

基于SCIEX X500 QTOF系统同时测定细胞培养基或细胞上清液中150种化合物

Analysis 150 Compounds in Cell culture medium and Cell Supernatant based on SCIEX X500 QTOF System

黄海^{1,2}; 刘婷¹; 郭立海¹

¹ SCIEX 中国应用部

² 华东理工大学

Keywords: LC-MS/MS, Cell Supernatant, X500

细胞基础培养基作为细胞生长的环境和营养物质来源，对其组成成分分析、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，专属性强特点，就能很好的解决这个问题。因此，SCIEX推出了使用X500 QTOF系统进样检测的“细胞培养基/上清液成分分析解决方案”。

首先，该方法为了获得最优异灵敏度，采用TOF MS（高分辨一级）结合*Scheduled MRMHR™*（时间窗口的精准多通道反应监测）定量，正、负离子模式分别进样，每次进样20分钟，即可实现细胞培养基/上清液中6种糖、54种氨基酸、20种维生素、26种核苷酸、5个常见脂肪酸以及其他39种代谢相关物质共150种化合物的同时分析。其次，方法学考察结果显示，150种化合物的平均灵敏度为0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，相关系数 r 均大于0.99，样本稳定性良好，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，使用高分辨质谱（HRMS）进行分析的另一优势就是：高分辨的强定性能力。不但可以在没有标准品的情况，对已知化合物进行鉴定，也可以对培养基或上清液中的未知成分进行初步鉴定和差异比较，进行更深层次的研究。

本方法具有以下特点：

1. TOF MS扫描结合*Scheduled MRMHR*扫描模式进行定量分析，保证灵敏度条件下，一种仪器即可完成糖类、氨基酸、维生素、有机酸等150种化合物的同时检测；后期可增加更多化合物进行定量分析；
2. 正负离子模式分别进样，每针仅需20 min，已优化好同分异构体的色谱分离；
3. 灵敏度高，前处理简单，稀释进样；
4. 考察了150种化合物的线性范围，线性相关系数 r 均大于0.99。
5. 方法稳定：仪器稳定，样品检测重现性好。
6. 方法学考察，一种方法满足绝对定量和相对定量需求。

仪器设备

SCIEX ExionLC™系统 + SCIEX X500 QTOF系统



样品前处理

样品用2倍体积冰乙腈沉淀蛋白，离心取上清液，用0.1%甲酸水溶液稀释10倍后，进样检测。

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：3 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、负离子模式分别进样；

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: 8

结果与讨论

1. 150种化合物的提取离子流（XIC）图

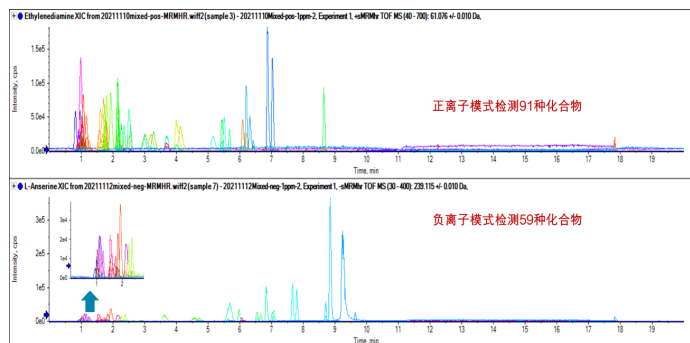


图1. 150种化合物的提取离子流（XIC）图

2. 异构体的分离（L-亮氨酸同时检测两个MRM离子对，辅助定性）

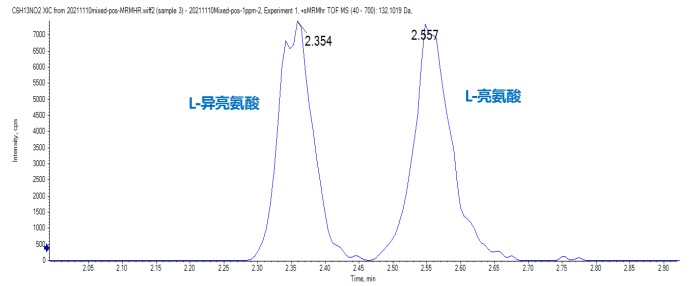


图2. 亮氨酸和异亮氨酸异构体色谱图

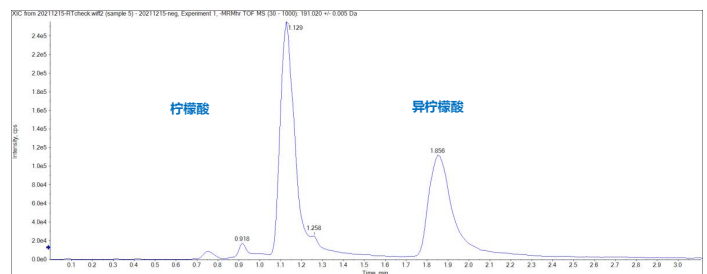


图3. 柠檬酸和异柠檬酸异构体色谱图

3. 灵敏度高，线性良好

将0.03 μ g/mL~10 μ g/mL（0.03 μ g/mL, 0.06 μ g/mL, 0.15 μ g/mL, 0.3 μ g/mL, 0.6 μ g/mL, 1.5 μ g/mL, 3 μ g/mL, 6 μ g/mL, 10 μ g/mL）拟标溶液（高盐溶液），2倍冰乙腈稀释，0.1%FA水溶液稀释10倍后进样，150种化合物相关系数r均大于0.99，部分化合物色谱图见图3。150种化合物的平均灵敏度为0.14 μ g/mL。

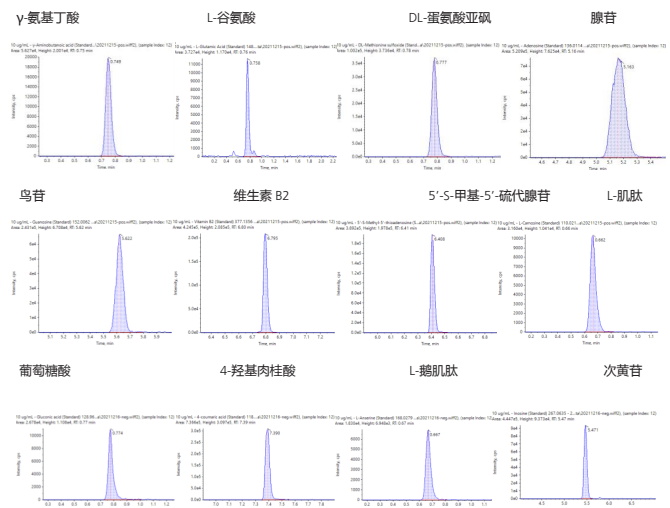


图4. 部分化合物色谱图

表1. 部分化合物RSD% <10% (n=10)

Name	RSD% (60ppb, n=6)	Name	RSD% (60ppb, n=6)
L-2-Aminobutyric acid	3.53	Xanthosine	4.87
Choline	3.87	5'-S-Methyl-5'-thioadenosine	2.84
L-Serine	6.39	Cytidylic acid	8.48
Cytosine	6.94	Folic acid	3.37
L-Valine	9.52	Glycine	9.80
L-Norvaline	5.57	Histamine	8.05
L-Threonine	7.76	L-Proline	8.87
L-Leucine 1	3.03	Nicotinic acid	5.71
L-Leucine 2	7.11	L-Pyroglutamic acid	4.18
L-Asparagine	8.36	L-Isoleucine	9.03
L-Ornithine	5.68	L-Aspartic Acid	8.87
L-Glutamine	3.10	Vitamin B4	8.08
L-Lysine	9.07	Hypoxanthine	1.82
DL-Methionine sulfoxide	3.63	Aminobenzoic acid	6.03
Pyridoxamine dihydrochloride	4.29	DL-Citrulline	5.46
L-Tyrosine	4.88	4-Pyridoxic acid	2.27
Phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate	8.18	L-Cystine	3.00
L-Tryptophan	3.87	γ-Glu-Cys	6.57
L-Kynurenine	5.27	Deoxyadenosine	5.78
L-Alanyl-L-glutamine	4.53	Choline glycerophosphate	5.77
Cytidine	3.80	Argininosuccinic acid	2.16
Uridine	8.21	L-Glutathione reduced	4.17

Name	RSD% (60ppb, n=6)	Name	RSD% (60ppb, n=6)
D(+)-Biotin	1.60	2'-Deoxyadenosine 5'-phosphate	5.08
Vitamin B1 hydrochloride	6.14	Penicillin G sodium	3.77
Adenosine	3.89	Vitamin B2	2.97
Guanosine	5.11	Vitamin B12	7.84
Gluconic acid	7.63	L-Saccharopine	3.97
L-Lyxose	9.87	S-Adenosyl-L-Homocysteine	2.12
L-Threonic acid calcium salt	8.61	5-Thymidylic acid disodium salt hydrate	3.57
D-Sucrose	8.74	Inosine	1.44
Vitamin B13	3.67	5-hydroxytryptophan	6.65
N-Acetylaspartic acid	7.56	Deoxyguanosine	3.82
Uric acid	5.27	3-Indolyacetic acid	8.91
Pyridoxal Phosphate	5.87	Pantothenic Acid	2.29
itaconic acid	5.79	o-Aminobenzoic acid	8.43
Formylkynurenine	7.05	nitrophenol	5.04
3-(4-Hydroxyphenyl) lactate	9.40	Glyceric acid	8.34
Kynurenic acid	3.23	Isocitric acid	7.74
phthalic acid	2.46	2-Oxovaleric Acid	9.53
4-coumaric acid	3.21	3-Methyl-2-oxovaleric acid	6.53
3,5-dinitrosalicylic acid	2.01	2-Isopropylmalic acid	3.53
Uridine 5-monophosphate	3.05	2-Ketoisovaleric acid	9.53
2-Deoxycytidine 5-monophosphate	4.80	tropic acid	2.72

4. 方法稳定性

4.1 仪器的稳定性和精确度

将0.6 μg/mL拟标溶液（标准品溶液和高盐溶液），2倍冰乙醇稀释后，0.1%FA水溶液稀释10倍，峰面积RSD < 10%（n=6）。见表1。

4.2 实际样品重现性和测量精确度

细胞上清液和培养基样品添加标准溶液浓度到0.6ug/mL，取6份进行前处理和检测，峰面积RSD < 10% (n=6)，见表2。

表2. 部分化合物细胞上清液样品和培养基样品添加RSD% <10% (n=10)

Name	细胞上清液添加 RSD% (n=6)	培养基添加 RSD% (n=6)
L-2-Aminobutyric acid	9.84	9.79
Choline	3.82	4.77
L-Serine	3.37	5.48
Cytosine	5.21	3.50
L-Valine	3.47	2.89
L-Norvaline	2.10	1.85
L-Threonine	1.49	5.54
L-Leucine 1	0.68	1.54
L-Leucine 2	1.06	1.29
L-Asparagine	2.71	6.18
L-Ornithine	3.77	6.47
L-Glutamine	3.40	9.09
L-Lysine	4.46	5.83
DL-Methionine sulfoxide	6.95	4.94
Pyridoxamine dihydrochloride	5.10	6.10
L-Tyrosine	2.36	1.08
Phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate	10.01	10.84
L-Tryptophan	7.04	4.48
L-Kynurenine	8.51	4.83
L-Alanyl-L-glutamine	9.94	5.26
Cytidine	2.07	5.06
Uridine	4.04	2.86
D(+)-Biotin	2.83	4.03
Vitamin B1 hydrochloride	4.88	5.29
Adenosine	4.00	1.79
Guanosine	3.03	3.43
Xanthosine	8.43	8.06
5'-S-Methyl-5'-thioadenosine	3.81	4.37
Cytidylic acid	5.60	8.41
Folic acid	5.36	2.60
Glycine	4.39	5.32
Histamine	7.54	7.77
L-Proline	3.98	4.30
Nicotinic acid	10.30	8.88
L-Pyroglutamic acid	6.48	2.57
L-Isoleucine	1.76	1.52
L-Aspartic Acid	4.22	6.53
Vitamin B4	7.78	2.54
Hypoxanthine	0.69	1.97
Aminobenzoic acid	4.31	6.93
DL-Citrulline	5.32	9.81
4-Pyridoxic acid	1.14	2.86
L-Cystine	6.16	6.09

Name	细胞上清液添加 RSD% (n=6)	培养基添加 RSD% (n=6)
γ -Glu-Cys	3.05	4.08
Deoxyadenosine	2.41	3.28
Choline glycerophosphate	12.45	9.63
Argininosuccinic acid	5.79	3.47
L-Glutathione reduced	3.76	3.51
2'-Deoxyadenosine 5'-phosphate	5.77	7.09
Penicillin G sodium	3.30	5.17
Vitamin B2	5.96	4.20
Vitamin B12	6.42	4.52
Gluconic acid	4.26	4.00
L-Lyxose	2.47	4.70
L-Threonic acid calcium salt	2.06	3.09
D-Sucrose	2.83	3.31
Vitamin B13	2.52	3.38
N-Acetylaspartic acid	7.81	6.22
Uric acid	3.44	5.41
Pyridoxal Phosphate	9.03	8.21
itaconic acid	4.53	8.75
Formylkynurenine	5.78	7.75
3-(4-Hydroxyphenyl)lactate	3.90	6.97
Kynurenic acid	3.42	2.28
phthalic acid	2.63	1.96
4-coumaric acid	2.09	1.79
3,5-dinitrosalicylic acid	1.82	0.99
Uridine 5-monophosphate	5.98	6.15
2-Deoxycytidine 5-monophosphate	4.13	2.65
L-Saccharopine	9.89	10.29
S-Adenosyl-L-Homocysteine	3.52	4.06
5-Thymidylic acid disodium salt hydrate	2.56	2.09
Inosine	1.93	1.75
5-hydroxytryptophan	2.44	7.50
Deoxyguanosine	3.63	4.32
3-Indolylacetic acid	4.69	4.32
Pantothenic Acid	1.25	1.65
o-Aminobenzoic acid	4.88	5.06
nitrophenol	6.96	5.75
Glyceric acid	1.12	8.93
Isocitric acid	7.08	11.50
2-Oxovaleric Acid	8.88	4.85
3-Methyl-2-oxovaleric acid	1.58	8.19
2-Isopropylmalic acid	1.65	2.45
2-Ketoisovaleric acid	2.97	4.85
tropic acid	2.62	4.30

5. 细胞上清液和培养基加标回收率

细胞上清液和培养基样品分别添加标准溶液浓度到1.0 µg/mL和 0.6 µg/mL, 取6份进行前处理和检测, 计算添加回收率, 细胞上清液和培养基样品的平均回收率分别为: 89.62%, 97.55%.

总结

本方法采用SCIEX X500 QTOF系统, 正负模式分别进样, 测定细胞上清液中150种化合物。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。

附表: 150个化合物分类

序号	英文名称	分类	序号	英文名称	分类
1	Gluconic acid	糖类	76	Uridine	核苷酸
2	Glucosamine	糖类	77	Xanthine	核苷酸
3	D-Glucose	糖类	78	Xanthosine	核苷酸
4	D-Sucrose	糖类	79	Cytosine	核苷酸
5	L-Threonic acid calcium salt	糖类	80	Deoxyadenosine	核苷酸
6	L-Lyxose	糖类	81	Deoxyguanosine	核苷酸
7	DL-2-Amino adipic acid	氨基酸	82	5'-S-Methyl-5'-thioadenosine	核苷酸
8	γ-Aminobutanoic acid (Gaba)	氨基酸	83	2'-Deoxycytidine 5'-monophosphate	核苷酸
9	Hydroxyproline	氨基酸	84	5-Thymidylic acid disodium salt hydrate	核苷酸
10	γ-Glu-Cys; γ-L-Glutamyl-L-cysteine	氨基酸	85	2'-Deoxyadenosine 5'-phosphate	核苷酸
11	L-Pyroglutamic acid	氨基酸	86	Nadide	核苷酸
12	L-Alanine; Ala	氨基酸	87	Vitamin B1	维生素
13	L-Alanyl-L-glutamine	氨基酸	88	4-Aminobenzoic acid	维生素
14	L-Arginine	氨基酸	89	Vitamin C	维生素
15	L-Asparagine	氨基酸	90	D(+)-Biotin	维生素
16	L-Aspartic Acid; Asp	氨基酸	91	Choline	维生素
17	DL-Citrulline	氨基酸	92	Vitamin B12	维生素
18	Cystathionine	氨基酸	93	Vitamin D2	维生素
19	L-Cysteine	氨基酸	94	Folic acid	维生素

序号	英文名称	分类	序号	英文名称	分类
20	L-Cystine; Cys	氨基酸	95	5-formyltetrahydrofolate	维生素
21	L-Glutamic Acid; Glu	氨基酸	96	Lipoic acid	维生素
22	L-Glutamine; Gln	氨基酸	97	Niacinamide	维生素
23	L-Glutathione reduced	氨基酸	98	Nicotinic acid	维生素
24	Glycine; Gly	氨基酸	99	Pantothenic Acid	维生素
25	Glycyl-L-glutaMine Monohydrate	氨基酸	100	Pyridoxamine dihydrochloride	维生素
26	L-Histidine	氨基酸	101	Pyridoxal hydrochloride	维生素
27	L-Isoleucine	氨基酸	102	Pyridoxine	维生素
28	L-Kynurenine	氨基酸	103	Vitamin B2	维生素
29	L-Leucine, Leu	氨基酸	104	Vitamin E	维生素
30	L-Lysine	氨基酸	105	Vitamin E acetate	维生素
31	L-Methionine; Met	氨基酸	106	Vitamin B13	维生素
32	DL-Methionine sulfoxide	氨基酸	107	palmitic acid	脂肪酸
33	N-Acetylaspartic acid	氨基酸	108	linolenic acid	脂肪酸
34	N-Acetylcysteine	氨基酸	109	cis-9,12-Octadecenoic acid	脂肪酸
35	L-Ornithine	氨基酸	110	oleic acid	脂肪酸
36	L-Glutathione oxidized	氨基酸	111	stearic acid	脂肪酸
37	L-Phenylalanine; Phe	氨基酸	112	ethanolamine	其他
38	D-Pipecolic acid	氨基酸	113	2-Ketoisovaleric acid	其他
39	L-Proline; Pro	氨基酸	114	3-Methyl-2-oxovaleric acid	其他
40	L-Serine; Ser	氨基酸	115	3-(4-Hydroxyphenyl) lactate	其他
41	L-Threonine, Thr	氨基酸	116	Citric acid	其他
42	L-Tryptophan, Trp	氨基酸	117	Ethylenediamine	其他
43	L-Tyrosine, Tyr	氨基酸	118	Fumaric acid	其他
44	L-Valine; Val	氨基酸	119	Glyceric acid	其他
45	Boc-D-Tyr-OH	氨基酸	120	Histamine	其他
46	Sarcosine	氨基酸	121	Isocitric acid	其他
47	DL-3-Aminoisobutyric acid	氨基酸	122	Lactic acid	其他

序号	英文名称	分类	序号	英文名称	分类
48	L-2-Aminobutyric acid	氨基酸	123	DL-Malic acid	其他
49	L-Norvaline	氨基酸	124	O-Phosphorylethanolamine	其他
50	Hydroxyproline	氨基酸	125	Putrescine	其他
51	DL-Homocysteine	氨基酸	126	Pyruvic acid	其他
52	5-Hydroxylysine hydrochloride	氨基酸	127	Succinic acid	其他
53	Serotonin	氨基酸	128	DL-Mevalonic acid	其他
54	Kynurenic acid	氨基酸	129	itaconic acid	其他
55	5-hydroxytryptophan	氨基酸	130	phthalic acid	其他
56	Formylkynurenine	氨基酸	131	4-coumaric acid	其他
57	L-Saccharopine	氨基酸	132	tropic acid	其他
58	Argininosuccinic acid	氨基酸	133	3,5-dinitrosalicylic acid	其他
59	5'-Inosinic acid	氨基酸	134	3-nitrophenol	其他
60	S-Adenosyl-L-Homocysteine	氨基酸	135	o-Aminobenzoic acid	其他
61	Adenine	核苷酸	136	Urocanic acid	其他
62	Adenosine	核苷酸	137	2-Oxoglutaric acid	其他
63	Adenosine 5'-monophosphate	核苷酸	138	3-Hydroxyanthranilic acid	其他

序号	英文名称	分类	序号	英文名称	分类
64	Cytidine	核苷酸	139	3-Indolylacetic acid	其他
65	Cytidylic acid	核苷酸	140	4-Pyridoxic acid	其他
66	2'-Deoxycytidine	核苷酸	141	Phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate	其他
67	Guanine	核苷酸	142	DL-Hydroxykynurenine	其他
68	Guanosine	核苷酸	143	L-Carnosine	其他
69	Guanosine-5'-monophosphate	核苷酸	144	L-Anserine	其他
70	Hypoxanthine	核苷酸	145	Pyridoxal Phosphate	其他
71	Inosine	核苷酸	146	Choline glycerophosphate	其他
72	Thymidine	核苷酸	147	Uridine 5'-monophosphate	其他
73	2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, 5-methyl-	核苷酸	148	2-Oxovaleric Acid	其他
74	2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione	核苷酸	149	Taurine	其他
75	Uric acid	核苷酸	150	Penicillin G sodium	抗生素

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14916-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
 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
 全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
 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
 官网: sciex.com.cn

广州分公司
 广州市天河区珠江西路15号
 珠江城1907室
 电话: 020-8510-0200
 传真: 020-3876-0835
 官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)