

利用 LC-MS/MS 分析三种用于抗体药物生产的培养基组分差异

LCMSMS-278

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-8045 联用同时测定 3 种用于抗体药物生产的培养基中 95 种化合物的方法。该方法在 17 min 内完成 95 种化合物的分析，速度快、重复性好、灵敏度高，适合用于抗体药物生产的培养基中氨基酸类、维生素类和其他类影响因子的高灵敏度快速检测。利用该方法可快速对比不同类别和不同批次培养基之间的组分差异，从而根据抗体生产的要求选择合适的培养基，提高抗体生产效率。

关键词：超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 抗体药物生产 培养基

动物细胞大规模培养和抗体质量分析已然成为抗体药物产业化的主要限制因素。培养基优化作为动物细胞大规模培养的关键环节，对抗体质量的影响显得尤为重要。众所周知，培养基开发与生产用细胞株特征关系密切，因此，在培养基开发过程中需要围绕生产用细胞株的特点进行“个性化培养基”的设计与优化，了解每种细胞在培养过程中对各种营养成分的消耗，以及自身分泌物对细胞生产繁殖的影响。

为满足快速全面分析细胞培养基组分，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 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-8045 联用，利用“细胞培养上清液方法包”建立了用于抗体药物生产的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。

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-8045 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-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 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“细胞培养上清液方法包”

流动相：见“细胞培养上清液方法包”

流速：0.35 mL/min

进样体积：1 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱

时间程序：见“细胞培养上清液方法包”

质谱条件

分析仪器：LCMS-8045

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℃

加热模块温度：400℃

接口温度：300℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：4.0-97.0 ms

MRM 参数：见“细胞培养上清液方法包”

化合物：见表 1

1.3 培养基

三种用于抗体药物生产的培养基分别为：1# 培养基、2# 培养基和 3# 培养基。

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 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。

表1 细胞培养上清液方法包中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-Acetylaspatic 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-Aminoadipic 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

结果讨论

2.1 用于抗体药物生产的培养基组分分析色谱图

使用“细胞培养上清液方法包”中的方法对用于抗体药物生产的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。

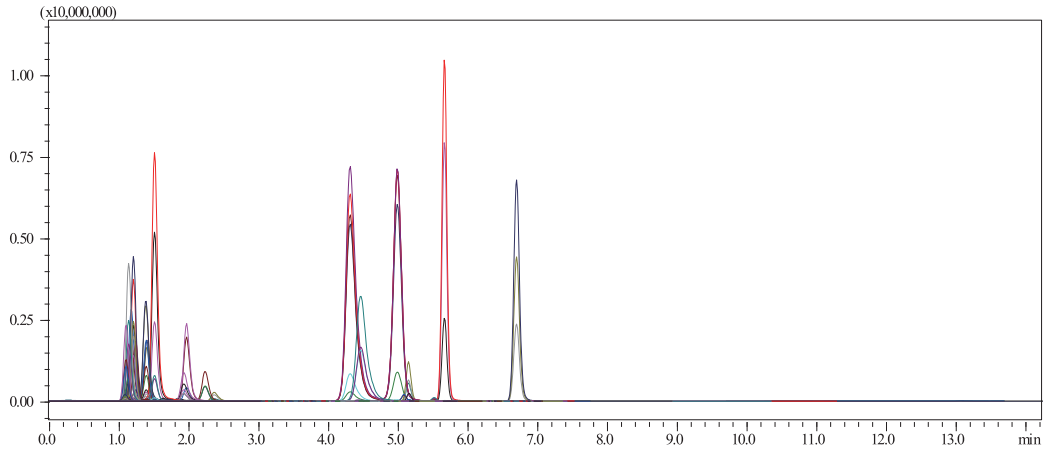


图1 1#培养基上清液分析色谱图

2.2 三种用于抗体药物生产的培养基中部分氨基酸、维生素和其他类化合物的含量差异

2.2.1 氨基酸类化合物

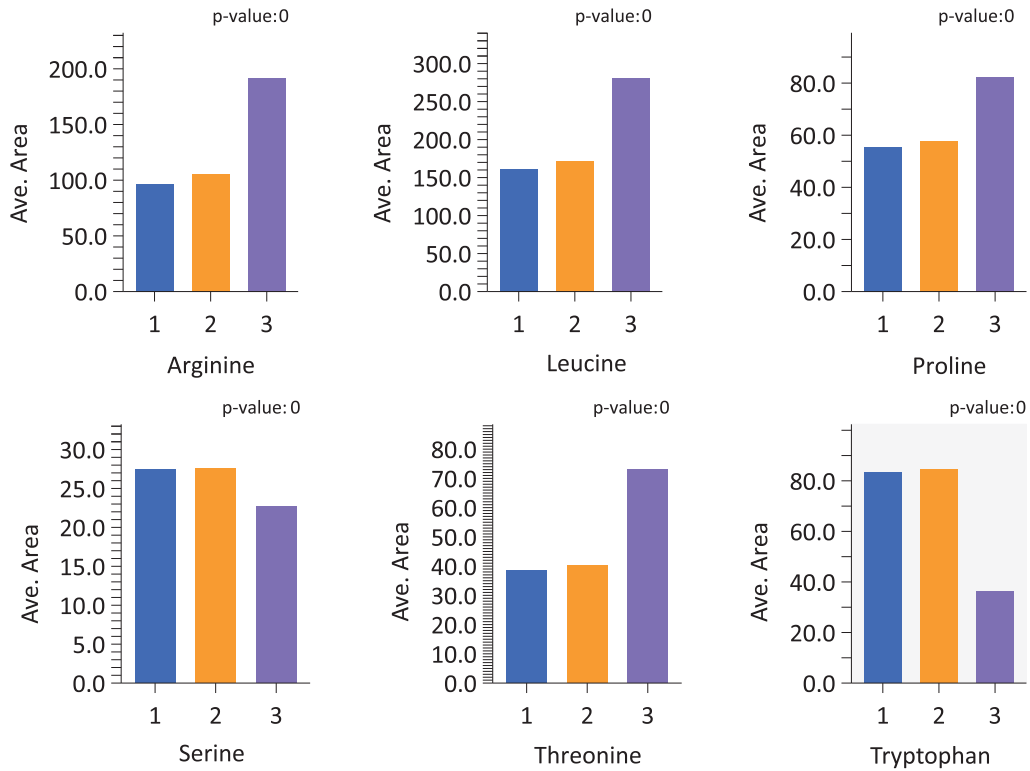


图2 3种用于抗体药物生产的培养基中部分氨基酸类化合物的相对含量差异

2.2.2 维生素类化合物

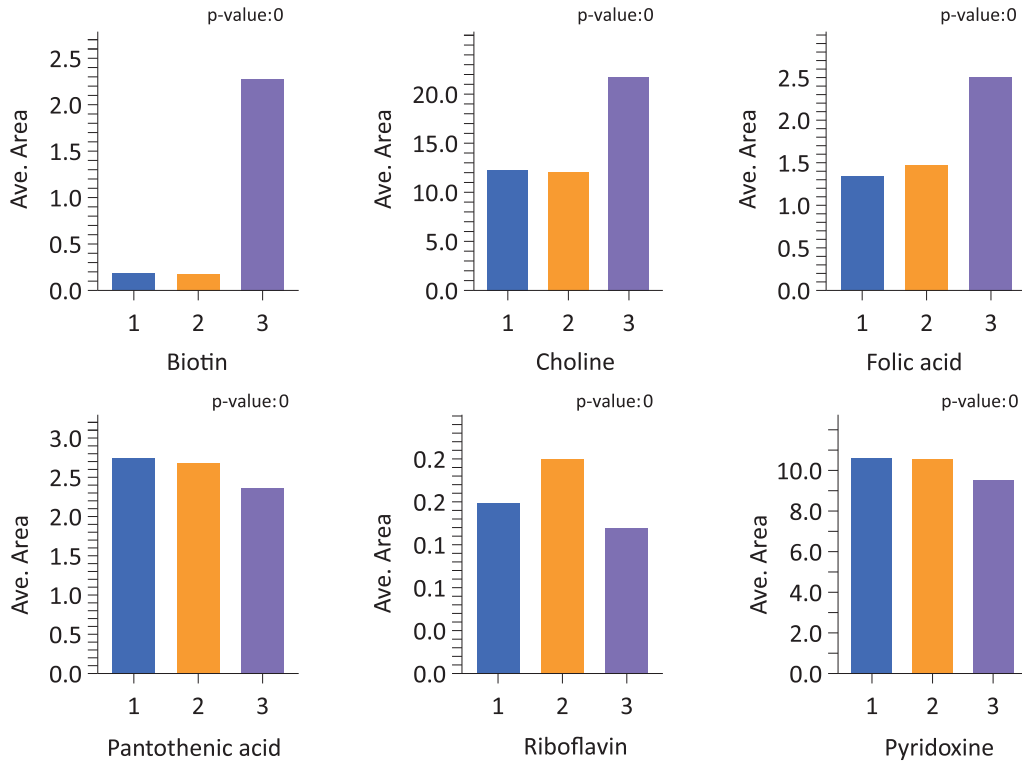


图3 3种用于抗体药物生产的培养基中部分维生素类化合物的相对含量差异

2.2.3 其他类化合物

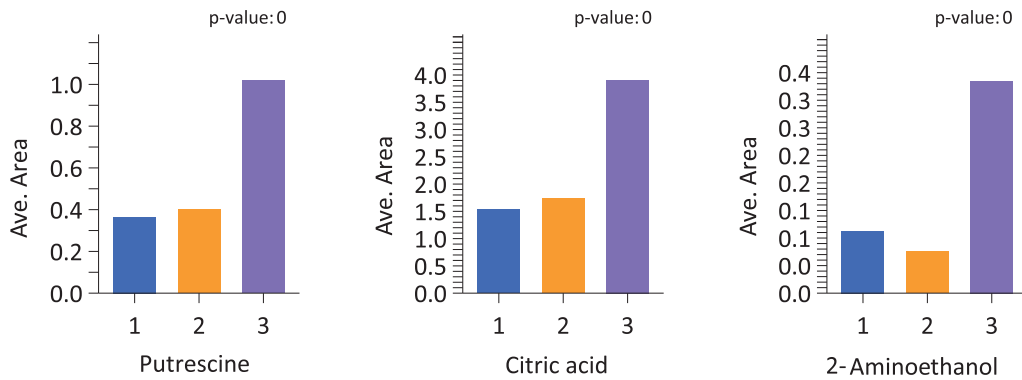


图4 3种用于抗体药物生产的培养基中其他类化合物的相对含量差异

图 2-4 中纵坐标为峰面积比，横坐标代表 3 个培养基样品。结果显示 1# 和 2# 培养基中每个对应的氨基酸、维生素和其他类化合物的峰面积比相差不大，表明这两个培养基组成以及比例相近，而 3# 培养基样品与 1# 和 2# 相差比较大。

■ 结论

采用岛津公司 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪分析 3 种用于抗体药物生产的动物细胞培养基中 95 种组分相对含量之间的差异。利用岛津“细胞培养上清液方法包”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、氨基酸类和其他类化合物在 3 种培养基中的分布情况以图表的形式进行了详细说明。