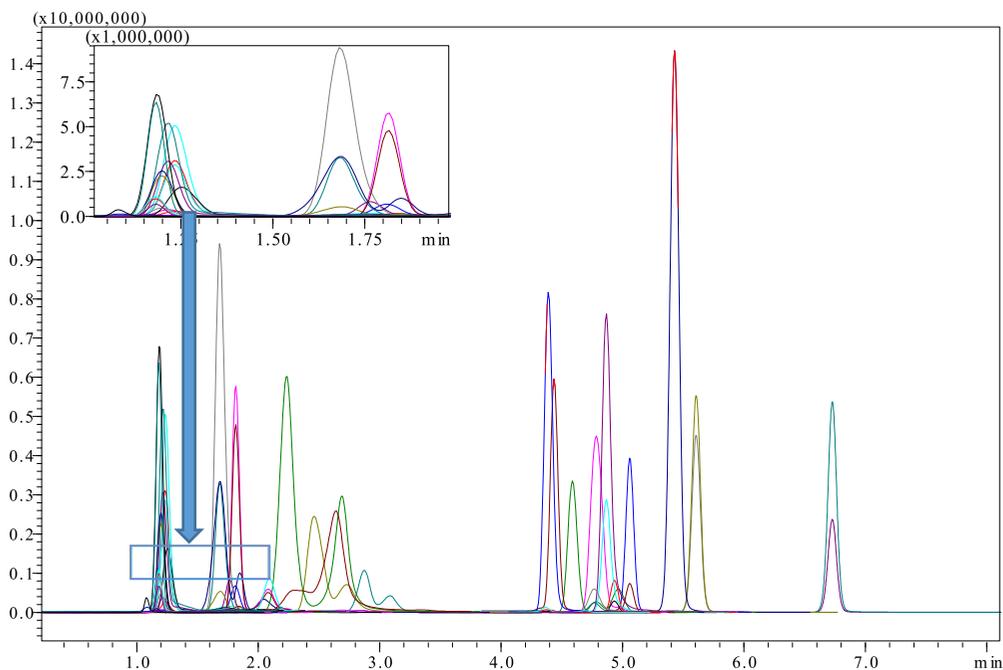
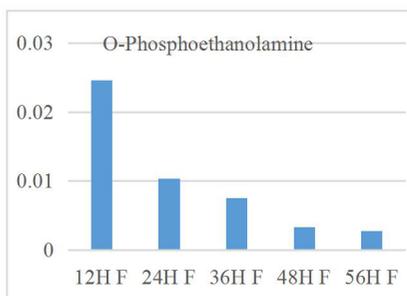


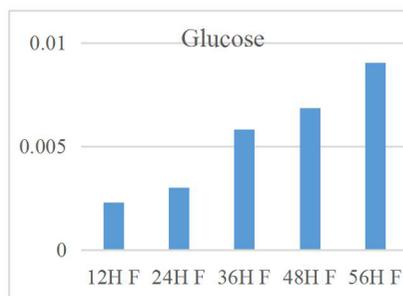
图1 酵母菌上清液（12 h）分析色谱图

2.2 酵母菌发酵液中部分组份含量变化趋势图

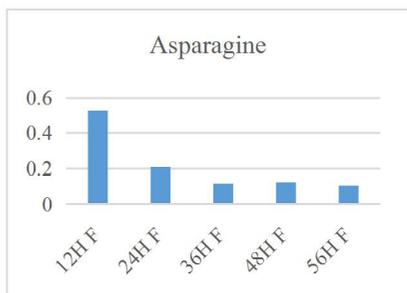
取酵母菌发酵液不同时间点的样品进行测定,以2-异丙基苹果酸为内标得到不同组份的面积比,以面积比做纵轴,时间点为横轴做曲线,得到不同时间点时酿酒酵母菌代谢物组份含量的变化趋势图如下所示:



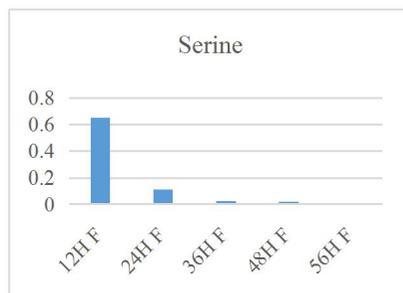
磷酸乙醇胺



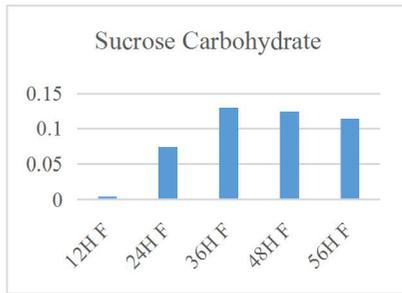
葡萄糖



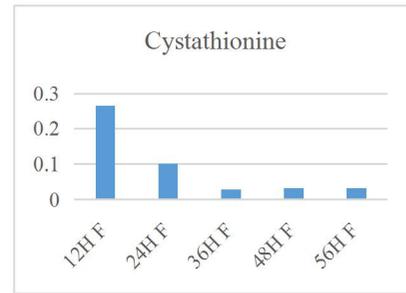
天冬酰胺



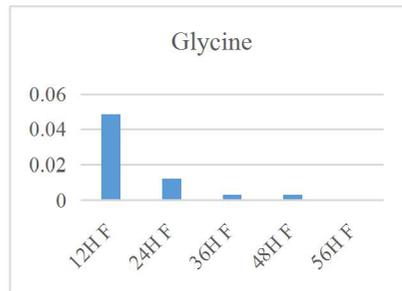
丝氨酸



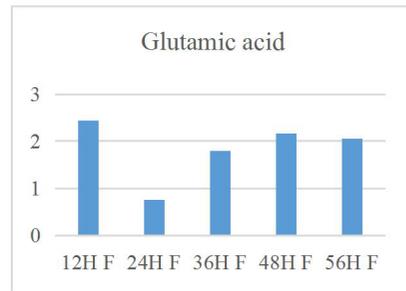
蔗糖碳水化合物



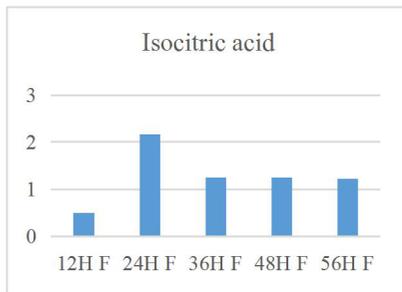
胱硫醚



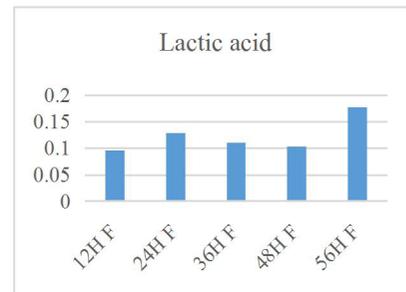
甘氨酸



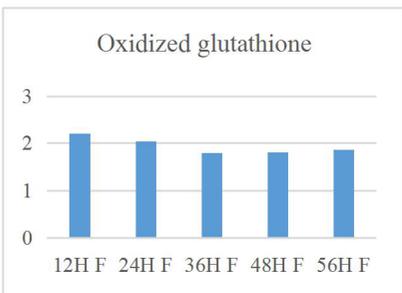
谷氨酸



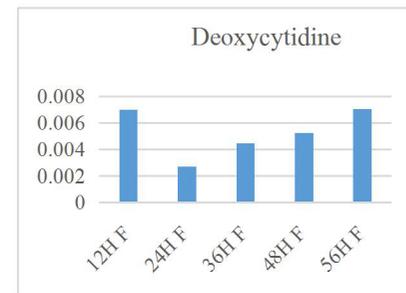
异柠檬酸



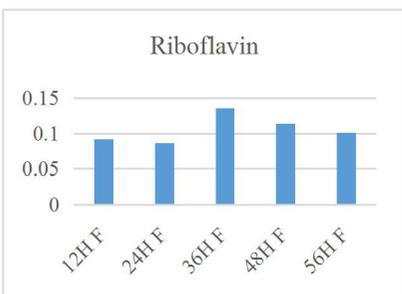
乳酸



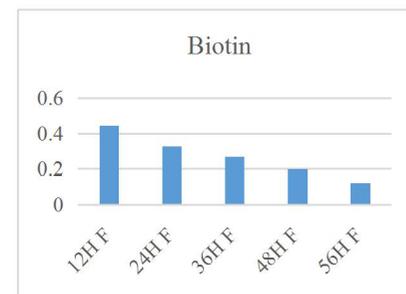
氧化型谷胱甘肽



去氧胞嘧啶核苷



维生素B2



生物素

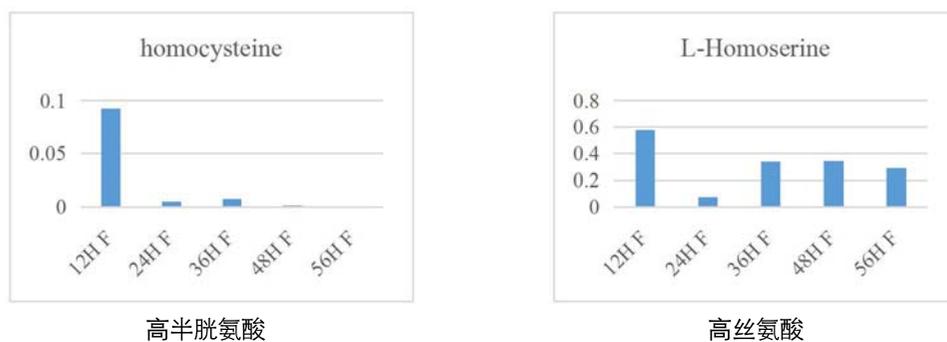


图5 发酵液组份含量变化趋势图

## ■ 结论

本文利用细胞培养基上清液分析方法包及超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 这种新型的技术为对于酒精发酵综合影响因素以及其生产工艺的研究可以进一步深入，为提高酒酿造品质提供依据。