

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 同时测定哺乳动物细胞培养上清液中 95 种化合物

LCMSMS-242

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 联用同时测定哺乳动物细胞培养上清液中 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 哺乳动物细胞培养上清液

适宜的培养基组成与优选的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。

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“细胞培养分析方法包”建立了哺乳动物细胞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-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

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 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱

时间程序：见“细胞培养分析方法包”

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°C

加热模块温度：400°C

接口温度：300°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

1.3 哺乳动物细胞培养相关信息

细胞：哺乳动物细胞

培养时间：13 天

培养基：含血清培养基

培养工艺：每天加料

1.4 数据处理

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 100 倍。

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-L-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-L-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 哺乳动物细胞培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养分析方法包”中的方法对哺乳动物细胞培养上清液中的组分进行分析，目标组分不同程度被检出，色谱图如图 1 所示。

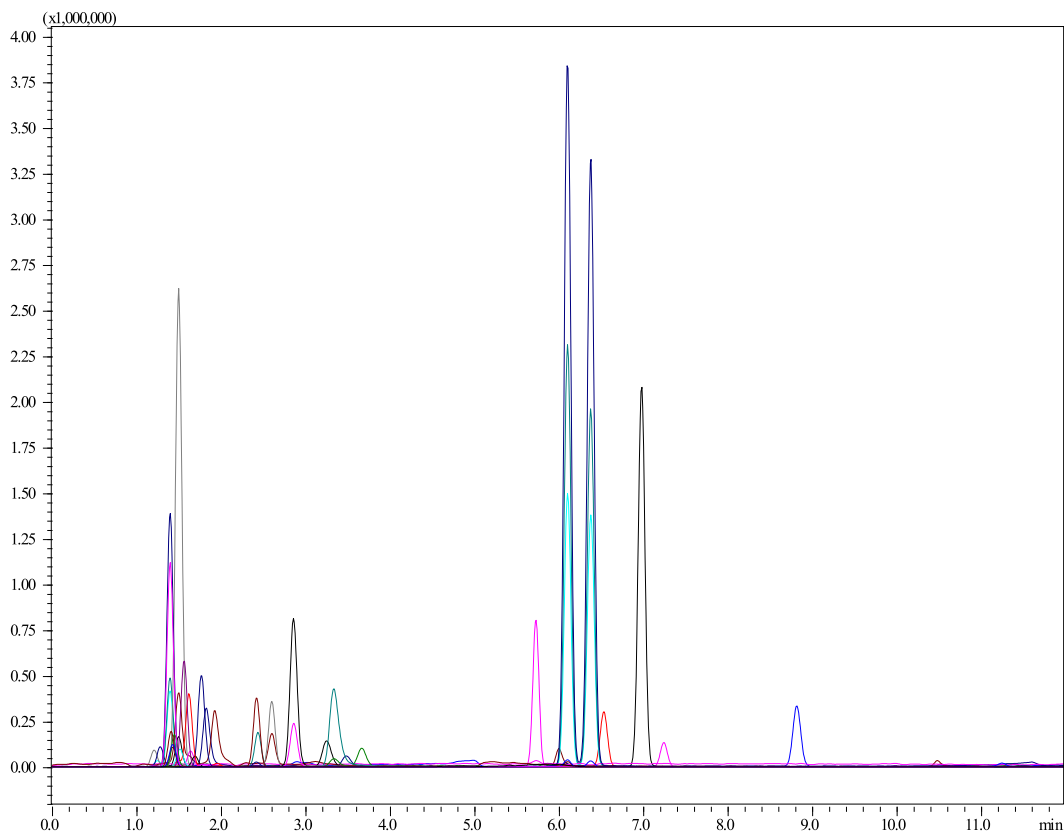
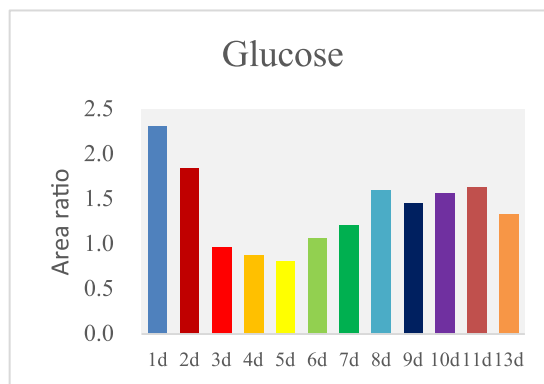
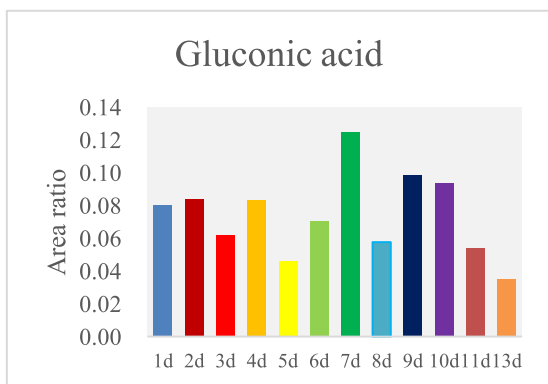


图1 哺乳动物细胞培养上清液（1d）分析色谱图

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

在持续加料的培养过程中 95 种化合物检测取样点分别为 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d、9d、10d、11d 和 13d。

2.2.1 培养过程中部分糖类化合物相对含量变化情况 (1-13d)



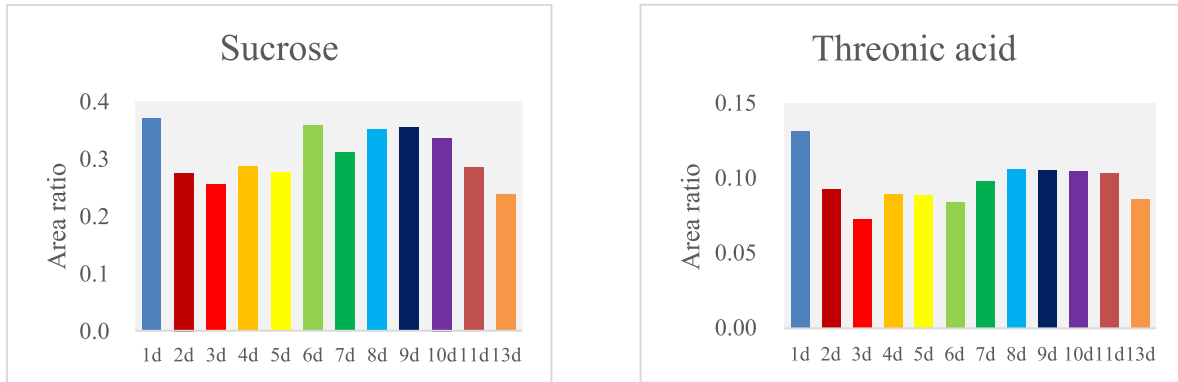


图2 哺乳动物细胞在1-13d培养过程中部分糖类化合物相对含量变化情况

由图2可知3-6d葡萄糖 (glucose) 的消耗最多, 由此可判断哺乳动物细胞在这段时间内生长比较旺盛, 可考虑在这段时间适当增加加料量以补充细胞生长所需碳源。

2.2.2 培养过程中部分氨基酸类化合物相对含量变化情况 (1-13d)

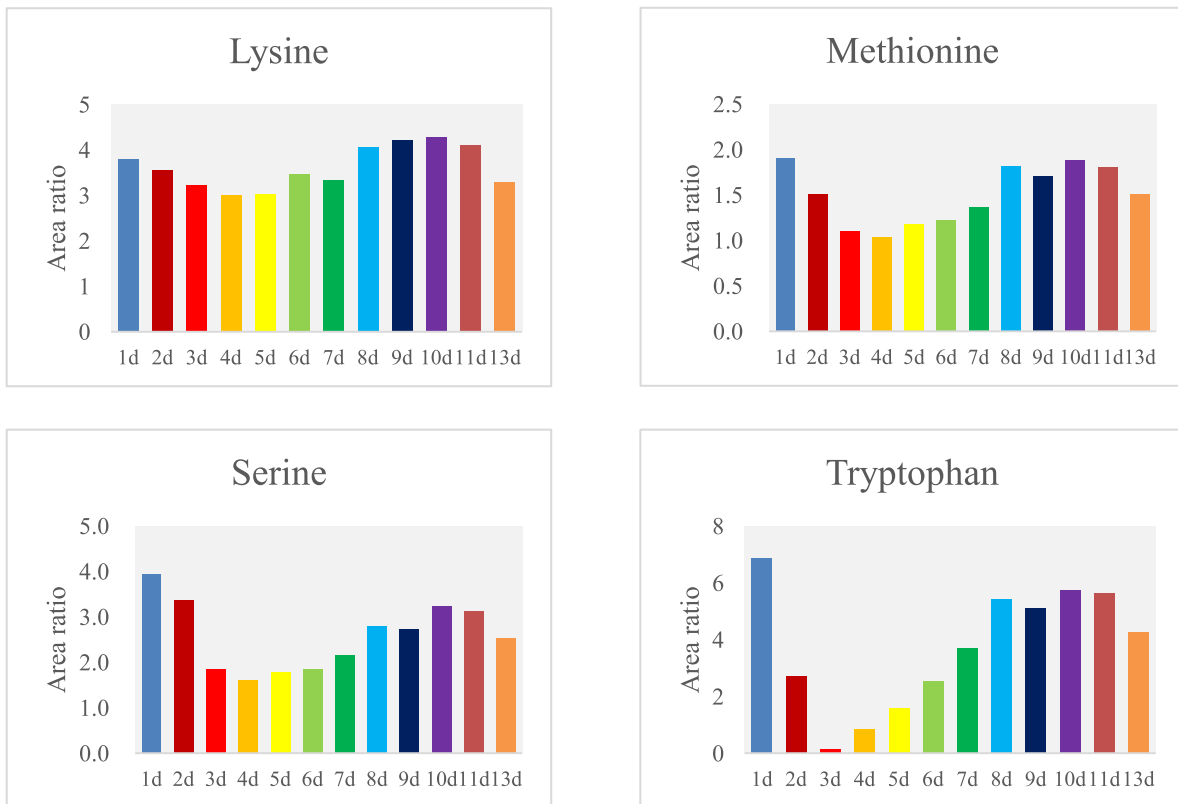


图3 哺乳动物细胞在1-13d培养过程中部分氨基酸类化合物相对含量变化情况

由图3可看出赖氨酸 (lysine)、蛋氨酸 (methionine)、丝氨酸 (serine) 和色氨酸 (tryptophan) 在3-6d的相对含量最小, 尤其是色氨酸在第3d时相对含量几乎为零, 由此可知这些氨基酸在3-6d时消耗量最大, 在过程加料时可考虑适当增加加料液中这些氨基酸的相对含量。

2.2.3 培养过程中部分维生素类化合物相对含量变化情况 (1-13d)

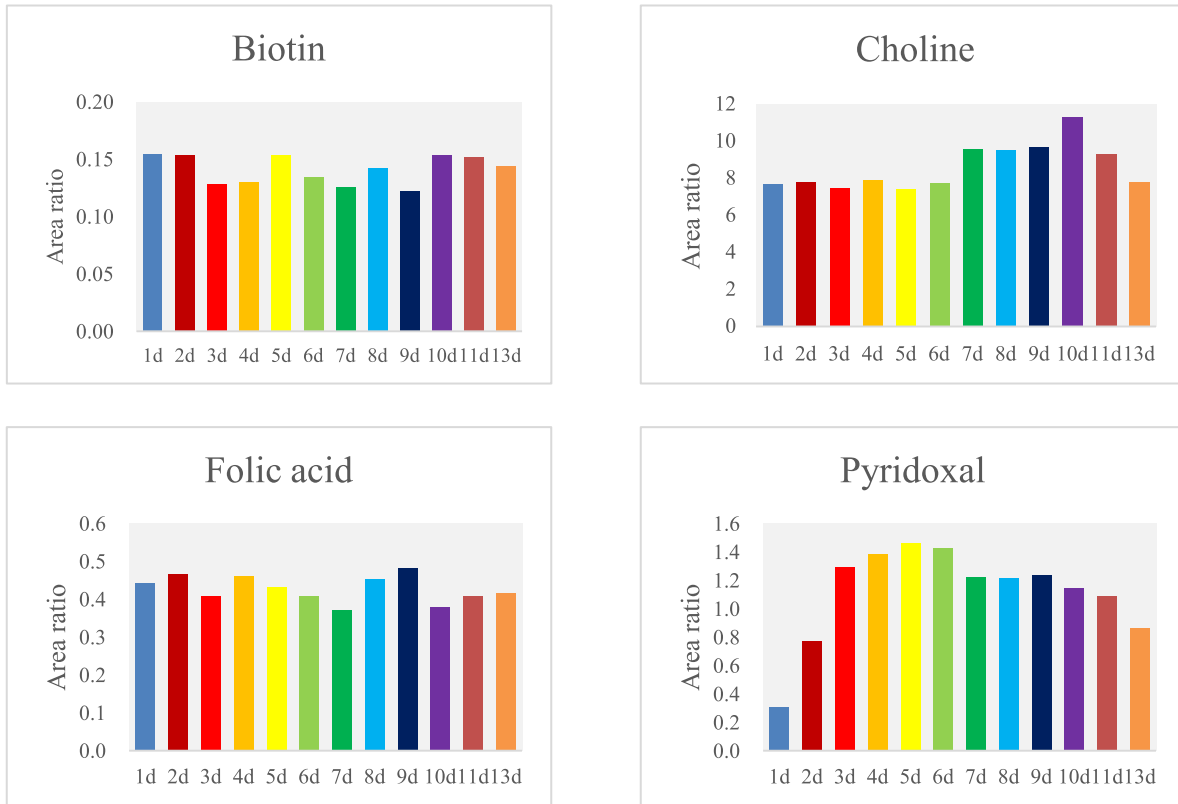
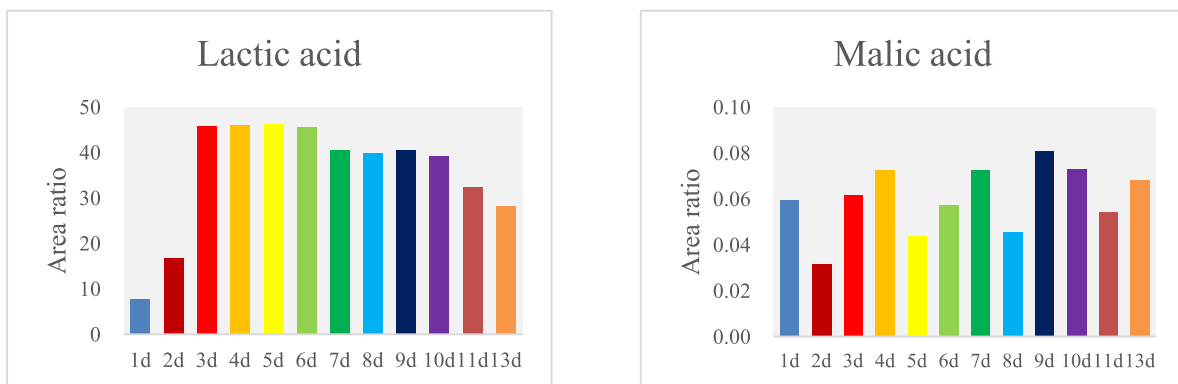


图4 哺乳动物细胞在1-13d培养过程中部分维生素类化合物相对含量变化情况

由图4可知在1d-13d的培养过程中生物素 (biotin)、胆碱 (choline)、叶酸 (folic acid) 的相对含量基本维持在一个浓度水平；在1-2d培养过程中吡哆醛 (pyridoxal) 的相对含量较低，培养后期基本维持在一个浓度水平，因此在培养过程加料时可考虑在1-2d培养期间内适当增加吡哆醛的投料量。

2.2.4 培养过程中部分有机酸类化合物相对含量变化情况 (1-13d)



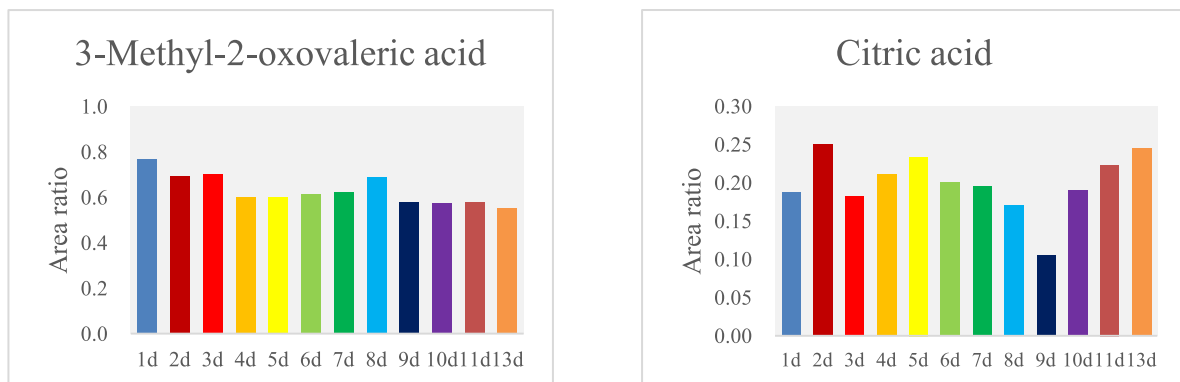


图5 哺乳动物细胞在1-13d培养过程中部分有机酸化合物相对含量变化情况

由图 5 可知在 1-3d 培养过程中乳酸 (lactic acid) 的相对含量逐渐增大, 由此可知在 1-3d 培养过程中哺乳动物细胞快速生长导致乳酸含量快速增加, 在后期培养过程中基本维持在一个浓度水平; 在 1-13d 的培养过程中苹果酸 (malic acid)、3- 甲基 -2- 羟基戊酸 (3-methyl-2-oxovaleric acid) 和柠檬酸 (citric acid) 的相对含量都很低, 在持续加料的培养过程中没有明显变化趋势。

■ 结论

采用岛津公司 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪快速分析哺乳动物细胞上清液中 95 种营养物质和代谢物质在 13 天培养过程中 (每天加料) 的相对浓度变化情况, 从而对哺乳动物细胞培养工艺提供可靠的参考依据。参考“细胞培养分析方法包”, 该方法无需优化仪器参数, 方法操作简单, 结果直观。