

利用LC-MS/MS同时测定细胞上清液中106种化合物

Analysis 106 Compounds in Cell Supernatant by Using LC-MS/MS

王姗姗; 刘婷

SCIEX, Technical MK, Shanghai, China

Keywords : cell Supernatant, Triple Quad™ 4500, Amino acid, Vitamin, Carbohydrate, Nucleic acid, organic acids

1955年, Eagle博士发布了细胞基础培养基配方, 指出培养基是“一个包含无机盐、糖、氨基酸、维生素及其他必须营养物质的等渗透压且具有pH缓冲能力的混合物”。作为细胞生长的环境和营养物质来源, 对培养基的组成成分、投料化合物含量配比及其在细胞培养过程中含量变化进行检测具有重要意义。因此, 几乎所有的生物制药公司、培养基生产商都不同程度的投入了大量的人力和物力开发培养基重要成分的检测方法。但是, 目前培养基成分的检测过于复杂, 需要使用不同的仪器、不同的方法进行测定, 已不能满足工业化快速、标准化要求。而液质联用技术具有高通量, 专属性强的特点, 就能很好的解决这个问题。因此, SCIEX公司推出了一针进样检测的“细胞培养基/上清液成分分析解决方案”。

首先, 该方法采用正负切换模式、一针进样即可在20分钟内实现细胞培养基/上清液中6种糖、39种氨基酸、19种维生素、18种核苷酸以及其他24种代谢相关物质共106种化合物的同时分析。其次, 该方法为内标绝对定量方法, 106种化合物的相关系数 r 均大于0.99, 可获得长时间跨度的投料化合物样本的绝对浓度, 易于比较; 在没有标准品的情况下, 也可将该方法应用于短时间或同批次样本的相对定量研究。最后, SCIEX独有的Scheduled MRM™模式, 保证了所有化合物具有足够的扫描点数, 从而保证峰形和灵敏度, 方便增加更多的化合物。

本方法具有以下特点 :

1. MRM模式, 高专属性, 一种仪器即可完成糖类、氨基酸、维生素、有机酸等106种化合物的同时检测。
2. 采用正负切换模式, 一针进样, 仅需20分钟。
3. 采用Scheduled MRM™模式, 提供保留时间, 保证峰形和灵敏度, 后期方便增加更多化合物。

4. 灵敏度高, 前处理简单, 稀释进样。
5. 考察了106种化合物的线性范围, 线性相关系数 r 均大于0.99。
6. 方法稳定: 高盐溶液正负切换模式下仪器稳定, 样品检测重现性好。
7. 内标法绝对定量, 一种方法满足绝对定量和相对定量需求。

仪器设备

SCIEX ExionLC™液相系统 + Triple Quad™ 4500质谱系统



样品前处理

样品用2倍体积乙腈沉淀蛋白, 离心取上清液, 用0.1%甲酸水溶液稀释10倍后, 进LC-MS/MS检测。

液相方法

色谱柱: C18柱

流动相: A: 水(含0.1%甲酸); B: 乙腈(含0.1%甲酸)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C;

进样量: 1 μ L

洗脱程序：梯度洗脱

检测时间：20分钟

质谱方法

离子源：ESI源，正负离子切换模式

离子源参数：

IS电压：5500/-4500 V； 气帘气 CUR: 35 psi；
 雾化气 GS1: 60 psi； 辅助气 GS2: 50 psi；
 离子源温度 TEM: 600°C； 碰撞气 CAD: Medium；

结果与讨论

1. 106种化合物的提取离子流（XIC）图，化合物名称和分类见表1。

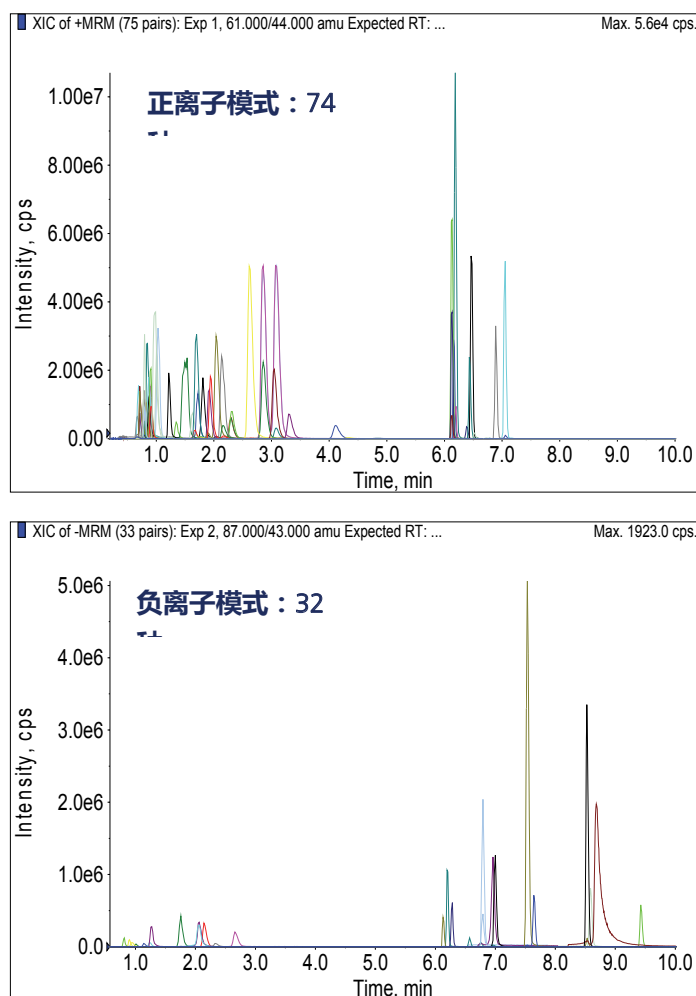


图1. 106种化合物的提取离子流（XIC）图。

2. 异构体的分离

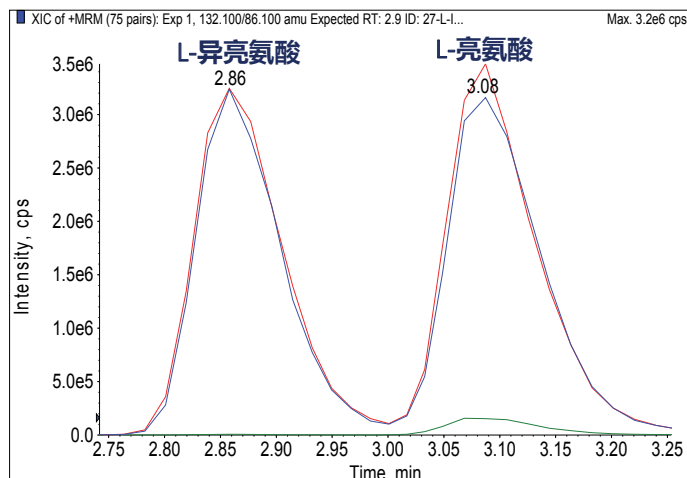


图2. 亮氨酸和异亮氨酸异构体色谱图。

3. 灵敏度高，线性良好

将0.03 μg/mL~150 μg/mL拟标溶液（高盐溶液），稀释30倍后进样，106种化合物相关系数r均大于0.99，部分化合物LLOQ色谱图，见图3。

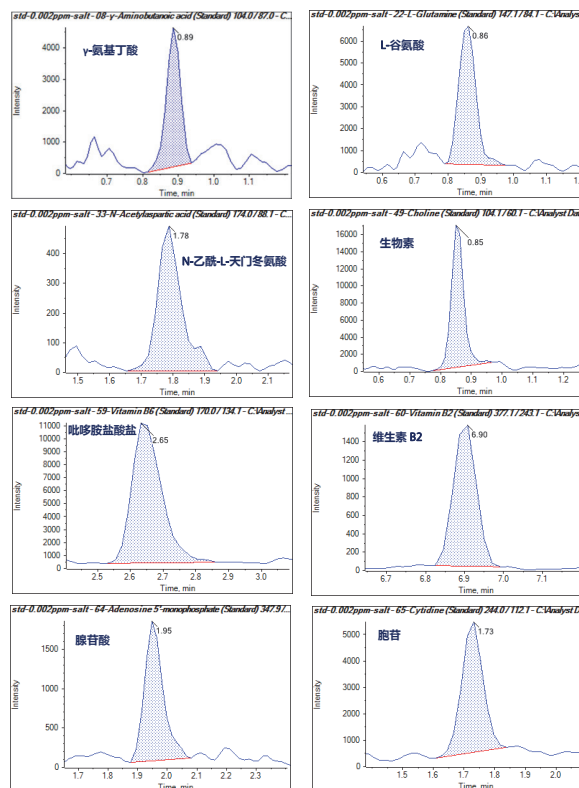


图3. 部分化合物色谱图。

4. 方法稳定性

4.1 仪器的稳定性

将0.06 µg/mL拟标溶液（高盐溶液），稀释30倍后进样，峰面积相对标准偏差小于8%（n=3），详见表2。

4.2 实际样品重现性

同一样品取3份进行前处理和检测，所有检出化合物峰面积相对标准偏差小于10%，详见表3。

总结

本方法采用LC-MS/MS正负切换模式，一针进样，20分钟内完成了细胞上清液中106种化合物的同时分析。该方法前处理简单，灵敏度高，重现性好，可用于细胞培养基/上清液中投料化合物的监测。

表1. 化合物名称及分类。

序号	英文名称	中文名称	分类	序号	英文名称	中文名称	分类
1	2-Isopropylmalic acid	2-异丙基苹果酸	内标	55	5-formyltetrahydrofolate	5-甲酰四氢叶酸	维生素
2	Gluconic acid	葡萄糖酸	糖类	56	Lipoic acid	硫辛酸	维生素
3	Glucosamine	氨基葡萄糖	糖类	57	Niacinamide	烟酰胺	维生素
4	D-Glucose	D-葡萄糖	糖类	58	Nicotinic acid	烟酸	维生素
5	D-Sucrose	D-蔗糖	糖类	59	Pantothenic Acid	D-泛酸	维生素
6	L-Threonic acid calcium salt	L-苏糖酸钙	糖类	60	Pyridoxamine dihydrochloride	吡哆胺盐酸盐	维生素
7	L-Lyxose	L-来苏糖	糖类	61	Pyridoxal hydrochloride	吡哆醛盐酸盐	维生素
8	DL-2-Aminoadipic acid	DL-2-氨基己二酸	氨基酸	62	Pyridoxine	吡哆醇	维生素
9	γ-Aminobutanoic acid	γ-氨基丁酸	氨基酸	63	Vitamin B2	维生素B2	维生素
10	Hydroxyproline	羟基脯氨酸	氨基酸	64	Vitamin E	维生素E	维生素
11	γ-L-Glutamyl-L-cysteine	G-谷氨酸-半胱-三氟乙酸盐	氨基酸	65	Vitamin E acetate	维生素E乙酸酯	维生素
12	L-Pyroglutamic acid	L-焦谷氨酸	氨基酸	66	Adenine	腺嘌呤	核苷酸
13	L-Alanine	L-丙氨酸	氨基酸	67	Adenosine	腺苷	核苷酸
14	L-Alanyl-L-glutamine	L-丙氨酰-L-谷氨酰胺	氨基酸	68	Adenosine 5'-monophosphate	腺苷酸	核苷酸
15	L-Arginine	L-精氨酸	氨基酸	69	Cytidine	胞苷	核苷酸
16	L-Asparagine	L-天冬酰胺	氨基酸	70	Cytidylic acid	胞苷酸	核苷酸
17	L-Aspartic Acid	L-天门冬氨酸	氨基酸	71	2'-Deoxycytidine	2'-脱氧胞苷	核苷酸
18	DL-Citrulline	DL-瓜氨酸	氨基酸	72	Guanine	鸟嘌呤	核苷酸
19	DL-Cystathionine	DL-胱硫醚	氨基酸	73	Guanosine	鸟苷	核苷酸
20	L-Cysteine	L-半胱氨酸	氨基酸	74	Guanosine-5'-monophosphate	鸟苷酸	核苷酸
21	L-Cystine	L-胱氨酸	氨基酸	75	Hypoxanthine	次黄嘌呤	核苷酸
22	L-Glutamic Acid	L-谷氨酸	氨基酸	76	Inosine	次黄苷	核苷酸
23	L-Glutamine	L-谷氨酰胺	氨基酸	77	Thymidine	胸苷	核苷酸
24	L-Glutathione reduced	L-还原型谷胱甘肽	氨基酸	78	Thymine	胸腺嘧啶	核苷酸

表1. 化合物名称及分类。(续)

序号	英文名称	中文名称	分类	序号	英文名称	中文名称	分类
25	Glycine	甘氨酸	氨基酸	79	Uracil	尿嘧啶	核苷酸
26	Glycyl-L-glutamine	甘氨酸-L-谷氨酰胺	氨基酸	80	Uric acid	尿酸	核苷酸
27	L-Histidine	L-组氨酸	氨基酸	81	Uridine	尿苷	核苷酸
28	L-Isoleucine	L-异亮氨酸	氨基酸	82	Xanthine	2,6-二羟基嘌呤	核苷酸
29	L-Kynurenine	L-犬尿氨酸	氨基酸	83	Xanthosine	黄嘌呤核苷	核苷酸
30	L-Leucine	L-亮氨酸	氨基酸	84	Penicillin G sodium	青霉素G钠	抗生素
31	L-Lysine	L-赖氨酸	氨基酸	85	ethanolamine	乙醇胺	其他
32	L-Methionine	L-蛋氨酸	氨基酸	86	2-Ketoisovaleric acid	3-甲基-2-氧丁酸	其他
33	DL-Methionine sulfoxide	DL-蛋氨酸亚砷	氨基酸	87	3-Methyl-2-oxovaleric acid	3-甲基-2-氧基戊酸	其他
34	N-Acetylaspartic acid	N-乙酰-L-天门冬氨酸	氨基酸	88	3-(4-Hydroxyphenyl)lactate	3-(4-羟基苯基)乳酸	其他
35	N-Acetylcysteine	N-乙酰-L-半胱氨酸	氨基酸	89	Citric acid	柠檬酸	其他
36	L-Ornithine	L-鸟氨酸	氨基酸	90	Ethylenediamine	乙二胺	其他
37	L-Glutathione oxidized	L-氧化型谷胱甘肽	氨基酸	91	Fumaric acid	延胡索酸	其他
38	L-Phenylalanine	L-苯丙氨酸	氨基酸	92	Glyceric acid	甘油酸	其他
39	D-Pipecolic acid	D-哌啶酸	氨基酸	93	Histamine	组胺	其他
40	L-Proline	L-脯氨酸	氨基酸	94	Isocitric acid	异柠檬酸	其他
41	L-Serine	L-丝氨酸	氨基酸	95	Lactic acid	乳酸	其他
42	L-Threonine	L-苏氨酸	氨基酸	96	DL-Malic acid	DL-苹果酸	其他
43	L-Tryptophan	L-色氨酸	氨基酸	97	O-Phosphorylethanolamine	O-磷酸乙醇胺	其他
44	L-Tyrosine	L-酪氨酸	氨基酸	98	Putrescine	腐胺	其他
45	L-Valine	L-缬氨酸	氨基酸	99	Pyruvic acid	丙酮酸	其他
46	Boc-D-Tyr-OH	Boc-D-酪氨酸	氨基酸	100	Succinic acid	丁二酸	其他
47	Vitamin B1	维生素B1	维生素	101	DL-Mevalonic acid	甲羟戊酸	其他
48	4-Aminobenzoic acid	对-氨基苯甲酸	维生素	102	itaconic acid	衣康酸	其他
49	Vitamin C	维生素C	维生素	103	phthalic acid	对苯二甲酸	其他
50	D(+)-Biotin	维生素B7	维生素	104	4-coumaric acid	4-羟基肉桂酸	其他
51	Choline	胆碱	维生素	105	tropic acid	菴菴酸	其他
52	Vitamin B12	维生素B12	维生素	106	3,5-dinitrosalicylic acid	3,5-二硝基水杨酸	其他
53	Vitamin D2	维生素D2	维生素	107	3-nitrophenol	3-硝基苯酚	其他
54	Folic acid	叶酸	维生素				

表2. 仪器稳定性测试结果表 (部分)。

Component Name	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3
nitrophenol	2ppb-salt	3 of 3	3.99E+03	7.74E+00	0.19	4.00E+03	3.98E+03	3.99E+03
pyridoxamine dihydrochloride	2ppb-salt	3 of 3	4.28E+04	7.46E+02	1.74	4.24E+04	4.37E+04	4.23E+04
Vitamin B2	2ppb-salt	3 of 3	6.57E+03	1.51E+02	2.3	6.54E+03	6.43E+03	6.73E+03
L-Tryptophan	2ppb-salt	3 of 3	1.99E+04	4.63E+02	2.33	1.98E+04	2.04E+04	1.95E+04
4-coumaric acid	2ppb-salt	3 of 3	1.96E+04	4.92E+02	2.51	2.01E+04	1.96E+04	1.91E+04
Adenosine 5'-monophosphate	2ppb-salt	3 of 3	7.84E+03	2.45E+02	3.12	7.60E+03	7.83E+03	8.09E+03
L-Isoleucine	2ppb-salt	3 of 3	3.51E+04	1.12E+03	3.18	3.57E+04	3.57E+04	3.38E+04
Xanthine	2ppb-salt	3 of 3	1.69E+04	5.70E+02	3.37	1.76E+04	1.66E+04	1.66E+04
D(+)-Biotin	2ppb-salt	3 of 3	1.44E+04	4.93E+02	3.42	1.42E+04	1.50E+04	1.41E+04
2-Isopropylmalic acid	2ppb-salt	3 of 3	5.39E+03	2.01E+02	3.74	5.54E+03	5.46E+03	5.16E+03
2'-Deoxycytidine	2ppb-salt	3 of 3	3.29E+04	1.28E+03	3.9	3.43E+04	3.18E+04	3.26E+04
Inosine	2ppb-salt	3 of 3	1.12E+03	4.52E+01	4.03	1.12E+03	1.07E+03	1.16E+03
Uridine	2ppb-salt	3 of 3	5.71E+03	2.31E+02	4.06	5.81E+03	5.86E+03	5.44E+03
Choline	2ppb-salt	3 of 3	3.63E+04	1.67E+03	4.59	3.68E+04	3.77E+04	3.45E+04
L-Kynurenine	2ppb-salt	3 of 3	4.42E+03	2.09E+02	4.72	4.19E+03	4.60E+03	4.47E+03
L-Leucine 2	2ppb-salt	3 of 3	2.82E+03	1.42E+02	5.03	2.98E+03	2.72E+03	2.77E+03
Niacinamide	2ppb-salt	3 of 3	3.13E+04	1.58E+03	5.05	3.03E+04	3.05E+04	3.31E+04
3,5-dinitrosalicylic acid	2ppb-salt	3 of 3	2.67E+04	1.38E+03	5.15	2.56E+04	2.83E+04	2.63E+04
L-Leucine 1	2ppb-salt	3 of 3	3.67E+04	1.93E+03	5.26	3.85E+04	3.47E+04	3.70E+04
Vitamin B6	2ppb-salt	3 of 3	6.47E+04	3.59E+03	5.54	6.33E+04	6.88E+04	6.21E+04
L-Tyrosine	2ppb-salt	3 of 3	1.30E+04	7.49E+02	5.75	1.23E+04	1.38E+04	1.29E+04
Adenosine	2ppb-salt	3 of 3	4.69E+04	2.71E+03	5.79	4.40E+04	4.94E+04	4.72E+04
L-Glutamine	2ppb-salt	3 of 3	2.38E+04	1.42E+03	5.97	2.48E+04	2.45E+04	2.22E+04
N-Acetylaspartic acid	2ppb-salt	3 of 3	1.93E+03	1.22E+02	6.3	2.06E+03	1.92E+03	1.82E+03
Folic acid	2ppb-salt	3 of 3	3.08E+03	2.01E+02	6.53	3.08E+03	3.27E+03	2.87E+03
Boc-D-Tyr-OH	2ppb-salt	3 of 3	9.79E+03	6.54E+02	6.68	9.72E+03	1.05E+04	9.18E+03
γ-Aminobutanoic acid	2ppb-salt	3 of 3	1.32E+04	9.38E+02	7.1	1.30E+04	1.24E+04	1.42E+04
Cytidine	2ppb-salt	3 of 3	2.28E+04	1.62E+03	7.1	2.31E+04	2.43E+04	2.11E+04
DL-Citrulline	2ppb-salt	3 of 3	2.47E+04	1.90E+03	7.7	2.67E+04	2.30E+04	2.44E+04

表3. 实际样品重现性检测结果表 (部分)。

Component Name	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3
phthalic acid	cell culture	3 of 3	1.74E+05	4.12E+02	0.24	1.73E+05	1.74E+05	1.74E+05
L-Leucine 2	cell culture	3 of 3	5.41E+06	3.54E+04	0.65	5.38E+06	5.45E+06	5.40E+06
L-Leucine 1	cell culture	3 of 3	5.09E+07	4.78E+05	0.94	5.05E+07	5.14E+07	5.07E+07
L-Phenylalanine	cell culture	3 of 3	2.00E+07	3.16E+05	1.58	1.98E+07	2.03E+07	1.98E+07
Xanthosine	cell culture	3 of 3	4.91E+04	1.04E+03	2.11	4.80E+04	5.00E+04	4.94E+04
Niacinamide	cell culture	3 of 3	1.39E+06	2.98E+04	2.14	1.37E+06	1.42E+06	1.37E+06
Inosine	cell culture	3 of 3	1.35E+04	3.00E+02	2.22	1.36E+04	1.38E+04	1.32E+04
L-Arginine	cell culture	3 of 3	1.36E+07	3.14E+05	2.31	1.38E+07	1.38E+07	1.32E+07
2-Ketoisovaleric acid	cell culture	3 of 3	3.02E+05	7.57E+03	2.5	3.09E+05	3.03E+05	2.94E+05
L-Histidine	cell culture	3 of 3	3.56E+06	9.27E+04	2.6	3.67E+06	3.51E+06	3.51E+06
L-Asparagine	cell culture	3 of 3	1.12E+06	2.94E+04	2.63	1.08E+06	1.13E+06	1.13E+06
γ -Aminobutanoic acid	cell culture	3 of 3	3.11E+04	8.60E+02	2.77	3.04E+04	3.21E+04	3.08E+04
L-Proline	cell culture	3 of 3	1.22E+07	3.48E+05	2.85	1.20E+07	1.26E+07	1.20E+07
L-Aspartic Acid	cell culture	3 of 3	9.06E+05	2.64E+04	2.92	8.76E+05	9.23E+05	9.20E+05
DL-Citrulline	cell culture	3 of 3	5.88E+05	1.84E+04	3.13	5.67E+05	5.94E+05	6.02E+05
L-Isoleucine	cell culture	3 of 3	3.88E+07	1.22E+06	3.15	3.80E+07	4.02E+07	3.81E+07
L-Methionine	cell culture	3 of 3	2.34E+06	7.38E+04	3.16	2.31E+06	2.43E+06	2.29E+06
L-Kynurenine	cell culture	3 of 3	2.75E+04	8.94E+02	3.25	2.64E+04	2.81E+04	2.79E+04
Vitamin E acetate	cell culture	3 of 3	4.55E+02	1.58E+01	3.47	4.71E+02	4.54E+02	4.39E+02
L-Pyroglutamic acid	cell culture	3 of 3	3.11E+06	1.08E+05	3.48	3.04E+06	3.23E+06	3.05E+06
L-Tyrosine	cell culture	3 of 3	4.86E+06	1.71E+05	3.51	4.77E+06	5.06E+06	4.76E+06
Cytidine	cell culture	3 of 3	1.01E+06	3.58E+04	3.54	1.01E+06	1.05E+06	9.74E+05
Uridine	cell culture	3 of 3	1.53E+05	5.42E+03	3.55	1.56E+05	1.56E+05	1.47E+05
L-Glutamine	cell culture	3 of 3	2.92E+07	1.05E+06	3.59	2.96E+07	3.01E+07	2.81E+07
L-Lysine	cell culture	3 of 3	5.26E+06	1.89E+05	3.6	5.30E+06	5.43E+06	5.06E+06
D-Pipecolic acid	cell culture	3 of 3	2.78E+06	1.00E+05	3.62	2.67E+06	2.87E+06	2.78E+06
Lipoic acid	cell culture	3 of 3	3.51E+03	1.30E+02	3.71	3.39E+03	3.49E+03	3.65E+03
Cytidylic acid	cell culture	3 of 3	7.17E+03	2.80E+02	3.91	6.87E+03	7.42E+03	7.22E+03
D(+)-Biotin	cell culture	3 of 3	1.41E+05	5.68E+03	4.04	1.36E+05	1.47E+05	1.39E+05

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-10046-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX