

细胞培养基上清液方法包在小牛血清成份分析方面的应用

LCMSMS-339

摘要： 本文使用细胞培养基上清液分析方法包对不同批次的小牛血清成份进行了分析。利用方法包中的条件对小牛血清中的 101 种成份进行了分析，对用户提供的 5 份小牛血清样品按照方法包中的前处理方法进行前处理后，并且按方法包中的分析条件进行测定，包含内标在内共有 54 种组分被检出。该方法可以对不同批次的小牛血清进行成份分析，从而对商品化的小牛血清的质量监控提供可靠的参考依据。

关键词： 三重四极杆质谱 细胞培养基 上清液分析方法包 小牛血清

人工合成的培养基通常会加入动物血清，加入动物血清是为了给体外培养的细胞提供一个类似生物体内的环境，此外动物血清中也包含了一些动物的激素和酶，可以促进细胞的发育。血清是由血浆去除纤维蛋白而形成的一种很复杂的混合物，其组成成份虽大部分已知，但还有一部分尚不清楚，且血清组成及含量常随供血动

物的性别、年龄、生理条件和营养条件不同而异。血清中含有各种血浆蛋白、多肽、脂肪、碳水化合物、生长因子、激素、无机物等，这些物质对促进细胞生长或抑制生长活性是达到生理平衡的。通过该方法包可以对不同批次的小牛血清中的组分进行量化的监控，为培养产品的质量提供了有效的监控手段。

实验部分

1.1 仪器

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，DGL-20A₅ 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 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 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 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

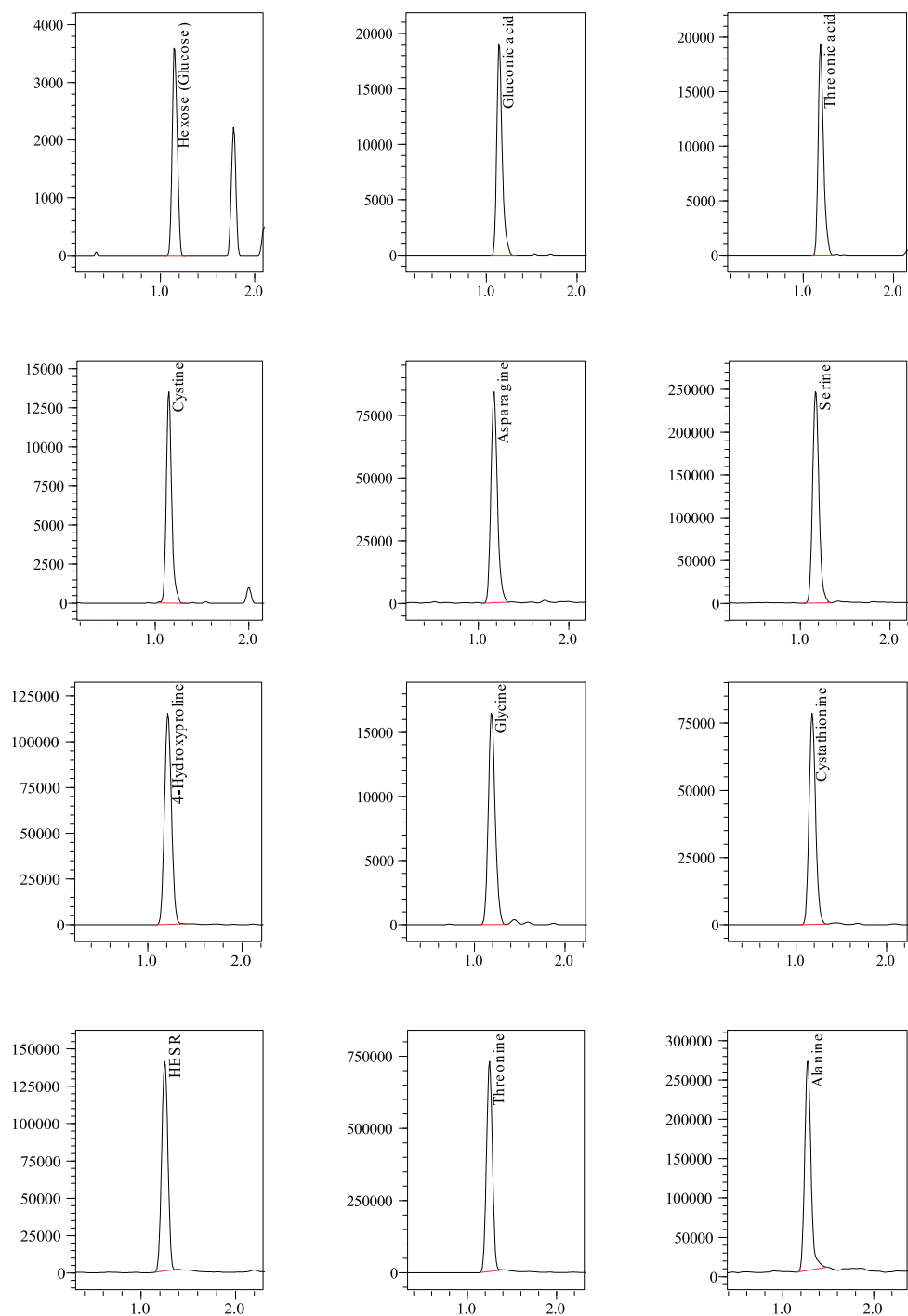
1.3 样品前处理方法

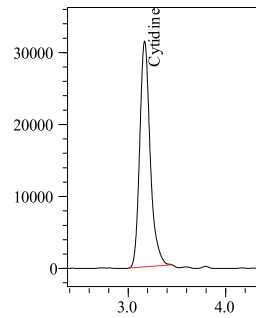
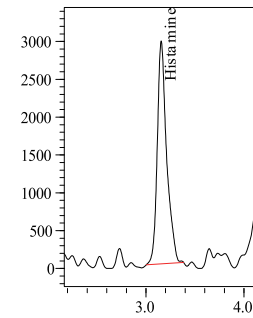
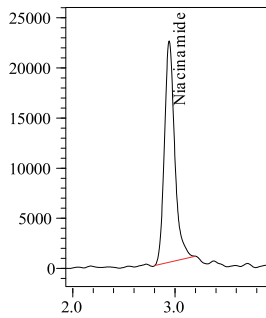
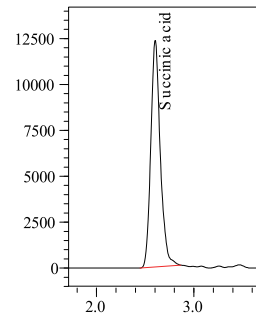
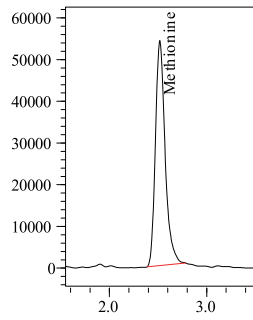
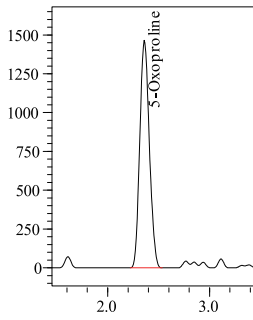
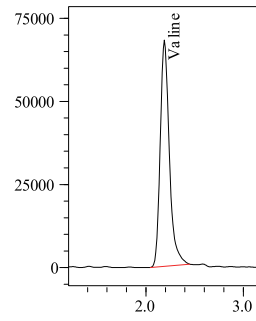
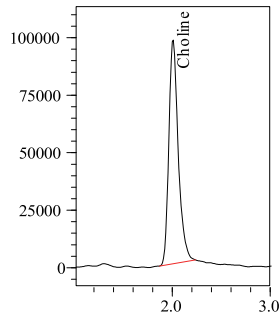
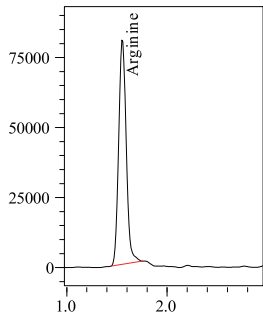
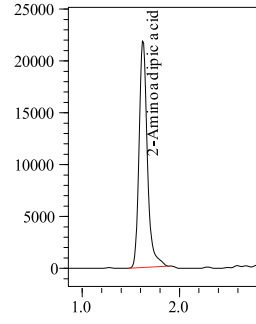
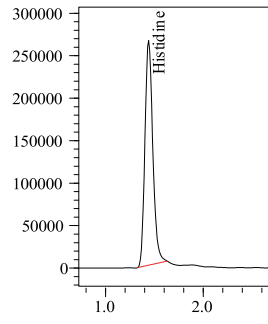
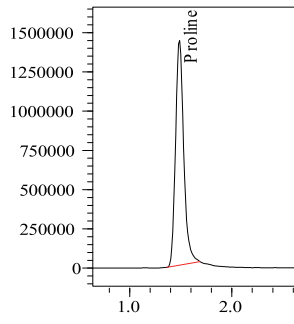
取 100 μL 小牛血清至离心管中加入 20 μL 内标溶液, 加入 200 μL 乙腈, 充分振匀室温 15000 rpm, 15 min 离心。取 100 μL 上清加入 900 μL 超纯水充分振匀后直接上样分析。

■ 结果与讨论

2.1 部分组份 MRM 色谱图

使用该方法包对 S-1、S-2、S-3、S-4、S-5 五个批次的小牛血清进行了分析，经分析，连同内标在内共有 54 种组份被检出，包含氮源、碳源、代谢产物以及微量元素等成份在内的部分检出的化合物的色谱图如下：





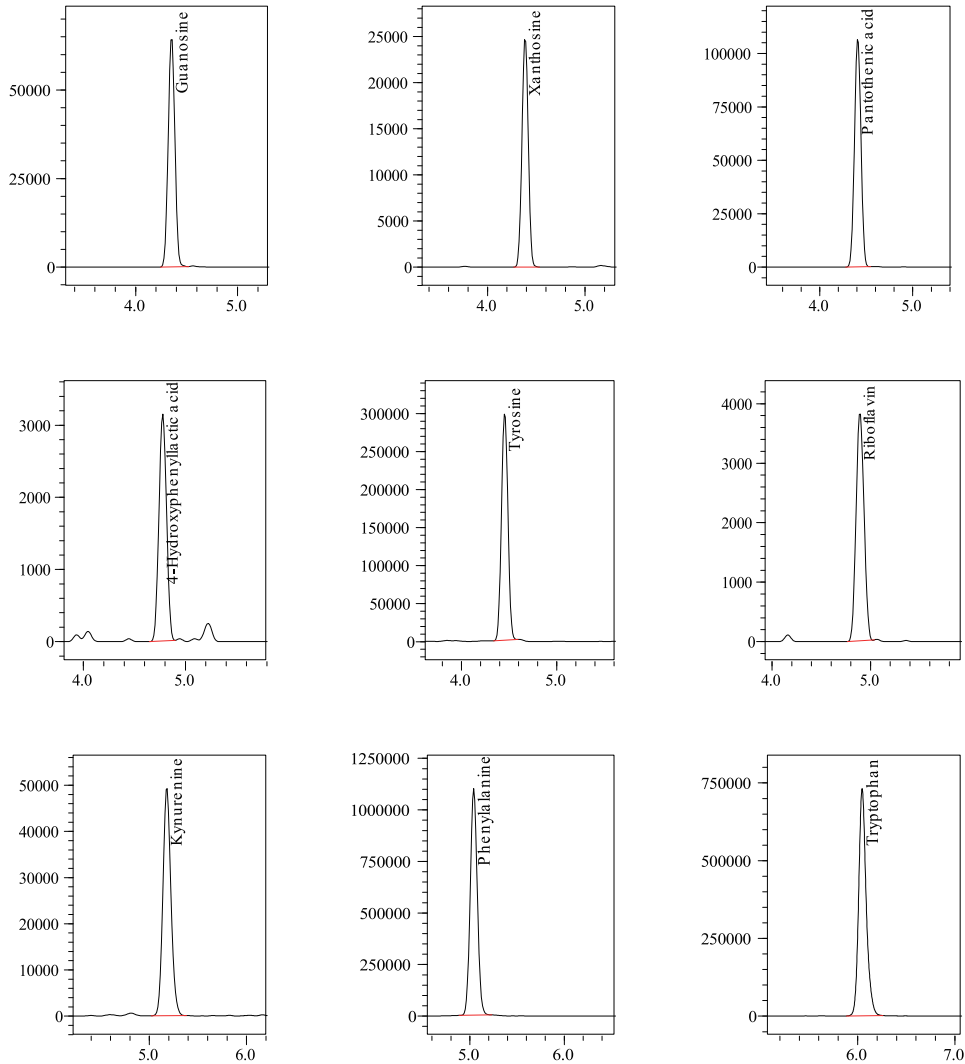
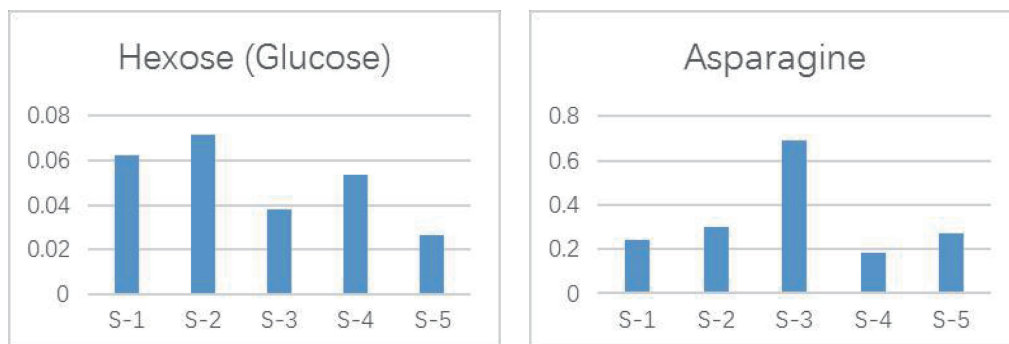


图1 部分检出化合物色谱图

2.2 不同批次小牛血清化合物对比图

对 5 个不同批次的小牛血清成份进行分析后，部分化合物的柱状对比图如下所示；由对比图可知不同批次的化合物在氨基酸，葡萄糖，代谢产物以及微量元素方面存在较大的差异。



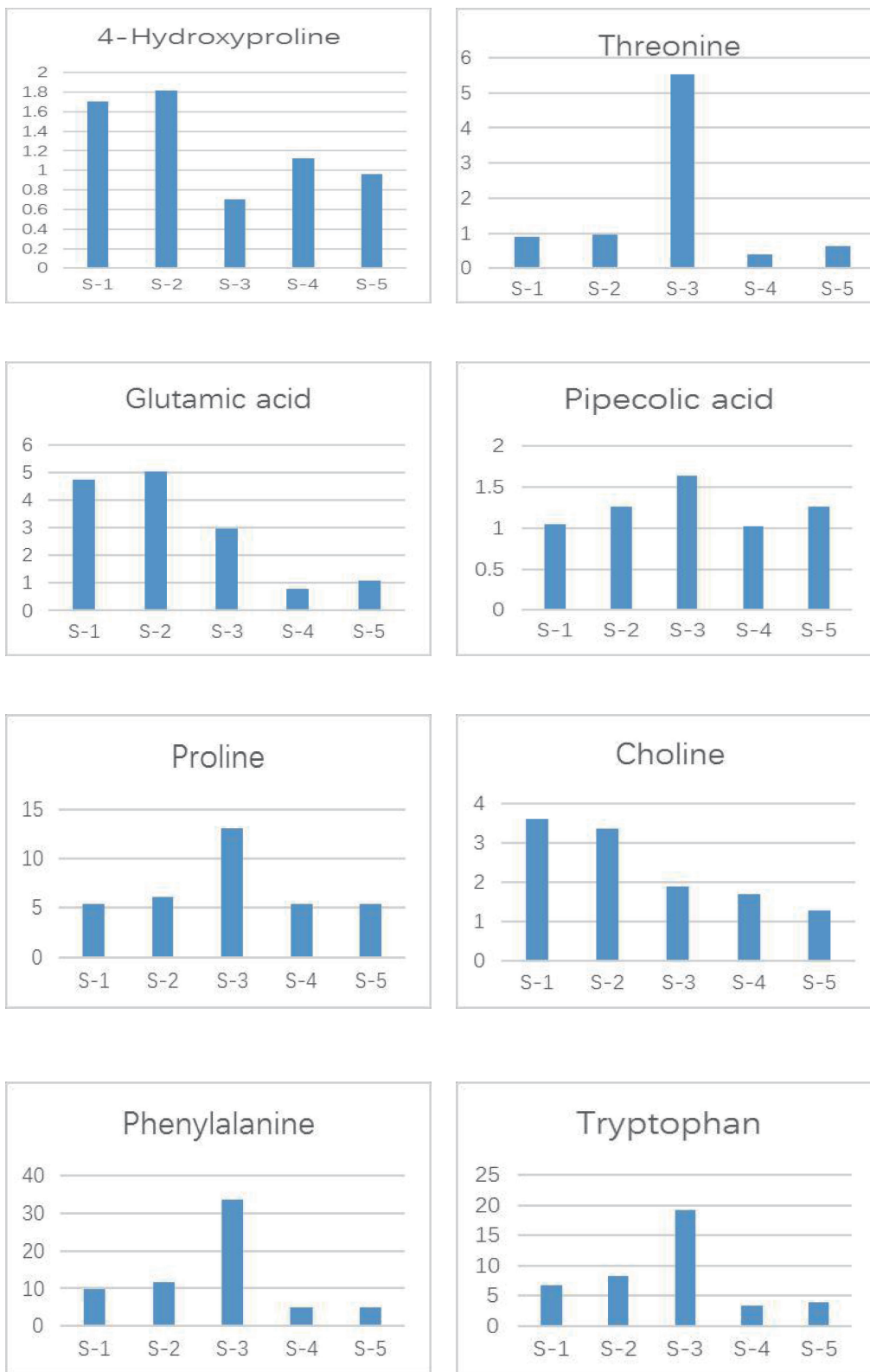


图2 部分检出化合物柱状对比图

■ 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 对商品化的 5 个不同批次的小牛血清进行了组份分析。使用该方法包共检出包含内标在内的 54 种组份，针对这些组分做了 5 个批次的柱状对比图，对比结果显示这五个不同批次的小牛血清在葡萄糖，氨基酸及微量元素等方面存在较大差异。该方法为相关从业人员提供了一种非常好的质量监控手段。