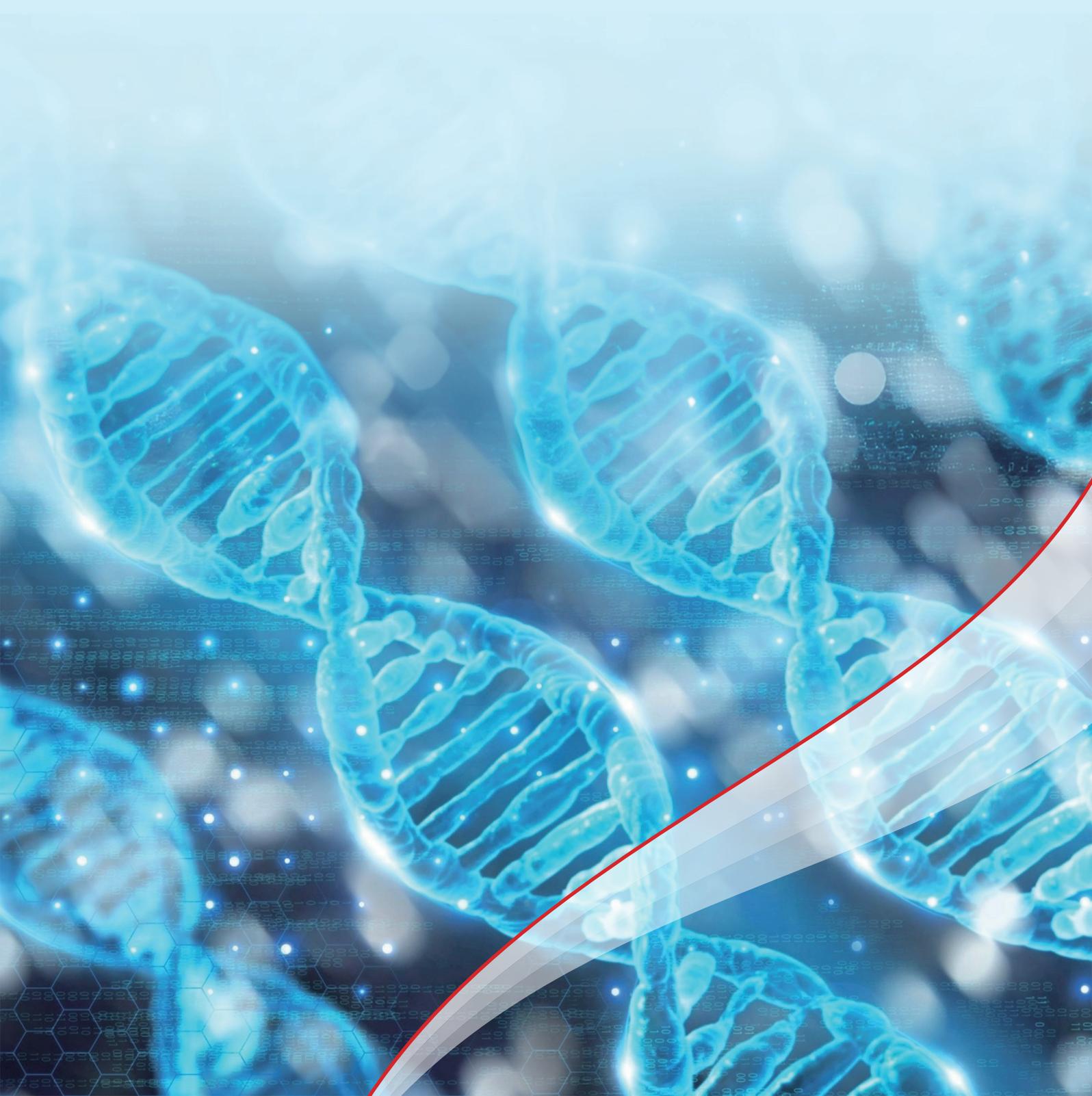


合成生物学应用分析指南



前言

合成生物学是一门融合生物学、工程学、化学、物理学和计算机等多学科知识与技术的前沿交叉学科，旨在通过设计和构建全新生物系统（如基因回路、代谢途径和细胞工厂）来实现特定目标的生物学功能。其核心思想是将生物学视为工程学科，通过标准化和模块化的生物元件（如基因、启动子、终止子和调控因子）进行精确组装，从而在细胞工厂中实现高效表达与生产。这一领域的发展不仅推动了基础科学的深入探索，还为解决药物生产、环境治理、能源开发、材料科学、食品安全及化妆品功效等人类面临的诸多挑战提供了全新技术路径，因此被誉为引领“第三次生物科技革命”的重要力量。

在合成生物学的研究与应用过程中，DBTL（设计-构建-测试-学习）工作流程作为一种系统化的研发模式，起到了加速技术从理论到实践转化的关键作用。首先，在设计阶段，研发人员通过计算模型和生物信息学工具，利用基因序列编辑、代谢网络重构等方法，设计出新的生物组件、回路或系统，为后续实验提供理论基础。进入构建阶段，设计方案通过 DNA 合成、克隆、转化和细胞培养等手段在实验室中实现，形成实际可操作的生物系统。紧接着，在测试阶段，通过菌株筛选、代谢物分析和产量评估等手段，验证系统的实际性能。这一阶段的数据为下一步的优化提供了科学依据。在学习阶段，基于测试结果，研究人员对系统进行反馈优化，不断提升其性能和稳定性，形成闭环反馈，从而实现持续改进。

合成生物学作为《“十四五”规划和 2035 年远景目标纲要》中明确支持的重点攻关领域，已成为我国推动科技创新和产业升级的重要方向。然而，目前这一领域仍面临着一系列技术瓶颈和挑战。首先，底盘细胞的设计和优化仍是其中的关键难题，现有微生物或细胞工厂的基因编辑、代谢调控技术存在局限，如何构建高效且稳定的底盘细胞仍需攻克。其次，代谢网络的重构与优化具有高度复杂性，多个代谢途径之间的相互作用使得代谢流的高效调控变得极具挑战性。此外，合成生物学的技术和产业链尚未完全成熟，科研平台和产业生态的完善仍是制约其大规模应用的瓶颈。

在此背景下，岛津作为全球知名的分析仪器制造商，充分发挥其在色谱质谱技术方面的优势，积极为合成生物学研究提供技术支持。自 1875 年成立以来，岛津始终秉承“以科学技术向社会做贡献”的宗旨，致力于提供领先的仪器设备和全面可靠的解决方案。在合成生物学领域，岛津推出了包括高通量菌株筛查、代谢物分析方法包套装以及痕量质谱分析技术在内的一系列创新应用。这些技术不仅能够帮助研究人员快速评估菌株的代谢产物，还能高效筛选出优质的菌株，促进合成生物学从基础研究到实际应用的快速转化，为推动合成生物学的发展提供了有力的技术保障。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

前 言.....	1
第 1 章 合成生物学简介.....	1
第 2 章 高通量菌株筛选.....	5
MALDI-TOF 用于高通量菌株筛查及母乳低聚糖分析示例.....	6
DPiMS 用于高通量菌株筛查及天然产物分析示例.....	9
第 3 章 发酵产物及杂质定量分析.....	11
使用氨基酸分析仪测定重组胶原蛋白中羟脯氨酸的含量.....	12
LC-MS/MS 法测定母乳低聚糖含量.....	17
LC-MS/MS 测定大肠杆菌发酵液中 3-羟基丙醛.....	22
高效液相色谱法测定紫杉醇含量.....	26
LCMSMS 检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留.....	30
LC-MS/MS 法定量分析发酵生产的寡糖中 IPTG 残留.....	34
第 4 章 底盘细胞代谢通路分析-胞内代谢物分析.....	38
全谱二维液相与 QTOF 联用定性分析微生物发酵液中生物农药.....	39
LC-MS/MS 测定微生物中初级代谢产物.....	46
使用 LC-MS/MS 同时分析 158 种脂质介质成分.....	52
GCMS 结合岛津代谢物数据库快速筛查冻干菌丝体中有机酸.....	55
GCMSMS 结合代谢物谱库分析芽胞杆菌代谢物.....	58
第 5 章 底盘细胞代谢通路分析-胞外代谢物 and 无机元素分析.....	63
第三代细胞培养分析方法包监控微生物发酵过程.....	64
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定链霉菌培养上清液中 95 种化合物.....	72
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定细菌培养上清液中 95 种化合物.....	78
LCMS-8050 监控融合蛋白药物生产过程中细胞培养上清液组分变化.....	83
超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定不同免疫细胞培养基组分差异.....	91
利用 ICPMS-2030 监控细胞培养上清液中无机元素含量变化.....	96

第 1 章 合成生物学简介

1. 合成生物学发展历史

合成生物学是一门基于工程化的设计理念，结合生物学、化学、医学、农学、工程学、计算机与数据科学等交叉学科技术，旨在改造或创造人造生命体系的新兴学科，在科技和产业创新两个层面均具备全面颠覆现有格局的潜力。合成生物学的发展主要经历了四个阶段：

创建时期（2000年-2003年）：本阶段产生了许多奠基性的研究手段和理论，特别是基因线路工程的建立及其在代谢工程中的成功运用。2003年，“合成生物学教父”Tom Knight教授开发BioBricks，使生物组件的标准化装配成为可能。应用开发上，2003年实现人工合成噬菌体基因组；同年，首次通过引入人工基因改造E.coli代谢途径，实现青蒿素前体生产。

扩张和发展期（2004年-2007年）：2004年举办“合成生物学1.0”大会，这是本领域第一个国际性会议。技术突破上，实现了RNA调控装置的开发，整个领域的设计范围开始从以转录调控为主，扩大到转录后和翻译调控；应用开发上，2006年首次实现利用工程化改造的E.coli侵入癌细胞，成为工程化活体疗法的先驱。

创新和应用转化期（2008年-2013年）：这一阶段涌现出大量新技术和工程手段，使合成生物学研究与应用领域大为拓展。例如，技术上，开发MAGE、TALEN、CRISPR/Cas技术用于基因/基因组编辑，开启基因改造新纪元；细胞工厂开发上，在E.coli中先后实现支链醇、生物柴油、1,4-丁二醇和生物汽油等多种产品生产。

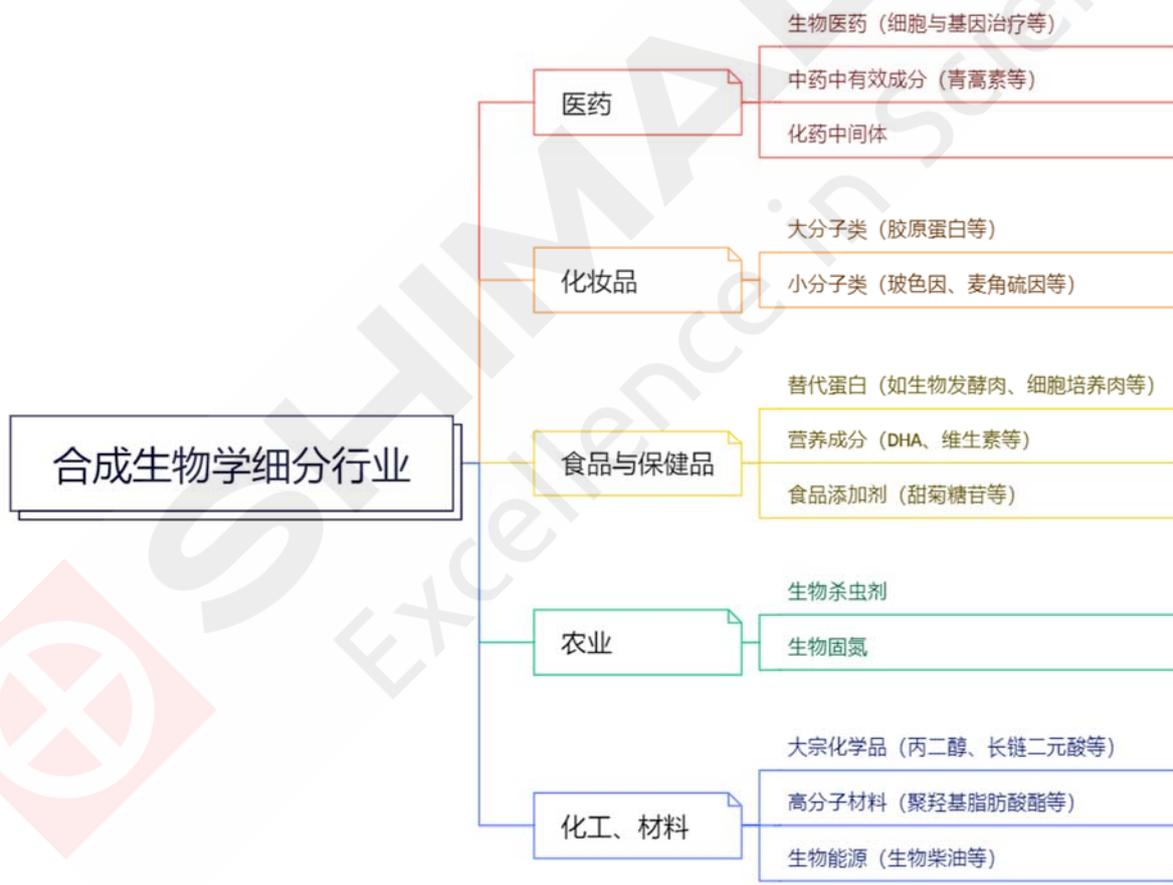
发展新阶段（2014年以后）：工程化平台的建设和生物大数据的开源应用相结合，全面推动合成生物学技术创新以及相关应用的开发和商业化。部分代表性技术包括人工密码子及非天然氨基酸系统的开发、计算AI蛋白结构设计及预测、DNA存储等。

创建时期 (2000年-2003年)	扩张和发展期 (2004年-2007年)	创新和应用转化期 (2008年-2013年)	发展新阶段 (2014年以后)
<ul style="list-style-type: none">• 本阶段产生了许多奠基性的研究手段和理论• 2003年，“合成生物学教父”Tom Knight教授开发BioBricks• 2003年，首次通过引入人工基因改造E.coli代谢途径，实现青蒿素前体生产。	<ul style="list-style-type: none">• 2004年举办“合成生物学1.0”大会，这是本领域第一个国际性会议。• 技术突破上，实现了RNA调控装置的开发• 2006年首次实现利用工程化改造的E.coli侵入癌细胞，成为工程化活体疗法的先驱。	<ul style="list-style-type: none">• 这一阶段涌现出大量新技术和工程手段，开启基因改造新纪元；• 细胞工厂开发上，在E.coli中先后实现支链醇、生物柴油、1,4-丁二醇和生物汽油等多种产品生产。	<ul style="list-style-type: none">• 工程化平台的建设和生物大数据的开源应用相结合；• 代表性技术包括人工密码子及非天然氨基酸系统的开发、计算AI蛋白结构设计及预测、DNA存储等。

2. 合成生物学细分行业

合成生物学作为一个跨学科领域，其应用范围极为广泛，涵盖了生物医药、化妆品、食品、医药、农业、化工等多个行业，并不断向更多领域扩展。

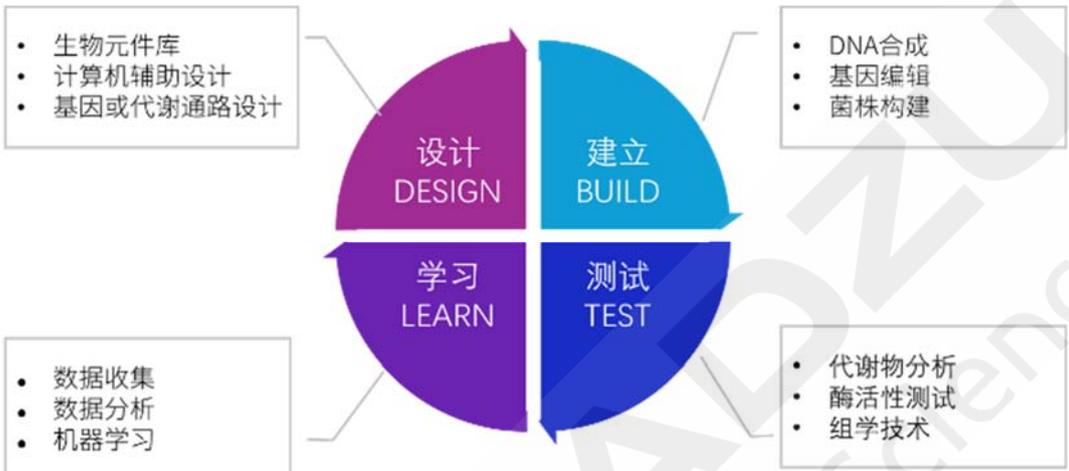
在生物医药行业，合成生物学被用于基因疗法、疫苗开发、细胞治疗和诊断工具的设计，推动个性化医疗和精准治疗的发展，如基于 CRISPR 技术的基因编辑工具可用于治疗遗传性疾病，如 mRNA 疫苗、CAR-T 细胞疗法；在化妆品行业，通过合成生物学实现从石油基到生物基原料的转变，生产高效且环保的活性成分，如玻尿酸、胶原蛋白、多肽、麦角硫因等，满足消费者对天然和可持续产品的需求；在食品和保健品领域，合成生物学技术用于开发替代蛋白和功能性食品添加剂，如生物发酵肉、DHA、HMO、甜味剂赤藓糖醇和阿洛酮糖等，以及改良作物基因以提高产量和抗逆性，同时促进食品安全和营养优化；医药行业中，正由传统的植物提取、化学法和发酵法，向更高效、更清洁的酶法工艺和细胞工厂过渡，其生产成本低及环境友好，可打破传统生产路线的桎梏、合成结构更复杂的高活性分子，如抗癌药物紫杉醇、抗疟疾药物青蒿素及抗生素、激素等药物中间体；农业方面，借助基因编辑和微生物工程实现作物增产、病虫害防治及土壤修复，为全球粮食安全提供支持，如利用基因编辑技术开发抗除草剂大豆和抗病毒番茄、通过改造根瘤菌增强氮固定能力，减少化肥使用量；在化工领域，合成生物学推动了生物燃料、生物基化学品以及绿色制造工艺的进步，减少对化石资源的依赖。



3. 合成生物学关键技术

在合成生物学研究中，DBTL (Design-Build-Test-Learn) 循环作为核心方法，其高效实施依赖于先进分析工具的系统性应用，这些工具为生物系统的构建、表征和优化提供了关键的技术支撑。

在 Design 阶段，研究人员利用生物信息学软件和 AI 模型进行基因线路或代谢通路设计，并依赖数据库和云计算平台进行模拟分析。Build 阶段则通过 DNA 合成仪、基因编辑工具和自动化工作站实现高通量基因组装与菌株构建。进入 Test 阶段后，分析仪器扮演着关键角色，用于高效表征、测试和优化生物系统。如 qPCR 和 NGS 测序验证基因表达，质谱和 HPLC 分析蛋白质与代谢物，流式细胞仪和共聚焦显微镜观测单细胞行为，而微流控芯片和酶标仪则支持高通量表型筛选。最终的 Learn 阶段通过数据整合工具和 AI 建模优化下一轮设计，并借助新兴技术（如单细胞多组学、纳米孔实时测序）提升分辨率与效率。



其中在 Test 阶段，色谱和质谱技术是代谢组学、蛋白质组学和代谢途径优化的核心分析手段，这些技术通过提供高灵敏度、高分辨率的检测能力，使研究人员能够深入解析工程菌株或细胞工厂的复杂生物分子网络。在代谢组学研究中，色谱-质谱联用技术可系统性地同时鉴定和定量细胞内数百种代谢物（如氨基酸、有机酸、核苷酸等），揭示代谢物的动态变化，为代谢途径的理性设计和动态调控提供数据支持；在蛋白质组学研究中，这些分析技术不仅能够实现关键酶类的精确定量分析和翻译后修饰位点的精准鉴定（如磷酸化、糖基化等），更可系统解析蛋白质相互作用网络及其动态调控机制，为合成生物学元件的功能验证和优化提供分子层面的关键依据；而在代谢途径优化方面，通过实时监测目标化合物（如关键次级代谢物、代谢终产物）的合成效率及其副产物积累情况，可快速识别途径瓶颈并指导下一轮基因改造。当前，前沿分析技术正朝着更高分辨率和更快分析速度的方向发展。例如，高分辨率质谱（如飞行时间质谱 TOF）可提升非靶向代谢物的定性分析能力，而实时直接分析技术（如 MALDI、DPiMS）则无需色谱分离即可实现快速筛查，极大地提高了分析通量。

合成生物学相关
色谱质谱分析项目



第 2 章 高通量菌株筛选

微生物菌株改造是合成生物学的核心技术之一，通过对微生物底盘细胞的基因组进行优化设计和精确调控，可以赋予其全新的生物学功能，使其成为生产生物基产品的高效工厂。这种改造能够实现复杂代谢途径的重构，从而高效合成药物、化工材料、生物燃料等多种高附加值产品，显著降低传统化工工艺对环境的影响。此外，微生物菌株改造在环境治理领域也具有重要意义，例如通过设计特定菌株分解污染物或捕获二氧化碳，助力解决全球气候变化等重大环境问题。因此，微生物菌株的改造不仅推动了生物制造领域的技术革新，也为实现绿色可持续发展提供了重要支撑。

尽管微生物菌株改造在合成生物学中的潜力巨大，其应用仍面临诸多技术挑战。首先，底盘细胞的遗传背景复杂，现有的生物元件和工具在不同菌株中存在适用性差异，导致设计的生物系统在实际构建中难以实现预期效果。其次，代谢网络的重构往往涉及多基因、多路径的协同调控，而非线性代谢流的优化仍是当前研究的难点。此外，工程化菌株的稳定性和环境适应性也是应用转化中的关键问题，特别是在大规模工业发酵中，菌株可能因突变或环境压力失去设计功能。

为了克服这些挑战并实现高效、精准和可控的微生物菌株改造，研究人员需要不断对进行尝试、优化和筛选。通过反复迭代实验，逐步调整和改进菌株的设计，才可能最终获得产率高、性能稳定的工程化菌株。高通量筛选技术在提高微生物改造效率和优化过程方面发挥着重要作用。通过高通量筛选，研究人员能够在短时间内评估大量菌株的代谢表现，筛选出性能最优的菌株，从而加速研究进展。质谱技术在这一过程中具有重要作用，质谱通过检测菌株代谢产物来判断菌株改造效果的好坏。除传统的 LCMS 技术外，岛津的 MALDI-TOF 质谱和 DPiMS 技术展现了显著的优势，在不依赖液相分离的情况下，能够快速分析大量微生物样本，极大地提高了筛选速度。其中 MALDI-TOF 系统还可配备自动点靶仪，能够实现自动化的样品上样和分析，极大提升了操作效率和实验的高通量能力。

MALDI-TOF 用于高通量菌株筛查及母乳低聚糖分析示例

1. MALDI-TOF原理

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)，因2002年日本岛津的田中耕一先生“开发了用于生物大分子质谱分析的软解吸电离方法”获得诺贝尔化学奖而首次广泛地走进公众视野。

MALDI的原理是基于激光诱导撞击解离离子的方法，通过激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜，基质从激光中吸收的能量并传递给目标分子，使其得到或失去质子而电离。这种电离过程几乎不产生碎片或分解，因此特别适用于混合物或不稳定分子的质量分析。TOF的原理是离子在电场作用下加速飞过飞行管道，根据到达检测器的飞行时间不同而被检测。离子的质荷比 (m/z) 与离子的飞行时间成正比，从而测定离子的质量。这种技术具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点。

2. MALDI-TOF在高通量菌株筛查中的优势

2.1 操作简便快速

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 以其高度简化的操作流程和极快的分析速度，成为现代生物分析领域的理想选择。在实际应用中，用户仅需将微量样品与特定基质混合后点样至靶板，经过短暂干燥后，即可将靶板放入仪器中进行检测，如图1所示。整个过程从样品准备到质谱图采集通常只需几秒至几十秒，极大地提高了实验效率。对于高通量菌株筛查，这种快速响应能力尤为关键。

为了进一步提升自动化水平、降低人力成本并减少人为误差，岛津与华大吉比爱公司合作开发了一款自动点靶仪，如图2所示。该设备利用先进的机械臂技术，能够精确、高效地完成样品和基质的点样工作，实验人员仅需将靶板放置于仪器中即可启动分析。这一创新不仅显著提升了工作效率，还确保了实验结果的高度一致性和可重复性，为大规模样本分析提供了强有力的支持。



图1. MALDI-TOF进样过程



图2. 自动点靶仪

2.2 质谱图简单，适合混合物分析

MALDI-TOF MS所获得的质谱图主要以单电荷形式存在，一级质谱中的碎片峰较少，这使得谱图解析变得相对简单，极大地方便了数据分析。尤其在处理复杂混合物时，MALDI-TOF MS的表现尤为突出。由于其能够清晰地区分不同分子的质荷比 (m/z)，因此非常适合用于分析合成生物学菌株中的多种代谢物。

2.3 质量范围广

MALDI-TOF MS的质荷比 (m/z) 测量范围广泛，涵盖了从1 Da到1500 kDa的分子量区间。这意味着该

技术不仅可以用于小分子代谢物的分析，还能对生物大分子如蛋白质、核酸等进行测定。

2.4 灵敏度高

所需样品量较少，一次分析仅需0.5~1 μL，且浓度可低至amol级，这对于体积小、浓度低的样品尤为重要。

3. 岛津在售MALDI-TOF仪器型号

岛津目前拥有的MALDI-TOF质谱仪包括台式型号MALDI-8020 Easycare和MALDI-8030 Easycare，以及落地式AXIMA系列的Assurance、Confidence和Performance。各型号在性能、功能和应用领域上各有特色，满足不同实验室的需求。

台式MALDI-TOF质谱仪体积小，通常可以放置在标准实验台上，节省了实验室的空间。尽管体积缩小，但台式MALDI-TOF质谱仪依旧保持高性能，配备200 Hz的MALDI激光频率，能够实现快速且高效的质谱数据采集，显著提升了分析通量和实验效率。最新款的MALDI-8030 Easycare不仅支持传统的线性正模式分析，还引入了负模式分析功能，这一改进极大地拓宽了分析范围。此外，在正模式分析中，某些样品容易产生加钠峰，这可能会对分析结果造成干扰，影响谱图解析的准确性。而负模式分析则有效规避了这些干扰，提供了更为简洁和清晰的谱图，特别适用于那些在正模式下难以解析或易受干扰的化合物。

落地式AXIMA系列拥有384个靶板孔位，显著提高了样品处理的通量，且配备较大尺寸的飞行时间管（TOF），提供了更高的质量分辨率，增强了对复杂样品的解析能力。AXIMA Confidence还支持反射模式，通过延长离子飞行路径，进一步提升了分辨率，使得复杂样品中的细微差异得以清晰区分。AXIMA Performance是AXIMA系列中的旗舰型号，配备了碰撞诱导解离（CID）和双飞行时间管（Dual TOF）技术。这使得该仪器不仅能够在一二级质谱中提供高分辨率的分析结果，还能进行二级碎片筛选，为复杂的生物大分子（如蛋白质和核酸）提供更深入的结构信息。



	MALDI-8020 Easycare	MALDI-8030 Easycare	AXIMA Assurance	AXIMA Confidence	AXIMA Performance
快速 MS	●	●			
线性	●	●	●	●	●
线性负离子		●	●	●	●
反射				●	●
CID-MSMS					●

图3. MALDI-TOF仪器型号及特点

4. MALDI-TOF用于微生物发酵产物母乳低聚糖快速分析

母乳低聚糖（HMOs, Human Milk Oligosaccharides）是母乳中仅次于乳糖和脂肪的第三大固体成分，具有多种重要的生物学功能。它们不仅为婴儿肠道内的有益菌群提供营养，促进双歧杆菌等有益菌的增殖，还能通过与病原体竞争结合位点，有效阻止病原菌的黏附和感染，从而增强婴儿的免疫系统。

然而，由于母乳低聚糖的复杂结构和多样性，传统的提取方法难以大规模生产，且成本高昂。近年来，随着合成生物学技术的发展，科学家们开始利用微生物发酵等手段，通过基因编辑和代谢工程，构建能够高效合成特定HMOs的微生物细胞工厂。这种方法不仅能够大幅降低生产成本，还能精确控制HMOs的种类和纯度，满足不同应用场景的需求。

采用MALDI-TOF质谱仪对微生物发酵产生的母乳低聚糖进行了分析，所得质谱图如图4所示。从图中可以清晰地观察到多个特征离子峰，如 m/z 730.4、274.4和177.1等。根据理论目标产物和中间代谢物的分子量信息，推断 m/z 730.4对应的离子可能是母乳低聚糖的主要成分之一，274.4和177.1等较小离子可能是微生物在发酵过程中产生的中间代谢产物。根据MALDI-TOF采集得到的质谱图，与理论目标产物及中间代谢物的分子量进行了对比分析，可以评估菌株的合成效率并验证基因工程改造的效果。通过这种比较，不仅可以确认目标低聚糖的生成情况，还可以监测关键中间代谢物的存在和含量变化。这有助于全面了解菌株的代谢途径优化程度，从而为后续的菌株筛选和进一步改造提供科学依据。

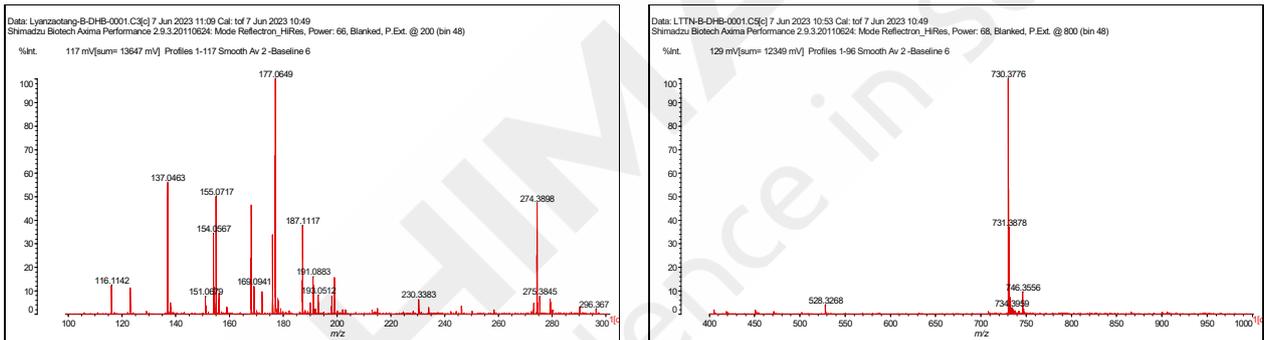


图4. MALDI-TOF采集母乳低聚糖样品质谱图

DPiMS 用于高通量菌株筛查及天然产物分析示例

1. DPiMS介绍

探针电喷雾离子化(Probe Electro Spray Ionization, PESI)技术是日本山梨大学平冈教授于2007年提出的一种面向未来的新型质谱分析方法。PESI是一种用于质谱分析的软电离技术，它结合了电喷雾离子化的高电离效率和微探针技术的优点，能够在不进行复杂的样品预处理的情况下，直接从固体、液体或凝胶样品表面提取并离子化目标分子，特别适用于复杂样品的直接分析。



图1. DPiMS操作及离子化过程

基于PESI技术原理，岛津推出了3款原位探针电喷雾离子源DPiMS(Direct Probe Ionization Mass Spectrometer)，为DPiMS-2020、DPiMS-8060、DPiMS-QT，分别搭载岛津单四极杆质谱分析仪LCMS-2020、三重四极杆质谱仪LCMS-8060/LCMS-8050/LCMS-8045和飞行时间高分辨质谱仪LCMS-9050/LCMS-9030使用，如图2所示。DPiMS系列仪器可在无需样品制备和液相分离的情况下，通过精密的探针取样式设计抽取微量样品并施加高电压进行电离，注入MS单元，进行质谱检测，实现快速便捷的样品分析。



图2. DPiMS-2020(左)、配有DPiMS-8060的LCMS-8060(中)、配有DPiMS-QT的LCMS-9050(右)仪器图

2. DPiMS在高通量菌株筛查中的优势

2.1 分析速度快，可实现高通量筛选

DPiMS的一个显著优势是其极快的分析速度。由于DPiMS前端未使用液相分离技术，样品分析时间大幅缩短，通常只需0.3-3 min即可完成一个样品多组分的同时检测。这一特性使得DPiMS非常适合用于高通量菌株筛查，尤其是在需要快速评估大量菌株代谢产物的情况下。

2.2 灵敏度高，适合痕量样品分析

DPiMS采用高电压针尖离子化技术，离子化效率高，即使在没有液相分离的情况下，依然能够保持较高的分析灵敏度。这使得DPiMS适合用于痕量样品的分析。对于低产量的天然产物或稀有代谢物的筛选，DPiMS的优势尤为明显。

2.3 特异性强，可多组分样品的同时分析

DPiMS离子化后的代谢产物进入质谱仪后，根据代谢物质量数的不同进行筛选，从而对化合物进行快速的定性定量分析。此过程特异性强，可同时进行多个代谢物组分的同时分析。

3. DPiMS用于天然产物花色苷色素快速筛查示例

许多天然产物因其独特的化学结构和显著的药理活性，在医药领域具有重要的应用价值。例如，黄花蒿 (*Artemisia annua*) 中提取的青蒿素是治疗疟疾的关键药物，而红豆杉树皮 (*Taxus brevifolia*) 中提取的紫杉醇则是一种高效的抗癌药物。然而，传统的提取方法依赖于植物或动物资源，存在产量有限、生产周期长、成本高昂以及环境影响大等问题，难以满足大规模临床需求。

通过合成生物学技术，研究人员能够将天然产物的生物合成基因簇引入易于培养和工程化的宿主细胞（如大肠杆菌和酿酒酵母）中，并对宿主细胞进行代谢工程改造，以优化目标化合物的合成途径。这一策略不仅能够显著提高天然产物的生产效率，还能降低生产成本，减少对自然资源的依赖，促进可持续发展。

本章节采用DPiMS测定天然产物花色苷色素，花色苷是花色苷与糖以糖苷键结合而成的一类化合物，广泛存在于植物的花、果实、茎、叶和根器官的细胞液中，使其呈现由红、紫红到兰等不同颜色。花色苷是类黄酮——以黄酮核为基础的一类物质，应用于清除体内自由基、增殖叶黄素、抗肿瘤、抗癌、抗炎、抑制脂质过氧化和血小板凝集、预防糖尿病、减肥、保护视力等。

图3中左图为花色苷色素的结构式及其分子量信息，右图为通过DPiMS-8060和LCMS-8060联用采集得到的花色苷质谱图。从质谱图中可以清晰地观察到花色苷的特征离子分别为449.1（前体离子）和287.0（碎片离子）。这些特征离子为花色苷的定性定量分析提供了可靠的依据。

通过检测和确认这些特征离子的存在，可以准确判断样品中是否含有花色苷。进一步地，基于特征离子的信号强度，可以对花色苷进行定量分析，从而评估其含量。这一方法能够精确测定花色苷的浓度，用于评估菌株改造后的花色苷生产能力，验证代谢工程策略的有效性。

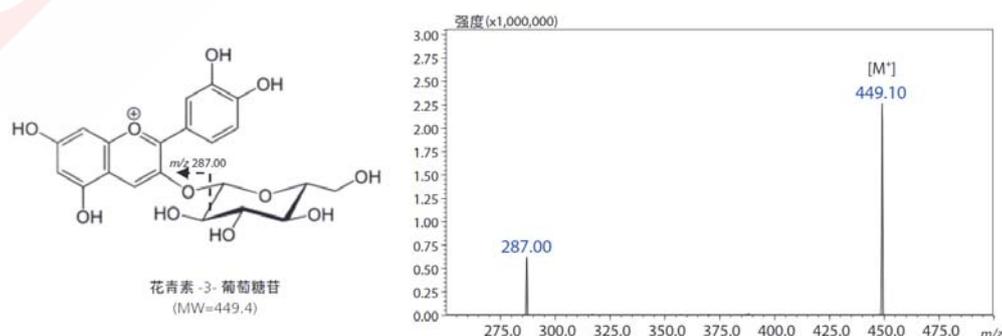


图3. 花色苷色素结构式及质谱图

第 3 章 发酵产物及杂质定量分析

合成生物学产物的一个显著特点是基质的复杂性，如样品中含有大量的蛋白、核酸、脂质、多糖等大分子以及各种小分子代谢物。这些代谢物具有不同的化学性质和浓度范围，这会产生很强的基质效应，影响目标化合物的回收率、灵敏度或选择性，因此需要选择合适的分析方法对产物进行定量分析。

此外，在合成生物学产物的生产过程中，杂质的引入也是一个不可避免的问题。比如，为了保证菌株在发酵时处于良好的生长状态，通常会在发酵液中添加抗生素、抑菌剂等物质；为了提高蛋白表达效率，可能会添加活性诱导物质，如 IPTG。这些杂质的存在会影响产物的质量，进而影响其在实际应用中的性能，所以需要测定杂质的残留量，但值得注意的是，这些杂质的含量往往非常低，难以通过传统方法进行准确测定。

将色谱分离和质谱检测结合，能够有效解决这些问题。色谱的高效分离能力能够将样品中的各类物质进行分离，而质谱的高灵敏度和抗干扰能力则确保了对低浓度目标产物的准确检测，即使在含有复杂背景物质的样品中，质谱也能提供准确的定量结果。具体来说，液相色谱（LC）或气相色谱（GC）可以根据不同化合物的化学性质将其分离，减少基质效应的干扰。随后，质谱（MS）通过精确的质量分析和碎片离子检测，能够识别并定量目标化合物，即便是痕量级别的杂质也能够被检测到。此外，质谱技术还可以通过选择反应监测（SRM）或多反应监测（MRM）模式进一步提高选择性和灵敏度，确保对目标化合物的特异性检测。这种联用技术不仅适用于合成生物学产物的定性和定量分析，还能够在工艺优化、质量控制和安全性评估等方面发挥重要作用，为合成生物学的研究和产业化提供了强有力的技术支持。

使用氨基酸分析仪测定重组胶原蛋白中羟脯氨酸的含量

摘要：本文参考 YY/T 1453-2016《组织工程医疗器械产品 I 型胶原蛋白表征方法》的相关条件和要求，采用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了一种自动柱后衍生高效液相色谱法测定胶原蛋白中羟脯氨酸含量的分析方法。实验结果表明：羟脯氨酸在 5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，线性相关系数大于 0.999，准确度在 98.9~101.2%之间。精密度实验中，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液保留时间 RSD%值为 0.15%，峰面积 RSD%值为 0.77%。该方法中茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，线性佳，分离效果好，可为胶原蛋白中羟脯氨酸的测定提供参考。

关键词：胶原蛋白 柱后衍生 羟脯氨酸 钠型

技术特点：

- ❖ LC-16AAA 氨基酸分析仪结合配套试剂包可以实现胶原蛋白水解液中羟脯氨酸的全自动柱后衍生，方便快捷，减少人为误差；
- ❖ 相较于柱前衍生方法，LC-16AAA 柱后衍生法基质干扰小。

胶原蛋白是机体中含量最丰富的结构蛋白，广泛存在于结缔组织中，具有维持组织形态、增强韧性和促进修复的功能。近年来，随着医学和功能性食品等领域的快速发展，胶原蛋白在抗衰老、组织修复等方面的应用不断增长，为满足市场对高质量胶原蛋白的需求，除传统天然提取工艺外，合成生物技术正逐步成为胶原蛋白生产的新途径。通过工程化微生物或细胞工厂合成胶原蛋白，该技术不仅能够实现来源可控、污染风险低等优势，还具备规模化和高效生产的能力，成为胶原蛋白制备的创新解决方案。

羟脯氨酸 (Hydroxyproline) 是胶原蛋白中特有的氨基酸，其含量是评价胶原蛋白纯度、来源和工

艺稳定性的重要指标。羟脯氨酸的定量检测为胶原蛋白在医用材料和食品保健领域的质量控制提供了科学依据，同时满足行业法规要求。通过精准测定羟脯氨酸含量，可验证产品质量、监控生产工艺，并为优化研发流程提供技术支持，对提升胶原蛋白产品的市场竞争力具有重要意义。

本实验依据 YY/T 1453-2016《组织工程医疗器械产品 I 型胶原蛋白表征方法》标准，采用高效液相色谱法 (HPLC) 对胶原蛋白水解液中羟脯氨酸进行定量分析。优化后的方法具有分离效果好、灵敏度高、重复性佳的特点，为胶原蛋白制品的研发与质量控制提供了可靠的技术手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A _{5R}
输液泵	: LC-16 \times 3	自动进样器	: SIL-16
柱温箱	: CTO-16L	高温反应箱	: CRB-40

鼓泡单元：DGU-10B

切换阀：FCV-11AL

检测器：SPD-16

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Amino-Na (100×6.0 mm I.D., 5µm)

(SGLC, P/N: S228-18837-91)

捕氨柱：Shim-pack ISC-30/S0504 Na (50×4.0 mm I.D.)

(SGLC, P/N: S228-14206-91)

流动相：钠型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C

衍生试剂：茚三酮溶液

流速：0.6 mL/min

衍生液流速：0.2 mL/min

柱温：60°C

衍生反应温度：130°C

进样体积：20 µL

检测波长：440 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度 0%，洗脱程序见表 1

表 1. 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
9.00	泵	B.Conc	0
13.00	泵	B.Conc	7
17.20	泵	B.Conc	8
17.21	泵	B.Conc	11
20.80	泵	B.Conc	11
20.81	泵	B.Conc	50
22.00	泵	B.Conc	58
22.01	泵	B.Conc	100
28.80	泵	SV(Pump A)	B
29.30	泵	B.Conc	100
29.31	泵	B.Conc	0
33.00	泵	SV(Pump A)	A
35.00	泵	Total Flow	0.6
36.50	泵	Total Flow	0.7
43.30	泵	Total Flow	0.7
44.00	泵	Total Flow	0.6
48.00	控制器	Stop	

注：SV(PumpA)表示 A 泵溶剂切换阀，“值”中选择 A 和 B 代表不同的流动相。

1.3 标准品溶液与试样的制备

羟脯氨酸标准储备液：准确称取羟脯氨酸标准品 1 mg，用流动相 A 溶解并定容至 1 mL，配制浓度为 1000 µg/mL 标准储备液。

羟脯氨酸标准溶液：取适量羟脯氨酸标准储备液，用流动相 A 逐级稀释为 5、10、20、50 和 100 µg/mL 的系列标准溶液。

样品制备：精密称定 SL403 样品 1 mg，至水解管中，加入 6mol/L 盐酸溶液（含 1.0%苯酚）1 mL，

密封，于 105°C 条件下水解 24 小时，氮气挥干；随后在样品水解管中加入 2 mL 流动相 A 溶解样品，振荡混匀后，吸取溶液通过 0.22 μm 水系过滤器后，转移至仪器进样瓶中，供测定用。

2. 结果与讨论

2.1 标准品色谱图

标准品溶液图谱见图 1，结果显示，羟脯氨酸峰形正常，未出现干扰峰，说明在本实验条件下专属性良好。

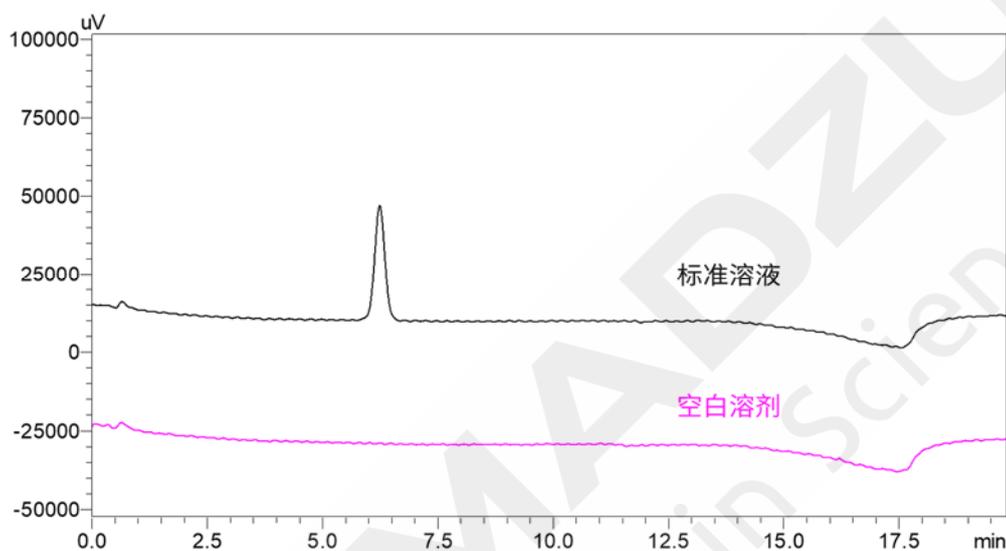


图 1. 羟脯氨酸标准溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和空白溶剂图谱

2.2 线性

取系列浓度标准品溶液进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立线性校准曲线，校准曲线如图 2 所示。结果显示，羟脯氨酸在 5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，线性相关系数大于 0.999，准确度在 98.9~101.2% 之间。

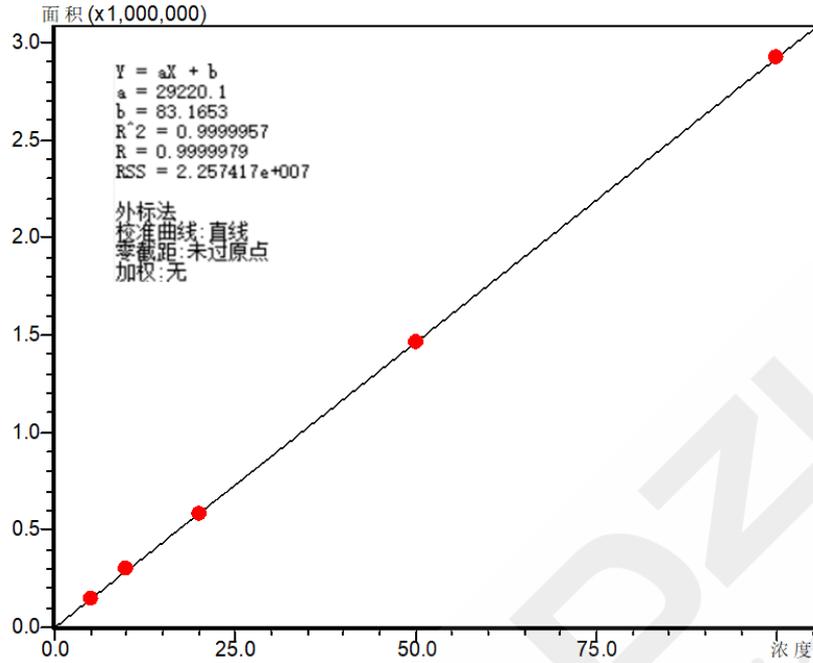


图 2. 羟脯氨酸校准曲线

2.3 精密度分析

对 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液连续进样 6 次, 考察仪器的精密度, 重叠色谱图如图 3 所示; 其中保留时间 RSD 值为 0.15%, 峰面积 RSD 值为 0.77%, 仪器精密度良好。

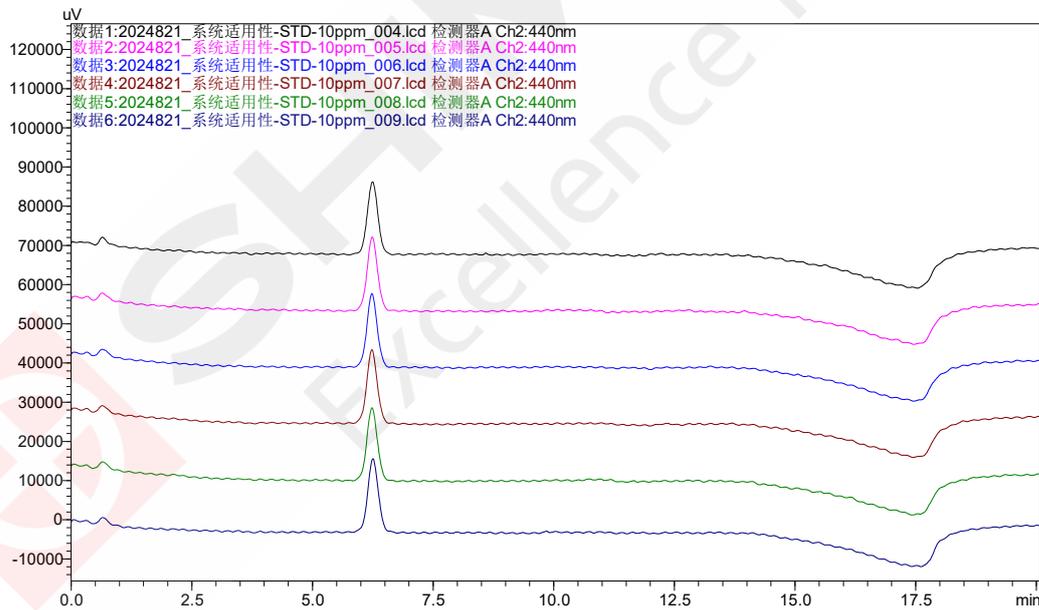


图 3. 标准溶液重叠色谱图 (n=6)

2.4 样品分析结果及回收率考察

取样品 SL403 按 1.3 节处理, 进样分析; 向该样品中添加 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羟脯氨酸标准溶液, 进行回收率实验, 结果如图 4 和表 2 所示。

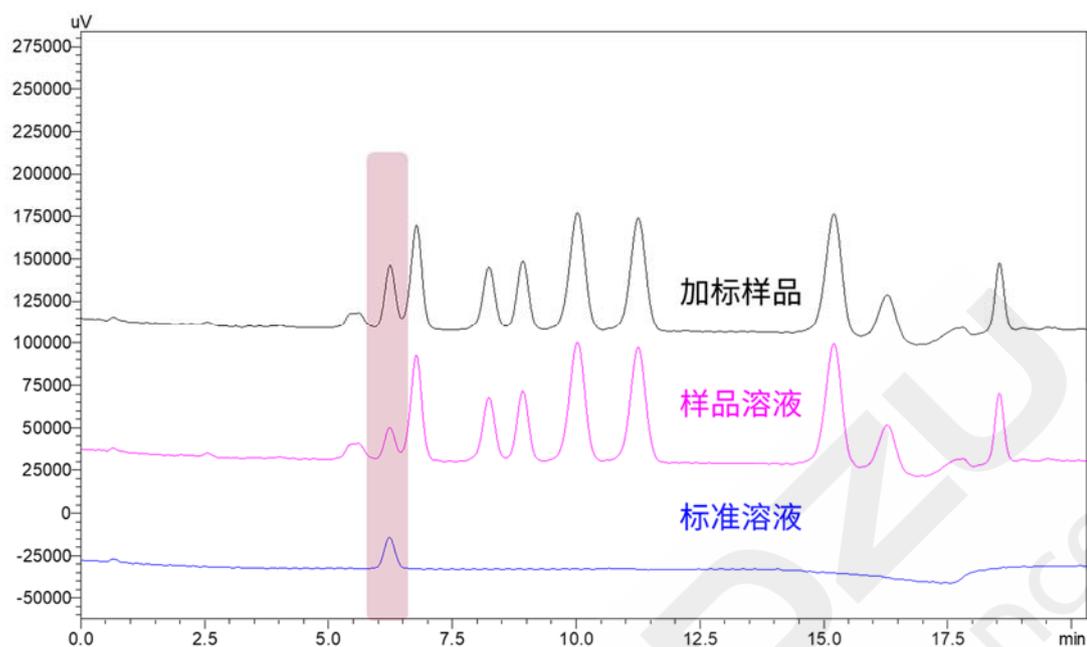


图4. 羟脯氨酸标准溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$)、SL403样品及其加标后色谱图

表 2. 回收率测定结果

化合物	样品本底含量 ($\mu\text{g/mL}$)	加标浓度水平 ($\mu\text{g/mL}$)	加标结果 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
羟脯氨酸	10.511	10.000	20.081	95.70

3. 结论

本文采用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了一种全自动柱后衍生高效液相色谱法测定胶原蛋白中羟脯氨酸含量的分析方法。结果显示线性、精密度结果均满足相关测定要求。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成,分离效果好、重复性佳、结果准确可靠,适用于胶原蛋白样品中羟脯氨酸的含量测定分析。

LC-MS/MS 法测定母乳低聚糖含量

摘要： 使用岛津超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用系统建立了测定婴幼儿配方乳粉中 3 种母乳低聚糖含量的分析方法。乳粉样品经溶解制备后，采用高速离心的方式去除脂肪，超滤去除蛋白质。滤液中的低聚糖经硼氢化钠破坏寡糖还原端的半缩醛结构，将 α 和 β 异头体还原成结构相同的开环结构，再使用多孔石墨化碳色谱柱进行分离。采用负离子模式进行电离，通过多反应监测模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用外标法定量，绘制 2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖校准曲线，线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度在 96.2%~103.7%之间，且精密度和不同浓度水平的加标回收率试验结果良好。

关键词： 三重四极杆质谱 婴幼儿配方乳粉 母乳低聚糖

技术特点：

- ❖ 乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖为立体异构体，通过优化洗脱条件，异构体获得较好分离；
- ❖ 母乳低聚糖经提取和还原后直接分析，无需衍生化。

母乳是新生儿出生后主要食物来源，其含有碳水化合物、脂肪、蛋白质、维生素、矿物质、脂肪酸和牛磺酸等多种营养成分。研究表明，母乳低聚糖 (human milk oligosaccharides, HMOs) 是母乳中继乳糖及脂肪之后的第三大主要成分。HMOs 在母乳中具有促进双歧杆菌定殖，改善肠道菌微生态、维持肠屏障、抵抗病原菌感染、调节免疫及神经发育等功能，对婴幼儿的健康成长起着不可忽视的作用。近期，国家卫生健康委员会批准了多款食品添加剂，其中包括了两款母乳低聚糖，分别为 2'-岩藻糖基乳糖和乳糖-N-新四糖，两者皆可应用于婴幼儿配方奶粉。

目前，母乳低聚糖的检测方法主要有毛细管电

泳法、高效液相色谱法、离子色谱法和高效液相色谱-串联质谱法等。其中，毛细管电泳法对同分异构体的分离度较差；高效液相色谱法一般搭配紫外检测器或荧光检测器，但由于母乳低聚糖紫外吸收能力弱、荧光性差，需要先进行衍生反应才能进行检测；而离子色谱法分离条件复杂，且分离结果重现性较差。液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 检测母乳低聚糖具有选择性好、准确度高的优势，且无需对样品进行衍生化处理。

本文基于岛津超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术，通过优化分析条件，建立了婴幼儿配方乳粉中 3 种母乳低聚糖的测定方法，供相关检测人员参考使用。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20DXR×2	自动进样器：	SIL-20AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.113		

温，记录加水后的溶液质量。称量制备后的溶液0.1 g至离心管中，加入100 μ L水，涡旋至充分混匀。

1.3.2 提取

将制备好的试液，在室温条件下6 000 rpm 离心20 min，吸取上清液至洁净的超滤管中。向原离心管中加入200 μ L水，涡旋震荡混匀，重复提取2次。将装有合并后上清液的超滤管，3000 rpm 离心20 min。向上管中加入400 μ L水，3000 rpm 离心20 min，保留底管中滤液。

1.3.3 还原

将所得滤液全部转移至5 mL 离心管内，加入500 μ L硼氢化钠溶液，旋涡振荡30 s混匀，室温反应30 min，每隔5 min 振摇20 s。缓慢加入500 μ L乙酸溶液，室温下放置20 min，每隔5 min 振摇20 s，直至不再产生气泡为止。转移所有溶液至5 mL容量瓶中，用水定容至刻度，再经0.22 μ m微孔滤膜过滤于进样小瓶中，待测。

1.4 校准曲线的制备

使用纯水作溶剂，配制系列混合标准工作溶液，具体浓度水平见表 3。取未添加 HMOs 乳粉作为空白基质，制备空白基质溶液。分别移取系列浓度的混合标准工作溶液 100 μ L 至离心管中，加入 100 μ L 空白基质溶液，涡旋至充分混匀。按照 1.3.2 和 1.3.3 处理后，供液相色谱-串联质谱测定。

表 3.3 种母乳低聚糖混合标准溶液系列浓度(μ g/mL)

No.	化合物名称	浓度水平 1	浓度水平 2	浓度水平 3	浓度水平 4	浓度水平 5
1	2'-FL	0.720	1.440	2.160	2.880	3.600
2	LNT	0.195	0.390	0.584	0.779	0.974
3	LNnT	0.179	0.358	0.537	0.716	0.895

2. 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

通过优化液相色谱梯度洗脱的时间程序，乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖同分异构体获得了较好分离。2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖的MRM色谱图见图1。

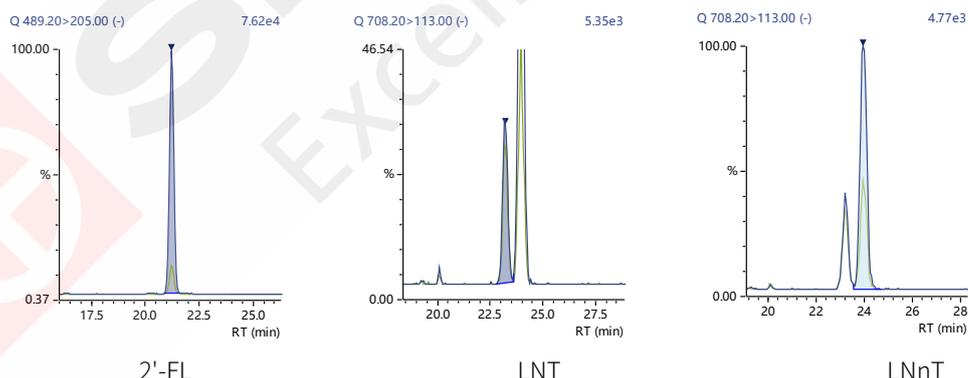


图 1.3 种母乳低聚糖（浓度水平 1）的 MRM 色谱图

2.2 线性考察

将不同浓度水平的母乳低聚糖混合标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量，绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 4。

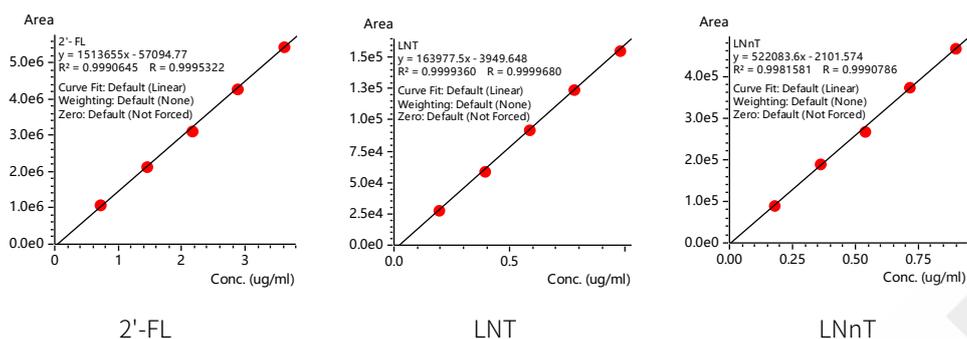


图 2.3 种母乳低聚糖校准曲线

表 4. 标准曲线信息

No.	化合物名称	线性方程	相关系数 R	准确度范围 (%)	检出限(μg/mL)
1	2'-FL	Y=1513655X-57094	0.9995	97.5~103.7	0.06
2	LNT	Y=163977X-3949	0.9999	99.2~100.5	0.06
3	LNnT	Y=522083X-2101	0.9990	96.2~103.1	0.03

2.3 精密度试验

对质控样品溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。结果显示：3 种母乳低聚糖的保留时间和峰面积相对标准偏差 not 高于 0.44% 和 1.00%，显示仪器精密度良好。

表 5a. 2'-FL 保留时间和峰面积重复性结果

#	Data Filename	Sample Name	m/z	Found RT	Area
1	质控样品-1	质控样品	489.20>205.00	20.880	3130091
2	质控样品-2	质控样品	489.20>205.00	20.964	3171676
3	质控样品-3	质控样品	489.20>205.00	20.883	3206619
4	质控样品-4	质控样品	489.20>205.00	20.882	3197704
5	质控样品-5	质控样品	489.20>205.00	20.962	3195896
6	质控样品-6	质控样品	489.20>205.00	20.896	3215621
Average	----	----	----	20.911	3186268
%RSD	----	----	----	0.193	1

表 5b. LNT 保留时间和峰面积重复性结果

#	Data Filename	Sample Name	m/z	Found RT	Area
1	质控样品-1	质控样品	708.20>113.00	22.670	91995
2	质控样品-2	质控样品	708.20>113.00	22.855	92447
3	质控样品-3	质控样品	708.20>113.00	22.680	94215
4	质控样品-4	质控样品	708.20>113.00	22.671	91155
5	质控样品-5	质控样品	708.20>113.00	22.830	91141
6	质控样品-6	质控样品	708.20>113.00	22.664	90494
Average	----	----	----	22.728	91908
%RSD	----	----	----	0.391	1

表 5c. LNnT 保留时间和峰面积重复性结果

#	Data Filename	Sample Name	m/z	Found RT	Area
1	质控样品-1	质控样品	708.20>113.00	23.391	267470
2	质控样品-2	质控样品	708.20>113.00	23.603	272876
3	质控样品-3	质控样品	708.20>113.00	23.400	272365
4	质控样品-4	质控样品	708.20>113.00	23.392	271801
5	质控样品-5	质控样品	708.20>113.00	23.587	271969
6	质控样品-6	质控样品	708.20>113.00	23.414	271794
Average	----	----	----	23.464	271379
%RSD	----	----	----	0.433	1

2.4 加标回收率试验

取未添加 HMOs 乳粉作为空白样品，加入适量母乳低聚糖的混合标准储备溶液，使试样中 2'-FL 添加浓度分别为 72.0 mg/100g 和 144.0 mg/100g，LNT 添加浓度分别为 19.5 mg/100g 和 39.0 mg/100g，LNnT 添加浓度分别为 17.9 mg/100g 和 35.8 mg/100g，平行做 3 份。按照 1.3.2 和 1.3.3 处理后上机分析，测定 3 种母乳低聚糖的添加回收率，各化合物的平均加标回收率结果在 98.6% ~ 102.9% 之间（见表 6）。

表 6.3 种母乳低聚糖加标回收率结果(n=3)

No.	化合物名称	添加浓度 (mg/100g)	平均回收率
1	2'-FL	72.0	99.4%
		144.0	102.7%
2	LNT	19.5	98.6%
		39.0	102.9%
3	LNnT	17.9	102.2%
		35.8	102.4%

3. 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪LCMS-8045联用系统建立了测定婴幼儿配方乳粉中2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖含量的分析方法。该方法特异性强、精密度好、且测量结果准确,有助于婴幼儿配方乳粉企业对2'-岩藻糖基乳糖、乳糖-N-四糖和乳糖-N-新四糖进行新产品开发与质量控制。

LC-MS/MS 测定大肠杆菌发酵液中 3-羟基丙醛

摘要: 本文采用岛津三重四极杆液质联用仪建立了大肠杆菌发酵产物 3-羟基丙醛的定量分析方法。该方法中, 在 0.05~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数均大于 0.999, 准确度为 96.8~103.6%。实际样品中检出 3-羟基丙醛, 根据检出浓度, 对样品进行加标, 回收率为 90.5%。实验结果表明, 该方法能快速准确定量分析大肠杆菌发酵产物 3-羟基丙醛。

关键词: 大肠杆菌 3-羟基丙醛 LC-MS/MS

技术特点:

- ❖ 3-羟基丙醛离子化效率差, 在流动相中乙酸后可以形成稳定的二聚体加和离子 $[2\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$, 成功建立了 3-羟基丙醛的 LCMSMS 方法。
- ❖ 发酵液组成复杂, 基质干扰严重, 经过调整流动相梯度和稀释样品减小发酵液基质对目标化合物的干扰, 实现 3-羟基丙醛 90.5%回收率。

3-羟基丙醛是一种具有重要工业价值的三碳化合物, 在化工、医药和材料领域中应用广泛。作为合成 1,3-丙二醇 (PDO)、丙烯酸及其衍生物的关键前体, 它在高性能聚酯纤维、涂料、溶剂以及生物基塑料的生产中发挥着不可替代的作用。此外, 其衍生物还可用于药物中间体和功能性食品添加剂的制备, 展现出极高的经济价值和应用潜力。

目前, 3-羟基丙醛的合成途径主要包括化学法和生物法。化学法通常以丙烯为原料, 通过氧化反应获得目标产物, 该方法工艺成熟且产率较高, 但存在对石化资源的高度依赖、能耗高以及环境污染严重等问题。相比之下, 生物法通过基因编辑技术对大肠杆菌等微生物进行代谢工程改造, 利用可再

生原料如甘油或葡萄糖实现绿色合成, 展现出显著的环境友好性和可持续性优势。然而, 由于微生物代谢网络的复杂性, 目标产物可能对细胞产生毒性, 从而限制产量。同时, 关键酶 (如甘油脱氢酶和醛脱氢酶) 的活性优化对于提高转化效率和确保反应顺利进行至关重要。因此, 监测发酵液中 3-羟基丙醛的含量对于调控代谢网络、优化发酵过程具有重要意义。

本文基于 LC-MS/MS 技术建立了大肠杆菌发酵液中 3-羟基丙醛的定量分析方法, 该方法具有快速、灵敏度高的特点, 能够准确测定发酵液中 3-羟基丙醛的浓度, 为大肠杆菌的基因改造及代谢通路调控提供了重要的数据支持和技术保障。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050, 具体配置为:

系统控制器	: CBM-40	自动进样器	: SIL-40C XR
脱气机	: DGU-405	柱温箱	: CTO-40C
输液泵	: LC-40D XR \times 2	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : C18 (150 mm x 2.1 mm I.D., 3 μ m)
流 动 相 : A相-15 mM 乙酸+10 mM 二戊胺水溶液, B相-甲醇
流 速 : 0.3 mL/min 柱 温 : 40°C
进 样 体 积 : 5 μ L
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为 0%, 时间程序见表 1。

表 1. 流动相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	0
10.00	Pumps	Pump B Conc.	10
10.10	Pumps	Pump B Conc.	90
12.00	Pumps	Pump B Conc.	90
12.10	Pumps	Pump B Conc.	10
15.00	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI (+) 接 口 温 度 : 300°C
接 口 电 压 : 4.5 kV D L 温 度 : 250°C
雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 加 热 块 温 度 : 400°C
加 热 气 : 空气 10.0 L/min 扫 描 模 式 : MRM
干 燥 气 : 氮气 10.0 L/min M R M 参 数 : 见表 2

表 2. MRM 参数

No.	中文名	CAS. No.	离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
1	3-羟基丙醛	2134-29-4	207.0 > 99.1	34.0	25.0	8.0

1.3 标准品配制

标准储备液: 准确称取标准品 1 mg, 用水溶解并定容至 1 mL, 配制浓度为 1000 μ g/mL 标准储备液。
标准溶液: 取适量标准储备液, 用水逐级稀释, 浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 μ g/mL

1.4 样品前处理

将样品采用超纯水稀释 10 倍后上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 前体离子确定

3-羟基丙醛分子量为 74 Da, 含羟基和醛基, 极性较弱, 在 ESI 离子源中较难离子化。通过 scan 分析, 仅在正模式下找到响应较低的前体离子, 但前体离子不稳定, 且在 CID 中不容易产生二级碎片离子, 所以通常不选择前体离子作为前体离子。通过在流动相中添加乙酸, 负模式下采集得到明显的二聚体加乙酸 [2M+CH₃COO] 的特征离子峰, m/z 为 207.1, 且信号稳定。

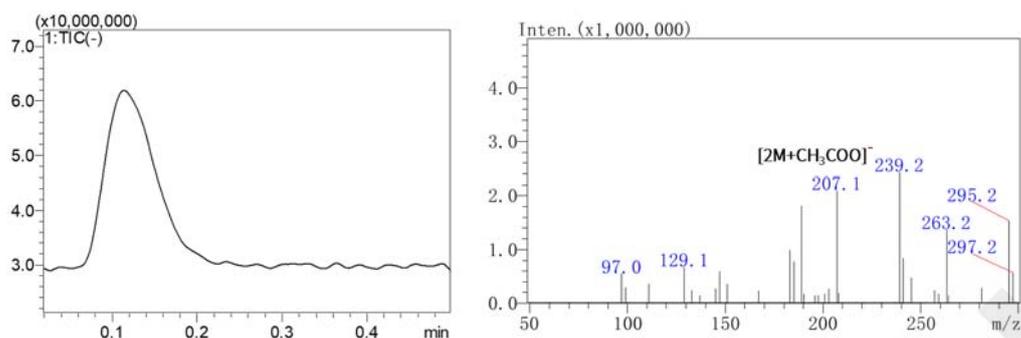


图 1. 标准溶液 Scan 模式下采集得到的色谱图和质谱图

2.2 标准溶液 MRM 图

通过软件自动优化得到目标化合物的最佳 MRM 参数，采集标准溶液 MRM 图如图 2 所示。

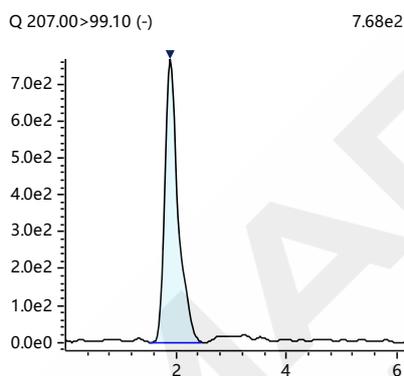


图 2. 标准溶液 MRM 图 (浓度: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.3 校准曲线

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立校准曲线。校准曲线如图 3 所示，线性相关系数大于 0.999，准确度为 96.8~103.6%。

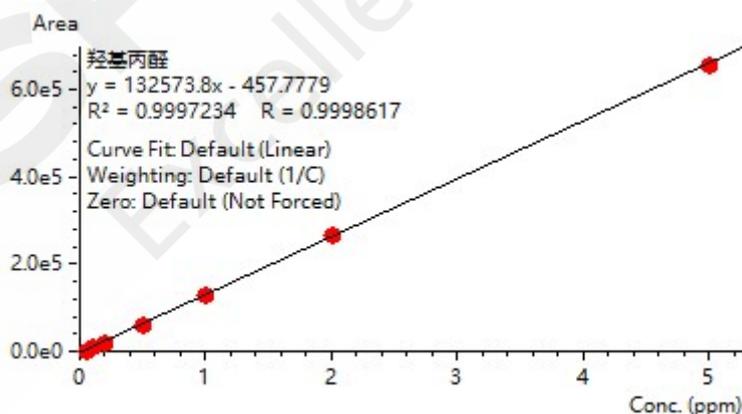


图 3. 校准曲线图

2.4 样品测定及加标实验结果

按照 1.4 中样品前处理方法对大肠杆菌发酵液进行处理，上机分析。发酵液成分复杂，易对目标化合物的定量分析造成干扰，影响其含量测定的准确性。为解决这一问题，通过在流动相中添加二戊胺，并优

化液相洗脱梯度，提高目标化合物在色谱柱上的保留，成功去除了基质的干扰。经过方法优化，最终样品加标回收率为 90.5%。样品及加标溶液色谱图见图 4，浓度结果见表 3。

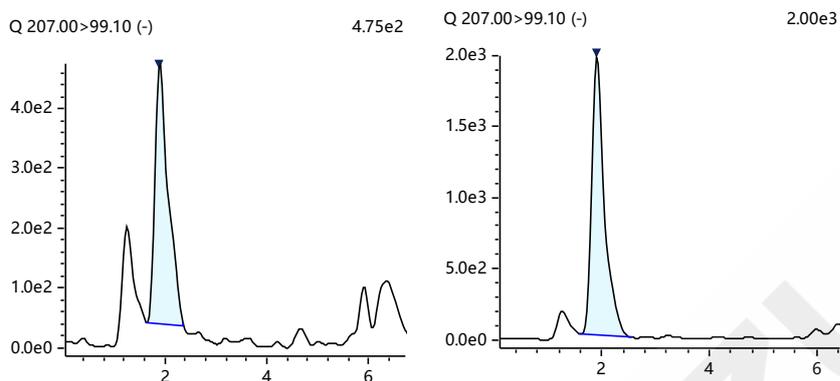


图 4. 样品（左）及加标溶液（右）色谱图

表 3. 样品浓度及加标回收率结果

化合物名	样品中浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	加标量 ($\mu\text{g/mL}$)	加标后浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率
3-羟基丙醛	0.58	1.0	1.43	90.5%

3. 结论

本文通过三重四极杆液质联用仪建立了大肠杆菌发酵液中3-羟基丙醛的定量分析方法，此方法分析速度快、灵敏度高、可准确测定发酵液中3-羟基丙醛的浓度，为大肠杆菌的基因改造及代谢通路调控提供了支持。

高效液相色谱法测定紫杉醇含量

摘要：本文建立了高效液相色谱仪分析药物涂层球囊提取液中紫杉醇的分析方法。结果表明：仪器定量限低于 0.02 $\mu\text{g/mL}$; 10.01-200.12 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，校准曲线线性良好，相关系数为 0.9999; 100.99 $\mu\text{g/mL}$ 标样连续 6 针测试结果显示，紫杉醇保留时间和峰面积 RSD 值分别不高于 0.14%和 0.10%，仪器精密度良好；药物涂层球囊提取液样品加标（50 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇）平行测定三次，平均回收率为 105.1%，相对标准偏差为 3.04%，回收率良好。该方法快速简单，灵敏度高，重复性和回收率好，适合药物涂层球囊提取液中紫杉醇含量的检测。

关键词： 高效液相色谱仪 药物涂层球囊提取液 紫杉醇

紫杉醇(Taxol)是从短叶红豆杉树皮中提取的一类有抗癌抗肿瘤活性的二萜生物碱类天然产物，分子式为 $\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$ 。微管和微管蛋白在维持正常细胞形态、有丝分裂过程中染色体的移动等方面具有重要地位。紫杉醇是首个被发现作用于真核细胞微管和微管系统而发挥抗肿瘤作用的药物。其独特的空间结构可以特异性的与 β -微管蛋白结合，促微管蛋白装配成微管并使之稳定，从而抑制细胞中诸如运动和分泌等依赖微管蛋白的过程，阻断细胞的有丝分裂，使之停止于 G2 晚期和 M 期。目前紫杉醇是临床上治疗乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等的

广谱抗肿瘤药物，疗效显著。紫杉醇由于其新颖复杂的化学结构、广泛而显著的生物活性、全新独特的作用机制、奇缺的自然资源使其受到了植物学家、化学家、药理学家、分子生物学家的极大青睐。时至今日，仍然是最好的用于治疗癌症的天然药物之一。

高效液相色谱仪是检测紫杉醇含量的常用检测手段，本文建立了高效液相色谱仪分析紫杉醇的分析方法。该方法快速简单，灵敏度高，重复性好，适合紫杉醇含量的检测。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 Nexera Bio 高效液相色谱仪系统，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-20A	自动进样器	: SIL-20ACXR
柱温箱	: CTO-20A	输液泵	: LC-20ADXR \times 2
脱气机	: DGU-20A 5R	紫外检测器	: SPD-20A
色谱工作站	: Labsolutions Ver. 6.102		

1.2 分析条件

色谱柱	: ACE3 C18 DV19-2674,(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)		
流动相 A	: 5 mM 磷酸二氢钠溶液 (pH=3.5)		
流动相 B	: 乙腈		
流速	: 1.0 mL/min	柱温	: 40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：10 μL

检测波长：227 nm

洗脱方式：等度洗脱（流动相 A：流动相 B=4：6），分析时间 12 min

1.3 样品处理

移取药物涂层球囊提取液 0.5 mL，置于 5 mL 量瓶中，加入初始比例流动相进行稀释，过滤、混匀后上样。

1.4 标准溶液的制备

紫杉醇标准系列工作液：移取一定量的标准中间液，用流动相溶液（流动相 A：流动相 B=4：6）稀释定容，配置成浓度分别为 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作液。

3. 结果与讨论

3.1 标准溶液色谱图与定量限

定量限 10 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇标准溶液色谱图如图 1 所示，同空白比较，出峰位置未有干扰。

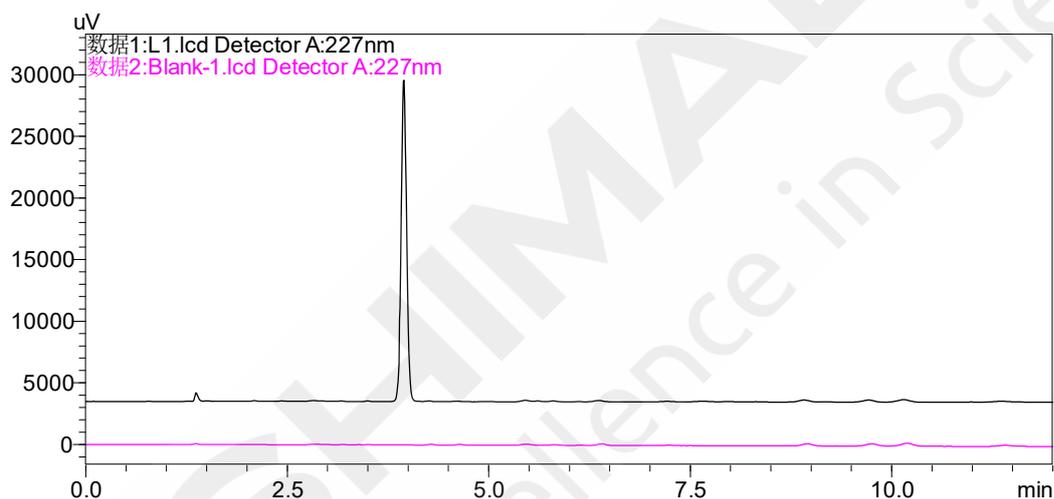


图 1. 10 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇标准溶液和空白溶剂色谱图

3.2 校准曲线

如图 2 所示，紫杉醇标准药物涂层球囊提取液在 10.01-200.12 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内，外标法校准曲线线性良好。其中线性方程为 $Y=10465.0X+16610$ ，线性相关系数 R 为 0.9999。准确度在 98.9%~101.2%之间。将校准曲线最低点 10.01 $\mu\text{g/mL}$ 浓度标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定，通过 LabSolutions Ver. 6.102 软件计算信噪比（采用 ASTM 计算方式），计算得到检出限和定量限分别为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ，和 0.16 $\mu\text{g/mL}$ 。

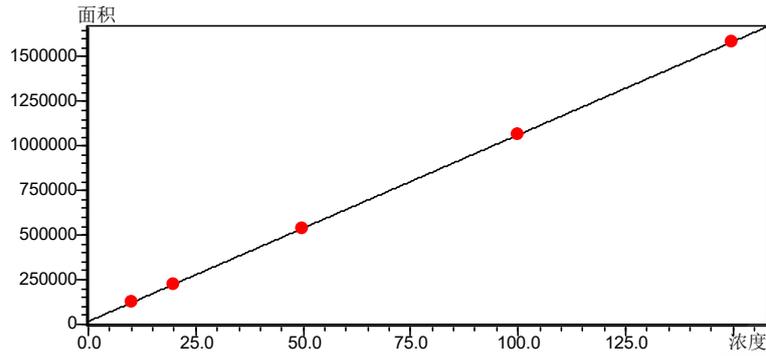


图 2. 紫杉醇溶液校准曲线

3.3 精密度

取 100.99 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇标准药物涂层球囊提取液重复进样 6 次，考察保留时间和峰面积的重复性如结果如表 1 所示，结果显示：紫杉醇保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.20%，0.22%，表明仪器精密度良好。

表 1. 保留时间和峰面积重复性

No.	紫杉醇			
	保留时间 (min)	RSD(%)	峰面积	RSD(%)
1	3.948	0.14	150729	0.10
2	3.952		150761	
3	3.950		150603	
4	3.947		150324	
5	3.938		150251	
6	3.941		149927	

3.4 加标回收率

取药物涂层球囊提取液样品，添加 20 $\mu\text{g/mL}$ 紫杉醇标准物质，平行测定三次，测得平均回收率为 105.1%，相对标准偏差为 3.04%，回收率良好。

表 2. 加标回收率结果

No.	紫杉醇						
	样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	加标浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	保留时间 (min)	实测浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 %	平均回收率 %	RSD(%)
1	3.68	20.00	3.946	24.14	102.3	105.1	3.04
2			3.951	25.39	108.6		
3			3.947	24.54	104.3		

3.5 样品分析

将所建立的方法用于实际样品分析，10 批药物涂层球囊提取液处理后各自进样分析，其色谱图和测定结果分别如图 3 和表 3 所示。

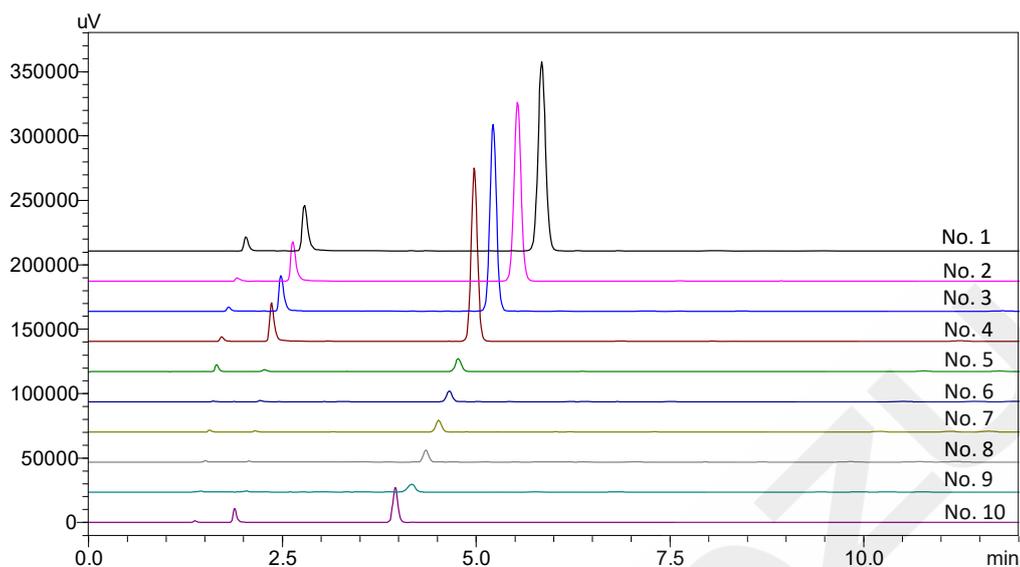


图3. 10批样品药物涂层球囊提取液色谱图

表3. 药物涂层球囊提取液中紫杉醇含量

样品 No.	移取量 (mL)	定容体积 (mL)	检测浓度($\mu\text{g/mL}$)	样品含量 ($\mu\text{g/g}$)
1	0.5	5	60.36	503.00
2	0.5	5	56.18	468.17
3	0.5	5	58.62	488.50
4	0.5	5	54.77	456.42
5	0.5	5	3.68	30.67
6	0.5	5	3.00	25.00
7	0.5	5	3.32	27.67
8	0.5	5	3.38	28.17
9	0.5	5	2.93	24.42
10	0.5	5	10.82	90.17

4. 结论

本文采用岛津高效液相色谱仪建立了药物涂层球囊提取液中紫杉醇的分析方法，该方法快速简单，灵敏度高，线性、重复性，加标回收率良好。并使用该方法对10批样品进行含量检测。实验表明，该方法满足适合药物涂层球囊中紫杉醇含量的检测。

LCMSMS 检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留

摘要：本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留的方法。样品经乙腈沉淀蛋白，离心滤过后上机分析。采用外标法定量，在 0.05~100 ng/mL 范围内，相关系数大于 0.9999。三个浓度下保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.05~0.15 %和 0.97~4.26 %之间。该方法灵敏可靠，氨苄西林定量限为 0.05 ng/mL；三个浓度样品加标回收率在 95.9~100.4%之间，每个浓度平行处理三次，测试结果的 RSD 在 1.11~4.73%之间；可为重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留测定提供参考。

关键词：重组胶原蛋白 氨苄西林 抗生素残留 三重四极杆液质联用仪

重组胶原蛋白是指采用重组 DNA 技术，对编码所需人胶原蛋白质的基因进行遗传操作和（或）修饰，利用质粒或病毒载体将目的基因带入适当的宿主细胞（细菌、酵母或其它真核细胞等）中，表达并翻译成胶原蛋白或类似胶原蛋白的多肽，经过提取和纯化等步骤制备而成。

重组人源胶原蛋白具有与人体胶原蛋白相同的氨基酸序列和稳固的三螺旋结构，同时在此基础上进行优化，提高了亲水性和活性，具有亲水性好、安全性高、稳定性高、机械强度和细胞粘附活性高等优点，在生物医用材料、美容化妆品、食品保健等领域有着广泛的应用前景。

重组人源胶原蛋白的生产一般采用生物发酵的方式，而该过程中会使用到氨苄西林等抗生素来保持宿主细胞培养时良好的生长状态。由于在培养过程中使用了氨苄西林，故需要对重组胶原蛋白终产品中氨苄西林残留量进行检测和监控，以保证产品安全性。

本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪检测重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留量的分析方法。样品经乙腈沉淀蛋白后直接进样分析，前处理简单、分析速度快、灵敏度高，可供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A ₅
输液泵	: LC-30AD×2	自动进样器	: SIL-30AC
柱温箱	: CTO-20AC	质谱仪	: LCMS-8050
色谱工作站	: LabSolutions Ver.5.99		

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shimadzu Shim-pack Velox SP-C18 100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8 μm;
P/N: 227-32001-03; 岛津（上海）实验器材有限公司

流 动 相 : A-0.1%甲酸水溶液; B-乙腈
 流 速 : 0.4 mL/min 柱 温 : 40°C
 进 样 体 积 : 1 μ L 洗 针 方 式 : 内外壁同时清洗
 洗针液 R1&R3 : 甲醇/乙腈/异丙醇/水
 洗 针 液 R0 : 甲醇/水=1/1 (v/v)
 =1/1/1/1 (v/v,含0.5%甲酸)
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为5%, 时间程序见表1。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	30
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
4.50	Pumps	Pump B Conc.	90
4.51	Pumps	Pump B Conc.	5
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI, 正离子模式 加 热 气 流 速 : 10 L/min
 雾化气流速 : 3 L/min 干 燥 气 流 速 : 10 L/min
 加热模块温度 : 400 °C 碰 撞 气 : 氦气 270 kPa
 接 口 温 度 : 300 °C 扫 描 模 式 : 多反应监测(MRM)
 D L 温 度 : 250 °C M R M 参 数 : 见表2

表 2. MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	氨苄西林	Ampicillin	69-53-4	350.05	106.10* 192.05	-10.0 -10.0	-20.0 -15.0	-21.0 -13.0

*代表定量离子对。

1.3 标准溶液制备

以 80%乙腈水配制标准贮备液 (500 μ g/mL), 以 80%乙腈水逐级稀释为 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL 共 11 个标准系列工作溶液, 待测。

1.4 样品前处理

准确称取重组胶原蛋白固体样品, 加入超纯水溶解完全, 配制为 1 mg/mL 的样品溶液。取 100 μ L 样品溶液, 加入 400 μ L 乙腈, 涡旋混匀, 14000 rpm 离心 5 min, 上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 专属性

溶剂空白与标准溶液 MRM 重叠谱图显示, 目标峰保留时间处, 未见明显干扰。

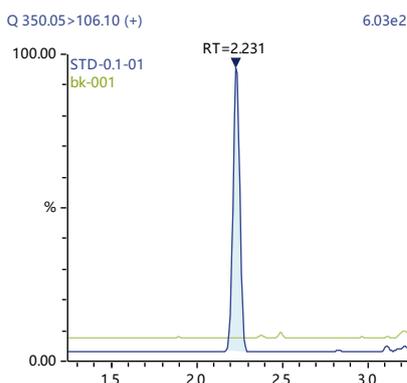


图 1. 溶剂空白 (a) 和标准溶液 (b, 0.1 ng/mL) MRM 重叠色谱图

2.2 线性关系

按照1.3配制11个不同浓度的标准系列溶液，按照1.2中的分析条件进行测定。以峰面积为纵坐标，以浓度为横坐标，外标法绘制标准曲线。各化合物标准曲线见图2，线性方程、相关系数和定量限见表3。

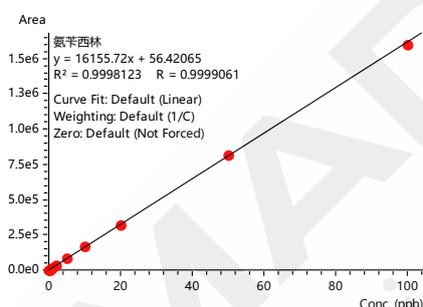


图2. 标准曲线

表 3. 线性关系和定量限 (权重: 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r	定量限 (ng/mL)	定量限 S/N
氨苄西林	$Y=16155.72X+56.4206$	0.05~100	87.9~105.1	0.9999	0.05	41.77

2.3 精密度实验

对三个浓度的标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。三个浓度标准品的保留时间和峰面积的 RSD 分别在 0.05~0.15% 和 0.97~4.26% 之间，仪器精密度良好。

表 4. 精密度结果 (n=6)

名称	RSD% (0.2 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (20 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氨苄西林	0.15	4.26	0.05	2.48	0.11	0.97

2.4 加标回收实验

使用本方法检测了两份重组胶原蛋白样品，在阴性样品中添加标准溶液，配制为三个不同浓度的加标样品，每个浓度平行制备三份，按照 1.4 处理后上机分析，样品 MRM 谱图见图 3，样品检测结果和加标回收结果见表 5。三个浓度加标回收率在 95.9~100.4% 之间，测试结果的 RSD 在 1.11~4.73% 之间，方法可靠。

表 5. 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	样品 1 含量 μg/g	样品 2 含量 μg/g	1 μg/g		10 μg/g		100 μg/g	
			回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
氨苄西林	N.D.	0.325	96.5	4.73	100.4	2.76	95.9	1.11

注: N.D.表示未检出。

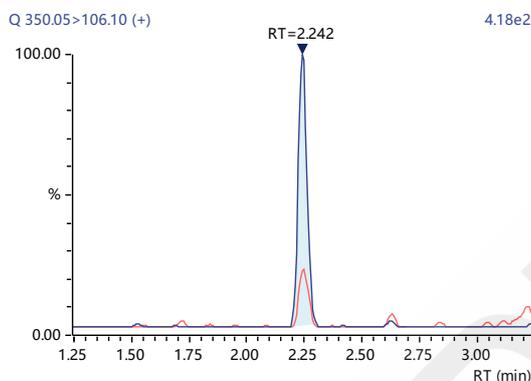


图 3. 样品 2 MRM 谱图

2.5 残留考察

高浓度标准样品 (100 ng/mL) 分析完成后, 进样分析溶剂空白, 分析结果与定量下限 (0.05 ng/mL) 比对, 残留考察结果表明, 氨苄西林检测通道中无干扰。

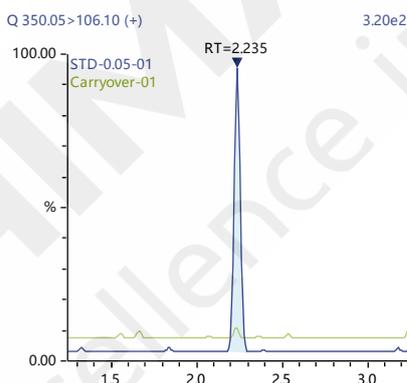


图 4. 残留考察溶剂空白 (a) 和定量下限 (b, 0.05 ng/mL) MRM 重叠图

3. 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定重组胶原蛋白中氨苄西林抗生素残留的方法。本方法中的重组胶原蛋白主要指人的胶原蛋白基因重组产物, 基于非人胶原蛋白基因重组胶原蛋白或类胶原蛋白产物中氨苄西林抗生素残留量检测, 也可参考本方法进行。本方法快速、灵敏、准确, 适用于重组胶原蛋白产品中氨苄西林抗生素残留的检测和监控。

LC-MS/MS 法定量分析发酵生产的寡糖中 IPTG 残留

摘要：本文采用岛津高效液相色谱联合三重四极杆质谱，建立了测定通过发酵生产的寡糖中 IPTG 含量的方法。该方法中，IPTG 在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数为 0.9998，各校准点准确度在 95.1~106.1% 之间。精密度实验中，低中高三个浓度点的 IPTG 的保留时间 RSD% 在 0.05~0.21 之间，峰面积 RSD% 在 1.02~4.51 之间。回收率实验中，IPTG 浓度为 0.5、5 和 50 ng/mL 的样品加标溶液平均回收率在 95.4~119.8% 之间，RSD% 在 1.55~2.31 之间。实验结果表明，该方法能快速准确地测定 IPTG 的含量。

关键词：高效液相色谱 三重四极杆质谱 寡糖 IPTG

IPTG 的中文名叫异丙基-β-D-硫代半乳糖，是β-半乳糖苷酶的活性诱导物质。基于这个特性，当pUC系列的载体DNA（或其他带有lacZ基因载体DNA）以lacZ缺失细胞为宿主进行转化时、或用M13噬菌体的载体DNA进行转染时，由于β-半乳糖苷酶的α-互补性，如果在平板培养基中加入X-Gal和IPTG，可以根据是否呈现白色菌落（或噬菌斑）而方便地挑选出基因重组体。此外，它还可以作为具有lac或tac等启动子的表达载体的表达诱导物使用。现有技术中，IPTG作为一种分子生物学试剂，常用于蓝白斑筛选及IPTG诱导的细菌内的蛋白表达等。基因工程技术中，采用IPTG作为诱导剂，可促进目的蛋白的大量表达。但IPTG价格昂贵，使用量过多时有毒性，并

且提高了工业生产成本。

IPTG是一种半硫代的化合物，没有紫外可见光吸收，无法直接采用紫外检测器检测。目前最常用的检测方法是衍生化联合荧光检测器检测，如常用的荧光衍生试剂有邻苯二甲醛和N-马来酰亚胺。但是这种检测法费时费力，选择性差，而且存在衍生不完全的可能。因此，开发一种IPTG含量的检测方法，以实现生化样品中IPTG含量的准确测定，对控制药物质量安全性具有重要意义。

本实验使用高效液相色谱联合三重四极杆质谱建立了寡糖中IPTG含量测定方法，该方法灵敏度高，分析速度快，准确度高。

1. 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱联合三重四极杆质谱，配置信息如下：

系统控制器	: CBM-20A	自动进样器	: SIL-30AC
输液泵	: LC-30AD×2	脱气机	: DGU-20A 5R
质谱仪	: LCMS-8050	色谱工作站	: Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 1.8 μm)		
流动相	: A-0.1%甲酸水+5 mM 乙酸铵溶液; B-甲醇		
进样体积	: 10 μL	柱温	: 40°C
流速	: 0.4 mL/min	洗针液	: 甲醇/水=1:1 (v:v)

洗脱方式：梯度洗脱，B相起始浓度为5%，时间程序如表1所示。

表 1. 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
1.00	泵	B Conc	5
6.00	泵	B Conc	95
7.00	泵	B Conc	95
8.00	泵	B Conc	5
10.00	控制器	STOP	

质谱条件

离子化模式	: ESI, 正离子模式	加热模块温度	: 400 °C
雾化气流速	: 3.0 L/min	干燥气流速	: 10.0 L/min
接口温度	: 300 °C	扫描模式	: 多反应监测(MRM)
D L 温度	: 250 °C	接口电压	: 4 kV
碰撞气	: 氦气	MRM 参数	: 见表2

表 2. MRM 参数

中文名称	缩写	CAS 号	前体 离子	产物 离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
异丙基-β-D-硫代半 乳糖苷	IPTG	367-93-1	256.1	163.1*	-15.0	-13	-15
				145.1	-15.0	-18	-15
				91.0	-15.0	-28	-15

*代表定量离子对。

1.3 标准工作溶液配制

称量1 mg IPTG标准品，加超纯水溶解，配制成1 mg/mL标准储备溶液。用水逐级稀释，配制成浓度分别为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL的标准工作溶液，上机测试。

1.4 样品溶液配制

分别称量1 mg 样品，加超纯水溶解，配制成1 mg/mL样品溶液，上机测试。

2. 结果与讨论

2.1 标准溶液 MRM 色谱图

按照1.2分析条件测定，0.5 ng/mL IPTG标准溶液响应如图1所示，IPTG的S/N为23.22，灵敏度良好。

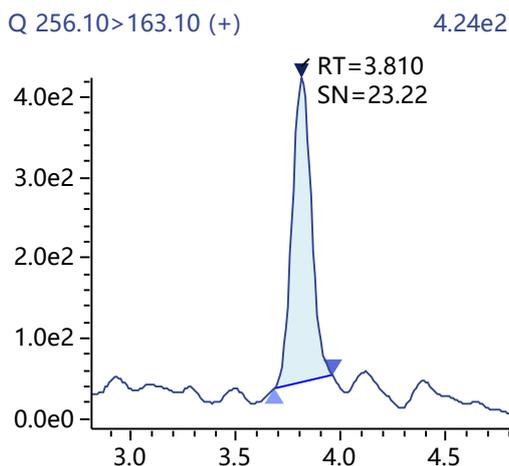


图 1. 标准溶液 MRM 色谱图(0.5 ng/mL)

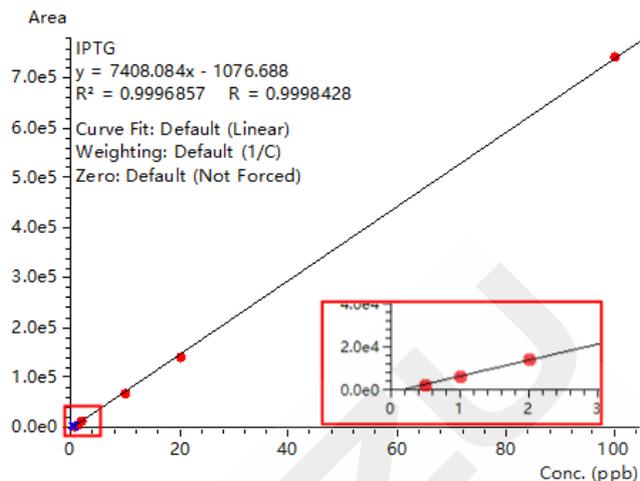


图 2. IPTG 校准曲线

2.2 校准曲线

按照 1.2 分析条件测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立线性校准曲线，结果如图 2 所示，IPTG 在 0.5~100 ng/mL 线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数为 0.9998，各校准点准确度在 95.1~106.1%之间。

2.3 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择浓度为 0.5 ng/mL, 2 ng/mL 和 50 ng/mL 的标准溶液连续进样 6 针考察仪器精密度。结果显示 IPTG 的保留时间 RSD% 在 0.05~0.21 之间，峰面积 RSD% 在 1.02~4.51 之间，见表 3。实验结果表明，该分析方法具有良好的精密度。

表 3. 保留时间和峰面积精密度结果 (n=6)

名称	低浓度(0.5 ng/mL)		中浓度(2 ng/mL)		高浓度(50 ng/mL)	
	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
IPTG	0.21	4.51	0.11	2.29	0.05	1.02

2.4 实际样品分析

将 2 个寡糖样品按 1.4 配制样品溶液，用 1.2 分析条件测定，结果如图 3 和图 4 所示，所测样品中均未检出 IPTG。

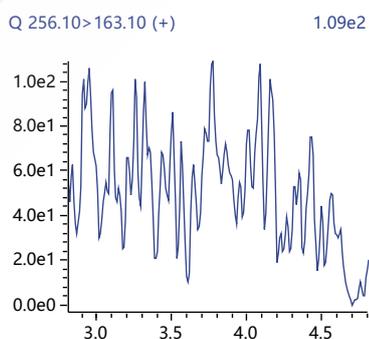


图 3. 样品 1 MRM 色谱图

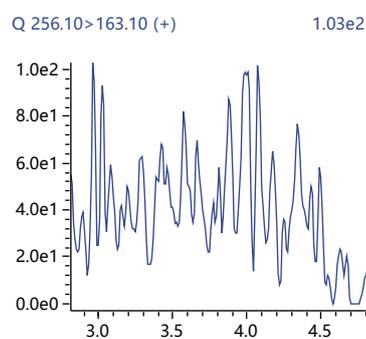


图 4. 样品 2 MRM 色谱图

2.5 回收率

向浓度为 1 mg/mL 的样品溶液中添加 IPTG 标准品溶液，配制成 IPTG 浓度为 0.5、5 和 50 ng/mL 的样品加标溶液，每个水平重复测定 3 次，质控品的准确度和精密度结果如表 4 所示，平均回收率在 95.4~119.8% 之间，RSD% 在 1.55 ~2.31 之间。在分析过程中为了避免高浓度样品进入质谱，在软件中设置阀切换程序，将 4.5 min 以后的高浓度组分切入废液。

表 4. 方法回收率结果(n=3)

理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
0.5	119.8	1.77
5	95.4	2.31
50	96.4	1.55

3. 结论

本实验使用岛津高效液相色谱串联三重四极杆质谱，建立了定量分析通过发酵生产的寡糖中IPTG含量的方法。IPTG在0.5~100 ng/mL范围内线性良好，相关系数为0.9998，精密度实验中，低中高三个浓度点的IPTG的保留时间RSD%在0.05~0.21之间，峰面积RSD%在1.02~4.51之间。回收率实验中，IPTG浓度为0.5、5和50 ng/mL的样品加标溶液平均回收率在95.4~119.8%之间，RSD%在1.55 ~2.31之间。实验结果表明，该方法灵敏度高，分析速度快，准确性好，可用于寡糖中IPTG的残留分析。

第 4 章 底盘细胞代谢通路分析-胞内代谢物分析

微生物作为合成生物学的底盘细胞，具有生长迅速、易于操作等优点，常见的底盘细胞包括大肠杆菌、酿酒酵母和枯草芽孢杆菌等。在合成生物学研究过程中，需要通过基因编辑技术对微生物基因进行改造，例如删除竞争性基因、引入外源基因等，以构建全新的代谢通路，从而提高目标产物的合成效率，降低成本，并减少对环境的影响。

对改造后的微生物进行代谢物分析可以揭示其在特定生长条件下的代谢状态，可以深入理解微生物代谢途径，提供关于代谢流向的宝贵信息，这对于微生物菌株的设计和优化至关重要。然而，尽管胞内代谢物分析具有重要意义，但其分析却具有一定的难度。首先，微生物细胞内的代谢物种类繁多，涵盖了小分子代谢物、氨基酸、糖类、脂质、核酸及其相关衍生物等，这些代谢物的浓度差异大且动态变化，给分析带来了很大的挑战。此外，微生物代谢物的化学结构复杂，极性差异显著，传统的分析方法常常难以实现对复杂代谢网络的全面分析。因此，开发高效、灵敏且全面的代谢物分析技术是克服这些难点、实现精准代谢调控的关键。

岛津推出的代谢物分析方法包套装，涵盖了 2000 余种代谢物，包括初级代谢产物、短链脂肪酸、D/L 氨基酸、脂质和磷脂等。该方法包不仅包含样品制备、数据采集和数据分析的方法，还配备了数据统计及可视化分析工具。通过这一全面的解决方案，研究人员无需自行开发方法，即可直接利用质谱仪器快速对微生物样本中的代谢物进行半定量分析，从而评估不同代谢产物的水平及其变化趋势。这为代谢途径的优化提供了强有力的数据支持，简化了实验流程，提升了研究效率。



全谱二维液相与 QTOF 联用定性分析微生物发酵液中生物农药

摘要：使用全谱二维液相系统与 LCMS-9050 联用对微生物发酵液中生物农药进行定性分析。对全谱二维分离效果进行考察，显示全谱二维系统能有效聚焦和分离；对仪器稳定性进行考察：正负模式同时采集，连续进样 9 次，TIC 图重复性良好，正负模式下 m/z 偏差在 1 ppm 以内。微生物培养液样品正模式共提取 1110 个 m/z，负模式共提取 910 个 m/z，并对其峰面积大于 1% 的组分进行定性分析，结果显示样品中含有多种多肽化合物。该系统可实现宽极性组分正负模式同时采集，达到“4 in 1”的效果，大大提高采集效率。

关键词：全谱二维液相系统 Q-TOF 微生物发酵液

技术特点：

- ❖ 全谱二维与 LCMS-9050 联用“4 in 1”特点，节省 3/4 样品和时间，且数据稳定可靠。
- ❖ 结合 Insight Explore 软件、MSDIAL 数据库对主要化合物实现定性分析。

生物农药是指利用生物活体或其代谢产物对害虫、病菌、杂草、线虫、鼠类等有害生物进行防治的一类农药制剂，生物农药按生物源的不同分为微生物源农药、植物源农药与生物化学农药。其克服化学农药对生态环境的污染和减少在农副产品中的农药残留量方法具有较大优势，是目前农药领域的重点发展方向之一。

微生物农药是将工业化大量繁殖的有害生物病原微生物活体加以利用的农药，一般具有较高的

特异性，只对靶标生物具有致病性，对人畜低毒，也不能渗透到植物体内。但其作用方式和成分较为复杂，在一定程度上制约其使用，因此对生物农药定性分析具有一定的现实意义。

利用全谱二维液相-QTOF联用系统定性分析微生物发酵液中生物农药，可有效实现高极性和低极性化合物分离和定性分析，同时搭配LCMS-9050正负模式同时扫描，实现4 in1效果，大大提高分析效率，扩展该系统在生物农药领域的应用。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津全谱二维液相与 LCMS-9050 联用系统，具体配置为：

输 液 泵	: LC-40B X3	系 统 控 制 器	: SCL-40
输 液 泵	: LC-40B XR	在 线 脱 气 机	: DGU-405
自 动 进 样 器	: SIL-40C X3	飞 行 时 间 质 谱 仪	: LCMS-9050
柱 温 箱	: CTO-40C (内置 FCV-36AH)		
色 谱 工 作 站	: LabSolutions Ver. 5.114; LabSolutions Insight Ver. 3.7		

1.3 样品前处理

样品用 80%乙腈水溶解，离心经 0.22 μm 滤膜过滤后上机分析。

2. 结果与讨论

2.1 发酵液 TIC 图

发酵液按照 1.3 进行处理后进样分析。正负模式同时采集，TIC 图如下。从 TIC 图中可以看出，发酵液经过全谱二维液相分离后，高级性和低级性化合物实现有效分离。

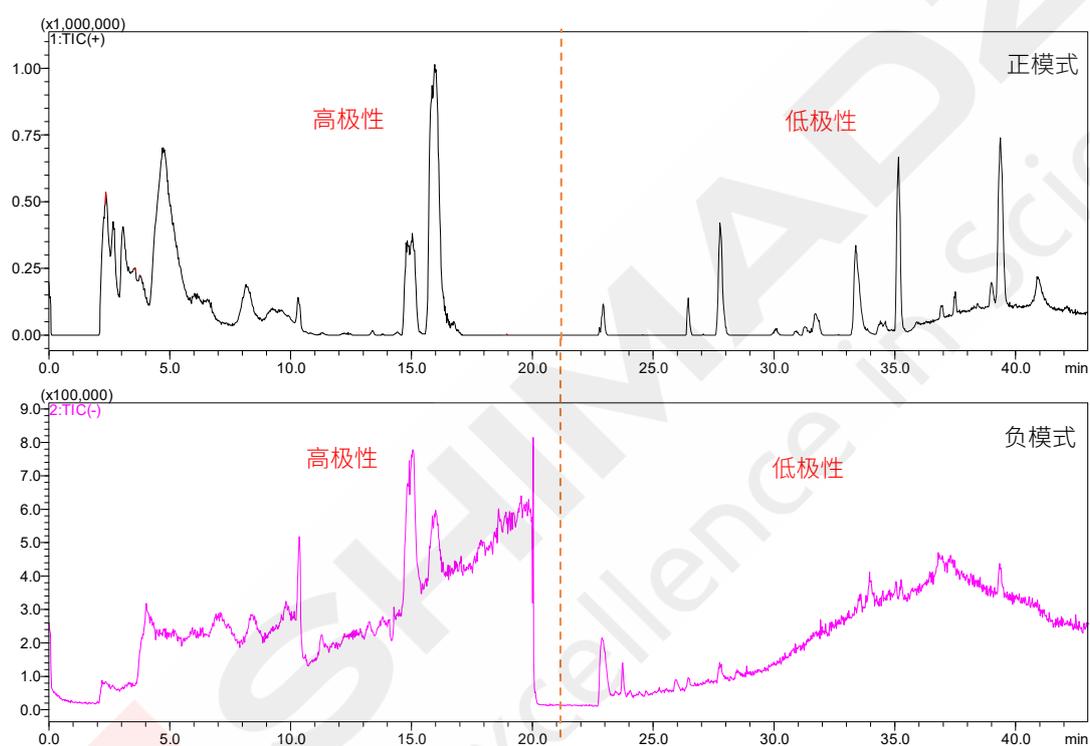


图 2. 发酵液 TIC 图

2.2 仪器稳定性考察

LCMS-9050 进行正负模式同时采集，连续进样 9 次，正模式和负模式 TIC 图重复性非常好，正负模式考察的 m/z 偏差均在 1 ppm 以内，说明正负模式同时采集仪器非常稳定。

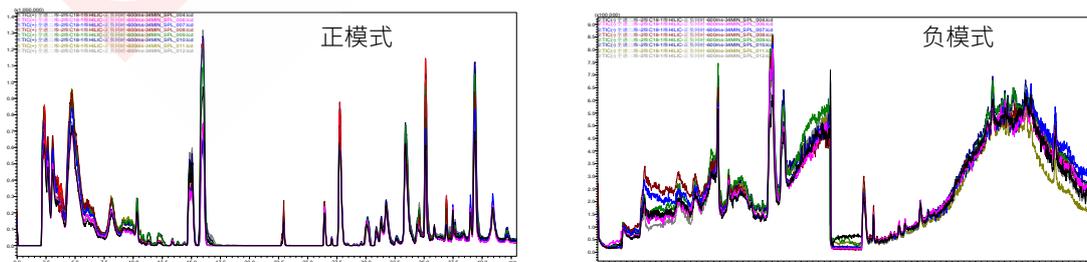


图 3. 发酵液样品正负模式 TIC 重叠图 (n=9)

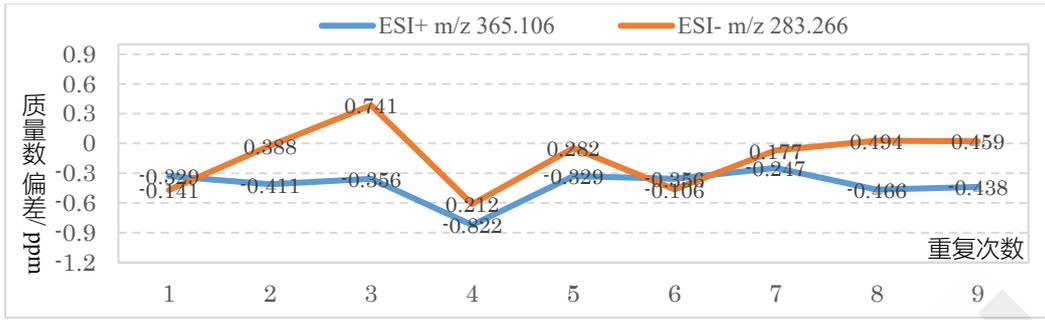


图 4. 正负模式质量数偏差

2.3 全谱二维分离效果考察

该样品使用常规一维系统 (HILIC 柱) 分析中, 有较多物质在 0-2 min 出峰, 无法实现较好分离; 若使用全谱二维系统 (HILIC 柱+C18 柱) 分析, 则可将一维 HILIC 柱 0-2 min 出峰物质切到二维 C18 色谱柱进行分离, 下面对比图可知, 原一维分离较差的组分, 在二维系统上峰形和分离度良好, 表明全谱二维系统能实现有效聚焦和分离。

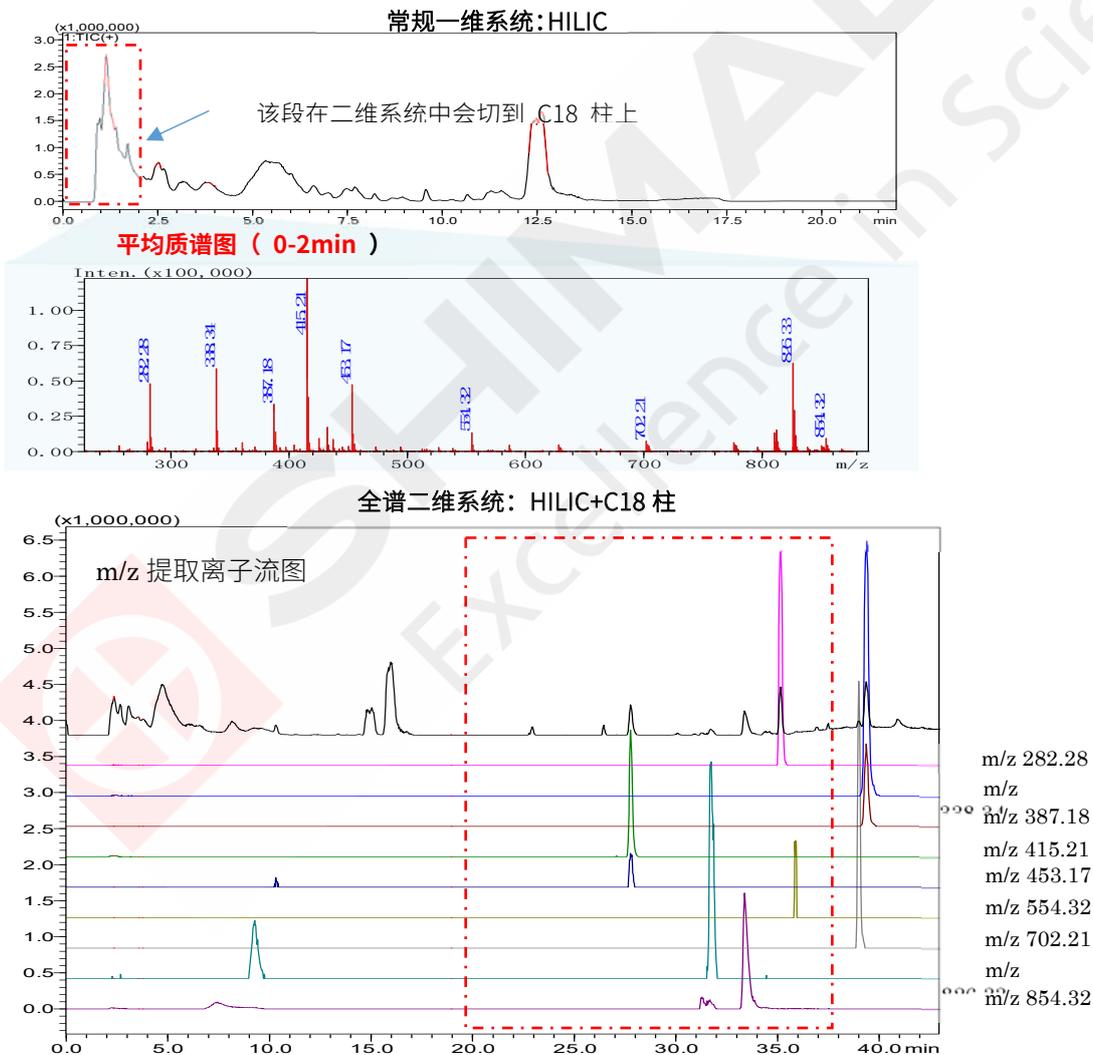


图 5. 全谱二维分离效果考察图

2.4 发酵液分定性分析

使用 MS DIAL 对 DDA 采集的数据进行提取，再结合 Insight Explore 软件对峰面积大于 1% 的组分进行定性分析。

正模式共提取 1110 个 m/z ，负模式共提取 910 个 m/z ，其散点图和提取色谱图如下。

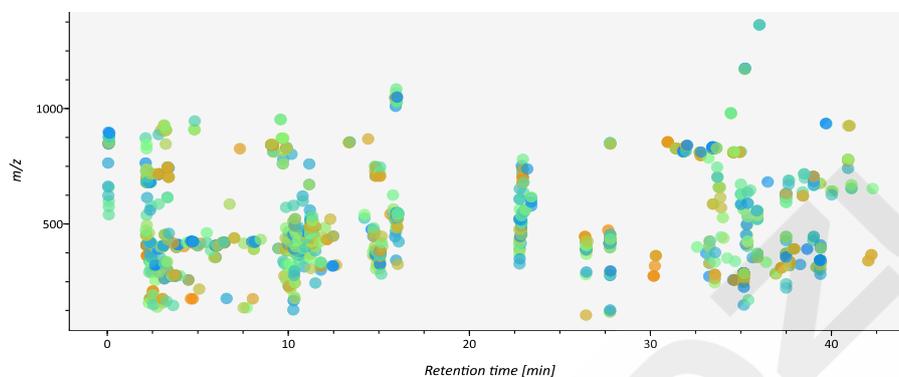


图 6. MS DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI+)

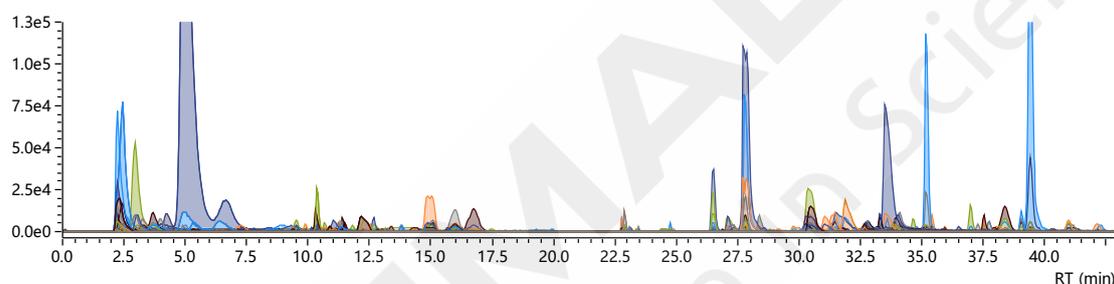


图 7. 提取离子流图 (ESI+)

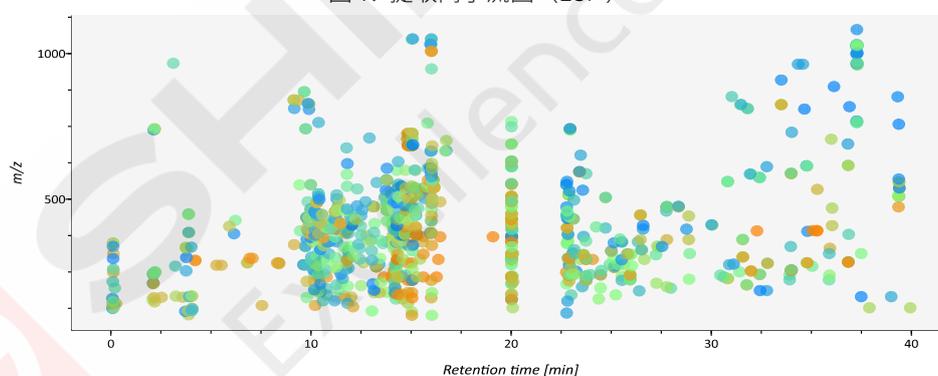


图 8. MS DIAL 软件筛查结果散点图 (ESI-)

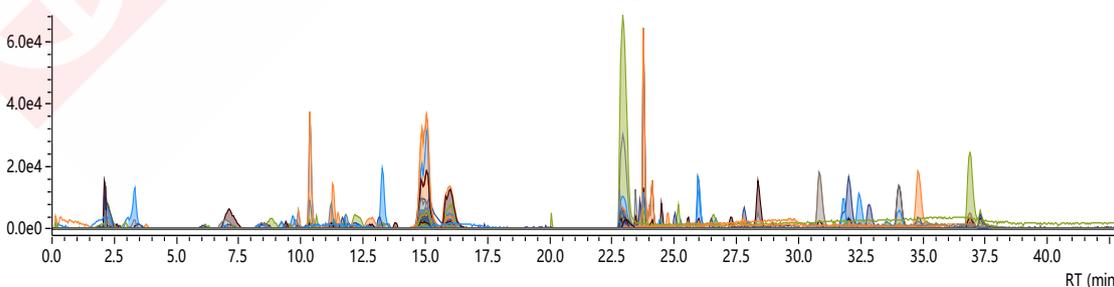


图 9. 提取离子流图 (ESI-)

采用 Insight Explore，对峰面积大于 1% 的组分进行定性分析，部分定性结果见下表。结果显示出样品

中含有多种多肽化合物。

表 2. 目标组分定性结果汇总 (ESI+)

保留时间 (min)	实测 m/z	理论 m/z	加合模式	质量数偏差 (ppm)	推测分子式	峰面积 积比 /%	可能化合物
2.408	416.22574	416.22521	[M+H] ⁺	1.273	C16 H29 N7 O6	3.19	gly-ser-pro-arg
2.407	402.24635	402.24594	[M+NH4] ⁺	1.019	C16 H28 N6 O5	3.45	his-lys-thr
2.662	318.29846	318.29893	[M+H] ⁺	-1.477	C16 H37 N4 O2	2.51	3-[(5-amino-5-carboxypentyl)-methylamino]propyl-dimethyl-[3-(methylamino)propyl]azanium
4.695	418.2415	418.24086	[M+H] ⁺	1.53	C16 H31 N7 O6	3.03	ala-ala-arg-thr
4.724	418.24154	418.24086	[M+H] ⁺	1.626	C16 H31 N7 O6	15.37	lys-arg-asp
6.341	404.26215	404.26159	[M+H] ⁺	1.385	C18 H32 N3 O6	0.98	arg-thr-lys
8.105	420.25685	420.25651	[M+NH4] ⁺	0.809	C16 H30 N6 O6	3.73	glu-arg-val
14.876	365.10338	365.1033	[M+H] ⁺	0.219	C22 H12 N4 O2	3.98	2,3-Diphenylpyrazino[2,3-g]quinoxaline-5,10-dione
15.031	381.07726	381.0776	[M+H] ⁺	-0.892	C12 H13 N O12	1.46	-
15.912	527.15558	527.15541	[M+H] ⁺	0.322	C19 H32 N2 O11 P2	2.25	[1-[[3-[(2S,3S)-2-amino-3-methylpentanoyl]oxy-2,2-dimethylpropanoyl]oxymethoxy-hydroxyphosphoryl]-1-hydroxy-2-pyridinylethyl]phosphonic acid
15.914	543.1294	543.12993	[M+H] ⁺	-0.976	C20 H38 N O4 P6	4.88	-
27.778	415.20883	415.20928	[M+H] ⁺	1.084	C20 H26 N6 O4	1.94	(2S,3S,4R,5R)-N-(Adamantan-1-yl)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furancarboxamide
33.456	826.32351	826.32135	[M+H] ⁺	2.614	C33 H47 N9 O16	3.11	D-Tyrosyl-L-alanyl-glycyl-glycyl-L-alpha-aspartyl-L-alanyl-L-seryl-glycyl-L-glutamic acid
35.142	282.27757	282.2778	[M+H] ⁺	-0.815	C16 H30 N3	2.56	1-(Di-1-piperidinylmethylene)piperidinium
39.407	338.33991	338.3404	[M+H] ⁺	-1.448	C20 H41 N4	3.44	1-Tetradecyl-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1-3,7~]decane

表 3. 目标组分定性结果汇总 (ESI-)

保留时间 (min)	实测 m/z	理论 m/z	加合模式	质量数偏差 (ppm)	推测分子式	峰面积 比, %	可能化合物
10.375	381.09683	381.09798	[M-H] ⁻	-3.018	C21 H18 O7	2.03	mitorubrin
13.245	267.07118	267.07124	[M-H] ⁻	-0.225	C9 H21 N O2 P3	1.14	-
15.019	221.0659	221.06668	[M-H] ⁻	-3.528	C16 C8 H14 O7	1.55	6-O-Acetylglucose
15.02	683.22403	683.22351	[M-H] ⁻	0.761	C29 H48 O12 S3	4.48	(2beta,3alpha,5alpha,6alpha,8xi)-14-Methylergosta-9(11),24(28)-diene-2,3,6-triyl tris(hydrogen sulfate)
15.276	377.08456	377.08561	[M+CL] ⁻	-2.785	C12 H22 O11	1.77	D-Sucrose
15.98	383.11859	383.1195	[M-H] ⁻	-2.375	C14 H24 O12	1.69	1-O-acetyl-alpha-maltose

22.898	237.06104	237.06159	[M-H]-	-2.32	C8 H14 O8	2.01	3-Deoxy-D-manno-octulosonic acid
33.97	255.23201	255.23161	[M-H]-	1.567	C14 H30 N3 O	2.01	4-[(Butylcarbamoyl)amino]-2,2,6,6-tetramethylpiperidinium
35.054	391.28743	391.28875	[M+HCOO]-	-3.373	C20 H42 O2 S	3.61	Didecyl sulfone

3. 结论

使用全谱二维+LCMS-9050 对微生物发酵液生物农药进行定性分析。正负模式同时采集，仪器稳定性良好，m/z 偏差在 1ppm 以内；同时对全谱二维分离效果进行考察，结果表明该系统可对一维保留较差的组分实现有效聚焦和分离；结合 MSDIAL、Insight Explore 软件，对微生物发酵液样品中峰面积大于 1%的组分进行定性分析。综上所述，全谱二维+LCMS-9050 可实现宽极性组分正负模式同时采集，达到“4 in 1”的效果，将大大提高样品分析效率。



SHIMADZU
Excellence in Science

LC-MS/MS 测定微生物中初级代谢产物

摘要： 本文使用三重四极杆液质联用仪和初级代谢产物方法包对大肠杆菌发酵过程中不同时间点的胞内代谢产物进行分析。初级代谢产物方法包共包含 114 种代谢产物，本实验共检出 58 种组分，包括氨基酸类、有机磷酸类、磷酸糖、核苷酸、辅酶等代谢产物。通过比较不同时间点代谢产物的峰面积，得到胞内代谢产物的变化趋势，可用于分析生物合成过程异常的原因。

关键词： 初级代谢产物方法包 合成生物学 LC-MS/MS

技术特点：

- ❖ 本文按照初级代谢产物方法包同时分析 114 种化合物，无需优化分离条件和 MS 参数。
- ❖ 分析合成生物学用大肠杆菌细胞内代谢产物，共检出 58 种代谢产物，并得到了不同时间点的变化趋势。

随着科技的发展，合成生物学(Synthetic biology)作为一门新兴学科正在受到越来越多的关注。合成生物学是在工程学思维的指导下重新设计新的生物体系或对原有生物系统进行深度改造，从而达到某种目的。其中创造或被改造的生物被称之为“底盘”，被改造的一个个硬件，比如DNA、蛋白质等，被称之为“元件”，通过“模块化”设计，将标准化的元件在底盘中拼装，从而构建出新的生物体系。

常被用做“底盘”的有大肠杆菌、酵母等微生物，这些物质通过初级代谢能使营养物质转化为结

构物质、具生理活性物质或为生长提供能量，如氨基酸、核苷酸、多糖、脂类、维生素等。因此初级代谢产物通常都是机体生存必不可少的物质，如果在这些物质的合成过程的某个环节上发生障碍，轻则引起生长停止，重则导致机体发生突变或死亡。

岛津初级代谢产物方法包可对细胞内中枢代谢途径的糖酵解、TCA循环、戊糖磷酸途径及氨基酸、核苷酸等生命科学领域代谢组分析中的114种重要代谢物成分进行同时分析，对正常/病态模型中的重要代谢物变化进行综合分析。

1. 实验部分

1.1 仪器

三重四极杆液质联用仪 LCMS-8060 NX，具体配置信息如下：

系统控制器	: CBM-20A	脱气机	: DGU-20A 5R
输液泵	: LC-20AD×2	自动进样器	: SIL-20AC
柱温箱	: CTO-20AC	质谱仪	: LCMS-8060 NX
色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.114		

1.2 分析条件

色谱条件

色谱柱：见初级代谢产物方法包

流动相：见初级代谢产物方法包

进样体积：3 μL

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

分析时长：20 min

洗脱方式：见初级代谢产物方法包

质谱条件

离子源：ESI (-)

接口温度：270 °C

雾化气：2.0 L/min

加热块温度：400 °C

干燥气：10.0 L/min

接口电压：-1 kV

加热气：10.0 L/min

聚焦电压：-3 kV

D L 温度：250 °C

扫描模式：MRM

No.	化合物名	类别	No.	化合物名	类别	No.	化合物名	类别
1	Lysine	氨基酸	39	Uric acid	嘌呤 衍生物	77	6-Phosphogluconic acid	有机磷酸
2	Arginine	氨基酸	40	Adenosine	核苷	78	Shikimic acid 3-phosphate	有机酸
3	Histidine	氨基酸	41	Lactic acid	有机酸	79	ADP-glucose	有机磷酸
4	4-Aminobutyric acid	氨基酸	42	Glucose 6-phosphate	磷酸糖	80	NADP	辅酶
5	Glycine	氨基酸	43	Tryptophan	氨基酸	81	Cytidine diphosphate	核苷酸
6	Serine	氨基酸	44	Ribose 5-phosphate	磷酸糖	82	KDPG	有机酸
7	Asparagine	氨基酸	45	Sedoheptulose 7- phosphate	磷酸糖	83	3-Phosphoglyceric acid_2- Phosphoglyceric acid	有机磷酸
8	Alanine	氨基酸	46	Fructose 6-phosphate	磷酸糖	84	Uridine diphosphate	核苷酸
9	Glutamine	氨基酸	47	Glycerol 3-phosphate	有机磷酸	85	Guanosine diphosphate	核苷酸
10	Threonine	氨基酸	48	Mannose 6- phosphate	磷酸糖	86	Fructose 1,6-bisphosphate	磷酸糖
11	4-Hydroxyproline	氨基酸	49	Glyceraldehyde 3- phosphate	有机磷酸	87	NADH	辅酶
12	2-Aminobutyric acid	氨基酸	50	Erythrose 4- phosphate	磷酸糖	88	Ribulose 1,5-bisphosphate	磷酸糖
13	Cysteine	氨基酸	51	Glucose 1-phosphate	磷酸糖	89	Adenosine diphosphate	核苷酸
14	Methionine sulfone	标准物质	52	Xylulose 5-phosphate	磷酸糖	90	Thymidine diphosphate	核苷酸
15	Proline	氨基酸	53	Ribulose 5-phosphate	磷酸糖	91	Phosphoenolpyruvic acid	有机磷酸
16	Valine	氨基酸	54	Glycerol 2-phosphate	有机磷酸	92	2-Isopropylmalic acid	有机酸
17	Methionine	氨基酸	55	MEP	有机磷酸	93	FMN	辅酶
18	Cytidine	核苷	56	Fructose 1-phosphate	有机磷酸	94	HMBPP	有机磷酸
19	Isoleucine	氨基酸	57	Orotic acid	有机酸	95	Indole 3-acetic acid	有机酸
20	Leucine	氨基酸	58	Cytidine monophosphate	核苷酸	96	NADPH	辅酶
21	Tyrosine	氨基酸	59	Ribose 1-phosphate	磷酸糖	97	Cytidine triphosphate	核苷酸
22	Guanine	嘌呤衍生 物	60	Dihydroxyacetone phosphate	有机磷酸	98	Phosphoribosyl pyrophosphate	磷酸糖
23	Hypoxanthine	嘌呤衍生 物	61	Pyruvic acid	有机酸	99	FAD	辅酶
24	Xanthine	嘌呤衍生 物	62	Uridine monophosphate	核苷酸	100	Uridine triphosphate	核苷酸
25	Uridine	核苷	63	NAD	辅酶	101	Guanosine triphosphate	核苷酸
26	AICAR	核苷酸	64	Guanosine monophosphate	核苷酸	102	2,3-Bisphosphoglyceric acid	有机磷酸
27	Morpholinoethanes ulfonic acid	标准物质	65	Inosine monophosphate	核苷酸	103	Adenosine triphosphate	核苷酸

28	Thymine	碱基	66	Thymidine monophosphate	核苷酸	104	Thymidine triphosphate	核苷酸
29	Glutamic acid	氨基酸	67	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	核苷酸	105	Pyrrroloquinoline quinone	辅酶
30	Adenine	嘌呤衍生物	68	Pantothenic acid	有机酸	106	Coenzyme A	辅酶
31	Aspartic acid	氨基酸	69	Adenosine monophosphate	核苷酸	107	3-Hydroxybutyryl coenzyme A	辅酶
32	Inosine	核苷	70	Nicotinic acid	有机酸	108	Malonyl coenzyme A	辅酶
33	Phenylalanine	氨基酸	71	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate	核苷酸	109	Acetyl coenzyme A	辅酶
34	Guanosine	核苷	72	4-Hydroxyphenyl pyruvic acid 3-	有机酸	110	IPP_DMAPP	有机磷酸
35	Shikimic acid	有机磷酸	73	Hydroxyphenylacetic acid	苯酚	111	Methylmalonyl coenzyme A	辅酶
36	Glyceric acid	有机磷酸	74	UDP-glucose	核苷酸糖	112	Succinyl coenzyme A	辅酶
37	Glycolic acid	有机酸	75	Xanthosine monophosphate	核苷酸	113	Crotonyl coenzyme A	辅酶
38	Thymidine	核苷	76	2-Ketoglutaric acid	有机酸	114	Butyryl coenzyme A	辅酶

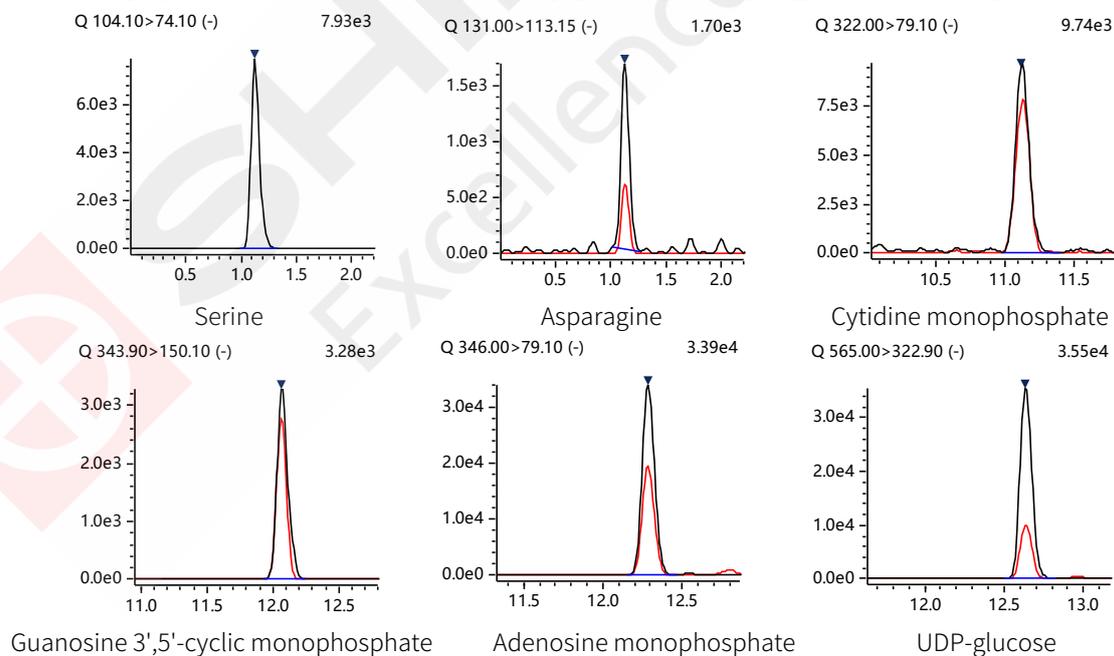
1.3 样品前处理方法

本实验样品为用于合成生物学的大肠杆菌，分别在发酵期间的 18、24、30、54 和 91 小时取样，前处理方法见初级代谢产物分析方法包。

2. 结果与讨论

2.1 部分组分 MRM 色谱图

使用初级代谢产物方法包对 5 个不同时间点的大肠杆菌胞内初级代谢产物进行分析，检出 58 种组分，包含氨基酸类、有机磷酸类、磷酸糖、核苷酸、辅酶等。部分检出组分色谱图如图 1 所示。



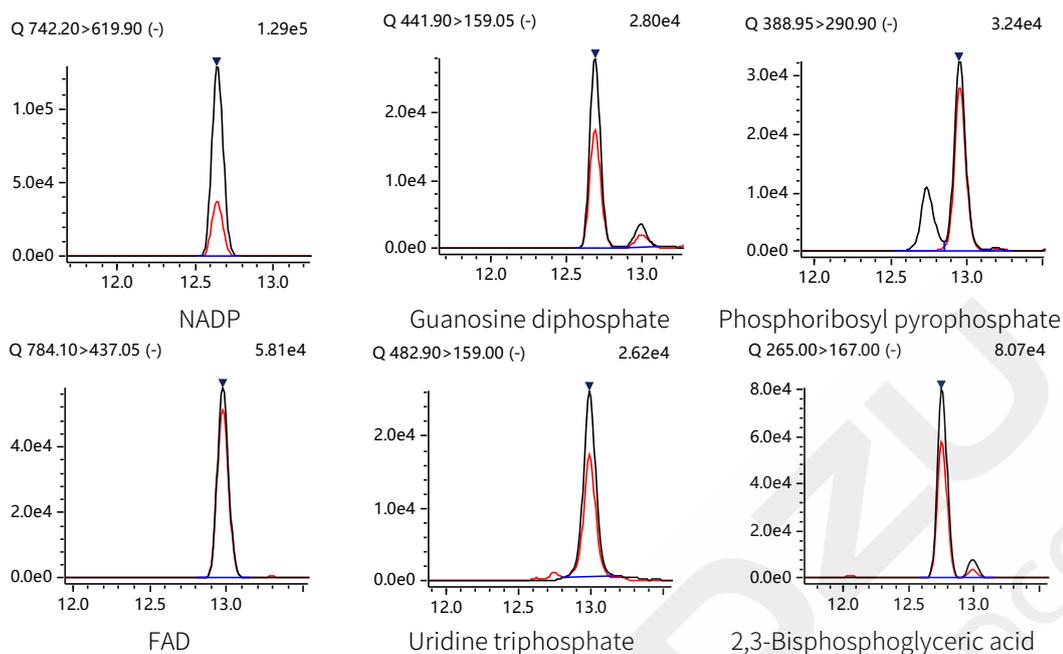
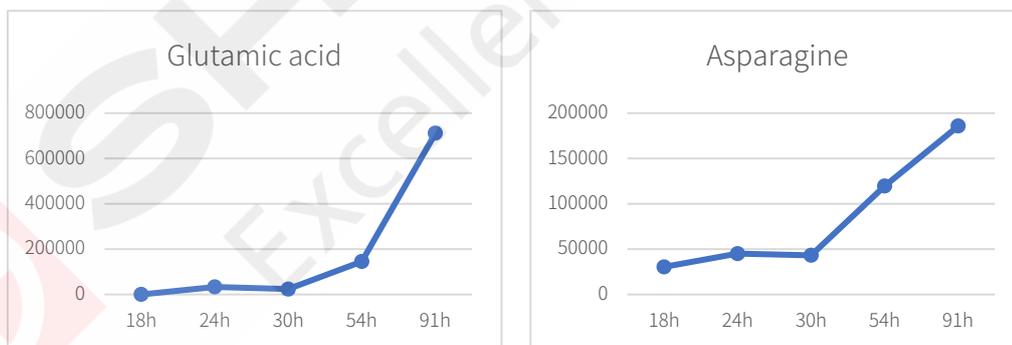


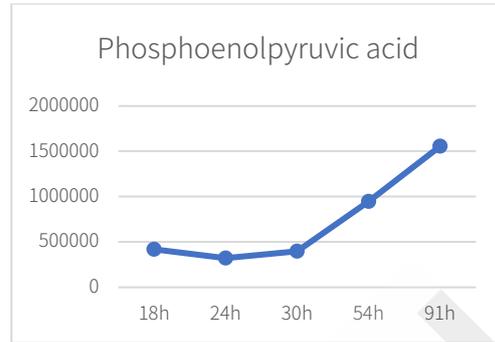
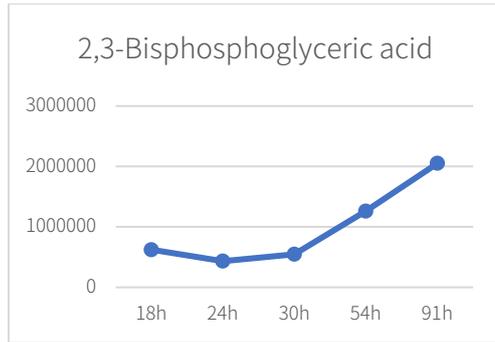
图 1. 部分检出组分 MRM 图

2.2 不同时间初级代谢产物变化趋势图

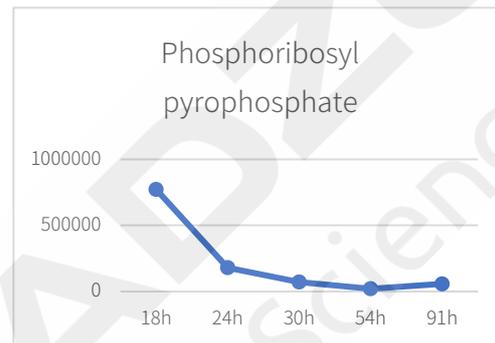
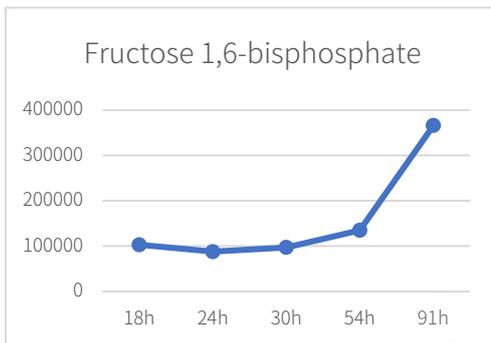
比较 5 个不同时间点的代谢产物峰面积，部分化合物峰面积折线图如图 2 所示。由图可知，随着时间的延长，不同类别的代谢产物存在不同的变化趋势。Glutamic acid 等氨基酸在前 30 h 含量基本维持不变，30 h 后出现较快增长，说明大肠杆菌初级代谢过程中会分泌这类物质。Phosphoribosyl pyrophosphate 等磷酸糖则随着时间的延长，不断降低，表明大肠杆菌初级代谢过程中会消耗这类物质。Cytidine monophosphate 等核苷酸类物质在 30 h 后出现较快速的增加，随后维持稳定。这些初级代谢产物含量随着时间的变化趋势，可用于推断大肠杆菌代谢是否存在异常。



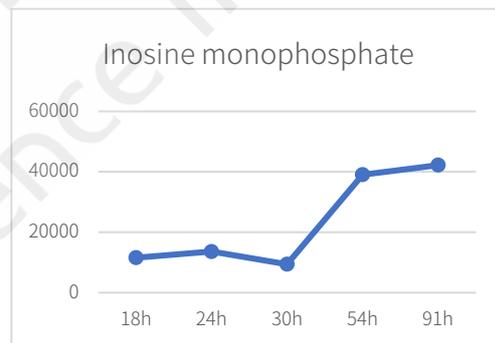
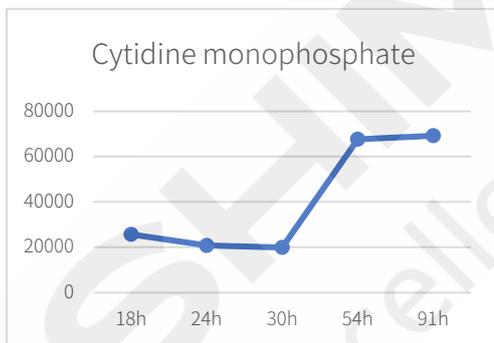
类别：氨基酸



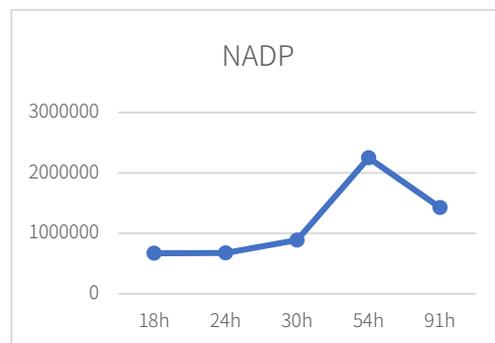
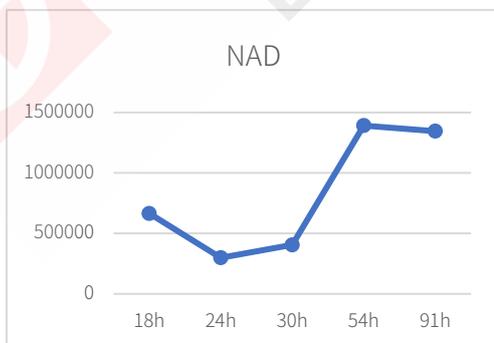
类别：有机磷酸



类别：磷酸糖



类别：核苷酸



类别：辅酶

图 2. 不同时间点代谢产物变化趋势图

3. 结论

本文使用初级代谢物方法包对 5 个不同时间点大肠杆菌胞内初级代谢产物进行分析，比较其初级代谢产物随时间的变化，可用于分析生物合成过程异常的原因。



使用 LC-MS/MS 同时分析 158 种脂质介质成分

脂质介质是具有生理活性脂质的总称，产生于人体内，影响着人体的各种生理机能。因其对糖尿病等与生活习惯有关的各种疾病产生的影响备受瞩目。近年来，随着 LC/MS 分析系统的快速化和高灵敏度化，可以对 100 种成分以上的脂质介质相关物质同时进行分析。因为脂质介质不仅分子量相同，而且 MS/MS 光谱中也存在很多相同的异构体，所以需要通过对 LC 分离和保留时间进行识别，以进行定性分析，得到脂质谱。

为了满足上述需求，岛津开发了使用高效三重

四极杆质谱联用仪 LCMS-8050 对脂质介质同时进行的方法包-“LC/MS/MS 方法包 脂质介质 Version2”。本方法包包括下述列表中 158 种成分的最佳 MRM 参数、LC 条件和保留时间。在此列举目标成分列表及其应用示例。列表中包括花生四烯酸代谢物(包含花生四烯酸的 87 种成分)、EPA 代谢物(包含 EPA 的 18 种成分)、DHA 代谢物(包含 DHA 的 16 种成分)、乙醇酰胺类 11 种成分、其他脂肪酸代谢物 23 种成分、Azelaoyl-PAF、PAF 和 LySO-PAF

表 1. 化合物一览表

No.	分类	成分名称	No.	分类	成分名称	No.	分类	成分名称	No.	分类	成分名称
1	LA	(±)12,13-DIHOME	45	AA	Pros taglandin D ₂	89	AA	12(S)-HETE	133	DHA	7(S),17(S)-hydroxy-DPA
2	LA	(±)9,10-DIHOME	46	AA	11β-13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}	90	AA	(±)9-HETE	134	DHA	(±)20-HDoHE
3	LA	13(S)-HODE	47	AA	15-keto Pros taglandin E ₂	91	AA	5(S)-HETE	135	DHA	(±)16-HDoHE
4	LA	9(S)-HODE	48	AA	14,15-LTC ₄	92	AA	12(S)-HpETE	136	DHA	(±)17-HDoHE
5	LA	(±)9-HpODE	49	AA	13,14-dihydro-15-keto PGF _{2α}	93	AA	12-KETE	137	DHA	(±)13-HDoHE
6	LA	13-KODE	50	AA	5(S),6(R)-Lipoxin A ₄	94	AA	(±)5,6-DHET-lactone	138	DHA	(±)10-HDoHE
7	LA	13(S)-HpODE	51	AA	13,14-dihydro-15-keto PGE ₂	95	AA	5(S)-HpETE	139	DHA	(±)14-HDoHE
8	LA	9-KODE	52	AA	LTD ₄	96	AA	(±)14(15)-EET	140	DHA	(±)11-HDoHE
9	LA	12(13)-EpOME	53	AA	5(S),6(S)-Lipoxin A ₄	97	AA	5-KETE	141	DHA	(±)8-HDoHE
10	LA	9(10)-EpOME	54	AA	14,15-LTE ₄	98	AA	(±)11(12)-EET	142	DHA	(±)8-HDoHE
11	ALA	9(S)-HOTrE	55	AA	13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂	99	AA	(±)8(9)-EET	143	DHA	(±)4-HDoHE
12	ALA	13(S)-HOTrE	56	AA	LTC ₄	100	AA	(±)5(6)-EET	144	DHA	DHA
13	EDA	(±)15-HEDE	57	AA	LTE ₄	101	AA	Arachidonic Acid (AA)	145	EA	PGF _{2α} -ethanolam ide
14	EDA	15-KEDE	58	AA	LTF ₄	102	ADA	1a,1b-dihom o-PGF _{2α}	146	EA	PGE ₂ ethanolam ide
15	AA	tetranor-PGFM	59	AA	8-Is o-PGA ₂	103	DGLA	Throm boxane B ₁	147	EA	PGE ₂ ethanolam ide
16	AA	tetranor-PGEM	60	AA	PGA ₂	104	DGLA	8-Is o-PGF _{1α}	148	EA	PGD ₂ ethanolam ide
17	AA	tetranor-PGDM	61	AA	11-trans -LTC ₄	105	DGLA	8-Is o PGE ₁	149	EA	LTB ₄ ethanolam ide
18	AA	20-hydroxy-PGF _{2α}	62	AA	11-trans -LTE ₄	106	DGLA	PGE ₁	150	EA	(±)14(15)-EET ethanolam ide
19	AA	20-hydroxy-PGE ₂	63	AA	PGJ ₂	107	DGLA	PGD ₁	151	EA	(±)11(12)-EET ethanolam ide
20	AA	18-carboxy dinor LTB ₄	64	AA	PGB ₂	108	DGLA	8-Is o-PGA ₁	152	EA	(±)8(9)-EET ethanolam ide
21	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF _{1α}	65	AA	8,12-Is o-IPF _{2α} -VI 1,5- lactone	109	DGLA	PGA ₁	153	EA	(±)5(6)-EET ethanolam ide
22	AA	2,3-dinor-8-Is o Pros taglandin F _{2α}	66	AA	8(S),15(S)-DIHETE	110	DGLA	15(S)-HETrE	154	EA	AEA (arachidonoyl ethanolam ide)
23	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGF _{1α}	67	AA	6-trans -LTB ₄	111	EPA	8-Is o-PGF _{3α}	155	EA	OEA (oleoyl ethanolam ide)
24	AA	6-keto-Pros taglandin F _{1α}	68	AA	5(S),15(S)-DIHETE	112	EPA	Throm boxane B ₃	156		Lys o-PAF C-16
25	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGD ₂	69	AA	LTB ₄	113	EPA	PGF _{3α}	157		PAF C-16
26	AA	20-carboxy-LTB ₄	70	AA	13,14-dihydro-15-keto PGJ ₂	114	EPA	PGE ₃	158		Azelaoyl-PAF
27	AA	20-hydroxy-LTB ₄	71	AA	12-keto-LTB ₄	115	EPA	PGD ₂	159	IS	tetranor-PGEM-d ₄
28	AA	13,14-dihydro-15-keto-tetranor-PGE ₂	72	AA	N-acetyl-LTE ₄	116	EPA	Lipoxin A ₅	160	IS	6-keto-PGF _{1α} -d ₄
29	AA	6,15-diketo-13,14-dihydro-PGF _{1α}	73	AA	(±)14,15-DHET	117	EPA	(±)17,18-DIHETE	161	IS	Throm boxane B ₂ -d ₄
30	AA	iPF _{2α} -IV	74	AA	12(S)-HHT	118	EPA	(±)14,15-DIHETE	162	IS	PGF _{2α} -d ₄
31	AA	8-Is o-15(R)-PGF _{2α}	75	AA	(±)11,12-DHET	119	EPA	5,6-DIHETE	163	IS	PGE ₂ -d ₄
32	AA	8-Is o-PGF _{2α}	76	AA	(±)8,9-DHET	120	EPA	18(S)-HEPE	164	IS	PGD ₂ -d ₄
33	AA	Throm boxane B ₂	77	AA	20-carboxy arachidonic acid	121	EPA	15(S)-HEPE	165	IS	LTG ₄ -d ₄
34	AA	11β-PGF _{2α}	78	AA	(±)5,6-DHET	122	EPA	12(S)-HEPE	166	IS	LTB ₄ -d ₄
35	AA	5-IPF _{2α} -VI	79	AA	19(S)-HETE	123	EPA	15(S)-HEPE	167	IS	5(S) HETE-d ₈
36	AA	8-Is o-15-keto PGF _{2α}	80	AA	15-deoxy-delta12,14-PG ₂	124	EPA	15(S)-HpEPE	168	IS	12(S) HETE-d ₈
37	AA	PGF _{2α}	81	AA	20-HETE	125	EPA	12(S)-HpEPE	169	IS	15(S) HETE-d ₈
38	AA	8-Is o-13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}	82	AA	(±)18-HETE	126	EPA	5(S)-HpEPE	170	IS	PAF C-16-d ₄
39	AA	8-Is o-PGE ₂	83	AA	(±)17-HETE	127	EPA	17(18)-EpETE	171	IS	OEA-d ₄
40	AA	PGE ₂	84	AA	(±)16-HETE	128	EPA	EPA	172	IS	EPA-d ₅
41	AA	11-dehydro Throm boxane B ₂	85	AA	15(S)-HETE	129	DHA	Res olvin D ₂	173	IS	DHA-d ₅
42	AA	15-keto PGF _{2α}	86	AA	11(S)-HETE	130	DHA	Res olvin D ₁	174	IS	AA-d ₈
43	AA	5(S),14(R)-LXB ₄	87	AA	8(S)-HETE	131	DHA	7(R)-Mares in 1			
44	AA	PGK ₂	88	AA	15(S)-HpETE	132	DHA	10(S),17(S)-DIHDoHE			

备注：分类缩写 LA:linoleic acid, ALA: a-inolenic add,EDA: icosadienio add, AA: arachidonic acid, ADA: adrenic add, DGLA.dihomo- y -linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, EA: ethanolamide 成分名缩写 PG: prostaglandin, LT:leukotrien, DiHOME: dihydroxyoctadecenoic acid, HODE: hydroxyoctadecadienio acid, Hp:hydroperoxy, KODE:keto-octadecadienio acid, HETE: hydroxyeicosatetraenio acid, EET:epoxyeicosatrienio acid)

1. 分析条件

HPLC 条件

色 谱 柱 : Phenomenex Kinetex C8 (150 mm L.x 2.1 mm I.D., 2.6 μ m)
流 动 相 : A-0.1%甲酸水, B-乙腈 流 速 : 0.4 mL/min
柱 温 : 40°C 进 样 体 积 : 5 μ L
洗 脱 程 序 : 10% B.(0 min)→25 %B.(5.0 min)→35 %B.(10.0 min)-75 % B.(20.0 min)→95 %
B.(20.1-25.0 min)

MS 条件

离 子 源 : ESI(正/负) 雾 化 气 流 速 : 3.0 L/min
干 燥 气 流 速 : 10.0 L/min 加 热 气 流 速 : 10.0 L/min.
D L 温 度 : 250°C 加 热 模 块 温 度 : 400°C
接 口 温 度 : 300°C C I D 气 压 : 230 kPa

2. 分析结果

根据 16 种内标成分将脂质介质 158 种成分进行分组, 采用接近保留时间的内标峰进行校正, 可实现高精度的峰识别。图 1 为从大鼠脑组织中检测识别的 8-iso-PGF_{2a}、8-iso-15(R)-PGF_{2a}、PGE₁和 PGD₁的色谱图。上方为标准样品混合溶液的色谱图。经比较可知, 内标样品的保留时间差与生体样品中基本相同, 说明峰识别精度高。

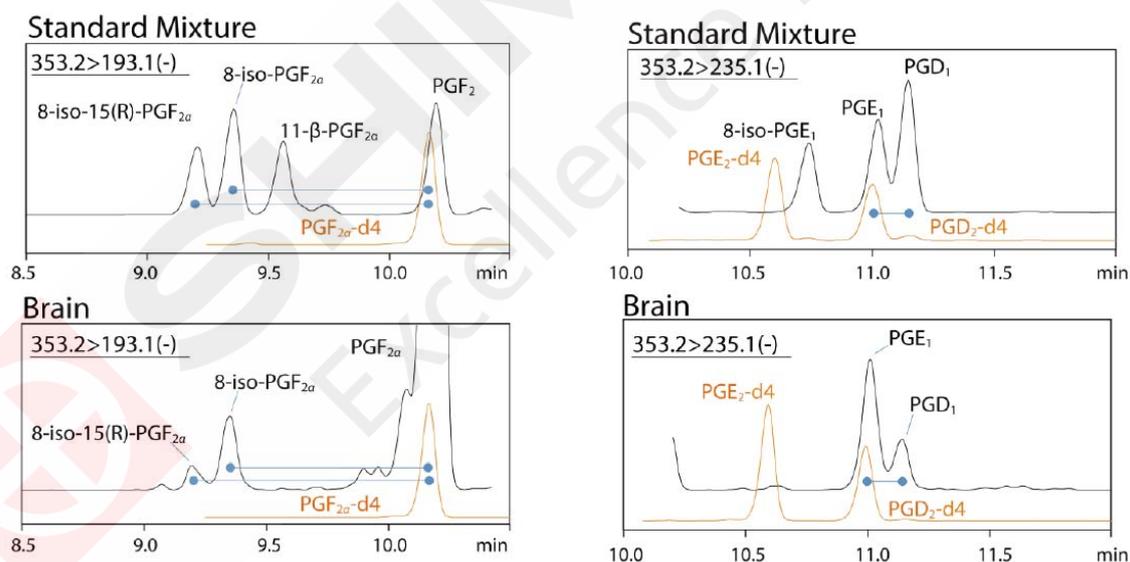


图 1. 标准样品混合溶液与老鼠脑脂质萃取溶液的 8-iso-PGF_{2a} (左)与 PGD₁(右)MRM 色谱图

摘出大鼠的脑、肝脏和脾脏后用液氮速冻, 分别称量冰冻组织, 再向组织中添加甲醇与内标混合溶液以进行脂质萃取。用甲酸稀释萃取溶液, 通过固相萃取精制和浓缩后进行同时分析。图 2 为 3 种组织中检测到的 78 种成分的脂质谱。对所有成分绘制标准曲线, 将所得定量值以对数方式标注在纵轴。纵轴单位是组织每单位重量的含量(fg/mg tissue)。由图可知, 肝脏的 PGE_z 为 0.10pg/mg tissue, 脑的 PGD_z 为 143 pg/mg tissue, 表明在低浓度范围可得到动态范围大的脂质谱。

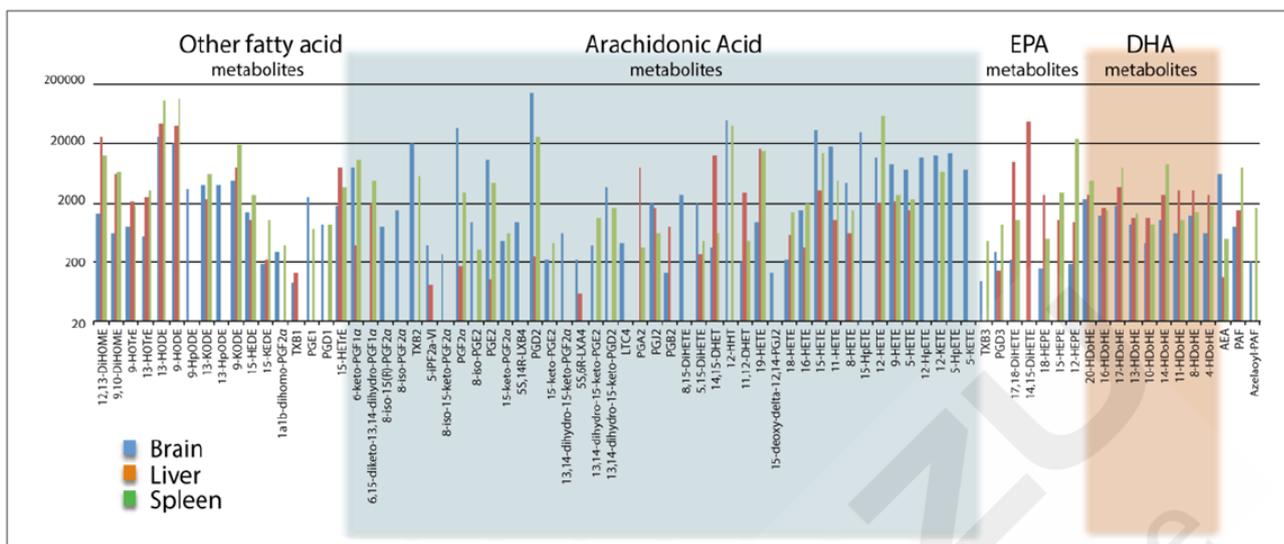


图 2. 大鼠脑、肝脏和脾脏的脂质谱

GCMS 结合岛津代谢物数据库快速筛查冻干菌丝体中有机酸

摘要：本文利用气相色谱质谱联用仪GCMS-QP2020结合岛津代谢物数据库建立了一种快速筛查冻干菌丝体中有机酸的方法。代谢物数据库包括保留指数、质谱图、化合物信息（CAS序列号和结构式）以及311种代谢物的方法文件（氨基酸、脂肪酸、有机酸）。AART功能的使用可快速创建代谢物分析条件，使用带保留指数的质谱库进行检索可以显著减少候选化合物数量，增加检索结果的可靠性。该方法操作简单便捷，可实现冻干菌丝体中有机酸的快速筛查。

关键词：GCMS 代谢物数据库 AART

岛津代谢物数据库包含下列内容：四份方法文件，氨基酸（EZ:faastTM 衍生物）、脂肪酸（甲基衍生物）以及有机酸/氨基酸（三甲基硅烷基衍生物）分析条件、质谱图和保留指数；四个库，包含氨基酸、脂肪酸以及有机酸代谢组分化合物信息（含CAS号）、261张EI源质谱图、50张CI源质谱图和保留指数。

本文使用有机酸（甲酯化衍生物）数据库，结合

指定的色谱柱和分析条件，通过分析正构烷烃标准溶液，以AART（保留时间自动校正，Automatic Adjustment of Retention Time）功能在没有有机酸标准品的情况下获得目标化合物的保留时间，并自动完成50种有机酸甲酯化产物的分析方法建立。该流程简单，操作简单便捷，可用于冻干菌丝体中有机酸的快速筛查。

1 实验部分

1.1 仪器

岛津气相色谱质谱仪 GCMS-QP 2020

1.2 分析条件

GCMS条件

色 谱 柱 : DB-5, 30 m × 0.25 mm × 1.00 μm

进 样 口 温 度 : 280°C

进 样 方 式 : 不分流进样

载 气 : He

载气控制方式 : 恒线速度 43.0 cm/sec

柱 温 程 序 : 40°C(2 min)_6°C/min_320°C(1 min)

离子化方式 : EI

离子源温度 : 200°C

溶剂延迟时间 : 2.25 min

采 集 方 式 : Scan (m/z 45~500)

1.3 样品制备

称取 1.5g 冻干菌丝体于 15mL 离心管中，加入 10mL 甲醇浸泡，超声 1h，离心，取上清液，旋蒸干燥。加入 3mL NaOH-甲醇溶液 (2gNaOH+100ml 甲醇，甲醇含水量<0.5%)，氮气密封，70°C搅拌反应 30min，室温冷却 3min。加入 3.5mL BF₃-甲醇溶液 (12-15% BF₃-甲醇溶液)，氮气密封，70°C搅拌 30min，室温冷却 3min。加入 2-3mL 正庚烷，氮气密封，70°C搅拌 5min，加入 5mL 饱和 NaCl 溶液，振荡，静置分层。吸取 1mL 上层正庚烷，加入少量无水 Na₂SO₄，进样 1μL 于 GCMS-QP2020 分析。

2 结果讨论

2.1 分析方法建立流程

使用分析方法包中的 FA_ME_DB5MS_EI_V3_Scan.qgm 方法采集 C9~C33 正构烷烃标品，用于推算有机酸甲酯化产物组分的保留时间。正构烷烃标品色谱图见图 1。

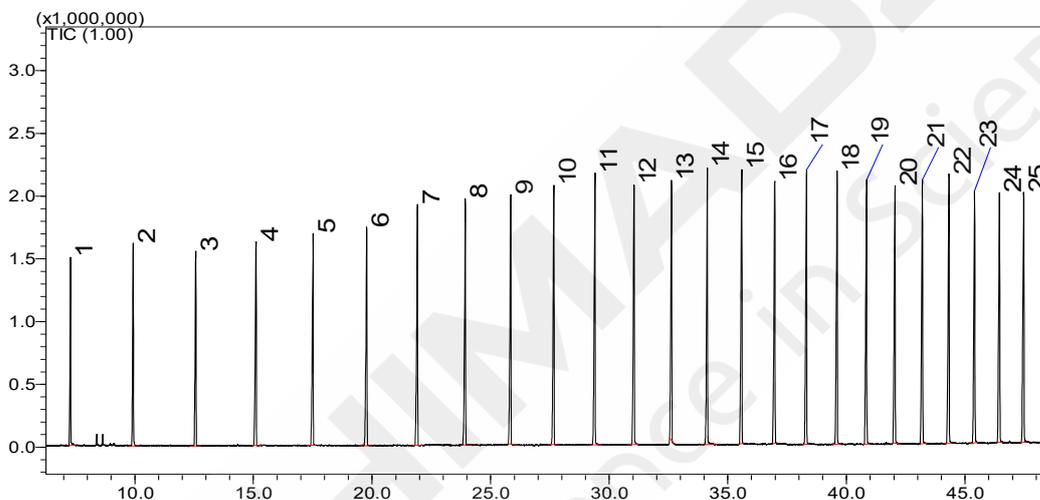


图 1. 正构烷烃 (C9-C33) 色谱图

利用以上所得的数据及 FA_ME_MRM_EI_V3.xlsm 数据库自动创建 50 种有机酸甲酯化产物的分析方法。数据库创建方法界面见图 2。

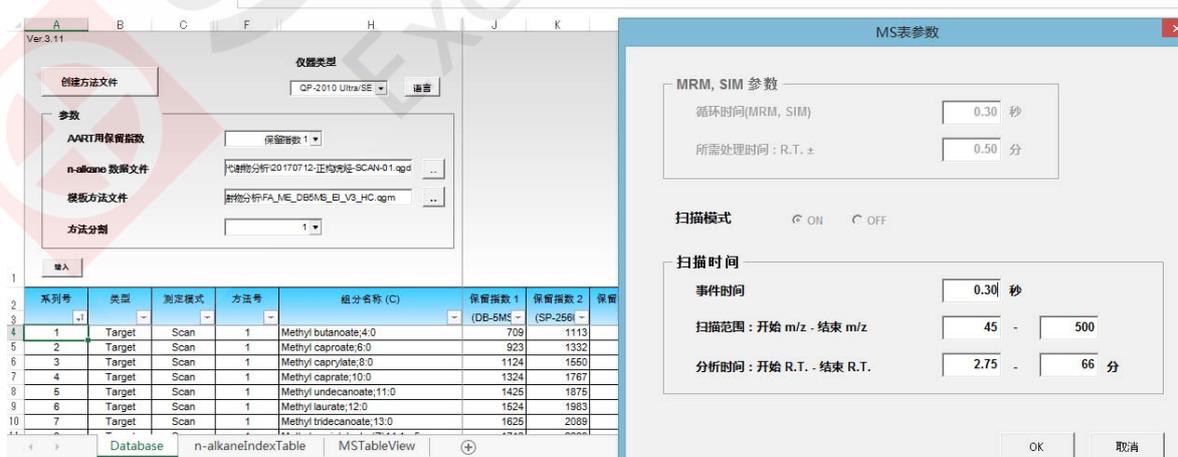


图 2. 数据库创建界面图

2.2 冻干菌丝体测定结果

采用 GCMS-QP2020 单四级杆气质联用仪和代谢物数据库建立了一种冻干菌丝体中有机酸的分析方法，分析结果见图 3，筛查结果见表 1。

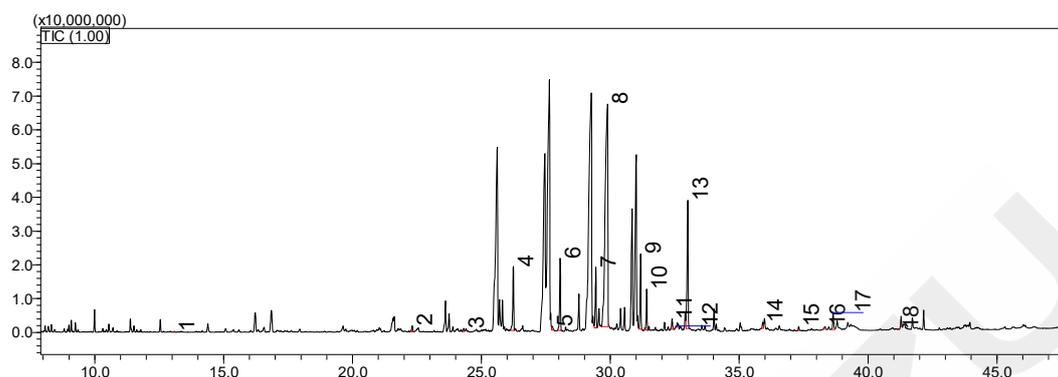


图 3. 冻干菌丝体分析结果 TIC 图

表 1. 冻干菌丝体中有机酸筛查结果

No	英文名称	中文名称	保留时间 (min)	CAS 号	相似度
1	Methyl caprylate	辛酸	13.10	124-07-2	95
2	Dodecanoic acid	十二烷酸	22.32	143-07-7	93
3	Tridecanoic acid	十三烷酸	24.32	638-53-9	94
4	Tetradecanoic acid	十四烷酸	26.24	544-63-8	95
5	cis-10-pentadecenoate	顺十五碳-10-烯酸	27.75	84743-29-3	94
6	Pentadecanoic acid	十五烷酸	28.05	1002-84-2	95
7	Hexadec-9-enoic acid	棕榈油酸	29.44	373-49-9	94
8	Hexadecanoic acid	十六烷酸	29.89	57-10-3	88
9	cis-10-heptadecenoate	10-顺-十七碳烯酸	31.17	29743-97-3	94
10	margarate;	十七烷酸	31.41	506-12-7	95
11	9-cis,11-trans-octadecadienoate	9-顺, 11-反-十八碳二烯酸	32.43	2540-56-9	82
12	cis-7-octadecenoate	反-7-十八碳烯酸	32.55	13126-31-3	93
13	Octadecanoic acid	十八烷酸	33.00	57-11-4	95
14	Icosanoic acid	二十烷酸	35.91	506-30-9	86
15	Henicosanoic acid	二十一烷酸	37.30	2363-71-5	94
16	erucate	芥酸	38.30	112-86-7	78
17	Docosanoic acid	二十二烷酸	38.64	112-85-6	92
18	Tetracosanoic acid	二十四烷酸	41.17	557-59-5	91

3 结论

利用岛津GCMS-QP2020单四级杆气质联用仪结合代谢物数据库建立了一种快速筛查冻干菌丝体中有机酸的方法。通过采集正构烷烃数据文件、使用AART(Automatic Adjustment of Retention Time) 功能在无标准样品的情况下精确预测代谢物数据库内化合物保留时间，从而快速创建筛查分析方法。本次实验有效筛查出有机酸成分18种，方法创建流程简单，分析速度快，适合冻干菌丝体中有机酸的快速筛查分析。

GCMSMS 结合代谢物谱库分析芽胞杆菌代谢物

摘要：代谢组学主要研究的是作为各种代谢路径的底物和产物的小分子代谢物，本文使用岛津三重四极杆串联气质联用仪并结合代谢物谱库，成功分析了发酵的芽胞杆菌胞内代谢物。

关键词：三重四极杆串联气质、代谢物谱库、芽胞杆菌胞内代谢物

自1999年英国教授Nicholson提出代谢组学一词后，代谢组学得到了快速的发展，并渗透到多项领域，比如疾病诊断、医药研制开发、环境学，植物学等与人类健康护理密切相关的领域。代谢组学主要研究的是作为各种代谢路径的底物和产物的小分子代谢物，其样品主要是动植物的细胞和组织的提取液。气相色谱-质谱及三重四极杆串联气质技术作

为代谢组学的研究手段也得到了广泛的应用。岛津开发了代谢物谱库，该谱库覆盖了568种（Scan）、475种（MRM）化合物的质谱图、保留指数、MRM定量定性离子对等信息，可实现在无标准品情况下的快速筛查检测与确证。本文使用岛津代谢物谱库，有效定性了发酵芽胞杆菌胞内的代谢物。

1 实验部分

1.1 仪器

GCMS-TQ8040 三重四极杆串联气质联用仪

1.2 分析条件

GCMS分析条件：

色 谱 柱	： BPX-5 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)	柱 流 量	： 1.14 mL/min
柱 温 程 序	： 60°C (2 min)_15°C/min_330°C (3 min)	分 流 比	： 5:1
载气控制方式	： 恒线速度	接 口 温 度	： 280 °C
进 样 方 式	： 分流进样	质 量 范 围	： 45~600 amu
离 子 源 温 度	： 200 °C		
采 集 模 式	： SCAN/MRM		

1.3 样品前处理

取在发酵培养基中发酵的芽胞杆菌细胞，与等量的0.25 mol/L高氯酸混合后，在-10°C进行淬灭10 min。以10000 rpm、0°C条件下离心5 min，在4°C下用0.9% NaCl溶液洗涤细胞两次，再以10000 rpm、0°C离心5 min，用75%乙醇90°C抽提细胞10 min后，转入-40°C抽提5 min，离心，取上清则为其胞内代谢物。在冻干后的细胞抽提物中，加入40 μL 20 mg/ml的甲氧胺盐酸盐吡啶溶液，37°C脎化90 min，再加入10 μL内标溶液乙酸苯乙酯/吡啶（5:1000），50 μL BSTFA，37°C衍生化60 min后稀释10倍，取1 μL进样。

2 结果与讨论

2.1 发酵芽胞杆菌胞内代谢物衍生产物TIC图

25	Psicose-meto-5TMS(2)	13.576	1855	33760
26	Tagatose-meto-5TMS(2)	13.574	1854	6193
27	Sorbose-meto-5TMS(1)	13.582	1855	6135
28	Fructose-meto-5TMS(1)	13.577	1855	41956
29	Sorbose-meto-5TMS(2)	13.582	1855	6135
30	Allose-meto-5TMS(1)	13.574	1854	25266
31	Myristic acid-TMS	13.504	1844	339752
32	Fructose-meto-5TMS(2)	13.576	1855	10403
33	Mannose-meto-5TMS(1)	13.574	1854	65461
34	Galactose-meto-5TMS(1)	13.576	1855	68164
35	Vanilmandelic acid-3TMS	13.687	1870	517
36	Glucono-1,5-lactone-4TMS	13.576	1855	59543
37	Glucose-meto-5TMS(1)	13.573	1854	88520
38	Hippuric acid-TMS	13.576	1855	1040328
39	Mannose-meto-5TMS(2)	13.575	1854	39757
40	Allose-meto-5TMS(2)	13.76	1881	41003
41	Erythrose 4-phosphate-meto-4TMS(1)	13.772	1882	2824
42	Erythrose 4-phosphate-meto-4TMS(2)	13.691	1871	16330
43	Galactose-meto-5TMS(2)	13.758	1880	36150
44	Glucose-meto-5TMS(2)	13.76	1881	41001
45	5-Dehydroquinic acid-5TMS	13.689	1870	6059
46	Glucosamine-5TMS(1)	13.892	1899	106512
47	Mannitol-6TMS	13.759	1880	26773
48	Sorbitol-6TMS	13.807	1887	7577
49	Galactitol-6TMS	13.896	1900	9828
50	Galacturonic acid-meto-5TMS(1)	13.891	1899	13803
51	Urocanic acid-TMS	14.077	1927	449
52	Glucuronic acid-meto-5TMS(2)	13.891	1899	13787
53	Ureidosuccinic acid-3TMS	14.113	1932	2404
54	Galactosamine-5TMS(2)	14.151	1938	420
55	Ascorbic acid-4TMS	14.115	1932	23010
56	Galacturonic acid-meto-5TMS(2)	14.111	1932	26656
57	N-Acetyl-Ornithine-4TMS	14.112	1932	5028
58	Gluconic acid-6TMS	14.114	1932	44192
59	Palmitoleic acid-TMS	14.829	2040	11499
60	Palmitic acid-TMS	14.831	2041	7069962
61	Inositol-6TMS(2)	14.885	2049	2153
62	Dopa-4TMS	15.008	2068	369
63	Ribulose 5-phosphate-meto-5TMS(2)	14.951	2059	1285
64	Norepinephrine-5TMS	15.486	2145	143382
65	Octadecanol-TMS	15.499	2147	6697
66	Cystamine-nTMS	15.787	2194	63672

67	Oleic acid-TMS	15.917	2215	22612
68	Elaidic acid-TMS	15.913	2215	49035
69	Spermidine-5TMS	15.988	2227	373
70	Stearic acid-TMS	16.048	2237	2627925
71	Uridine-4TMS	17.244	2448	7857
72	5-Methoxytryptamine-3TMS	17.246	2449	58123
73	Uridine-3TMS	17.251	2450	5690
74	Docosahexaenoic acid-TMS	17.858	2564	8581
75	Sucrose-8TMS	17.85	2563	24968
76	Batyl alcohol-2TMS	18.35	2661	4632
77	Maltose-meto-8TMS(1)	18.448	2681	16046
78	Trehalose-8TMS	18.45	2681	35944
79	Lactitol-9TMS	18.499	2691	6680
80	Monostearin-2TMS	18.816	2757	1348748

2.3 发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物MRM谱图

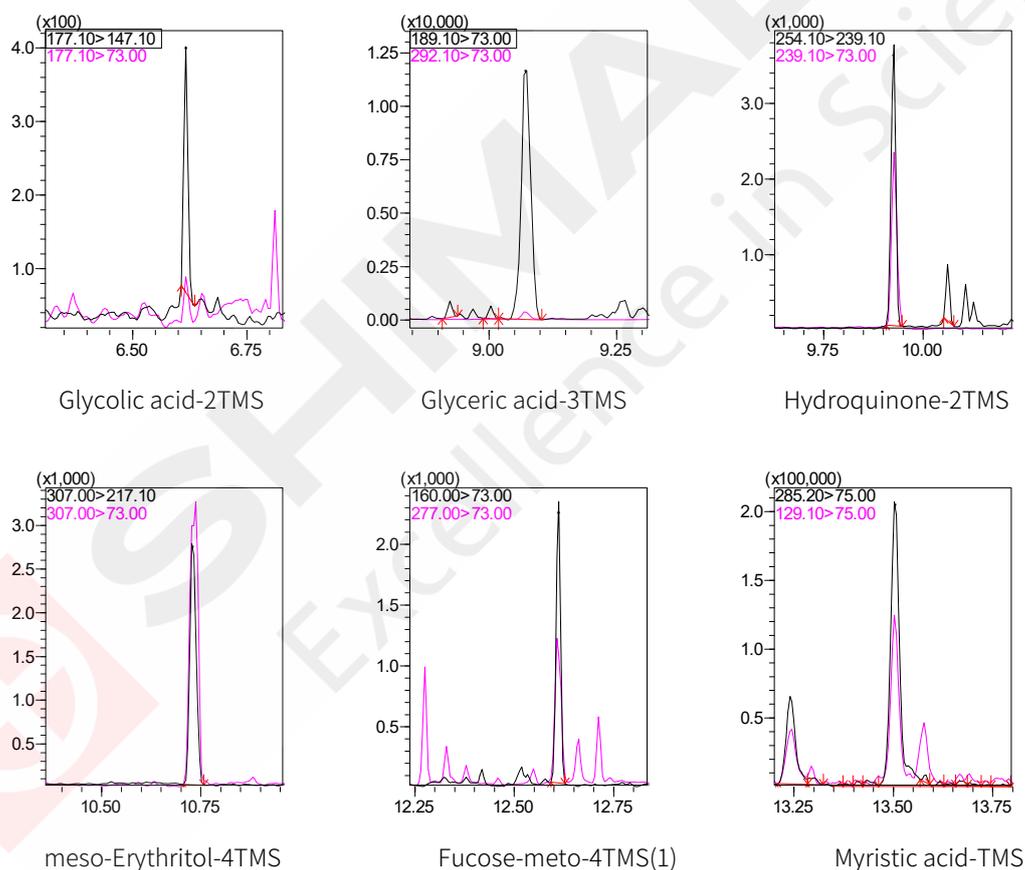


图 2. 发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物 MRM 图

2.4 发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分化合物的检索结果

本方法采用 Scan/MRM 同时数据采集模式，在得到 MRM 数据的同时，利用 Scan 采集得到的质谱图和代谢物质谱库中标准质谱图进行相似度检索，进一步定性确证该代谢物。发酵芽孢杆菌胞内代谢物部分

化合物的检索结果如下图 3 所示。

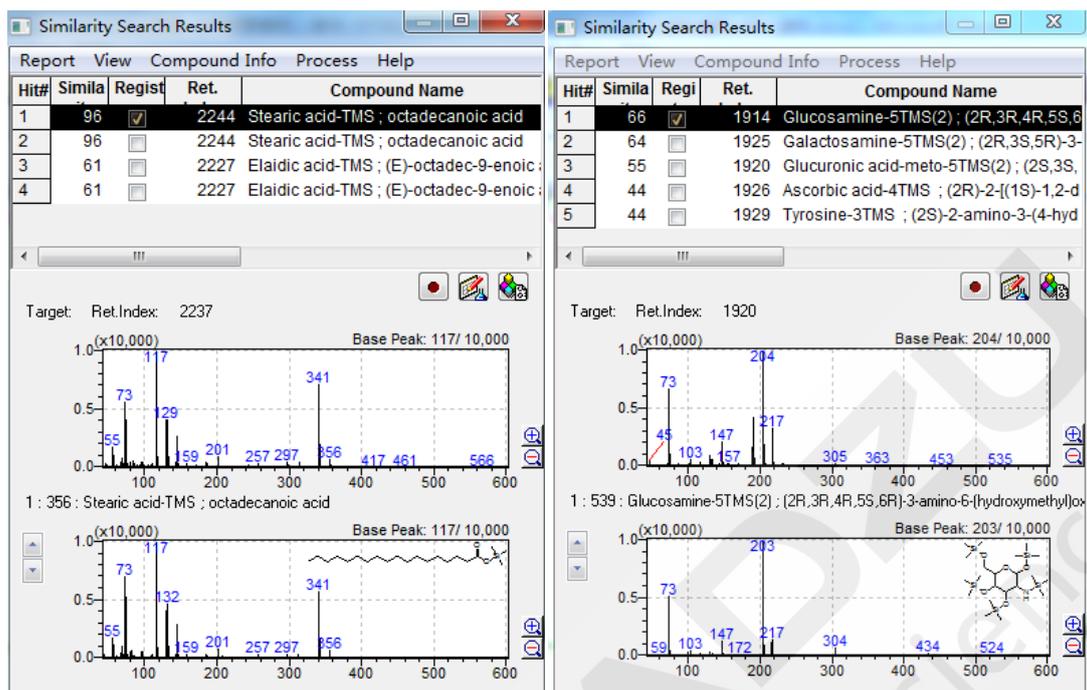


图 3. 部分化合物检索结果

3. 结论

使用岛津三重四极杆气质联用仪GCMS-TQ8040及代谢物谱库对发酵芽孢杆菌胞内代谢物进行定性分析，可鉴定80余种代谢物，显示代谢物谱库强大的定性能力，可以有效定性测定多种代谢物。

第 5 章 底盘细胞代谢通路分析-胞外代谢物和无

机元素分析

微生物培养是合成生物学中的基础操作，影响着微生物代谢的调控及目标产物的合成效率。在合成生物学的研究中，微生物常作为“细胞工厂”被设计和改造用于生产药物、化工品、能源等多种产品，因此精确控制培养条件至关重要。通过优化培养环境，如温度、pH、氧气供给和培养基成分，能够大幅提升微生物的生长速度和代谢活性，进而提高目标产物的产量。同时，培养条件的优化也有助于微生物在工业化生产中的稳定性和可重复性，因此微生物培养是合成生物学中必不可少的一部分，直接影响着生物制造效率和成本。

培养基营养成分在微生物的代谢过程中扮演着至关重要的角色，如氨基酸、核苷酸、维生素、无机元素等，它们为微生物的生长和代谢提供了必需的营养和矿物质。为了优化微生物培养和提高目标产物的合成效率，岛津提供了细胞培养分析方法包和高效的 ICP（电感耦合等离子体）技术，帮助研发人员快速分析培养基中的有机成分和无机元素。通过对这些有机营养成分的测定，研究人员可以根据微生物的代谢需求调整培养基配方，确保其代谢途径的有效性与目标产物的高效生产。

此外，微生物在培养过程中会有部分代谢物分泌至培养基中，分析微生物胞外代谢物对于了解微生物的代谢途径和生产能力具有重要意义。例如，代谢流的失衡可能导致某些代谢产物的积累，而这些代谢产物的浓度波动又能反映微生物的代谢活动。岛津细胞培养分析方法包中目标物除培养基中有机营养成分外，也包含部分胞外代谢物。使用此方法包对胞外代谢物的分析，研究人员能够精确评估微生物的产物生产能力，进一步指导代谢工程和基因改造的优化。

第三代细胞培养分析方法包监控微生物发酵过程

摘要：本文使用三重四极杆液质联用仪结合第三代细胞培养分析方法包建立了半定量分析抗生素发酵液成分的方法，采集不同时间发酵液中 144 种化合物的相对含量，采用多组学整合分析工具 Multi-omics 绘制不同类别化合物含量变化趋势，用于判断发酵液成分含量的变化对抗生素产量的影响。该方法可在 17 min 内完成 144 种化合物的分析，分析速度快、灵敏度高、抗干扰能力强，适合发酵液中糖类、氨基酸类、核苷类和维生素类等化合物的快速检测。

关键词：三重四极杆质谱仪 发酵液 细胞培养分析方法包

技术特点：

- ❖ 基于三重四极杆液质联用仪，第三代细胞培养分析方法包最快可在 17 min 内完成 144 种化合物的分析，无需方法优化。
- ❖ 配备多组学整合分析工具 Multi-omics，可根据代谢通路快速绘制不同类别化合物及其代谢物含量变化趋势图。

发酵工程作为现代生物技术的一个重要组成部分，具有广阔的应用前景。例如，用基因工程的方法有目的地改造原有的菌株并且提高其产量；利用微生物发酵生产药品，如人的胰岛素、干扰素和生长激素等。但是由于微生物发酵过程，机理十分复杂，影响因素错综复杂，为了对发酵过程进行优化控制，保持微生物生长按照一定的生长轨迹生长，需要确保微生物生长的环境条件为最优。

传统的方式是通过控制微生物生长环境参数如温度、pH值、溶氧度等来实现的。但是由于缺乏量化的依据，传统的方式难以准确的对发酵过程中各成份的变化进行监控，所以在从实验室到中试，从

中试到大规模生产过程中会出现许多问题，因此开发一种能准确的对发酵过程中各组分进行量化监控的方法是十分必要的。

岛津开发了“细胞培养分析方法包”，目前该方法包已升级至第三代，包括培养基上清液组分和细胞内代谢物，共144种化合物。分析采用三重四极杆液质联用仪，仅需17分钟，即可同时监测分析144种培养上清液营养成份和代谢物的相对含量变化，结合多组学整合分析工具Multi-omics提供的代谢分类趋势图，为发酵过程中各组分的量化监控提供了有效的手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40D XR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器	： SCL-40	自动进样器	： SIL-40C XR
输液泵	： LC-40D XR	质谱仪	： LCMS-8050
柱温箱	： CTO-40S	色谱工作站	： LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机	： DGU-405		

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 (P/N: 225-46320-93)

流 动 相 : 见细胞培养基上清液分析方法包

柱 温 : 40 °C

流 速 : 0.3 mL/min

洗 脱 方 式 : 见细胞培养分析方法包

进 样 体 积 : 1 µL

质谱条件

离 子 源 : ESI, 正负模式

D L 管 温 度 : 250°C

接 口 电 压 : +4.0 kV; -3.0 kV

加 热 模 块 温 度 : 400°C

雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min

接 口 温 度 : 300°C

干 燥 气 : 氮气 10 L/min

扫 描 模 式 : 多反应监测(MRM)

加 热 气 : 空气 10 L/min

表 1. 细胞培养方法包中 146 种化合物列表 (含 2 种内标)

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	5-Oxoproline	氨基酸	50	Kynurenic acid	氨基酸	99	Thymidine	核苷酸
2	Alanine	氨基酸	51	Kynurenine	氨基酸	100	Thymidine monophosphate	核苷酸
3	Asparagine	氨基酸	52	Serotonin	氨基酸	101	Thymine	核苷酸
4	Aspartic acid	氨基酸	53	Tryptophan	氨基酸	102	Uracil	核苷酸
5	Glutamic acid	氨基酸	54	1-Methylhistidine	氨基酸	103	Uridine	核苷酸
6	Glutamine	氨基酸	55	3-Methylhistidine	氨基酸	104	Uridine monophosphate	核苷酸
7	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	56	Histidine	氨基酸	105	Gluconic acid	糖类
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	57	Urocanic acid	氨基酸	106	Hexose (Glucose)	糖类
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	58	4-Hydroxyphenyllactic acid	氨基酸	107	Sucrose	糖类
10	Arginine	氨基酸	59	Dopa	氨基酸	108	Threonic acid	糖类
11	Argininosuccinic acid	氨基酸	60	Norepinephrine	氨基酸	109	Riboavin	维生素
12	Citrulline	氨基酸	61	Phenylalanine	氨基酸	110	Pantothenic acid	维生素
13	Creatine	氨基酸	62	Phenyllactic acid	氨基酸	111	4-Pyridoxic acid	维生素
14	Ornithine	氨基酸	63	Tyrosine	氨基酸	112	Pyridoxal	维生素
15	Proline	氨基酸	64	3-Hydroxyisobutyric acid	氨基酸	113	Pyridoxalphosphate	维生素
16	Putrescine	氨基酸	65	3-Methyl-2-oxovaleric acid	氨基酸	114	Pyridoxine	维生素

17	2-Aminobutyric acid	氨基酸	66	Isoleucine	氨基酸	115	Biotin	维生素
18	5-Glutamylcysteine	氨基酸	67	Leucine	氨基酸	116	4-Aminobenzoic acid	维生素
19	5'-Methylthioadenosine	氨基酸	68	Valine	氨基酸	117	Folic acid	维生素
20	Cystathionine	氨基酸	69	Alanyl-glutamine	氨基酸	118	Cyanocobalamin	维生素
21	Cysteine	氨基酸	70	Asymmetric dimethylarginine	氨基酸	119	Ascorbic acid	维生素
22	Cystine	氨基酸	71	Glycyl-glutamine	氨基酸	120	Acetylcholine	维生素
23	Glutathione	氨基酸	72	Symmetric dimethylarginine	氨基酸	121	Choline	维生素
24	Homocysteine	氨基酸	73	Adenine	核苷酸	122	Citicoline	维生素
25	Homocystine	氨基酸	74	Adenosine	核苷酸	123	NAD	维生素
26	Methionine	氨基酸	75	Adenosine monophosphate	核苷酸	124	Niacinamide	维生素
27	Methionine sulfoxide	氨基酸	76	Deoxyadenosine	核苷酸	125	Nicotinic acid	维生素
28	N-Acetylcysteine	氨基酸	77	Deoxyguanosine	核苷酸	126	Lipoic acid	维生素
29	Ophthalmic acid	氨基酸	78	Deoxyguanosine monophosphate	核苷酸	127	2-ketoglutaric acid	其它
30	Oxidized glutathione	氨基酸	79	Guanine	核苷酸	128	Acotinic acid	其它
31	S-Adenosylhomocysteine	氨基酸	80	Guanosine	核苷酸	129	Citric acid	其它
32	2-Aminoethanol	氨基酸	81	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate	核苷酸	130	Fumaric acid	其它
33	Glycine	氨基酸	82	Guanosine monophosphate	核苷酸	131	Isocitric acid	其它
34	O-Phosphoethanolamine	氨基酸	83	Hypoxanthine	核苷酸	132	Lactic acid	其它
35	Serine	氨基酸	84	Inosine	核苷酸	133	Malic acid	其它
36	Threonine	氨基酸	85	Inosine monophosphate	核苷酸	134	Pyruvic acid	其它
37	2-Amino adipic acid	氨基酸	86	Uric acid	核苷酸	135	Succinic acid	其它
38	Acetylcarnitine	氨基酸	87	Xanthine	核苷酸	136	Glyceric acid	其它
39	Carnitine	氨基酸	88	Xanthosine	核苷酸	137	Glycolic acid	其它
40	Hydroxylysine	氨基酸	89	Xanthosine monophosphate	核苷酸	138	Glyoxylic acid	其它
41	Lysine	氨基酸	90	3-Aminoisobutyric acid	核苷酸	139	Mevalonic acid	其它
42	Pipecolic acid	氨基酸	91	3-Aminopropanoic acid	核苷酸	140	MVA-P	其它
43	Saccharopine	氨基酸	92	Cytidine	核苷酸	141	Penicillin G	其它

44	3-Hydroxyanthranilic acid	氨基酸	93	Cytidine 3',5'-cyclic monophosphate	核苷酸	142	Resveratrol	其它
45	5-Hydroxytryptophan	氨基酸	94	Cytidine monophosphate	核苷酸	143	Shikimic acid 3-phosphate	其它
46	Anthranilic acid	氨基酸	95	Cytosine	核苷酸	144	Taurine	其它
47	Formylkynurenine	氨基酸	96	Deoxycytidine	核苷酸	145	2-Isopropylmalic acid	内标
48	Hydroxykynurenine	氨基酸	97	Deoxycytidine monophosphate	核苷酸	146	10-Camphorsulfonic acid	内标
49	Indole-3-acetic acid	氨基酸	98	Orotic acid	核苷酸			

1.3 样品前处理方法

本实验样品为某菌株发酵液，用于合成红霉素，分别在发酵期间的 0、23、47、71、95、119、140、167 和 191 小时取样，前处理方法见细胞培养分析方法包 Ver.3。

2. 结果与讨论

2.1 部分检出组分 MRM 色谱图及半定量结果

使用该方法包对不同时间的某菌株发酵液上清液进行了分析，检出 113 种组分。部分检出化合物与内标峰面积的比值（半定量结果）见表 2，部分检出的化合物的色谱图如图 1 所示。

表 2. 发酵液样品中部分检出化合物列表

No.	化合物名	不同时间点目标物峰面积比值								
		0h	23h	47h	71h	95h	119h	140h	167h	191h
1	Gluconic acid	5.599	6.546	4.129	5.348	10.25	7.574	8.937	7.845	8.675
2	Hexose	6.897	5.698	3.358	2.842	5.542	1.924	1.476	1.658	1.343
3	Sucrose	5.552	2.907	2.671	2.281	0.784	1.276	0.984	0.604	0.358
4	Aspartic acid	12.03	19.88	15.820	17.17	27.83	24.15	8.405	17.92	16.57
5	Malic acid	0.804	0.379	0.459	0.390	0.439	0.851	0.363	0.646	0.740
6	Serine	20.37	31.71	29.688	33.52	37.16	35.85	18.73	38.15	37.34
7	Hydroxyproline	0.903	2.035	3.105	4.124	4.516	5.203	7.516	5.169	5.508
8	Asparagine	8.835	5.364	4.728	4.936	5.531	4.877	2.559	5.161	5.162
9	Threonine	9.119	16.26	15.965	19.11	21.64	21.10	11.74	21.34	17.77
10	Glycine	1.847	3.900	3.919	4.147	5.213	4.728	2.336	4.441	4.145
11	Glutamic acid	10.71	46.39	40.211	53.20	57.19	62.11	53.57	71.64	77.91
12	Alanine	48.62	73.84	75.209	77.83	85.30	77.99	41.15	80.18	78.38
13	Citrulline	2.266	53.98	24.385	5.912	10.35	3.333	1.798	3.412	3.142

14	2-Aminoadipic	0.046	3.352	6.876	9.068	11.41	12.24	11.09	10.69	11.28
15	Proline	1.227	1.293	1.036	1.167	1.294	1.230	0.529	1.293	1.288
16	Uridine	1.902	7.658	10.007	12.12	12.46	13.38	4.737	13.95	14.09
17	Valine	5.183	7.712	8.614	9.648	11.38	11.15	4.795	10.89	10.36
18	Uracil	0.939	3.555	3.813	4.211	4.051	4.137	1.438	4.086	4.101
19	Ornithine	4.928	3.695	0.358	0.821	0.966	0.295	0.203	0.418	0.357
20	Lysine	16.43	96.47	100.47	43.68	38.55	37.94	18.06	28.37	25.80
21	Histidine	3.965	4.037	4.201	4.696	5.192	5.429	2.743	5.647	5.788
22	Methionine	12.602	14.381	14.748	17.520	21.88	20.17	9.218	20.82	24.31
23	Aminobutyric acid	44.469	32.084	40.704	51.441	36.155	39.038	2.699	25.993	19.640
24	Arginine	50.919	68.798	61.522	65.384	69.282	67.941	33.047	74.078	75.663
25	Tyrosine	27.137	31.074	31.077	36.031	42.461	38.486	18.894	43.549	42.804
26	Nicotinic acid	0.658	4.191	6.945	8.676	9.998	11.562	15.779	13.182	13.221
27	Inosine	0.050	2.619	1.746	2.850	3.514	3.485	2.204	3.488	3.843
28	Isoleucine	5.794	12.212	11.925	12.835	16.367	14.094	3.817	12.840	12.687
29	Pipecolic acid	7.265	46.393	47.845	20.844	17.538	16.747	8.501	13.430	12.840
30	Cytidine	5.629	6.553	4.557	4.464	2.544	3.125	0.089	2.427	1.961
31	Xanthine	0.110	2.459	2.316	1.642	0.953	0.746	0.149	0.450	0.365
32	Leucine	23.305	24.957	25.291	30.136	35.159	33.454	12.783	33.103	33.785
33	Hypoxanthine	0.187	5.168	6.306	6.844	7.161	6.683	3.904	6.402	6.001
34	Pantothenic acid	0.128	0.834	1.457	1.541	1.753	1.908	2.476	2.776	3.378
35	Xanthosine	0.299	1.664	1.209	1.804	2.200	2.109	1.134	2.053	2.158
36	Guanosine	6.208	30.348	21.720	30.863	37.267	37.837	19.675	36.149	37.932
37	Deoxycytidine	1.612	5.600	1.362	0.338	0.295	0.460	0.238	0.395	0.454
38	Phenylalanine	48.064	51.561	50.008	57.288	71.778	64.994	28.185	74.750	74.779
39	Thymidine	0.141	1.752	1.896	1.835	1.455	1.516	0.536	1.655	1.413
40	Deoxyguanosine	0.047	18.177	16.006	15.601	29.707	28.583	23.406	32.863	33.685
41	Choline	50.062	0.416	0.503	4.297	1.767	1.715	2.922	5.020	8.151
42	Riboflavin	0.031	0.485	0.779	0.929	1.040	1.059	0.478	0.871	0.970
43	Tryptophan	6.921	23.794	24.481	30.384	40.972	39.809	19.834	49.318	51.324

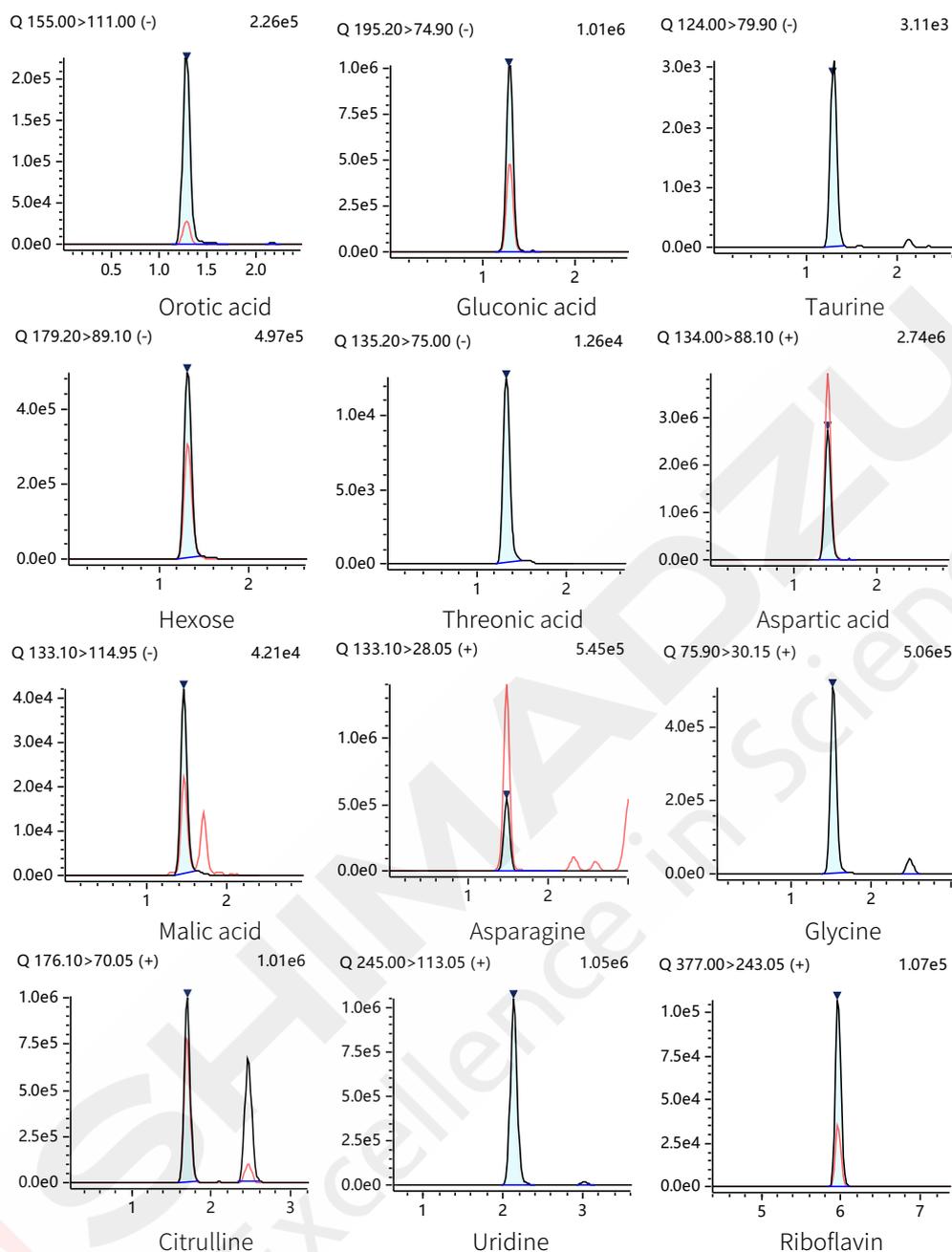


图 1. 部分检出化合物色谱图

2.2 部分糖、氨基酸、核苷和维生素类化合物的含量变化趋势

采用多组学整合分析工具 Multi-omics 分析发酵液中目标组分含量的变化趋势。按照化合物所属类别分类，以发酵时间为横坐标，目标化合物与内标化合物的峰面积比为纵坐标进行绘图，部分糖类、氨基酸、核苷和维生素的变化趋势如下。

糖类化合物：

糖类化合物作为发酵的碳源之一，在发酵过程中可能会转化为糖酸。图 2 为葡萄糖酸（Gluconic acid）、葡萄糖（Hexose）、蔗糖（Sucrose）、苏糖酸（Threonic acid）四种物质含量随时间的变化趋势。从图可以看出，两种糖的含量整体呈现下降趋势，但在 95h 时葡萄糖含量增加，推测此时可能进行了补料。糖酸中葡萄糖酸的含量比较稳定，而苏糖酸含量在 23h 后下降明显，推测糖更多的转化形成了葡萄

糖酸。

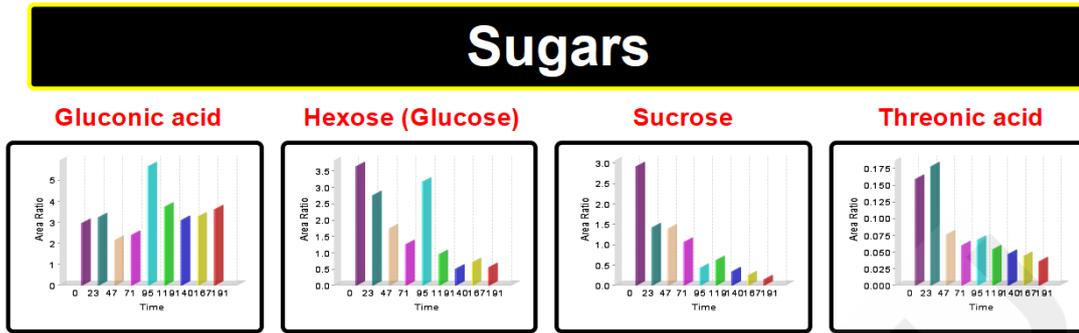


图 2. 发酵液中糖类相对含量变化趋势

氨基酸类化合物：

氨基酸是菌株发酵中的氮源，图 3 为赖氨酸代谢通路中相关化合物随时间的变化趋势图。其中 2-氨基己二酸 (2-Aminoadipic acid)、乙酰左旋肉碱 (Acetylcarnitine)、酵母氨酸 (Saccharopine) 含量基本维持稳定，而赖氨酸 (Lysine)、羟基赖氨酸 (Hydroxylysine)、哌啶酸 (Pipelicolic acid) 则在增加后迅速消耗。

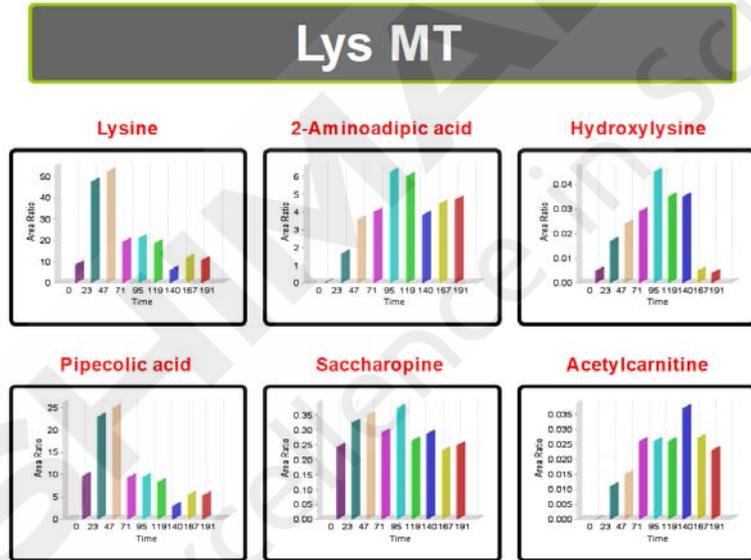


图 3. 发酵液中赖氨酸代谢通路中相关化合物相对含量变化趋势

核苷类化合物：

核苷类物质在发酵过程中作为生物活性物质，图 4 为嘧啶的代谢通路中相关化合物含量变化趋势图。其中胸腺嘧啶 (Thymidine)、尿嘧啶 (Uracil)、尿苷 (Uridine) 在 23h 内含量迅速上升，之后维持稳定 (140h 出现异常下降的情况)。3-氨基异丁酸 (3-Aminoisobutyric acid)、5-尿苷一磷酸 (Uridine monophosphate) 含量则在上升后出现下降的趋势。

Pyrimidine MT

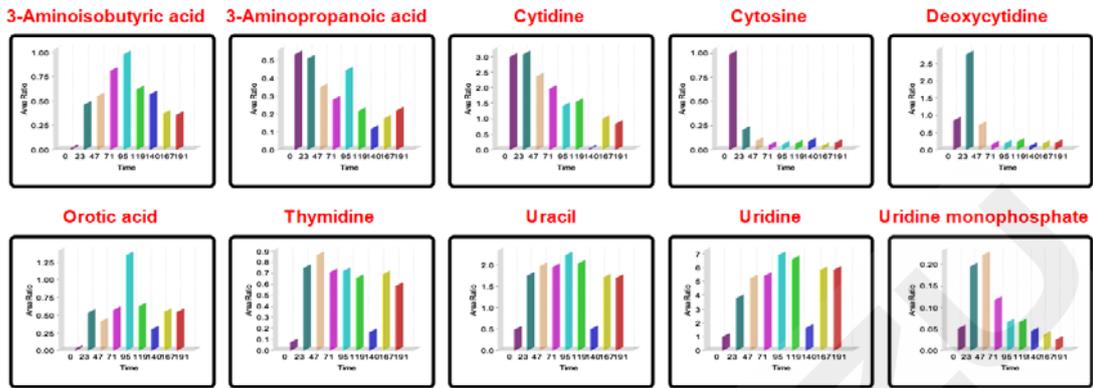


图 4. 发酵液中嘧啶代谢通路中相关化合物相对含量变化趋势

维生素类化合物：

维生素是发酵过程中的微量营养物质，图 5 为维生素 B 和 C 含量随时间的变化趋势。从图可以看出，发酵开始后维生素 B2、B5、B6、C 含量先迅速增加，然后基本维持稳定（140h 时含量略有下降）。

Vitamins

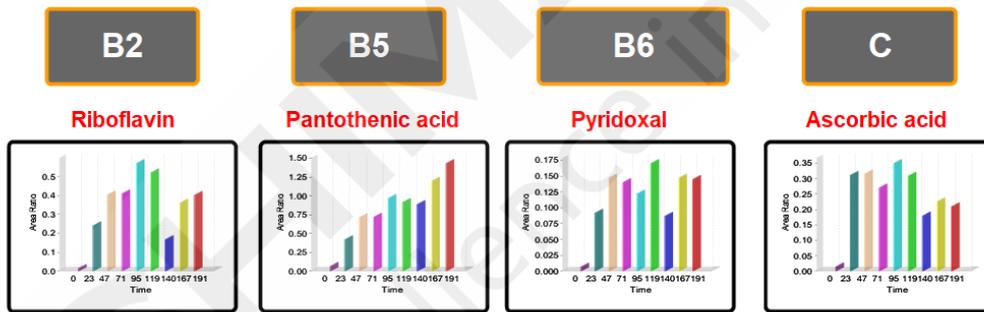


图 5. 发酵液中部分维生素相对含量变化趋势

3. 结论

本文利用细胞培养分析方法包及三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 快速分析了发酵液中目标组分相对含量，并采用多组学整合分析工具 Multi-omics 绘制部分化合物在不同发酵时间点含量变化趋势，可用于监测发酵液成分的变化，为发酵效率的提高提供技术支持。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定链霉菌培养上清液中95种化合物

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用同时测定链霉菌培养上清液中 95 种化合物。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分离, 分析速度快、重复性好、灵敏度高, 适合细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等化合物的高灵敏度快速检测。

关键词: 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 链霉菌培养上清液

开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是细胞培养生产工艺的核心内容之一。适宜的培养基组成与优选的细胞培养工艺对于提高酶和其他蛋白类药物的产率, 保证产品批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要。

对于通过细胞培养生产酶和其他蛋白类药物的公司而言, 目前生物过程工艺开发与优化仅限于检测常规的OD值和酶活等参数, 缺乏对于细胞上清液组分直接、全面和快速的客观动态数据分析, 因此无法准确了解培养基中各组分和细胞代谢物对酶或者其他蛋白质产量和质量的影响。为满足快速全面分析细胞培养上清液组分, 将基础碳源、氮源、核

苷酸、维生素和其他主要代谢物一起检测分析, 得到更多有关生物过程中的详细信息, 我们开发出“细胞培养上清液方法包”。该技术平台采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪, 仅需17分钟, 即可同时监测分析下列95种细胞培养上清液营养成分和代谢物的相对丰度变化。

本文使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱LCMS-8060联用, 利用“细胞培养上清液方法包”建立了链霉菌培养上清液中营养物质和细胞代谢物的液相色谱-串联质谱的同时分析方法, 供相关人员参考。

1. 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, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 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. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色 谱 柱 : 见“细胞培养上清液方法包”

柱 温 : 40°C

流 动 相 : 见“细胞培养上清液方法包”

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱

流 速 : 0.35 mL/min

时 间 程 序 : 见“细胞培养上清液方法包”

进 样 体 积 : 1 μL

质谱条件

离子源	: ESI, 正负离子同时扫描	脱溶剂管温度	: 250°C
接口电压	: +4.0 kV; -3.0 kV	加热块温度	: 400°C
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	接口温度	: 300°C
干燥气	: 氮气 15 L/min	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
加热气	: 空气 10 L/min	驻留时间	: 2.0-5.0 ms
碰撞气	: 氩气	M R M 参数	: 见“细胞培养上清液方法包”

1.3 菌株相关信息

菌株: 链霉菌

培养时间: 115 小时

1.4 样品制备

样品前处理方法: 取 500 μL 细胞培养液, 在室温下离心 1 分钟 (3000 rpm), 吸取 100 μL 离心后上清液到新的离心管中, 然后加入 20 μL 2-异丙基苹果酸内标溶液 (0.5 mmol/L), 再加入 200 μL 乙腈, 涡旋使充分混匀, 室温下离心 15 分钟 (15000 rpm), 精密吸取上清液 100 μL , 加入 900 μL 水, 涡旋混匀, 上机前再用纯水稀释 1000 倍, 即得。

2. 结果及讨论

2.1 链霉菌培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对链霉菌培养上清液中的组分进行分析, 目标组分不同程度的被检出, 色谱图如图 1 所示。

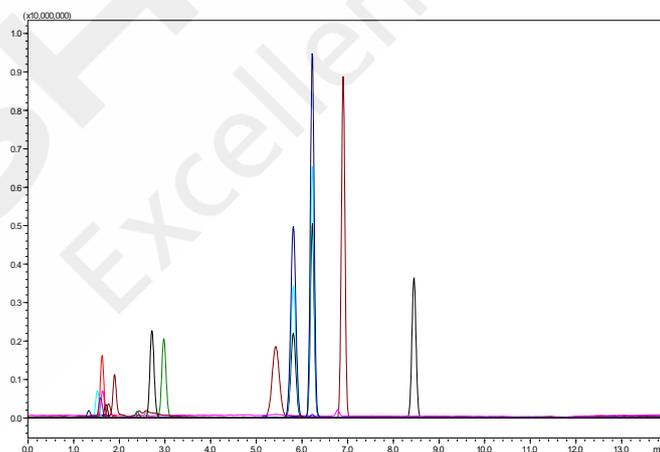


图 1. 链霉菌上清液 (48 h) 分析色谱图

2.2 培养过程中酶活参数变化趋势

在培养过程中酶活检测取样点分别为 72 h, 78 h, 86 h, 93 h, 101 h 和 115 h。

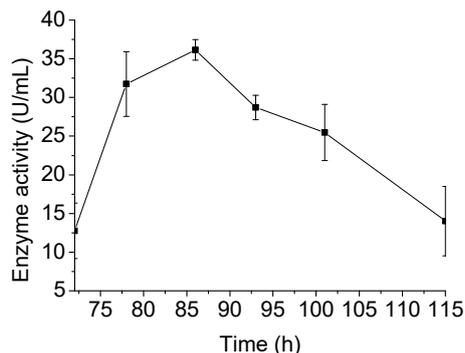


图 2. 链霉菌上清液酶活曲线图 (72-115 h)

2.3 在细胞培养过程中部分营养物质和代谢物质峰面积与内标峰面积比值变化趋势

在培养过程中 95 种化合物检测取样点为 48 h, 72 h, 78 h, 86 h, 93 h, 101 h 和 115 h。

2.3.1 培养过程中氨基酸类化合物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

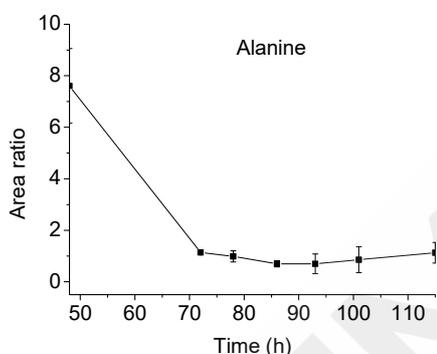


图 3. 丙氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

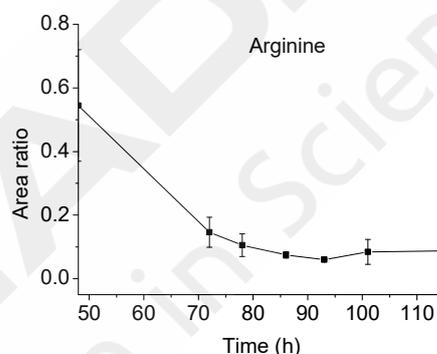


图 4. 精氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

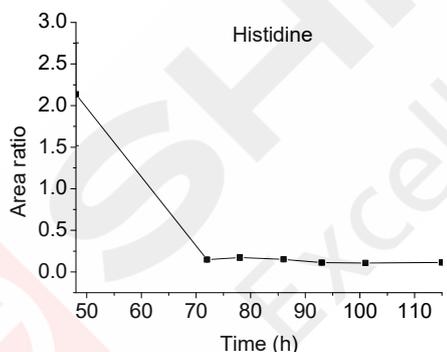


图 5. 组氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

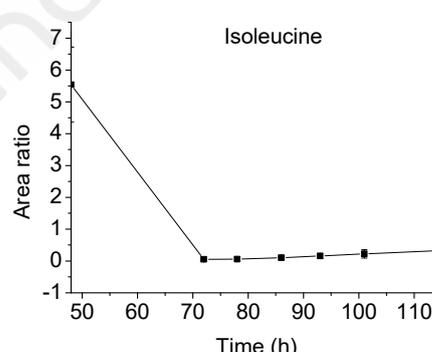


图 6. 异亮氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

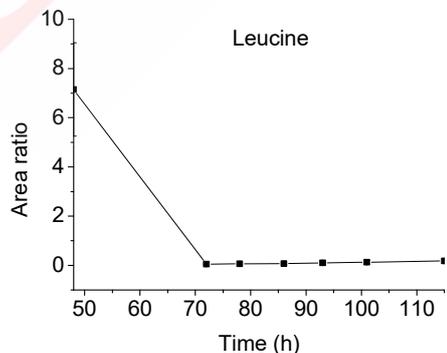


图 7. 亮氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

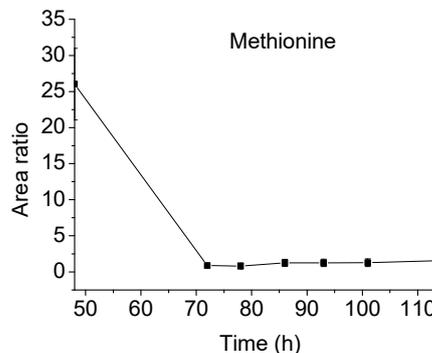


图 8. 蛋氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

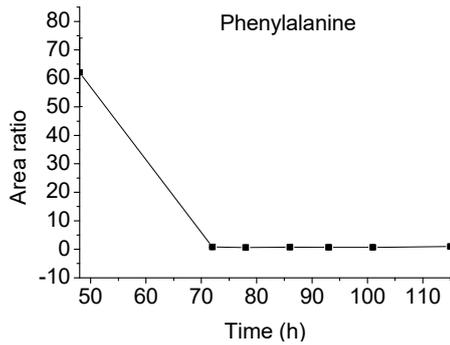


图 9. 苯丙氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

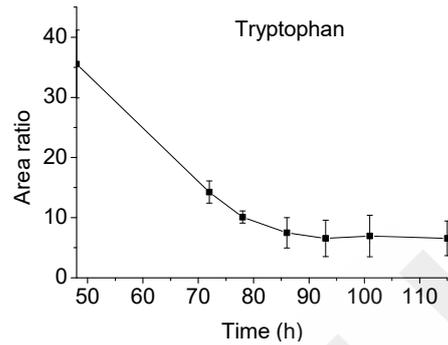


图 10. 色氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

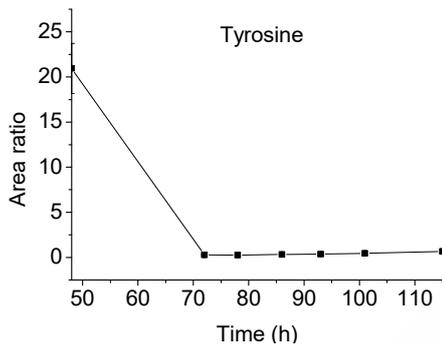


图 11. 酪氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

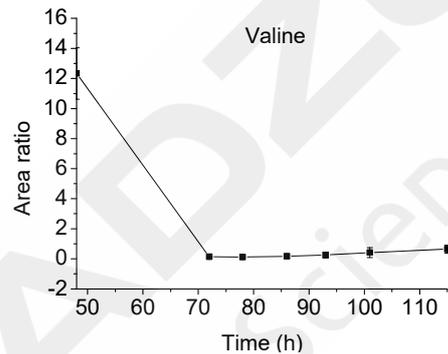


图 12. 缬氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 3-12 可知, 这些氨基酸在链霉菌 48-72 h 培养过程中浓度急剧下降, 72 h 后维持在一个较低水平, 接近于 0, 由此可推断 48-72 h 这些氨基酸被大量消耗, 用于蛋白质 (酶) 的合成。而由图 1 酶活趋势图可知, 在细胞培养到 86 h 时, 酶活才达到最大值, 所以在优化培养工艺时可以考虑在 72 h 时往培养液中补加这些氨基酸, 促进蛋白质的合成, 从而进一步提高酶活。

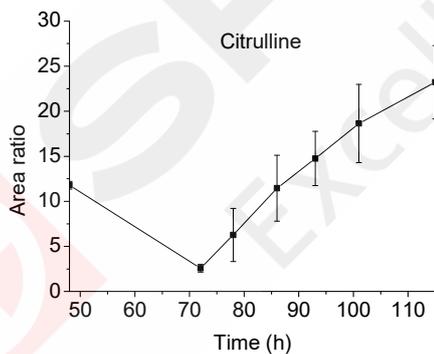


图 13. 瓜氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

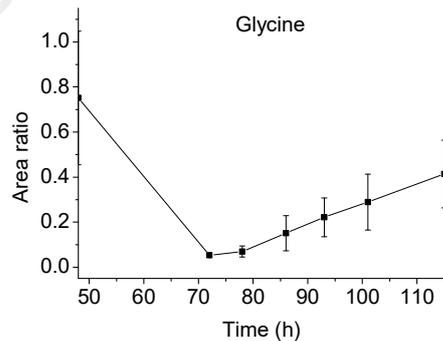


图 14. 甘氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

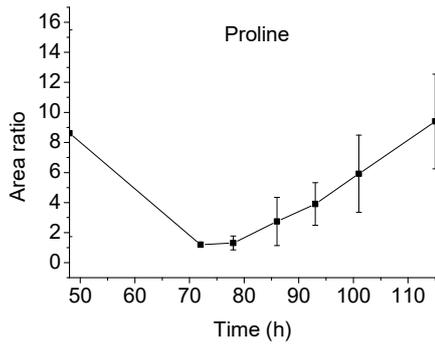


图 15. 脯氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

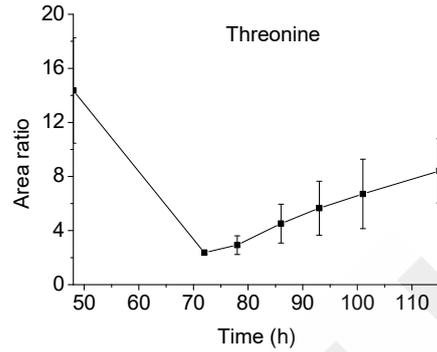


图 16. 色氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 13-16 可知，在 72 h 之前这些氨基酸的量急剧减少，72 h 后开始增加，可能的原因是 72 h 前这些氨基酸被大量消耗，72 h 后培养液中蛋白质分解开始生成新的氨基酸，而此时链霉菌又无法快速消耗掉这些氨基酸，从而导致这些氨基酸开始积累，浓度逐渐增大。

2.3.2 培养过程中链霉菌有机酸代谢物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

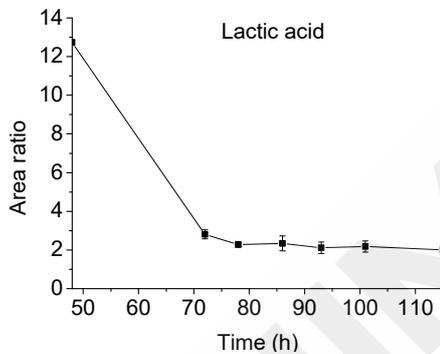


图 17. 乳酸在培养过程中峰面积比变化趋势

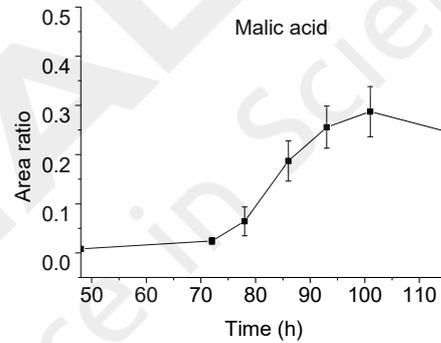


图 18. 苹果酸在培养过程中峰面积比变化趋势

细胞培养初期在有充足碳源（甘油，参考 1.3 培养基组成）的情况下，细胞快速生长，并分泌乳酸，碳源量急剧下降，到达 48 h 后，培养液中甘油和其他碳源无法维持细胞正常生长，于是细胞开始消耗乳酸（以乳酸为碳源），导致乳酸的含量急剧下降（图 17）。

由图 18 可知，该株链霉菌在 72 h 后开始不断产生苹果酸，在 101 h 后细胞开始消耗自身产生的这些苹果酸（图 18）。

2.3.3 培养过程中维生素类化合物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

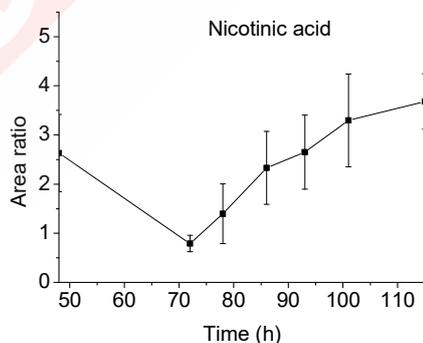


图 19. VB3 在培养过程中峰面积比变化趋势

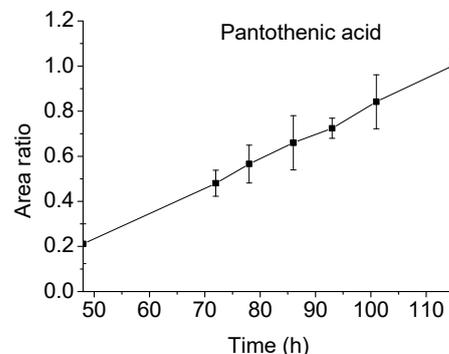


图 20. VB5 在培养过程中峰面积比变化趋势

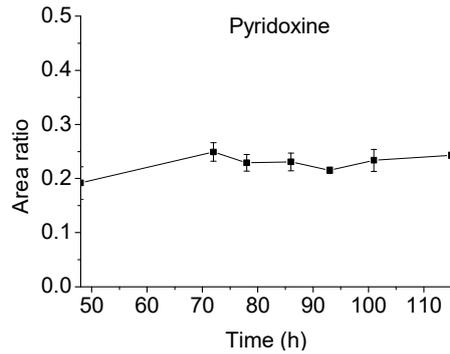


图 21. VB6 在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 19 可知在链霉菌 48-72 h 培养过程中，细胞不断消耗维生素 B3 (VB3)，但 72 h 后 VB3 开始积累；该株链霉菌在培养过程中会不断代谢产生维生素 B5 (VB5) (图 20)；在培养的 48-115 h，培养液中维生素 B6 (VB6) 的浓度变化不大 (图 21)。

3. 结论

采用岛津 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪分析链霉菌上清液中 95 种营养物质和代谢物质相对含量在 115 小时培养过程中随着时间的变化曲线。参考“细胞培养上清液方法包”，无需优化仪器参数，方法操作简单，结果直观。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法同时测定细菌培养上清液中 95 种化合物

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用同时测定细菌培养上清液中 95 种化合物。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分离, 分析速度快、重复性好、灵敏度高, 适合细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等化合物的高灵敏度快速检测。

关键词: 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 细菌培养上清液

开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是生物技术药物生产工艺的核心内容之一。适宜的培养基组成与优选的细胞培养条件对于提高重组蛋白类药物的产率, 保证产品批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要, 尤其是 ADC、Bi-specific、Fc Fusion Protein 等相对分子量大、结构复杂的抗体类药物, 对其重要性不言而喻。对于培养基生产商和自行配制培养基的细胞培养公司而言, 了解培养基中各组分在培养过程中的变化以及对目标产物质量和产量的影响至关重要, 因此我们需要尽可能多的了解培养基配方中各组分的含量在整个细胞培养过程中的变化趋势。

目前生物过程工艺开发与优化偏重于检测常规的温度、搅拌、气体溶解量和 OD 值等理化条件以及少数培养成分与代谢物的变化, 缺乏对于细胞上清

液组分直接、全面和快速的客观动态数据分析, 因此无法精准优化调整细胞培养工艺条件和培养基中各组分配比。为满足快速全面分析细胞培养上清液组分, 将基础碳源、氮源、核苷酸、维生素和其他主要代谢物一起检测分析, 得到更多有关生物过程中的详细信息, 我们开发出“细胞培养上清液方法包”。该技术平台采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪, 仅需 17 分钟, 即可同时监测分析下列 95 种细胞培养上清液营养成份和代谢物的相对丰度变化。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8050 联用, 利用“细胞培养上清液方法包”建立了藤黄杆菌培养上清液中营养物质和细胞代谢物的液相色谱-串联质谱的同时分析方法, 供相关人员参考。

1. 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-8050 联用系统。具体配置为: LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱	: 见“细胞培养上清液方法包”	柱温	: 40°C
流动相	: 见“细胞培养上清液方法包”	洗脱方式	: 梯度洗脱
流速	: 0.35 mL/min	时间程序	: 见“细胞培养上清液方法包”

进样体积：1 μL

质谱条件

离子源：ESI，正负离子同时扫描	脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$
接口电压：+4.0 kV; -3.0 kV	加热块温度：400 $^{\circ}\text{C}$
雾化气：氮气 3.0 L/min	接口温度：300 $^{\circ}\text{C}$
干燥气：氮气 15 L/min	扫描模式：多反应监测 (MRM)
加热气：空气 10 L/min	驻留时间：2.0-5.0 ms
碰撞气：氩气	M R M 参数：见“细胞培养上清液方法包”

1.3 菌株相关信息

菌株：藤黄杆菌（细菌）

培养时间：12 小时

1.4 样品制备

样品前处理方法：取500 μL 细胞培养液，在室温下离心1分钟（3000 rpm），吸取100 μL 离心后上清液到新的离心管中，然后加入20 μL 2-异丙基苹果酸内标溶液（0.5 mmol/L），再加入200 μL 乙腈，涡旋使充分混匀，室温下离心15分钟（15000 rpm），精密吸取上清液100 μL ，加入900 μL 水，涡旋混匀，上机前再用纯水稀释100倍，即得。

2. 结果及讨论

2.1 藤黄杆菌培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对藤黄杆菌培养上清液中的组分进行分析，目标组分不同程度的被检出，色谱图如图1所示。

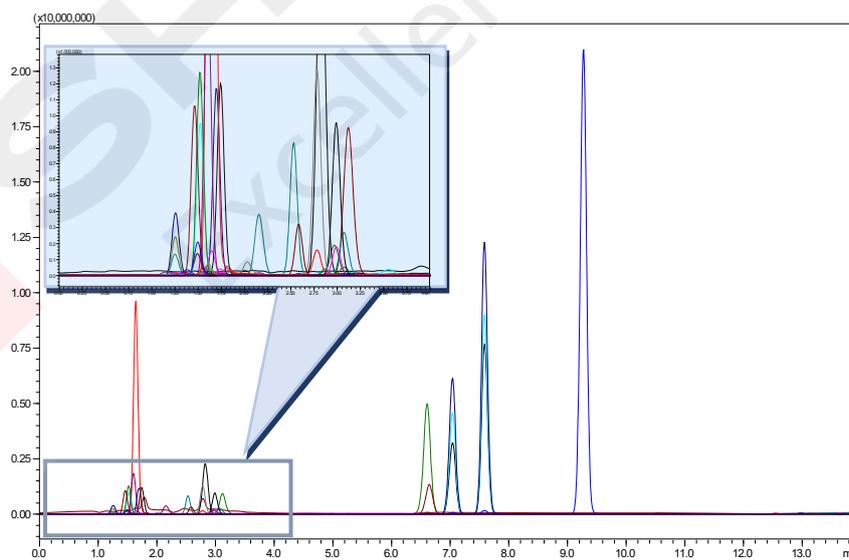


图1 藤黄杆菌上清液（4 h）分析色谱图

2.2 在细胞培养过程中部分营养物质和代谢物质峰面积与内标峰面积比值变化趋势

2.2.1 随着培养时间增长峰面积比逐渐增加的化合物

2.2.1 随着培养时间增长峰面积比逐渐增加的化合物

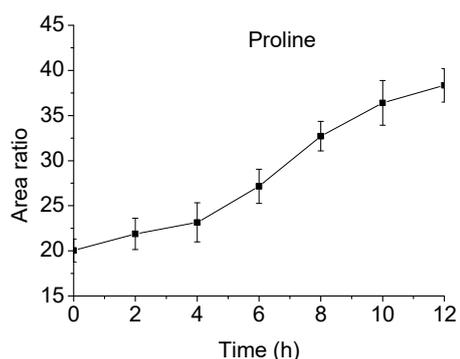


图2 脯氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

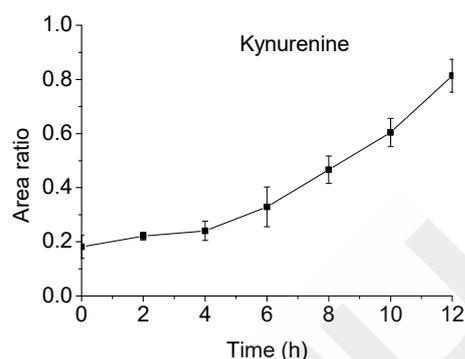


图3 犬尿氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

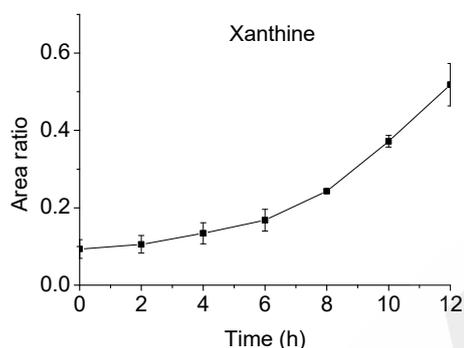


图4 黄嘌呤在培养过程中峰面积比变化趋势

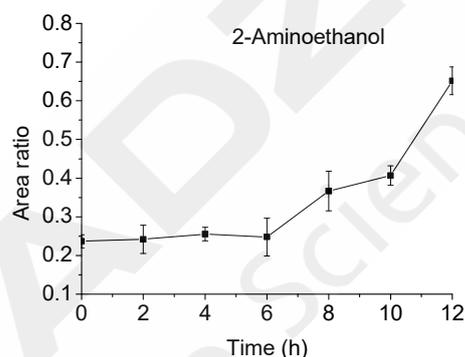


图5 2-氨基乙醇在培养过程中峰面积比变化趋势

2.2.2 随着培养时间增长峰面积比逐渐减小的化合物

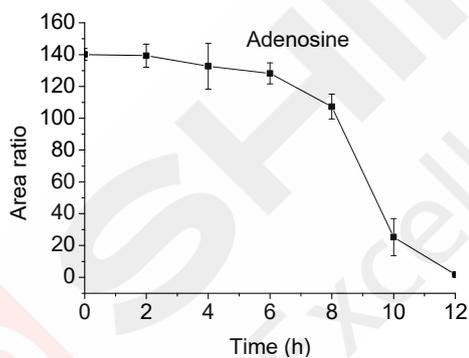


图6 腺苷在培养过程中峰面积比变化趋势

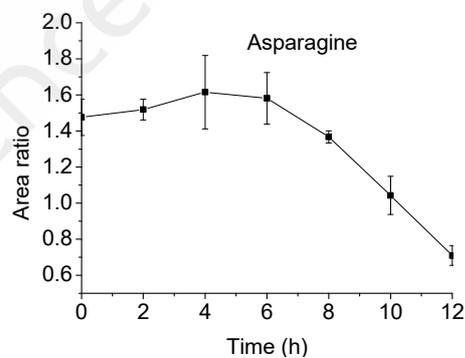


图7 天冬酰胺在培养过程中峰面积比变化趋势

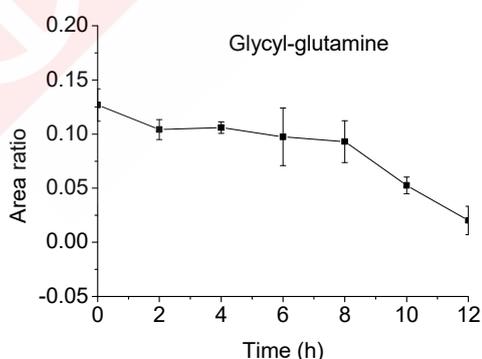


图8 氨基乙酰基谷氨酰胺在培养过程中峰面积比变化趋势

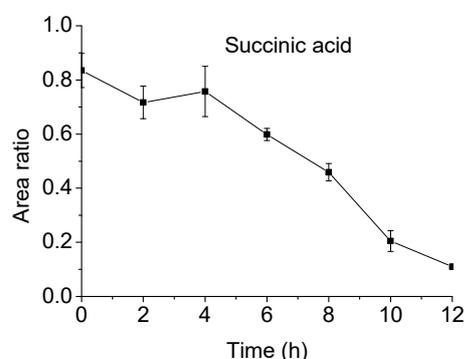


图9 琥珀酸在培养过程中峰面积比变化趋势

2.2.3 随着培养时间增长峰面积比几乎不变的化合物

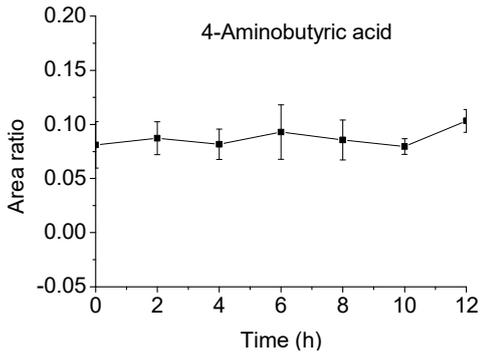


图 10 4-氨基丁酸在培养过程中峰面积比变化趋势

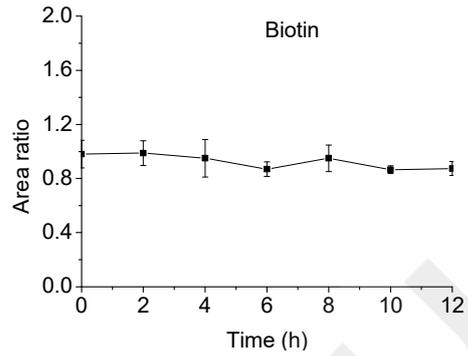


图 11 生物素在培养过程中峰面积比变化趋势

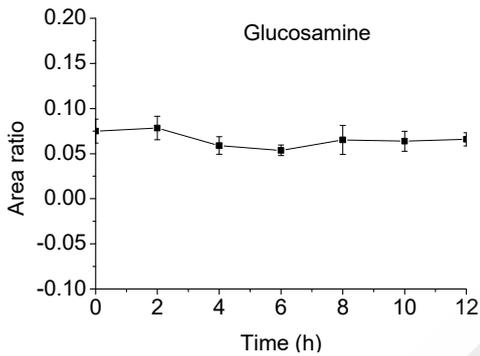


图 12 葡萄糖胺在培养过程中峰面积比变化趋势

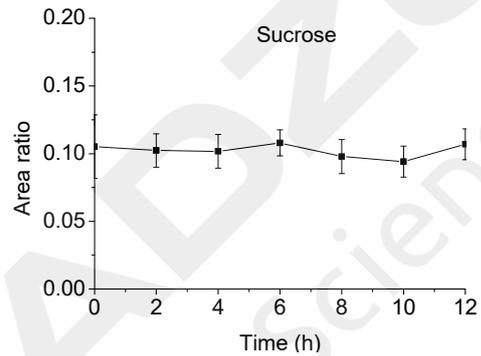


图 13 蔗糖在培养过程中峰面积比变化趋势

2.2.4 随着培养时间增长峰面积比先增加后减少的化合物

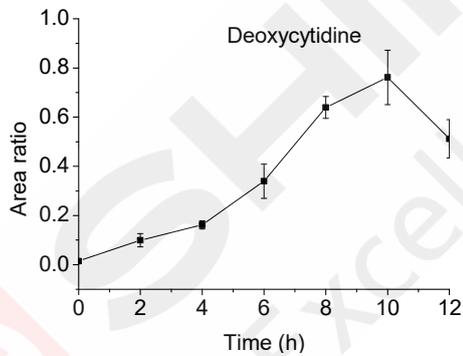


图 14 脱氧胞苷在培养过程中峰面积比变化趋势

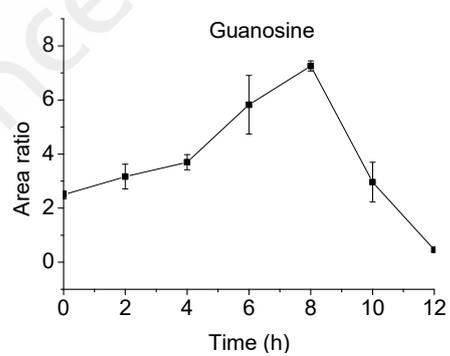


图 15 鸟苷在培养过程中峰面积比变化趋势

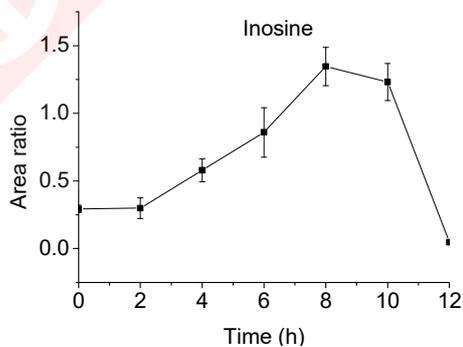


图 16 肌苷在培养过程中峰面积比变化趋势

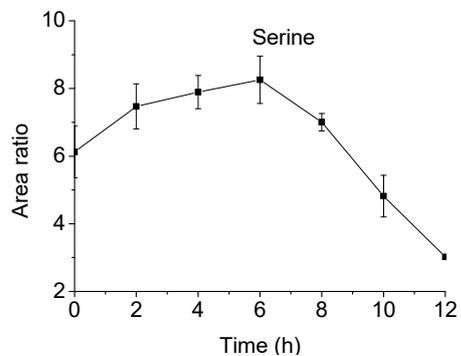


图 17 丝氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图2-5可知，脯氨酸和犬尿氨酸（氨基酸）、黄嘌呤（核苷酸）、2-氨基乙醇的峰面积与内标峰面积

比值随着培养时间逐渐增大,说明在此培养条件下,这些化合物的量是足够的,可以考虑适当减少这些化合物在培养基中的配比;由图6-9可知,腺苷(核苷酸)、天冬酰胺和氨基乙酰基谷氨酰胺(氨基酸)、琥珀酸的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间逐渐减少,说明细菌培养过程中一直在消耗这些物质,可以考虑适当增加这些化合物在培养基中的配比;由图10-13可知,4-氨基丁酸(氨基酸)、生物素(维生素)、葡萄糖(糖)、蔗糖(糖)的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间无明显变化,表明这些化合物在此培养条件下一直处于一个平衡状态或者不参与该细菌的培养,如果是后者,可以考虑在培养基配方中去除这些化合物,从而降低成本;由图14-17可知,脱氧胞苷、鸟苷和肌苷(核苷酸)、丝氨酸(氨基酸)的峰面积与内标峰面积比值随着培养时间先增大后减少,说明这些化合物是先积累后消耗,根据减少的量可考虑适当增加或减少这些化合物在培养基中的配比。实验数据表明“细胞培养上清液方法包”适合分析细菌类细胞培养过程中各种营养物质和代谢物质的变化趋势,从而根据实验结果调整培养基配方和培养工艺。

3. 结论

采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪分析藤黄杆菌上清液中95种营养物质和代谢物质相对含量在12小时培养过程中随着时间的变化曲线。参考“细胞培养上清液方法包”,无需优化仪器参数,方法操作简单,结果直观。



SHIMADZU
Excellence in Science

LCMS-8050 监控融合蛋白药物生产过程中细胞培养上清液组分变化

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定融合蛋白药物生产过程中细胞培养上清液成分的方法。17 min 内同时测定 102 种化合物，快速、灵敏、重复性好，适合细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类化合物及其他影响因子的快速高灵敏度测定。结合产品的补料工艺，分析了补料对细胞培养上清液中部分组分的影响，提出了补料添加策略的改进方向。

关键词：超高效液相色谱 三重四极杆质谱 细胞培养上清液 补料工艺开发

生物技术类药物包括抗体、重组蛋白、多肽、疫苗等发展迅速，前景看好。动物细胞培养技术是生产生物技术类药物的核心技术，开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是其中的关键任务。适宜的培养基组成与优选的细胞培养条件对于提高此类药物的产率，保证产品批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要。

随着细胞培养时间延长，培养基中的营养物质逐步消耗，代谢废物逐渐积累，不利于细胞生长和产物表达。故需及时补加营养物质，优化补料组成、含量及补加时间，平衡营养物质的消耗和代谢副产物的累积，在满足细胞生长和产物表达的同时，提高营养物的利用率，引导细胞降低对代谢副产物的积累，甚至是对代谢副产物加以利用，从而维持培养环境的相对稳定。由于不同细胞代谢特点和营养需求不尽相同，故需要有针对性地设计培养基组成、补料组成及补加策略。这使得培养基优化成为复杂耗时的工作。

目前生物过程工艺开发与优化偏重于检测常规

的温度、搅拌、气体溶解量和OD值等理化条件以及少数培养成分与代谢物的变化，且这些参数需要使用不同的方法不同的仪器进行检测，既缺乏对于细胞上清液组分直接、全面的数据分析，又耗时费力。鉴于此，岛津《细胞培养上清液分析方法包》应运而生，该技术平台采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪，仅需17分钟，即可同时监测分析95种细胞培养上清液营养成份和代谢物的相对丰度变化。目标化合物信息和实验方法全内置，用户无需自行开发方法，即装即用，还可根据需要自行补充（本文中补充到102种），前处理操作简单，是快速高效优化细胞培养工艺的助推器。

本文使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱LCMS-8050联用，结合《细胞培养上清液分析方法包》建立了融合蛋白药物生产过程中细胞培养上清液组分变化同时分析方法，并结合实际生产中使用的补料工艺，提出了改进补料策略的方向，供相关人员参考。

1. 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-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions 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 (P/N: 225-46320-93)
流 动 相 : 见细胞培养基上清液分析方法包
柱 温 : 40 °C 流 速 : 0.3 mL/min
洗 脱 方 式 : 见细胞培养基上清液分析方法包 进 样 体 积 : 1 μL

质谱条件

离 子 源 : ESI, 正负模式 D L 管 温 度 : 250°C
接 口 电 压 : +4.0 kV; -3.0 kV 加 热 模 块 温 度 : 400°C
雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min 接 口 温 度 : 300°C
干 燥 气 : 氮气 10 L/min 扫 描 模 式 : 多反应监测(MRM)
加 热 气 : 空气 10 L/min

1.3 哺乳动物细胞培养相关信息

- ①. 细胞: 哺乳动物细胞
- ②. 培养时间: 14 天
- ③. 培养基: 无血清培养基
- ④. 补料工艺: 在培养后第 3/5/8 天补加 feed1, 第 4/7 天补加 feed2, feed1 和 feed2 为两种不同组成的补料。
- ⑤. 取样方法: 每天取样, 每次取样均在补料之前。

1.4 样品处理方法

样品前处理方法: 取 500 μL 细胞培养液, 在室温下离心 1 分钟 (3000 rpm), 吸取 100 μL 离心后上清液到新的离心管中, 然后加入 20 μL 2-异丙基苹果酸内标溶液 (0.5 mmol/L), 再加入 200 μL 乙腈, 涡旋使充分混匀, 室温下离心 15 分钟 (15000 rpm), 精密吸取上清液 100 μL, 加入 900 μL 水, 涡旋混匀, 上机前再用纯水稀释 10 倍, 即得。

2 结果讨论

2.1 细胞培养上清液成分分析色谱图

按照前述分析条件测定细胞培养上清液样品, 其中组分不同程度被检出, 色谱图见图 1。共检出 72 种化合物, 检出化合物列表见表 2。

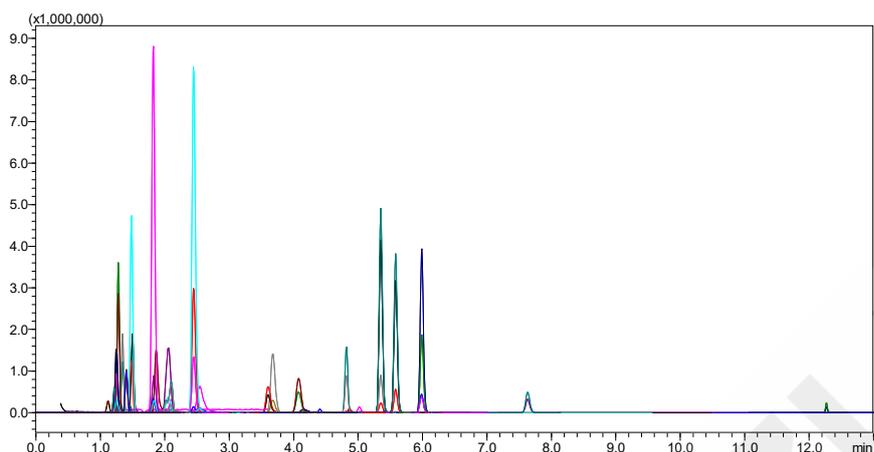


图 1. 培养第 2 天的色谱图

表 2. 细胞培养上清液样品中检出化合物列表 (共 72 种, 不含内标)

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	内标	26	Isoleucine	氨基酸	51	Hypoxanthine*	核苷酸
2	Gluconic acid	糖类	27	Ornithine	氨基酸	52	Guanine*	核苷酸
3	Glucosamine	糖类	28	Oxidized	氨基酸	53	Deoxycytidine	核苷酸
4	Hexose (Glucose)	糖类	29	Pipecolic	氨基酸	54	Guanosine	核苷酸
5	Sucrose	糖类	30	Proline	氨基酸	55	Guanosine	核苷酸
6	Threonic acid	糖类	31	Serine	氨基酸	56	Inosine	核苷酸
7	Phenylalanine	氨基酸	32	Threonine	氨基酸	57	Uridine	核苷酸
8	4-Hydroxyproline	氨基酸	33	Tryptophan	氨基酸	58	Xanthosine	核苷酸
9	5-Oxoproline	氨基酸	34	Tyrosine	氨基酸	59	Cytidine	核苷酸
10	Alanine	氨基酸	35	Valine	氨基酸	60	Adenine	核苷酸
11	Alanyl-glutamine	氨基酸	36	L-	氨基酸	61	Adenosine	核苷酸
12	Arginine	氨基酸	37	Leucine	氨基酸	62	Adenosine	核苷酸
13	Asparagine	氨基酸	38	Lysine	氨基酸	63	Cytidine	核苷酸
14	Aspartic acid	氨基酸	39	Methionine	氨基酸	64	Thymine*	核苷酸
15	Citrulline	氨基酸	40	Methionine	氨基酸	65	Thymidine*	核苷酸
16	Cystathionine	氨基酸	41	4-	维生素	66	4-	其他
17	Cysteine	氨基酸	42	Biotin	维生素	67	Citric acid	其他
18	Cystine	氨基酸	43	Choline	维生素	68	Glyceric acid	其他
19	Glutamic acid	氨基酸	44	Folic acid	维生素	69	Isocitric acid*	其他
20	Glutamine	氨基酸	45	Niacinamide	维生素	70	Lactic acid	其他
21	Glycine	氨基酸	46	Pantothenic	维生素	71	Malic acid	其他
22	Glycyl-glutamine	氨基酸	47	Pyridoxal	维生素	72	O-	其他
23	Histidine	氨基酸	48	Pyridoxine	维生素	73	Succinic acid*	其他
24	2-Aminoadipic	氨基酸	49	Riboflavin	维生素			
25	4-Aminobutyric	氨基酸	50	Tocopherol	维生素			

注: *表示样品 Day 0 (即培养基) 中未检出该化合物。

2.2 细胞培养上清液中部分糖类、氨基酸、核苷酸和维生素类化合物在培养过程中的变化趋势

取各组细胞培养上清液进行测定, 以 2-异丙基苹果酸为内标, 得到各目标组分的峰面积比。以峰面积比为纵坐标, 培养天数为横坐标, 绘制各样本中目标物组分含量的变化趋势图, 见图 2~图 13。结合该产品的补料工艺, 分析了补料对培养基上清液中各组分的影响。

2.2.1 糖类化合物

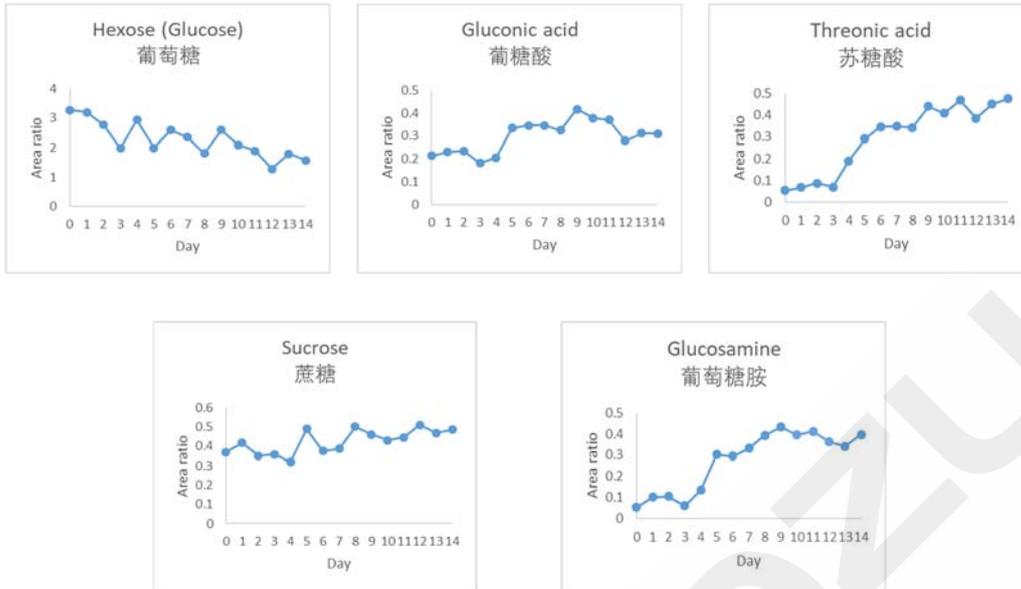


图 2. 糖类化合物含量变化趋势

由上图可知，葡萄糖含量在第 4/6/9 天有明显提升，与在第 3/5/8 天补料 feed1 中含有葡萄糖的情况一致（每次抽样均在补料之前，故在第 3 天补料，在第 4 天检测结果中体现明显）。蔗糖含量在培养过程中较稳定，较少消耗，可适当减少添加量。苏糖酸和葡萄糖胺含量在培养后期呈现上升的趋势，细胞消耗量小于补加量，在后期补加时可考虑不加或少加。

2.2.2 氨基酸类化合物

2.2.2.1 随培养时间增加峰面积比减小的氨基酸类化合物

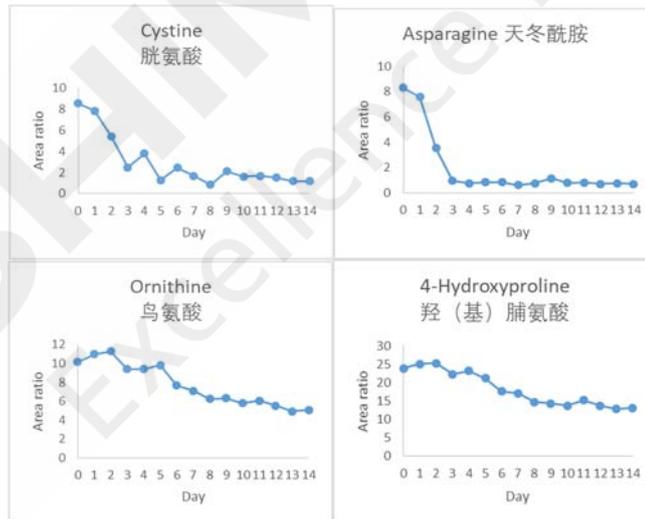


图 3. 随培养时间增加峰面积比减小的氨基酸含量变化趋势

胱氨酸和天冬酰胺在培养后期含量明显降低，接近耗尽的程度，其中胱氨酸含量在第 4/6/9 天的增加符合补料 feed1 的补加情况，但总体上相对于起始水平，补料并未起到明显提升的作用，可考虑在后期补料时提高添加量。鸟氨酸和羟脯氨酸的相对含量呈现逐渐减低的趋势，可酌情进行调整。

2.2.2.2 随培养时间增加峰面积比增加的氨基酸类化合物

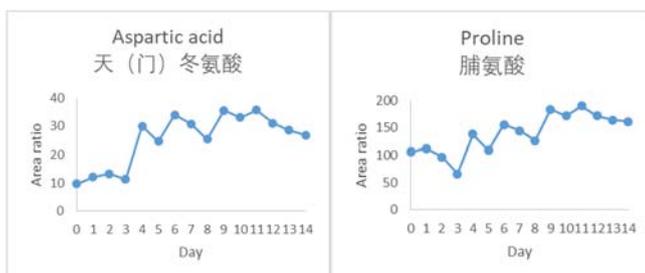


图 4. 随培养时间增加峰面积比增加的氨基酸含量变化趋势（天冬氨酸和脯氨酸）

上图的两种氨基酸含量呈现上升趋势，第 4/6/9 天含量突然升高，与在这几天进行了补料的情况非常一致，且补料中含量偏高。由图可知，培养后期细胞消耗量小于补加量，可考虑适当降低补料中这两种氨基酸的含量。

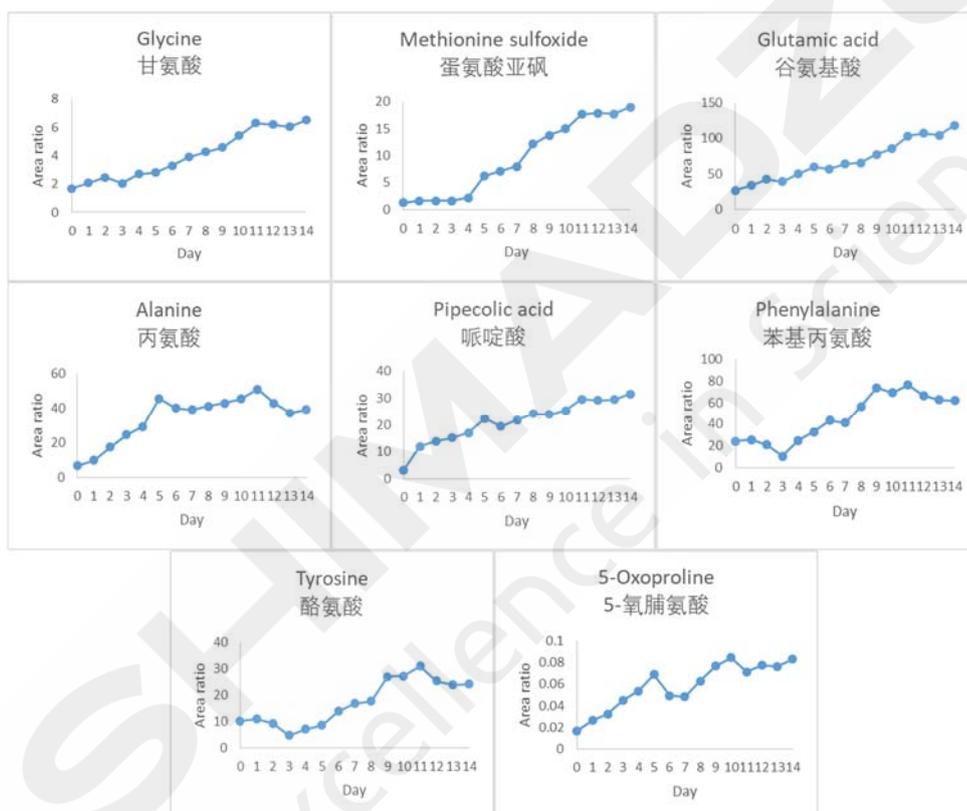


图 5. 随培养时间增加峰面积比增加的氨基酸含量变化趋势

上图中的氨基酸含量呈现明显上升趋势，特别是在培养 3 天后，可考虑适当降低补料中这些氨基酸的含量。蛋氨酸亚砜和丙氨酸在第 5 天和第 8 天有明显提升，与补料 feed2 第 4 天和第 7 天进行补料的情况相符。但由于这 2 个组分在培养过程中呈累积增加趋势，可酌情调整补料工艺，不加或者少加。

2.2.2.3 谷氨酰胺及谷氨酰胺二肽含量变化趋势

谷氨酰胺是细胞培养的重要能量来源，可以参与蛋白质的合成和核酸的代谢。但是谷氨酰胺在水溶液中不稳定，极易分解为谷氨酸和氨。而氨对细胞具有一定的毒害作用，其累积对细胞生长不利。甘氨酸谷氨酰胺和丙氨酸谷氨酰胺为谷氨酰胺二肽，较为稳定，可由肽酶分解为谷氨酰胺以供利用。谷氨酰胺及谷氨酰胺二肽含量变化趋势见下图：



图 6. 谷氨酰胺及谷氨酰胺二肽含量变化趋势

由上图可知，培养基中含有谷氨酰胺和丙氨酰谷氨酰胺，不含有甘氨酰谷氨酰胺。谷氨酰胺在培养的第 3 天消耗近零，而丙氨酰谷氨酰胺在培养的第 3 天消耗殆尽，甘氨酰谷氨酰胺含量在第 5 天和第 8 天有明显提升，与补料 feed2 的工艺相符合，且相对于补料前有明显的提升，建议予以重点关注，在第十四天消耗殆尽。谷氨酰胺含量则在培养的第五天明显增加，至第十四天，含量变化呈现逐渐增加的趋势。可推测第五天以后细胞培养上清液中的谷氨酰胺可能由甘氨酰谷氨酰胺分解而来，又由于培养后期细胞消耗谷氨酰胺的量小于甘氨酰谷氨酰胺分解的谷氨酰胺量，故后期谷氨酰胺含量变化呈缓慢上升的趋势。细胞培养上清液中的谷氨酰胺相对含量在培养后第三天很低，已经接近于零，可考虑适当增加培养基中丙氨酰谷氨酰胺的含量或者将甘氨酰谷氨酰胺补加时间提前，这两种谷氨酰胺二肽分解可提供谷氨酰胺，为细胞生长提供能量，也不会造成氨的过量累积。

2.2.2.4 4-氨基丁酸含量变化趋势



图 7. 4-氨基丁酸含量变化趋势

培养基中仅含有少量 4-氨基丁酸。由图可知，4-氨基丁酸含量在培养后第 5 天和第 8 天有明显提升，与补料 feed2 的工艺相符合，且相对于补料前有明显的提升，建议予以重点关注。根据文献报道，4-氨基丁酸有减少动物细胞的无意识运动，减少能量消耗，促进生长激素分泌，从而促进生长的作用。这可能是在培养后期补加该成分的部分原因。

2.2.2.5 丝氨酸和赖氨酸含量变化趋势

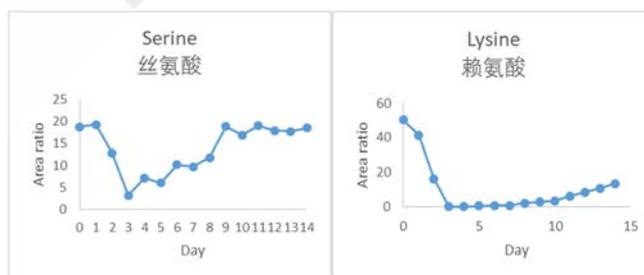


图 8. 丝氨酸和赖氨酸含量变化趋势

由图可知，丝氨酸和赖氨酸在培养过程中消耗较快，尤其是赖氨酸，在培养后第 3 天消耗近零，之后呈现缓慢上升的趋势。丝氨酸的增长趋势，与 feed1 在第 3/5/8 天进行补加的情况相符合，但第 3 天和第 5 天补加后的含量仍然远低于初始培养基中的含量，可能尚未达到补加的理想效果，可考虑酌情调整补加策

略。赖氨酸未见明显补加现象，整个培养后期其含量均较低，可考虑酌情调整补加策略。

2.2.2.6 精氨酸和瓜氨酸含量变化趋势

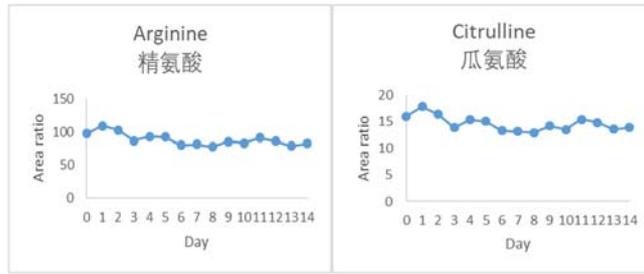


图 9. 精氨酸和瓜氨酸含量变化趋势

精氨酸和瓜氨酸的含量在整个培养过程中变化不大，可酌情调整其在初始培养基中的含量。

2.3 维生素



图 10. 维生素含量变化趋势

由上图知，胆碱含量在培养第 3 天后消耗殆尽，含量增长趋势与 feed1 在第 3/5/8 天进行补加的情况相符合，可考虑将补加时间提前，使胆碱含量维持在合适的水平。吡哆醇含量随培养时间延长呈现逐渐下降的趋势，于培养第五天消耗殆尽。吡哆醛含量随培养时间延长呈现先增加后下降的趋势，于培养第十二天消耗殆尽，且变化趋势与补料未表现出相关性。初始培养基中吡哆醇含量远高于吡哆醛。可推测该动物细胞主要是通过将吡哆醇转化为吡哆醛，而加以利用。可考虑调整补加策略，使培养后期吡哆醛的含量维持在合适的水平。

2.4 核苷酸



图 11. 核苷酸含量变化趋势

上图的核苷酸类化合物均表现出培养前期含量较低，在培养后期含量升高的现象。其变化趋势与 feed2 的补加方法相符。据文献报道，前期添加核苷酸，可能会抑制细胞生长。而培养基中添加核苷酸，可以对蛋白质的糖基化特征产生影响。故在培养后期添加核苷酸，既可以保证细胞正常生长，又可以满足糖基化修饰的需要。

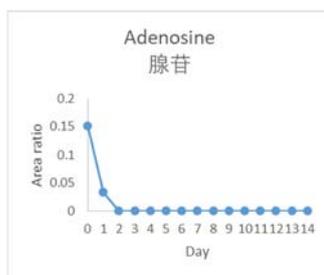


图 12. 腺苷含量变化趋势

上图中腺苷在培养第二天消耗殆尽，可酌情予以补加。

2.5 其他化合物

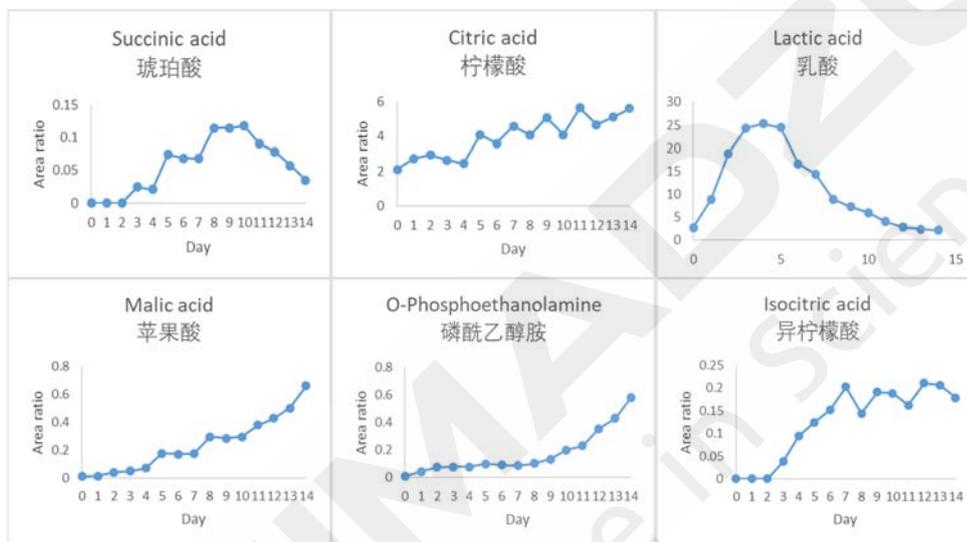


图 13. 其他化合物含量变化趋势

乳酸含量呈现出先增加后降低的变化趋势，且在培养后期维持在较低的浓度，这是在细胞培养过程中的一种较为理想的变化趋势。乳酸是在细胞快速生长阶段生成的代谢副产物，大量累积会抑制细胞生长和产物表达。在细胞生长后期，由于糖类化合物在快速生长阶段的大量消耗，细胞转而消耗乳酸，提供能量，还可以避免乳酸大量累积对细胞的毒害，从而有利于细胞维持活性和产物的高效表达。

3 结论

采用岛津LCMS-8050，结合“细胞培养上清液分析方法包”，测定了融合蛋白药物生产过程中的细胞培养上清液成分，并绘制了细胞培养上清液样品中检出化合物含量变化趋势图。细胞培养上清液中共检出 72 种成分。对部分糖类、氨基酸类、维生素类、核苷酸类及细胞代谢化合物的含量变化趋势进行了详细说明。根据细胞培养上清液成分含量变化趋势，可以指导补料添加策略的调整方向，提高细胞培养工艺优化效率。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定不同免疫细胞培养基组分差异

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用同时测定 3 种免疫细胞培养基中 95 种化合物的方法。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分离，分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合免疫细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类和其他类影响因子等化合物的高灵敏度快速检测。

关键词：超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 免疫细胞培养基

免疫细胞培养时一般需加入一定量血清，以提供必要的营养成分和细胞调节因子。但是实际生产时很难保证不同批次间血清的一致性，而且血清对免疫细胞存在潜在的毒性作用和外源污染等。为了避免不同批次间血清的质量变动，提高细胞培养和实验结果的重复性，避免血清对细胞的毒性作用和血清源性污染等，很多细胞培养基开发商开始研究开发无血清细胞培养基，即在细胞培养基中加入某些组分来替代血清。因此我们首先需要分析检测添加了血清的培养基和未添加血清的培养基之间的差异性，尽可能多地分析培养基中各组分的相对含量以及不同组分间的配比。

为满足快速全面分析细胞培养上清液组分，将基础碳源、氮源、核苷酸、维生素和其他主要代谢物一起检测分析，得到更多有关生物过程中的详细信息，我们开发出“细胞培养分析方法包”。该平台采用超高效液相色谱三重四极杆液质联用仪，仅需17分钟，即可同时监测分析95种细胞培养上清液营养成分和代谢物的相对丰度变化。

本文使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱LCMS-8050联用，利用“细胞培养分析方法包”建立了免疫细胞培养基中营养物质和细胞代谢物的液相色谱-串联质谱的同时分析方法，供相关人员参考。

1. 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-8050 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 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

柱 温 : 40 °C 流 速 : 0.35 mL/min

洗 脱 方 式 : 见细胞培养基上清液分析方法包 进 样 体 积 : 1 μ L

质谱条件

离 子 源 : ESI, 正负模式

D L 管 温 度 : 250°C

接 口 电 压 : +4.0 kV; -3.0 kV

加 热 模 块 温 度 : 400°C

雾 化 气 : 氮气 3.0 L/min

接 口 温 度 : 300°C

干 燥 气 : 氮气 10 L/min

扫 描 模 式 : 多反应监测(MRM)

加 热 气 : 空气 10 L/min

1.3 培养基相关信息

1#培养基: 无血清

2#培养基: 1#培养基+血清 A

3#培养基: 1#培养基+血清 B

1.4 数据处理

软件: LabSolutions & Traverse MS

1.5 样品制备

样品前处理方法: 取 500 μ L 细胞培养液, 在室温下离心 1 分钟 (3000 rpm), 吸取 100 μ L 离心后上清液到新的离心管中, 然后加入 20 μ L 2-异丙基苹果酸内标溶液 (0.5 mmol/L), 再加入 200 μ L 乙腈, 涡旋使充分混匀, 室温下离心 15 分钟 (15000 rpm), 精密吸取上清液 100 μ L, 加入 900 μ L 水, 涡旋混匀, 上机前再用纯水稀释 100 倍。

2. 结果及讨论

2.1 免疫细胞培养基上清液分析色谱图

使用“细胞培养分析方法包”中的方法对免疫细胞培养基中组分进行分析, 目标组分不同程度被检出, 色谱图如图 1 所示。

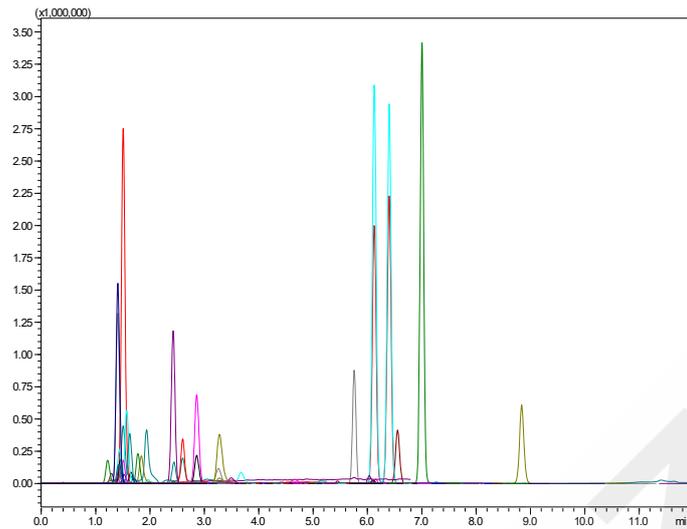


图 1. 4#培养基上清液分析色谱图

2.2 三种免疫细胞培养基中部分糖、氨基酸和维生素类化合物的含量差异

2.2.1 糖类化合物

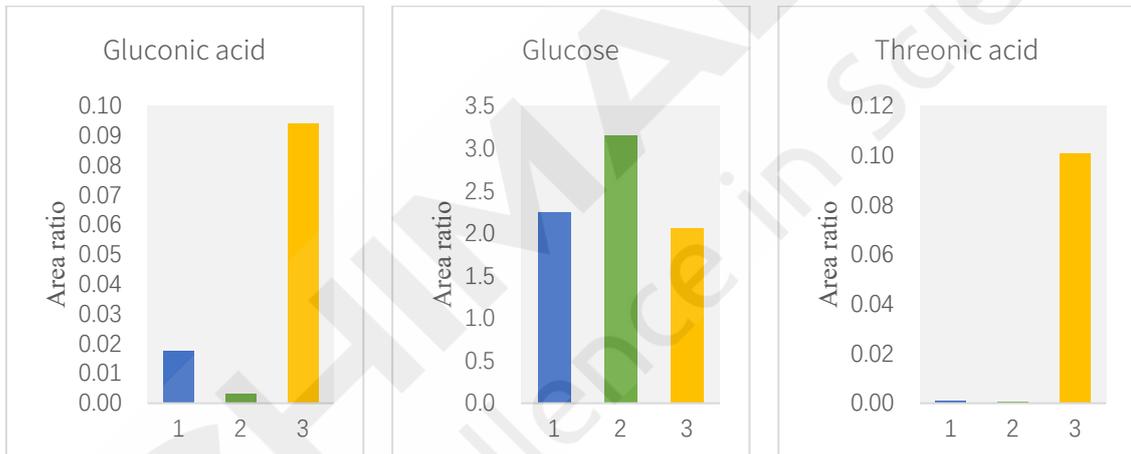


图 2. 3 种免疫细胞培养基中部分糖类化合物的相对含量差异

由图 2 可知添加了血清 B 的 3#培养基中葡萄糖酸 (Gluconic acid) 和苏糖酸 (Threonic acid) 的相对含量明显高于未添加血清的 1#培养基。所以为了配制营养丰富的无血清培养基，可以考虑在 1#培养基中提高葡萄糖酸和苏糖酸的含量；另外图 2 表明不同批次的血清中葡萄糖酸和苏糖酸含量差异比较大，所以为了保证培养基批次间一致性，最好调整培养基各组分含量，配制营养丰富的无血清培养基，避免使用天然血清。

2.2.2 氨基酸类化合物

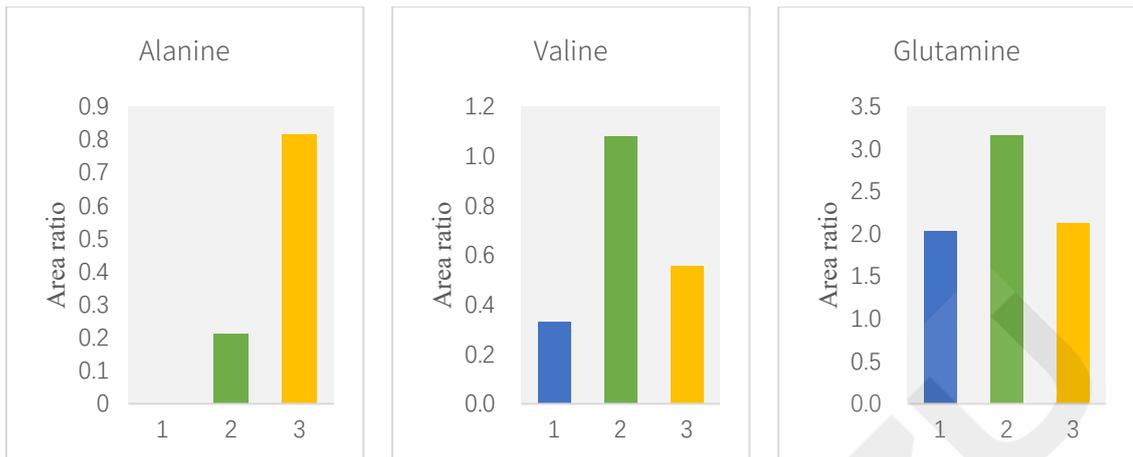


图 3.3 种免疫细胞培养基中部分氨基酸类化合物的相对含量差异

由图 3 可知加入血清后，培养基中丙氨酸（alanine）和缬氨酸（valine）的含量明显提高，因此为了保证免疫细胞培养中对丙氨酸的需求量，可以考虑在配制无血清培养基时适当提高这些氨基酸的含量并调整各氨基酸之间的配比；另外从图 3 中可看出加入了不同批次血清的 2#和 3#培养基中丙氨酸、缬氨酸和谷氨酰胺（glutamine）相对含量差异较大，再次说明不同批次间血清组分含量差异性较大。

2.2.3 核苷酸类化合物

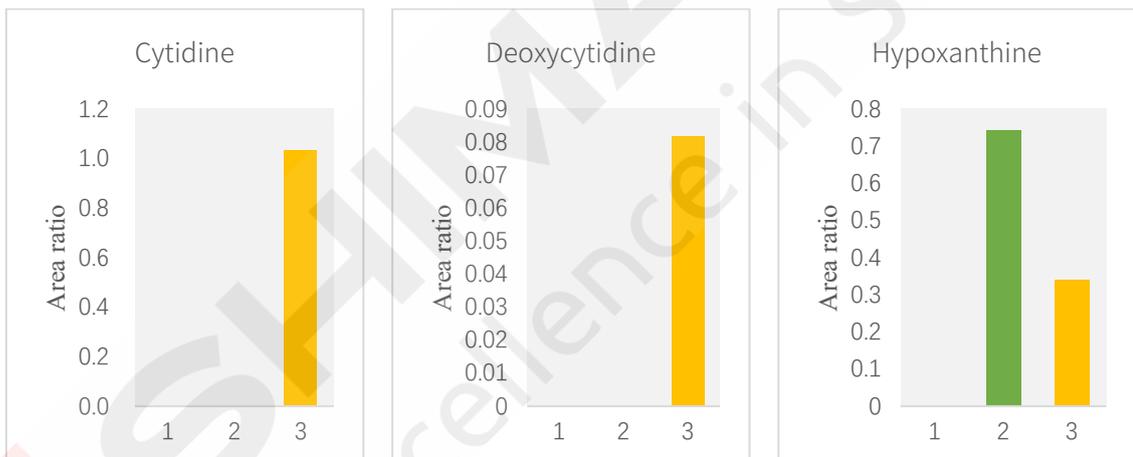


图 4.3 种免疫细胞培养基中部分核苷酸类化合物的相对含量差异

由图 4 可知不含血清的 1#培养基中胞苷（cytidine）、脱氧胞苷（deoxycytidine）和次黄嘌呤（hypoxanthine）的相对含量明显低于加了血清的 2#和 3#培养架，因此在做免疫细胞培养时可根据具体的培养要求，可适当调整核苷酸类化合物的含量。

2.2.4 维生素类化合物



图 5.3 种免疫细胞培养基中部分维生素类化合物的相对含量差异

由图 5 可知，加入了不同批次血清的 2#和 3#培养基中叶酸（folic acid）、烟酰胺（niacinamide）和维生素 B5（pantothenic acid）相对含量有所差异；维生素 B5（pantothenic acid）在未添加血清的 1#培养基中含量明显低于加了血清的培养基，因此在配制营养丰富的无血清培养基时可考虑适当提高维生素 B5 的含量。

3. 结论

采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪分析 3 种免疫细胞培养基中 95 种组分相对含量之间的差异。利用岛津“细胞培养分析方法包”快速分析了 3 种培养基中 95 种化合物的相对含量，并对培养基中糖类、氨基酸类、核苷酸类和维生素类化合物在 3 种培养基中的分布情况以图表的形式进行了详细说明。通过比较含血清培养基和无血清培养基中各营养成分的差异，可以适当调整无血清培养基中各组分的含量，从而配制符合要求的营养丰富的无血清培养基。

利用 ICPMS-2030 监控细胞培养上清液中无机元素含量变化

摘要: 本文以 2% HNO₃ 稀释样品, 使用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 对仓鼠卵巢细胞 (CHO) 培养上清液中无机元素含量进行了测试。该方法操作简单, 分析速度快, 灵敏度高, 可以对多元素进行同时测定。利用该方法, 考察了 CHO 在 2 种不同培养工艺过程中不同时间点细胞培养上清液无机元素含量变化情况, 并绘制出时间变化趋势图, 对相关研究人员判断细胞状态、改进培养基组成、优化培养工艺具有一定参考意义。

关键词: ICPMS-2030 CHO细胞培养上清液 无机元素

细胞培养基是人工模拟细胞在体内生长的营养环境, 为促进细胞生长增殖提供物质基础, 是培养细胞生长和繁殖的生存环境。细胞培养基主要包含糖类、氨基酸、维生素等有机成分, 还有微量及痕量的无机元素。无机元素含量对细胞代谢途径的调节、对某些酶和信号分子的活性起关键作用, 如低含量的铜可以促进细胞生长, 提高蛋白类药物产率, 但含量过高也会增加抗体产物的基本变体的相对量。

培养基中无机元素的变化, 对细胞生长会产生一定影响, 如细胞生长形态、分裂速度等。严格控制培养基中无机元素含量, 优化细胞培养工艺对于

提高蛋白类药物的产率, 保证细胞培养批次之间的一致性、稳定关键质量属性等因素至关重要。

本文采用直接稀释法处理细胞培养上清液样品, 使用岛津 ICPMS - 2030 电感耦合等离子体质谱仪测定了 CHO 细胞培养上清液中多种元素含量, 同时考察了 CHO 在 2 种不同培养工艺过程中不同时间点细胞培养上清液无机元素含量变化情况, 并绘制出时间变化趋势图, 有助于相关研究人员判断不同条件下细胞的生长状态, 为培养基配方优化提供指导意义。

1. 实验部分

1.1 仪器

岛津 ICPMS - 2030 电感耦合等离子体质谱仪

1.2 仪器参数

ICP-MS 仪器分析条件见表 1。

表 1. ICP-MS 分析条件

参数	参数设定	参数	参数设定
高频功率	1.20 kW	等离子体气流速	8.0 L/min
辅助气流速	1.10 L/min	载气流速	0.70 L/min
炬管类型	Mini 炬管	雾化器	同心雾化器
雾化室	旋流	雾化室温度	5°C
采样深度	5.0 mm	高频频率	27.12 MHz
碰撞气体	He	碰撞气流速	6 mL/min
池电压	-21 V	能量过滤器电压	7.0 V

1.3 细胞培养相关信息

细胞系：仓鼠卵巢细胞（CHO）

培养时间：14 天

培养工艺：从培养第三天开始每奇数天补料

1.4 样品前处理

准确移取 500 μ L 试样于 10 mL 容量瓶中，使用 2% 的 HNO₃ (V/V) 定容至刻度线，摇匀待测，同法制备样品空白溶液。对于含量高的元素可以增大稀释倍数后测试。

2. 结果与讨论

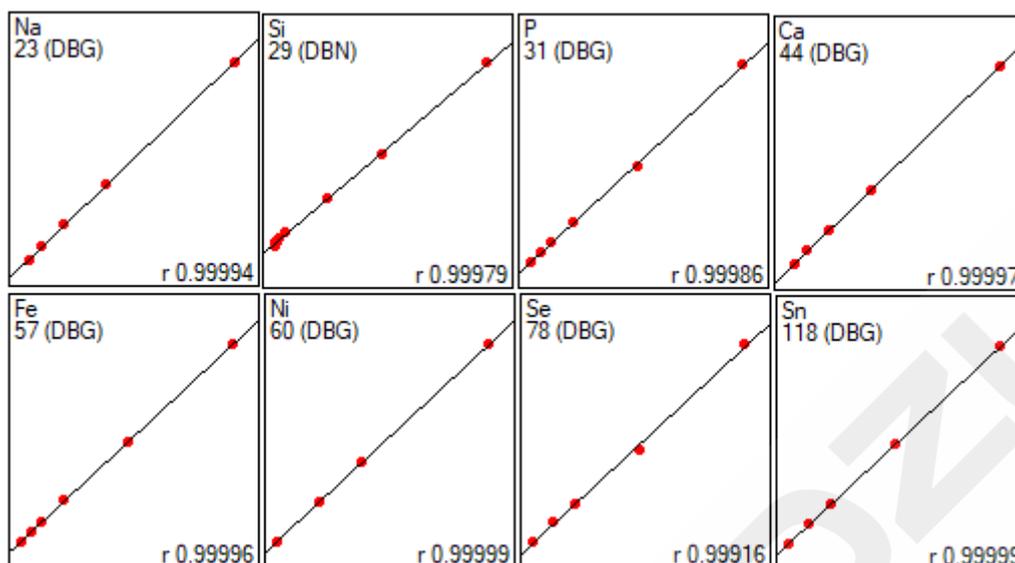
2.1 标准曲线溶液配制

配制介质为 2% (V/V) HNO₃ 的混合系列标准溶液于 50 mL 容量瓶中，配制溶液浓度如表 2 所示。内标元素 ⁴⁵Sc、⁷²Ge 浓度为 500 μ g/L，¹⁰³Rh 浓度为 100 μ g/L，采用内标组件在线添加。

表 2. 元素标准溶液浓度及分析质量数

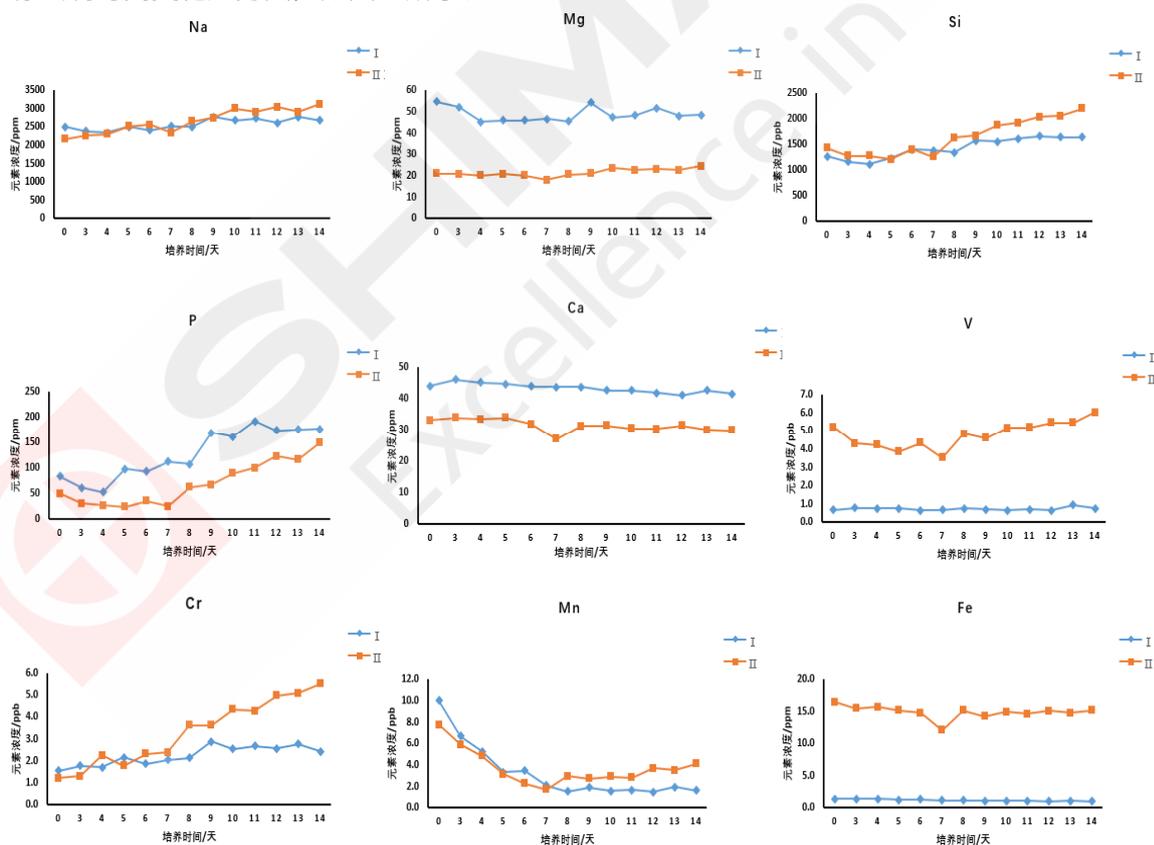
元素	质量数 (amu)	内标	标准曲线浓度(μ g/L)					
			STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6
Na	23	⁴⁵ Sc	0.00	200	500	1000	2000	5000
Mg	24	⁴⁵ Sc	0.00	200	500	1000	2000	5000
Si	28	⁴⁵ Sc	0.00	2.00	5.00	10.0	50.0	100.0
P	31	⁴⁵ Sc	0.00	50.0	100	200	500	1000
Ca	44	⁴⁵ Sc	0.00	200	500	1000	2000	5000
V	51	⁴⁵ Sc	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Cr	52	⁴⁵ Sc	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Mn	55	⁴⁵ Sc	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Fe	57	⁷² Ge	0.00	50.0	100	200	500	1000
Co	59	⁷² Ge	0.00	2.00	5.00	10.0	50.0	100.0
Ni	60	⁷² Ge	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Cu	65	⁷² Ge	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Zn	66	⁷² Ge	0.00	10.0	50.0	100	200	500
Se	78	⁷² Ge	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Mo	95	¹⁰³ Rh	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--
Sn	118	¹⁰³ Rh	0.00	1.00	2.00	5.00	10.0	--

2.2 部分元素标准曲线如下



2.3 无机元素含量变化趋势图

取 2 种不同培养工艺中不同时间点细胞培养上清液进行测试，以无机元素含量为纵坐标，培养时间为横坐标绘制时间变化趋势图，如图 1 所示。



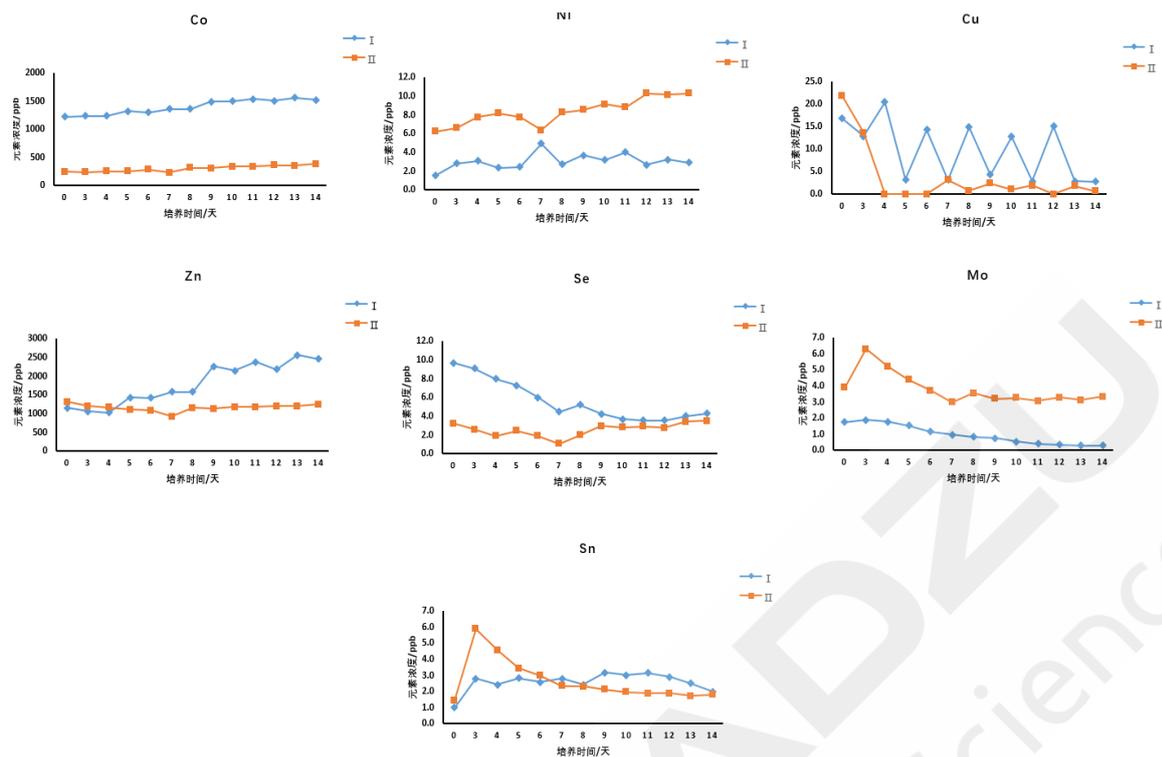


图 1 细胞培养上清液无机元素含量变化趋势图

两种不同培养工艺中，元素 Na、Mg、Ca、V、Fe、Co、Ni 等元素含量随着时间的变化，均趋于平稳状态，元素 Si、P、Cr、Zn 等元素呈现上升趋势，元素 Mn、Se、Mo 等元素呈现下降趋势，元素 Sn 先升后降，元素 Cu 在培养工艺 I 中处于波动状态，在培养工艺 II 中呈下降趋势。不同培养工艺中，I 中元素 Mg、P、Ca、Co、Zn、Se 等含量明显高于 II，V、Fe、Ni、Mo 等元素明显低于 II。

3. 结论

本文使用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 对仓鼠卵巢细胞 (CHO) 培养上清液中无机元素含量进行了测试。考察了在 2 种不同培养工艺过程中不同时间点 CHO 细胞培养上清液中无机元素含量变化情况，并绘制出时间变化趋势图，对相关研究人员判断细胞状态、改进培养基组成、优化培养工艺具有一定参考意义。

分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本产品资料所宣传的内容,以本版本为准,资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考,如有变动恕不另行通知。

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市南山区粤海街道高新南七道18号高新技术产业园区R3-B座一楼
邮政编码: 518057
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028,OCEAN CENTRE,HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI,KOWLOON,HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。