

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

## LCMSMS-267

**摘要：** 本文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，建立了一种同时测定细胞培养上清液中 95 种化合物的方法。该方法在 17 min 内可完成 95 种化合物的分析，适用于细胞培养上清液中糖类、氨基酸类、核苷酸类、维生素类等化合物的快速检测，且重复性好、灵敏度高。利用该方法，我们考察了细胞株在 4 种不同培养基中的营养物和代谢物变化情况，并绘制出目标物的时间变化趋势图，对相关研究人员判断细胞状态、改进培养基组成具有一定参考意义。

**关键词：** 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪 细胞培养上清液 代谢物分析

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。合成细胞培养基是用化学成分明确的试剂配制的培养基，是目前常用的一类培养基，其组分稳定，主要包括糖类、必需氨基酸、维生素、无机盐类等。

培养基组分的变化，对细胞生长会产生一定影响，如细胞生长形态、分裂速度等。同时，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。因此，寻求一类合适的培养基组成，对细胞培养具有重大意义。

细胞生长状态的分析，除形态学观察外，还可对细胞培养上清液中细胞代谢物进行分析，通过考察细胞上清液中营养物和代谢物的变化，判断细胞在生长增殖过程中状态的优劣。鉴于此，我们开发了“细胞培养分析方法包”，该技术可在 17 分钟内同时分析 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-8060 联用，结合“细胞培养分析方法包”建立了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，为相关研究人员评估细胞生长状态、改进培养基组分提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪 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-20A5R( 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. 5.82 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 1.2.1 仪器条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

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

进样体积：1  $\mu$ L

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱方式：见“细胞培养基上清液分析方法包”

时间程序见表 1

### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子源：ESI(+/-)

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热气：氮气 10.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

碰撞气：氩气

接口温度：300℃

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

离子源接口电压：+4.5 kV; -3.5 kV

监控的化合物信息：见表 1

MRM 参数：见“细胞培养基上清液分析方法包”

## 1.3 细胞培养和取样方法

(1) 细胞株：CHO DG44 细胞株

(2) 细胞培养方法：取对数期细胞，传代并接种于培养瓶中。实验中使用 4 种不同培养基，分别为无蛋白培养基 I：proCHO5、无动物源成分培养基 II：Balan CD Growth A、无蛋白培养基 III：opti CHO 和无蛋白无动物源成分培养基 IV：Forti CHO。每种培养基分别制备 8 管，每管各取 5 mL 培养基培养一瓶细胞，连续培养 5 天。

(3) 取样方法：每个时间点 (5 min, 3h, 10h, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d) 分别从每组相应的细胞中取 500  $\mu$ L 细胞培养基上清液 (取样 3 次)，以 I 为例：5 min 时从 I-1 中取 500  $\mu$ L；3 h 时从 I-2 取 500  $\mu$ L，依此类推，直至 Day 5；I-0 为培养基原液。

## 1.4 样品制备

取 500  $\mu$ L 细胞培养液，在室温下离心 1 min(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 min(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 50 倍。

## 结果讨论

### 2.1 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 CHO DG44 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。

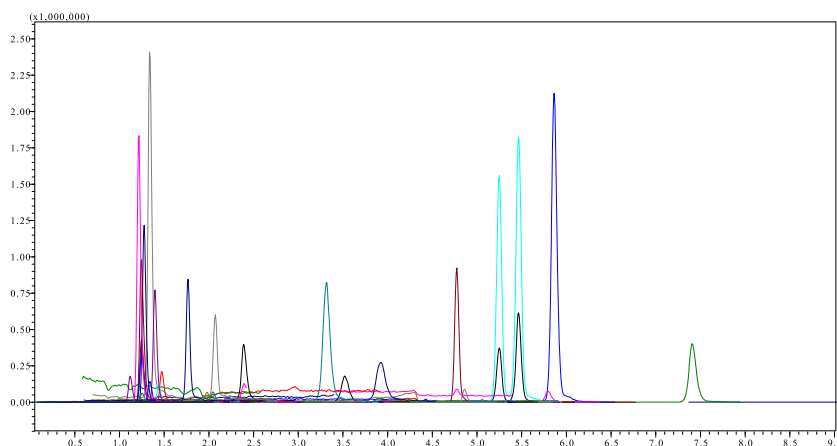


图1 细胞培养上清液 (IV-0) 分析色谱图

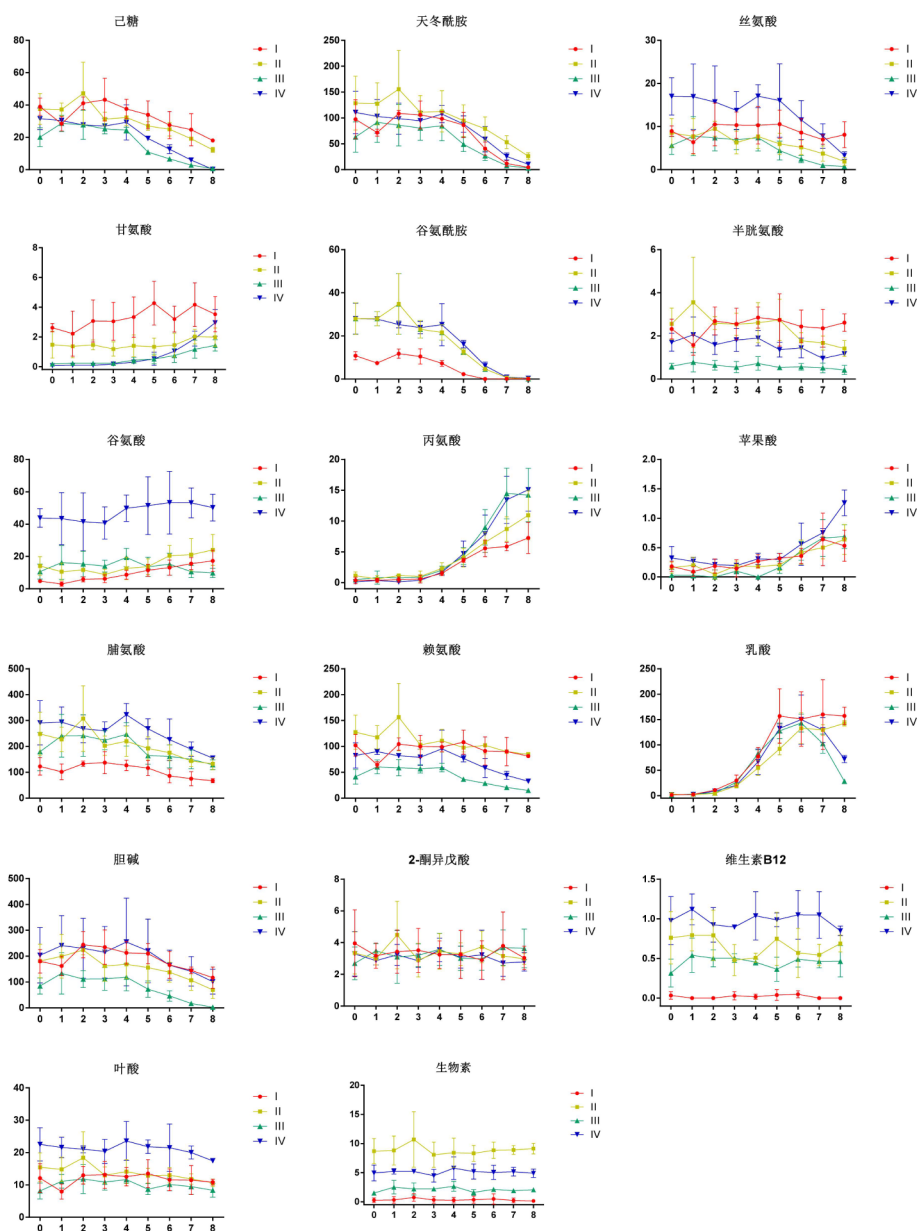


图2 细胞培养上清液目标组份含量变化趋势图

## 2.2 目标物含量变化趋势图

取各组细胞培养上清液在不同时间点的样品进行测定，以 2- 异丙基苹果酸为内标，得到各目标组份的面积比。以面积比为纵坐标，时间点为横坐标绘制折线，得到不同时间点时目标营养物质和代谢物组份含量的变化趋势图，如图 2 所示。

在 4 种培养条件下，己糖、天冬酰胺、谷氨酰胺和胆碱随时间的变化，均呈现下降趋势，而丙氨酸、苹果酸呈现上升趋势。对于乳酸而言，在 I 和 II 型培养基中，乳酸浓度为先升高后平稳的趋势，而 III 和 IV 型培养基中，乳酸浓度变化为先升后降。不同细胞上清液中，I 型培养基中的甘氨酸含量明显高于其它培养基，而谷氨酰胺、维生素 B12 明显低于其它培养基；III 型培养基中的半胱氨酸含量明显高于其它培养基；IV 型培养基中的谷氨酸、叶酸含量明显高于其它培养基。生物素在各培养基中的含量为：II>IV>III>I。

## ■ 结论

本文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，并结合细胞培养基上清液分析方法包，完成了在 4 种不同培养基条件下，细胞上清液中营养物和代谢物变化情况，并绘制出目标物的时间变化趋势图。该结果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。

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	维生素素	77	Uridine	核苷酸
14	Arginine	氨基酸	46	Ascorbic acid	维生素素	78	Xanthine	核苷酸
15	Asparagine	氨基酸	47	Ascorbic acid 2-phosphate	维生素素	79	Xanthosine	核苷酸
16	Aspartic acid	氨基酸	48	Biotin	维生素素	80	Penicillin G	抗生素
17	Citrulline	氨基酸	49	Choline	维生素素	81	2-Aminoethanol	其他
18	Cystathionine	氨基酸	50	Cyanocobalamin	维生素素	82	2-Ketoisovaleric acid	其他
19	Cysteine	氨基酸	51	Ergocalciferol	维生素素	83	3-Methyl-2-oxovaleric acid	其他
20	Cystine	氨基酸	52	Folic acid	维生素素	84	4-Hydroxyphenyllactic acid	其他
21	Glutamic acid	氨基酸	53	Folinic acid	维生素素	85	Citric acid	其他
22	Glutamine	氨基酸	54	Lipoic acid	维生素素	86	Ethylenediamine	其他
23	Glutathione	氨基酸	55	Niacinamide	维生素素	87	Fumaric acid	其他
24	Glycine	氨基酸	56	Nicotinic acid	维生素素	88	Glyceric acid	其他
25	Glycyl-L-glutamine	氨基酸	57	Pantothenic acid	维生素素	89	Histamine	其他
26	Histidine	氨基酸	58	Pyridoxal	维生素素	90	Isocitric acid	其他
27	Isoleucine	氨基酸	59	Pyridoxine	维生素素	91	Lactic acid	其他
28	Kymurenine	氨基酸	60	Riboflavin	维生素素	92	Malic acid	其他
29	Leucine	氨基酸	61	Tocopherol acetate	维生素素	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