

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 同时测定链霉菌培养上清液中 95 种化合物

LCMSMS-224

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-8060 联用同时测定链霉菌培养上清液中 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 链霉菌培养上清液

开发合适的培养基配方与优化细胞培养条件是细胞培养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工艺对于提高酶和其他蛋白类药物的产率，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。

对于通过细胞培养生产酶和其他蛋白类药物的公司而言，目前生物过程工艺开发与优化仅限于检测常规的 OD 值和酶活等参数，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，因此无法准确了解培养基中各组分和细胞代谢物对酶或者其他蛋白质产量和质量的影响。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质谱联用仪，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-8060 联用，利用“细胞培养分析方法包”建立了链霉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-8060 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-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℃

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-8060

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：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 菌株相关信息

菌株：链霉菌

培养时间：115 小时

1.4 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 1000 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	糖类	35	Ornithine	氨基酸	67	Deoxycytidine	核苷酸
4	Hexose (Glucose)	糖类	36	Oxidized glutathione	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 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

结果与讨论

2.1 链霉菌培养上清液分析色谱图

使用“细胞培养分析方法包”中的方法对链霉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。

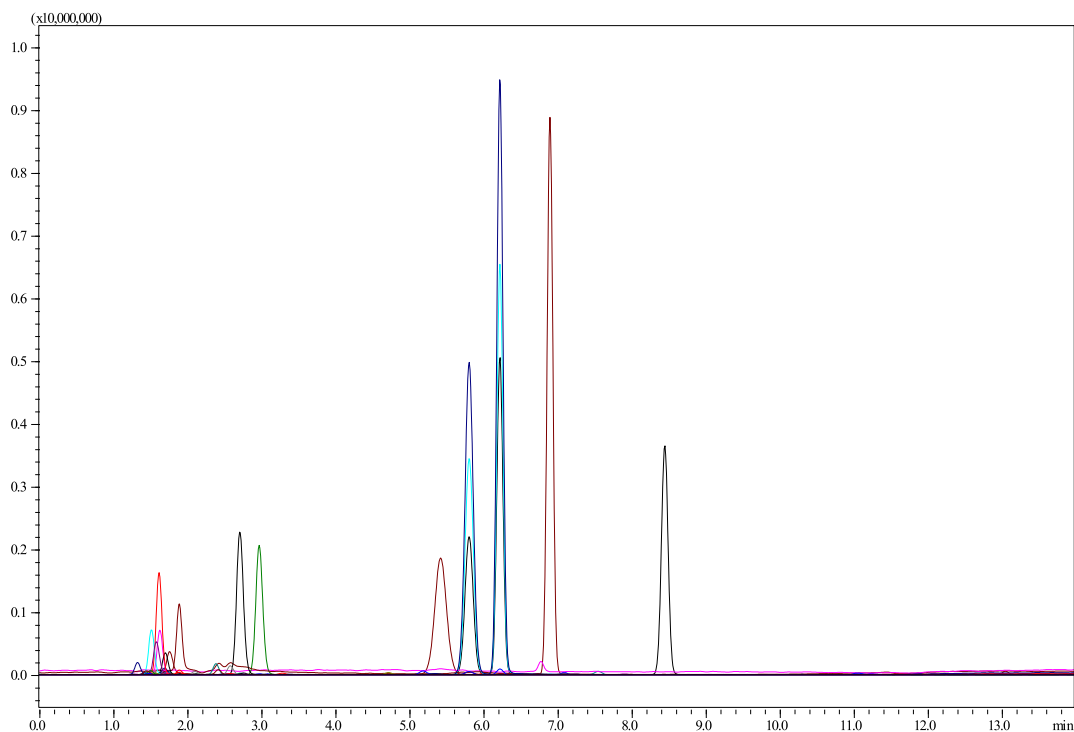


图1 链霉菌色谱图上清液(48 h)分析色谱图

2.2 培养过程中酶活参数变化趋势

在培养过程中酶活检测取样点分别为 72 h, 78 h, 86 h, 93 h, 101 h 和 115 h。

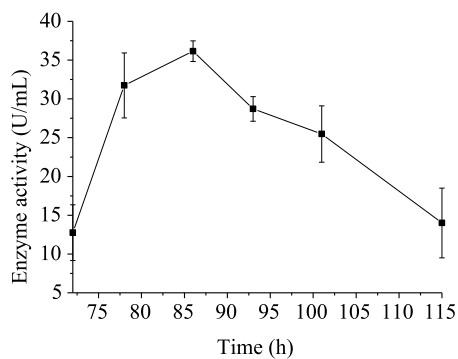


图2 链霉菌上清液酶活曲线图(72-115 h)

2.3 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

在培养过程中 95 种化合物检测取样点分别为 48 h, 72 h, 78 h, 86 h, 93 h, 101 h 和 115 h。

2.3.1 培养过程中氨基酸类化合物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

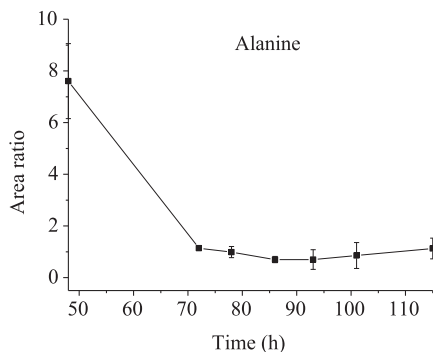


图3 丙氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

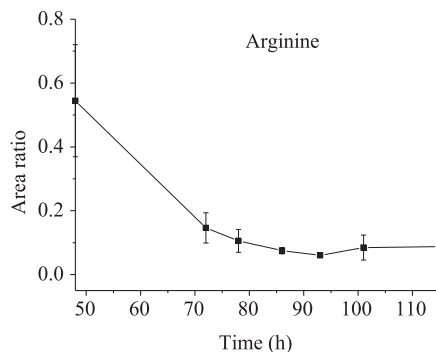


图3 精氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

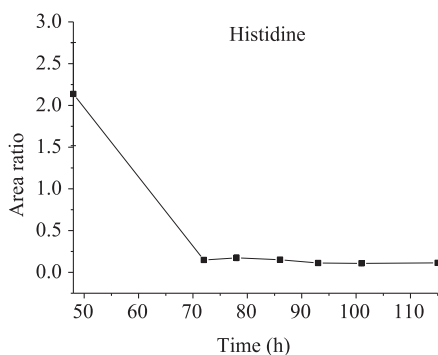


图5 组氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

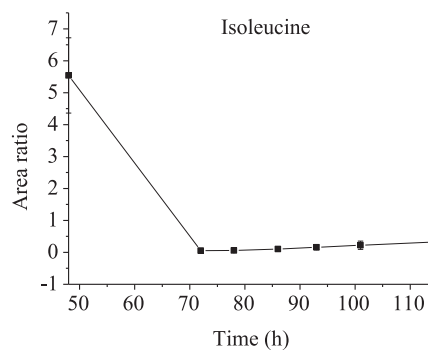


图6 异亮氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

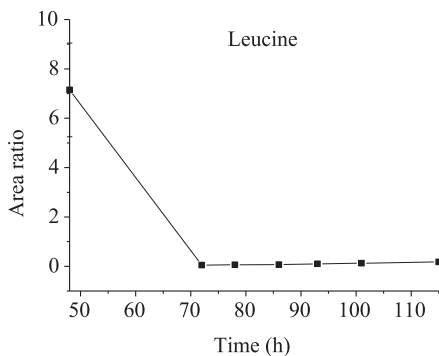


图7 亮氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

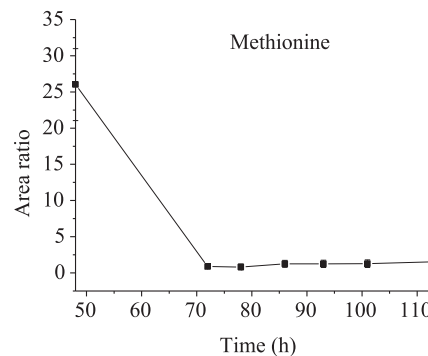


图8 蛋氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

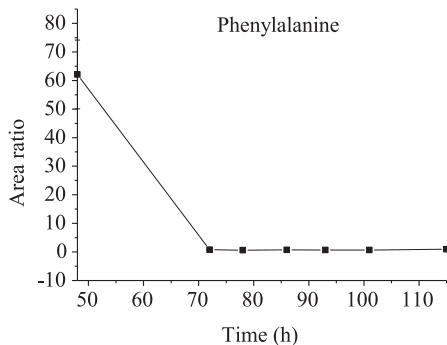


图9 苯丙氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

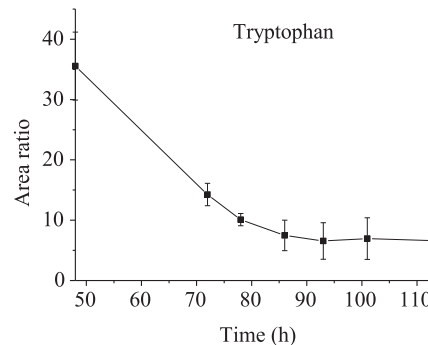


图10 色氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

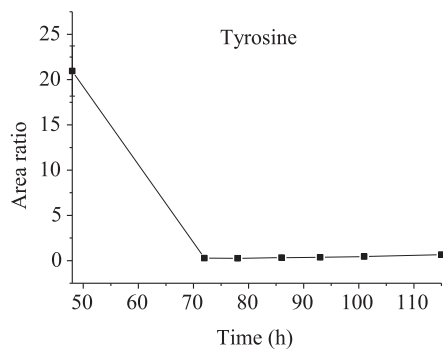


图11 酪氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

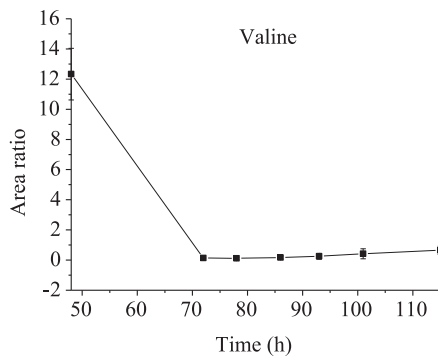


图12 缬氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

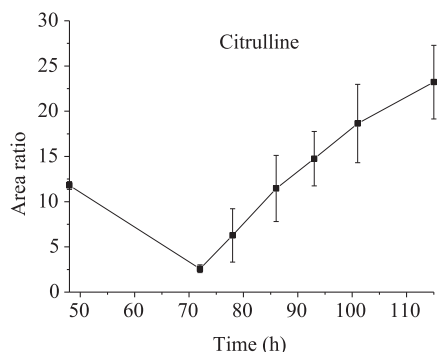


图13 瓜氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

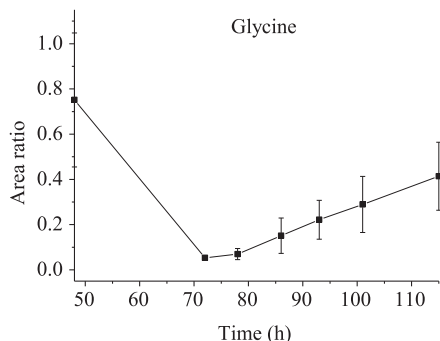


图14 甘氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 3-12 可知，这些氨基酸在链霉菌 48-72 h 培养过程中浓度急剧下降，72 h 后维持在一个较低水平，接近于 0，由此可推断 48-72 h 这些氨基酸被大量消耗，用于蛋白质（酶）的合成。而由图 1 酶活趋势图可知，在细胞培养到 86 h 时，酶活才达到最大值，所以在优化培养工艺时可以考虑在 72 h 时往培养液中补加这些氨基酸，促进蛋白质的合成，从而进一步提高酶活。

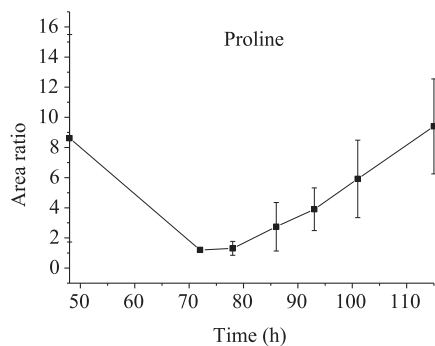


图15 脯氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

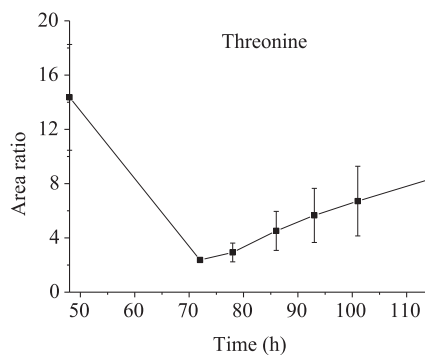


图16 色氨酸在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 13-16 可知，在 72 h 之前这些氨基酸的量急剧减少，72 h 后开始增加，可能的原因是 72 h 前这些氨基酸被大量消耗，72 h 后培养液中蛋白质分解开始生成新的氨基酸，而此时链霉菌又无法快速消耗掉这些氨基酸，从而导致这些氨基酸开始积累，浓度逐渐增大。

2.3.2 培养过程中链霉菌有机酸代谢物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

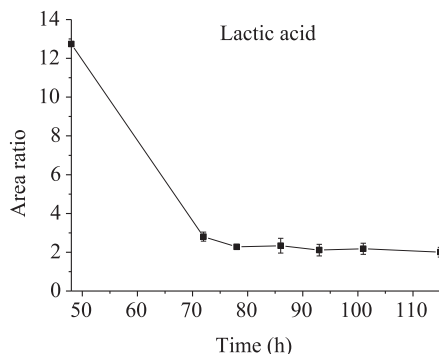


图17 乳酸在培养过程中峰面积比变化趋势

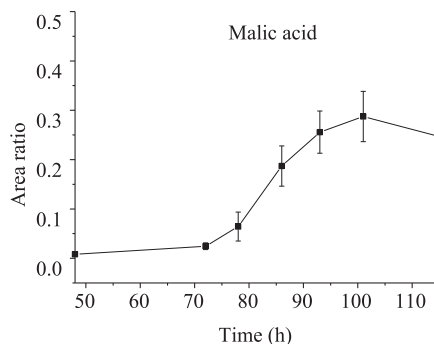


图18 苹果酸在培养过程中峰面积比变化趋势

细胞培养初期在有充足碳源(甘油, 参考 1.3 培养基组成)的情况下, 细胞快速生长, 并分泌乳酸, 碳源量急剧下降, 到达 48 h 后, 培养液中甘油和其他碳源无法维持细胞正常生长, 于是细胞开始消耗乳酸(以乳酸为碳源), 导致乳酸的含量急剧下降(图 17)。

由图 18 可知, 该株链霉菌在 72 h 后开始不断产生苹果酸, 在 101 h 后细胞开始消耗自身产生的这些苹果酸(图 18)。

2.3.3 培养过程中维生素类化合物峰面积比变化趋势 (48-115 h)

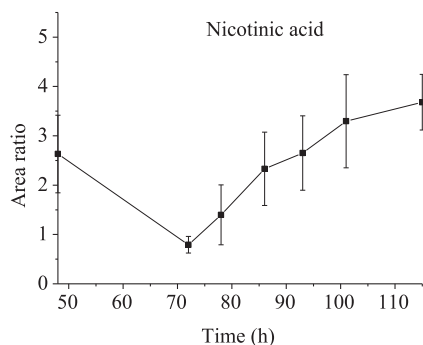


图19 VB3在培养过程中峰面积比变化趋势

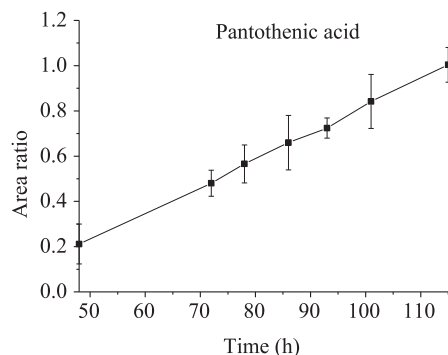


图20 VB5在培养过程中峰面积比变化趋势

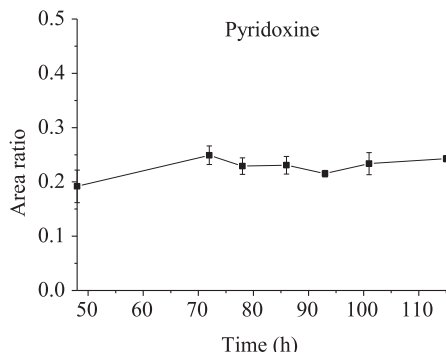


图21 VB6在培养过程中峰面积比变化趋势

由图 19 可知在链霉菌 48-72 h 培养过程中, 细胞不断消耗维生素 B3(VB3), 但 72 h 后 VB3 开始积累; 该株链霉菌在培养过程中会不断代谢产生维生素 B5(VB5)(图 20); 在培养的 48-115 h, 培养液中维生素 B6(VB6) 的浓度变化不大(图 21)。

■ 结论

采用岛津公司 LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪分析链霉菌上清液中 95 种营养物质和代谢物质相对含量在 115 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。