

LCMS-8060 细胞培养基上清液分析 方法包测定上清液成份

LCMSMS-221

摘要：本文使用细胞培养基上清液分析方法包对不同时间点的发酵液进行了成分测定。利用方法包中的条件对发酵液中的 95 种成份进行了半定量分析，使用方法包中的内标物 2-异丙基苹果酸对发酵过程中所涉及的碳源、氮源、微量元素、维生素及代谢物等组分的结果进行了半定量分析。该分析结果为发酵过程中各组分含量的变化提供了量化的参考依据。

关键词：三重四极杆质谱 细胞培养基上清液分析方法包 发酵液

近年来，生物技术工业发展迅速，发酵技术也有了很大的发展，并且已经进入能够人为控制和改造微生物，使这些微生物为人类生产产品的现代发酵工程阶段。现代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种并且提高其产量；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。岛津公司推出的细胞培养基上清液分析方法包即为发酵过程中各组分的量化监控提供了有效的手段。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：见细胞培养基上清液分析方法包

流动相：见细胞培养基上清液分析方法包

流速：0.35 mL/min

柱温：40°C

进样量：1 µL

洗脱方式：见细胞培养基上清液分析方法包

质谱条件

离子化模式：ESI(+/-)

加热气：空气 10.0 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测(MRM)

监控的化合物信息：见表 1

表 1 细胞培养方法包中 96 种化合物列表

编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别	编号	化合物名	类别
1	2-	内标	33	N-	氨基酸	65	Cytidine	核苷酸
2	Gluconic acid	糖类	34	N-	氨基酸	66	Cytidine	核苷酸
3	Glucosamine	糖类	35	Ornithine	氨基酸	67	Deoxycytidine	核苷酸
4	Hexose	糖类	36	Oxidized	氨基酸	68	Guanine	核苷酸
5	Sucrose	糖类	37	Phenylalanine	氨基酸	69	Guanosine	核苷酸
6	Threonic acid	糖类	38	Pipecolic acid	氨基酸	70	Guanosine	核苷酸
7	2-Aminoacidic	氨基酸	39	Proline	氨基酸	71	Hypoxanthine	核苷酸
8	4-	氨基酸	40	Serine	氨基酸	72	Inosine	核苷酸
9	4-	氨基酸	41	Threonine	氨基酸	73	Thymidine	核苷酸
10	5-	氨基酸	42	Tryptophan	氨基酸	74	Thymine	核苷酸
11	5-Oxoproline	氨基酸	43	Tyrosine	氨基酸	75	Uracil	核苷酸
12	Alanine	氨基酸	44	Valine	氨基酸	76	Uric acid	核苷酸
13	Alanyl-	氨基酸	45	4-	维生素	77	Uridine	核苷酸
14	Arginine	氨基酸	46	Ascorbic acid	维生素	78	Xanthine	核苷酸
15	Asparagine	氨基酸	47	Ascorbic acid	维生素	79	Xanthosine	核苷酸
16	Aspartic acid	氨基酸	48	Biotin	维生素	80	Penicillin G	抗生素
17	Citrulline	氨基酸	49	Choline	维生素	81	2-Aminoethanol	其他
18	Cystathionine	氨基酸	50	Cyanocobalam	维生素	82	2-Ketoisovaleric acid	其他
19	Cysteine	氨基酸	51	Ergocalciferol	维生素	83	3-Methyl-2-	其他
20	Cystine	氨基酸	52	Folic acid	维生素	84	4-	其他
21	Glutamic acid	氨基酸	53	Folinic acid	维生素	85	Citric acid	其他
22	Glutamine	氨基酸	54	Lipoic acid	维生素	86	Ethylenediamine	其他
23	Glutathione	氨基酸	55	Niacinamide	维生素	87	Fumaric acid	其他
24	Glycine	氨基酸	56	Nicotinic acid	维生素	88	Glyceric acid	其他

25	Glycyl-	氨基酸	57	Pantothenic	维生素	89	Histamine	其他
26	Histidine	氨基酸	58	Pyridoxal	维生素	90	Isocitric acid	其他
27	Isoleucine	氨基酸	59	Pyridoxine	维生素	91	Lactic acid	其他
28	Kynurenine	氨基酸	60	Riboflavin	维生素	92	Malic acid	其他
29	Leucine	氨基酸	61	Tocopherol	维生素	93	O-	其他
30	Lysine	氨基酸	62	Adenine	核苷酸	94	Putrescine	其他
31	Methionine	氨基酸	63	Adenosine	核苷酸	95	Pyruvic acid	其他
32	Methionine sulfoxide	氨基酸	64	Adenosine monophosphate	核苷酸	96	Succinic acid	其他

1.3 内标液的配制

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

1.4 样品前处理方法

取 500 μ L 发酵液初步离心（室温，3000 rpm, 1 min），取 300 μ L 上清至进样小瓶中，从中取 100 μ L 至另一离心管中加入 20 μ L 内标溶液，加入 200 μ L 乙腈，充分振匀室温 15000 rpm, 15 min 再次离心。取 100 μ L 上清加入 900 μ L 超纯水充分振匀后直接上样分析。

结果与讨论

2.1 部分组份 MRM 色谱图

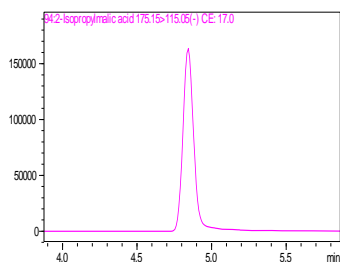


图 1 空白加内标色谱图

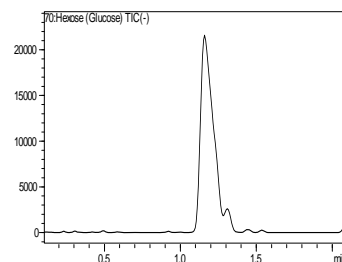


图 2 葡萄糖色谱图

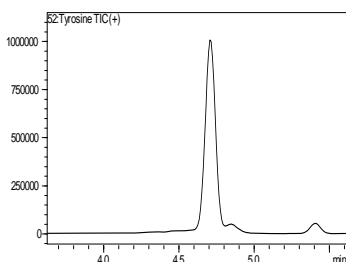


图 3 酪氨酸色谱图

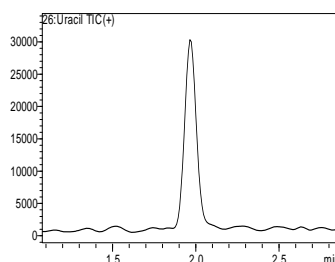


图 4 尿嘧啶色谱图

2.2 发酵液中部分组份含量变化趋势图

取相同培养液不同发酵时间点的样品进行测定，以 2-异丙基苹果酸为内标得到不同组

份的面积比，以面积比做纵轴，时间点为横轴做曲线，得到不同时间点时组份含量的变化趋势图如下所示：

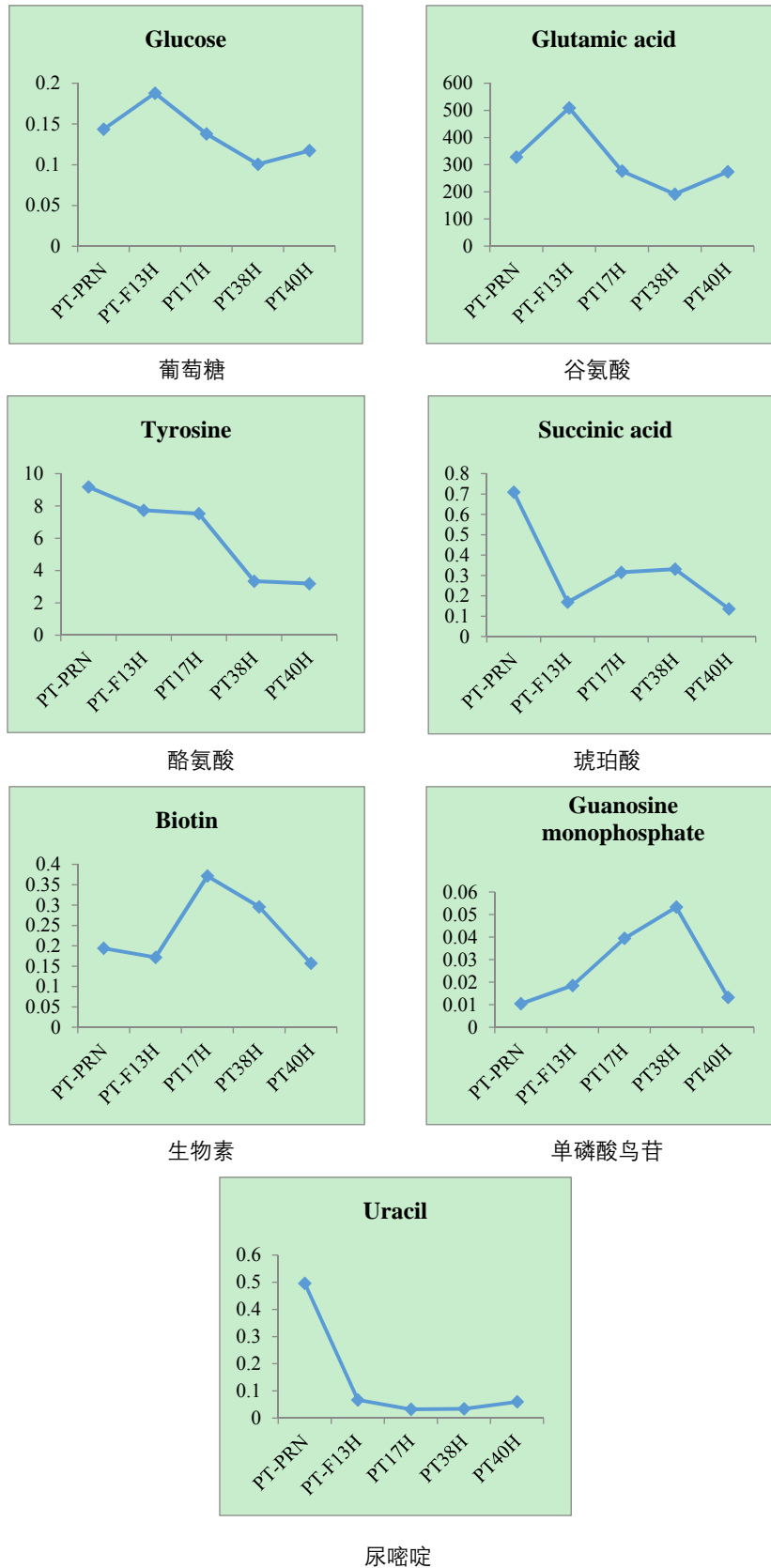


图 5 上清液组份含量变化趋势图

■ 结论

本文利用细胞培养基上清液分析方法包及超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8060 这种新型的方式为传统的发酵过程的监控提供了一种新的思路，即量化的方式精准地对发酵的过程进行监控。由此可以为发酵工程从实验室到中试，从中试到大规模生产过程提供有效的量化参考，可大大提高发酵生产的效率，降低生产成本。