

# 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

## LCMSMS-225

**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“细胞培养分析方法

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-8050联用, 利用“细胞培养分析方法包”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。

### 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-20A<sub>5</sub> 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。

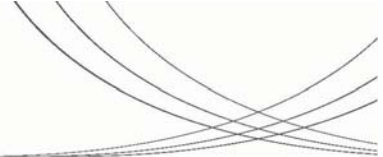
#### 1.2 分析条件 液相色谱条件

分析仪器: LC-30A系统

色谱柱: 见“细胞培养分析方法包”

流动相: 见“细胞培养分析方法包”

流速: 0.35 mL/min



进样体积：1  $\mu$ L  
柱温：40 $^{\circ}$ C  
洗脱方式：梯度洗脱  
时间程序：见“细胞培养分析方法包”

加热模块温度：400 $^{\circ}$ C  
接口温度：300 $^{\circ}$ C  
扫描模式：多反应监测 (MRM)  
驻留时间：2.0-5.0 ms  
MRM 参数：见“细胞培养分析方法包”  
化合物：见表 1

LCMSMS-225

#### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8050  
离子源：ESI, 正负离子同时扫描  
离子源接口电压：+4.0 kV; -3.0 kV  
雾化气：氮气 3.0 L/min  
干燥气：氮气 15 L/min  
加热气：空气 10 L/min  
碰撞气：氩气  
脱溶剂管温度：250 $^{\circ}$ C

#### 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  $\mu$ L 细胞培养液，在室温下离心 1 分钟 (3000 rpm)，吸取 100  $\mu$ L 离心后上清液到新的离心管中，然后加入 20  $\mu$ L 2-异丙基苹果酸内标溶液 (0.5 mmol/L)，再加入 200  $\mu$ 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  $\mu$ L，加入 900  $\mu$ L 水，涡旋混匀，上机前再用纯水稀释 100 倍，即得。

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-Isopropylmalic acid	内标	33	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	65	Cytidine	核苷酸
2	Gluconic acid	糖类	34	N-Acetylcysteine	氨基酸	66	Cytidine monophosphate	核苷酸
3	Glucosamine Carbohydrate	糖类	35	Ornithine	氨基酸	67	Deoxycytidine	核苷酸
4	Hexose (Glucose) Carbohydrate	糖类	36	Oxidized glutathione	氨基酸	68	Guanine	核苷酸
5	Sucrose Carbohydrate	糖类	37	Phenylalanine	氨基酸	69	Guanosine	核苷酸
6	Threonic acid Carbohydrate	糖类	38	Pipecolic acid	氨基酸	70	Guanosine monophosphate	核苷酸
7	2-Amino adipic acid	氨基酸	39	Proline	氨基酸	71	Hypoxanthine	核苷酸
8	4-Aminobutyric acid	氨基酸	40	Serine	氨基酸	72	Inosine	核苷酸
9	4-Hydroxyproline	氨基酸	41	Threonine	氨基酸	73	Thymidine	核苷酸
10	5-Glutamylcysteine	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-glutamine	氨基酸	45	4-Aminobenzoic acid	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 2-phosphate	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	Cyanocobalamin	维生素	82	2-Ketoisovaleric acid	其他
19	Cysteine	氨基酸	51	Ergocalciferol	维生素	83	3-Methyl-2-oxovaleric acid	其他
20	Cystine	氨基酸	52	Folic acid	维生素	84	4-Hydroxyphenyllactic acid	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-glutamine	氨基酸	57	Pantothenic acid	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 acetate	维生素	93	O-Phosphoethanolamine	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

## 结果及讨论

### 2.1 藤黄杆菌培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养分析方法包”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。

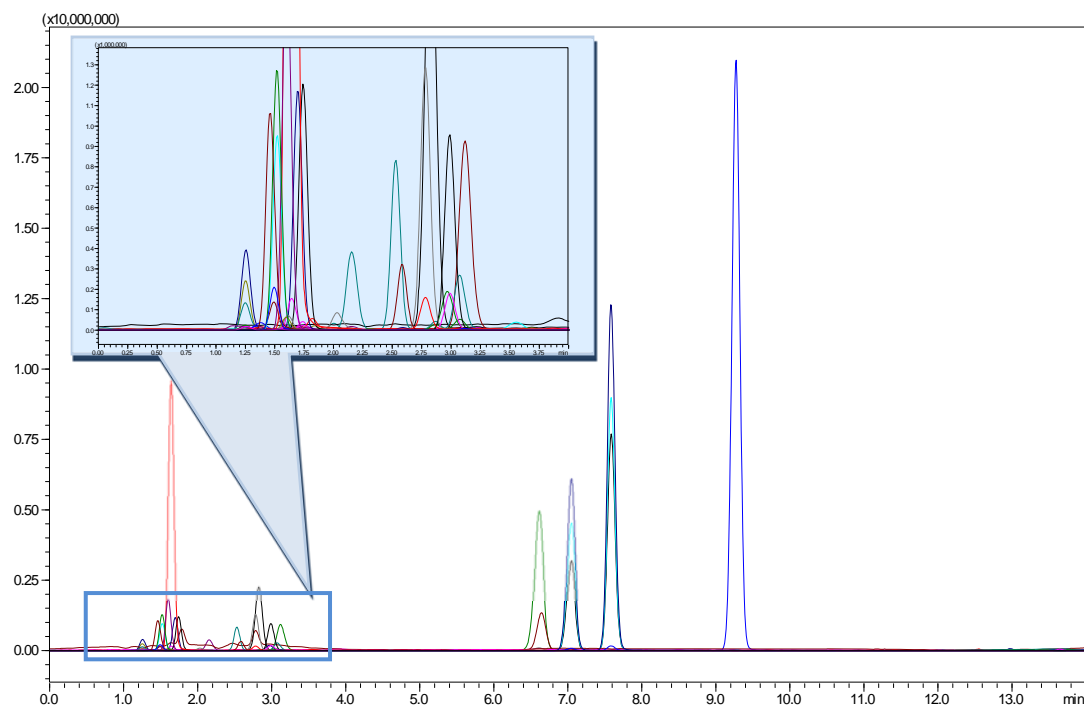


图 1 藤黄杆菌上清液 (4 h) 分析色谱图

### 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

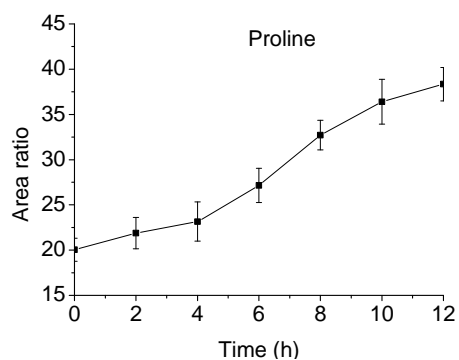


图 2 脯氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

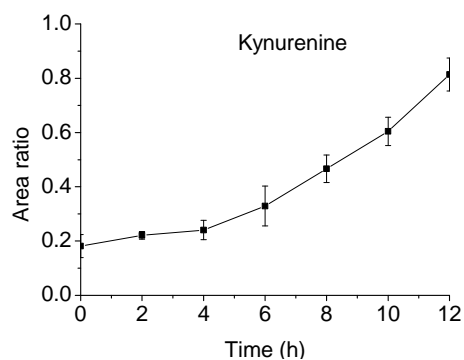


图 3 犬尿氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

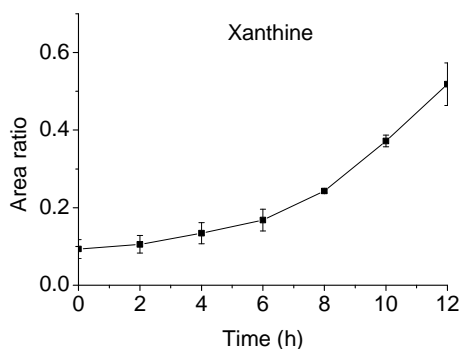


图 4 黄嘌呤在培养过程中峰面积比变化趋势

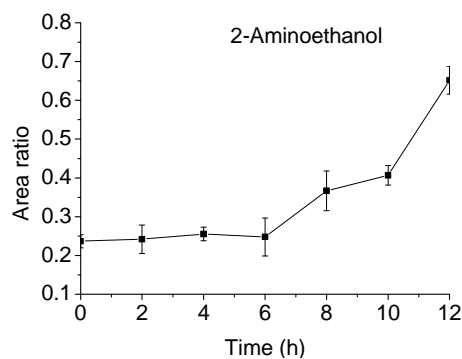


图 5 2-氨基乙醇在培养过程中峰面积比变化趋势

### 2.2.2 随着培养时间增长峰面积比逐渐减小的化合物

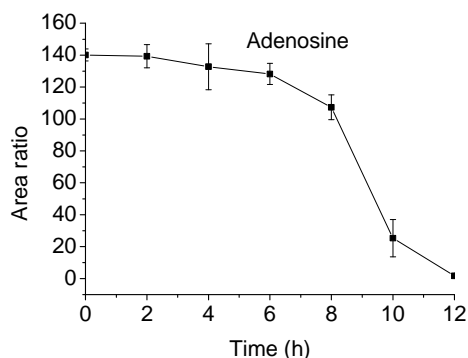


图 6 腺苷在培养过程中峰面积比变化趋势

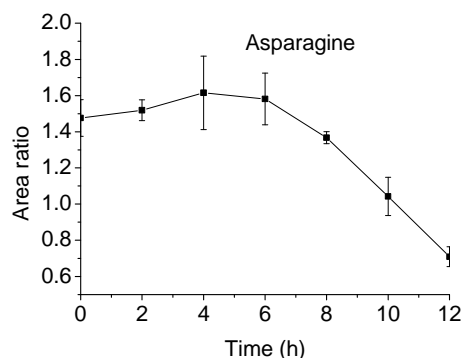
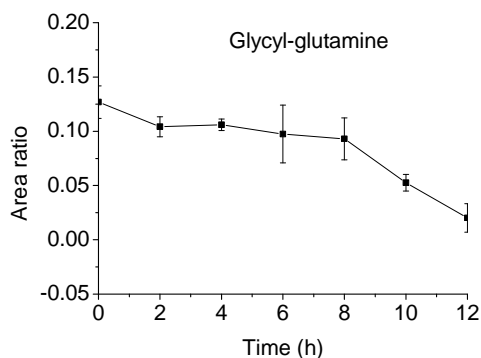


图 7 天冬酰胺在培养过程中峰面积比变化趋势



8 氨基乙酰基谷氨酰胺在培养过程中峰面积比变化趋势

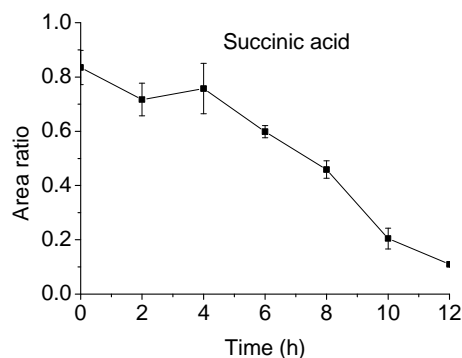


图 9 琥珀酸在培养过程中峰面积比变化趋势

图

### 2.2.3 随着培养时间增长峰面积比几乎不变的化合物

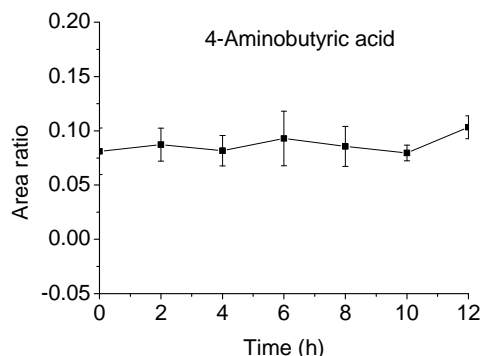


图 10 4-氨基丁酸在培养过程中峰面积比变化趋势

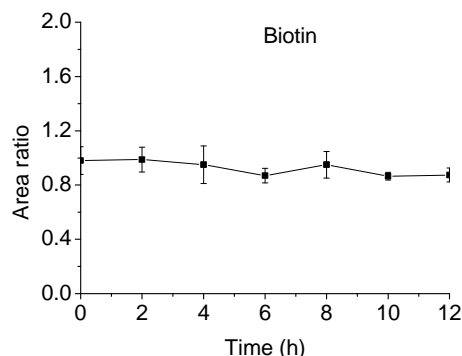


图 11 生物素在培养过程中峰面积比变化趋势

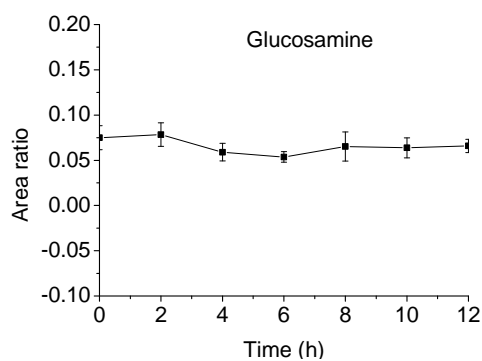


图 12 葡萄糖胺在培养过程中峰面积比变化趋势

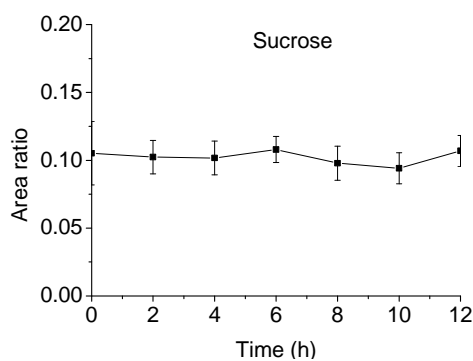


图 13 蔗糖在培养过程中峰面积比变化趋势

### 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

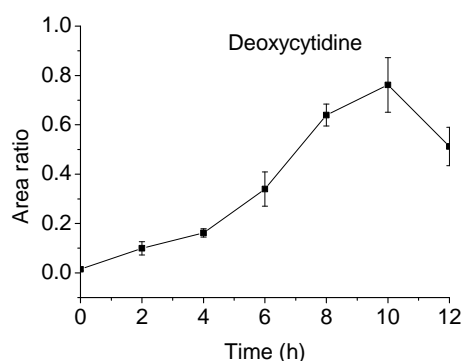


图 14 脱氧胞苷在培养过程中峰面积比变化趋势

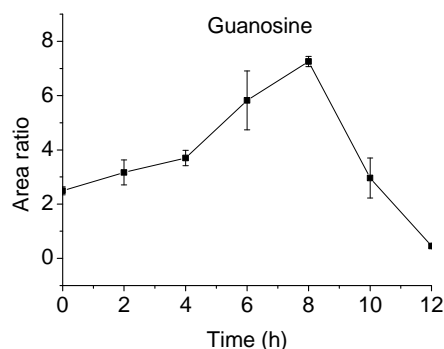


图 15 鸟苷在培养过程中峰面积比变化趋势

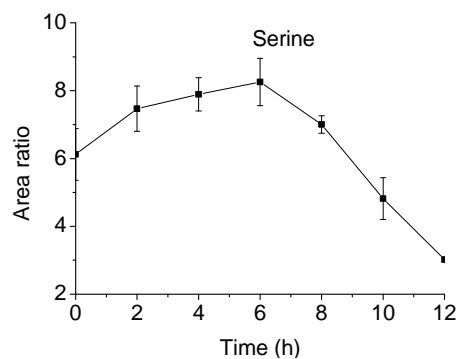
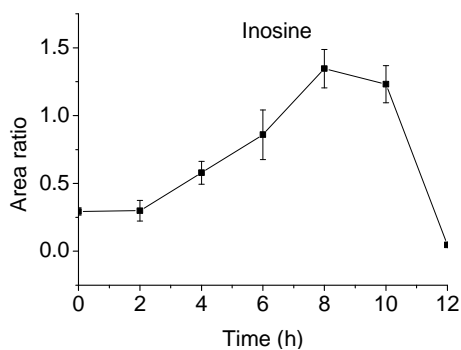


图 16 肌苷在培养过程中峰面积比变化趋势

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“细胞培养分析方法包”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。

## 结论

采用岛津公司 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“细胞培养分析方法包”，无需优化仪器参数，方法操作简单，结果直观。