

# 使用 HILIC LC/MS 对哺乳动物细胞培养基进行监测

## 作者

Jordy J. Hsiao、  
Genevieve van-de-Bittner、  
Te-Wei Chu、Oscar G. Potter  
和 Hongfeng Yin  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

将 Agilent InfinityLab Poroshell HILIC-Z 色谱柱与 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 结合使用，对六天内采集的哺乳动物细胞培养基中的养分吸收和分泌废物进行监测。HILIC-Z 色谱柱可保持良好的峰形与保留时间重现性，能适应高盐样品（如细胞培养基）。该方法通过优化流动相、梯度和仪器参数，可用于在负离子模式下的单次分析运行中对生长培养基的养分（即葡萄糖和氨基酸）与代谢废物（即乳酸及 TCA 循环相关的其他有机酸）进行监测。

## 前言

质谱 (MS) 是一种高灵敏度分析技术，常用于针对各种小分子的代谢组学研究<sup>1</sup>。哺乳动物细胞代谢组学一跃成为在多个研究领域中具备应用潜力的新兴工具，研究细胞培养基中细胞消耗与分泌的多种代谢物变得越来越重要<sup>2,3</sup>。分析仍然面临一些挑战，包括阴离子代谢物的保留<sup>4</sup>、样品基质效应<sup>5</sup>，以及螯合有机酸和磷酸化化合物的分析性能<sup>6</sup>。

为应对这些挑战，开发了一种稳定且可重现的亲水相互作用色谱 (HILIC) LC/MS 方法，方法中采用 InfinityLab 去活剂添加剂作为流动相改性剂，以增强金属螯合有机酸和磷酸化分析物的峰形和检测信号。作为色谱优化与 HILIC 色谱柱测试的一个步骤，对样品基质中盐浓度的影响进行了研究。研究中建立了一种分析细胞生长培养基中代谢物消耗和分泌的方法。

## 实验部分

### 方法

**耐盐性研究：**为进行 HILIC LC/MS 方法开发，选择了一套涵盖磷酸化分析物与磷酸糖异构体的代谢物标准品。使用 Milli-Q 纯化水配制 5 mg/mL 的分析物储备液。然后用 80:20 的乙腈 (ACN)/水将储备液稀释为 1 ng/μL (ppm) 的样品。在实验中，配制一份高盐储备液 (4 mol/L 尿素和 2 mol/L 氯化钠 (NaCl) 水溶液) 作为盐加标样。将高盐溶液按 20% (80 mmol/L 尿素、40 mmol/L NaCl) 与 40% (160 mmol/L 尿素、80 mmol/L NaCl) 加标至代谢物标准品 (3 ng) 中。因为盐不溶于样品基质 (80% ACN)，因此没有尝试采用更高的盐浓度 (> 40%)。

**细胞培养研究：**在添加 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中，培养 K562 白血病细胞。立即 (第 0 天)、24 小时 (第 1 天)、48 小时 (第 2 天)、72 小时 (第 3 天) 或 6 天 (第 6 天) 后采集部分细胞和培养基。将样品在 250 × g 条件下离心 5 分钟，使细胞形成团块。将生长培养基 (100 μL) 转移至另一个离心管，与 400 μL 50% ACN 混合，再在 10000 × g 条件下离心 5 分钟。然后，对 1 μL 上清液进行 HILIC LC/MS 分析。使用 Agilent MassHunter 定量分析软件分析结果。

**分析物分离：**在 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 mm × 50 mm, 2.7 μm, PEEK 内衬 (部件号 679775-924) 色谱柱上进行色谱分离。首先配制一份 10 倍流动相缓冲储备液 (100 mmol/L 乙酸铵, pH 9.0) 水溶液，然后用水 (A 溶液) 或 ACN (B 溶液) 配制 1 倍溶剂。在水溶液和有机流动相中添加 InfinityLab 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506)，确保浓度在梯度洗脱过程中保持不变。

### 仪器

使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪与配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6545 Q-TOF 的联用系统进行 LC/MS 分析。液相色谱仪包括：

- 带清洗密封垫的 Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- 带柱温箱 (G1330B) 的 Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- 安捷伦柱温箱 (G1316C)

通过连续注入参比质量溶液，实现动态质量轴校准。表 1 和表 2 汇总了优化的 LC 和 MS 条件。使用 Agilent MassHunter 软件套件进行数据采集与分析。

表 1. 最佳 LC 参数

1290 Infinity 液相色谱系统	
色谱柱	InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (部件号 679775-924)
流动相	A) 10 mmol/L 乙酸铵水溶液, pH 9, 含 5 μm 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506) B) 10 mmol/L 乙酸铵水/ACN 10:90 (v:v) 溶液, pH 9, 含 5 μm 去活剂添加剂 (部件号 5191-4506)
流速	0.25 mL/min
梯度	0-2 分钟, B 为 95% 2-12 分钟, B 由 95% 降至 50% 12-13 分钟, B 由 50% 升至 95% 13-21 分钟, B 为 95%
柱温	25 °C
进样量	1 μL
自动进样器温度	10 °C

## 结果与讨论

利用 InfinityLab Poroshell HILIC-Z 色谱柱宽范围的 pH 稳定性与高分离度, 开发了一种简单而稳定的 HILIC LC/MS 方法。在本研究中, pH 9.0 的流动相在色谱分离中获得了最佳整体结果。此外, 添加 InfinityLab 去活剂添加剂明显改善了整合有机酸与磷酸化合物的峰形, 同时增强了信号强度。在 DMEM 与 RPMI 1640 这两种最常用的培养基中, 含有的高浓度无机盐包括 (NaCl, 约 100 mmol/L)、

氯化钾 (KCl, 约 5 mmol/L) 和硝酸钙 (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 约 0.4 mmol/L)。这些无机盐可保持培养基渗透平衡, 并有助于调节培养细胞的膜电位。为确定盐对保留时间重现性与代谢物峰形的影响, 我们使用 HILIC LC/MS 方法对浓度增加的尿素和 NaCl 加标样品进行分析 (图 1)。结果表明, HILIC 色谱柱保持了保留时间重现性, 同时高盐样品中的目标核苷酸 (如 AMP、ADP、ATP 和 GTP) 与磷酸糖异构体 (如葡萄糖-1-磷酸盐和葡萄糖-6-磷酸盐) 检测到极小的离子抑制 (图 1)。

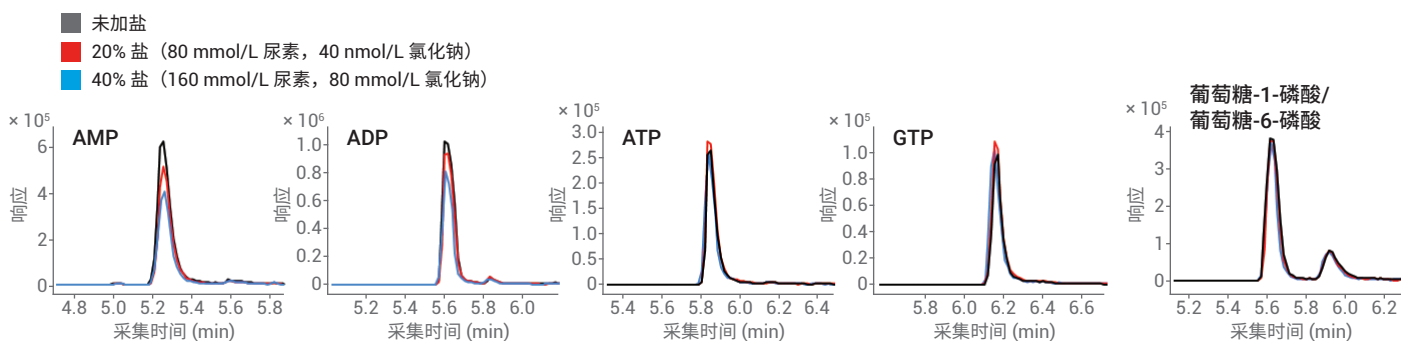


图 1. 使用 HILIC LC/MS 得到的盐样品中分析物的保留时间重现性

表 2. 最佳 MS 参数

6545 Q-TOF LC/MS	
电离模式	安捷伦喷射流
电离极性	负
干燥气温度	200 °C
干燥气	10 L/min
雾化器压力	40 psi
鞘气温度	300 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	125 V
锥孔电压	65 V
八极杆 1 RF 电压	750 V
采集范围	m/z 50-1000
MS 采集速率	1 质谱图/秒
参比质量	m/z 980.01638

接下来，我们设计了一项实验，用于监测细胞培养基在六天时间内的养分消耗与代谢物分泌（图 2）。在生长培养基中，乳酸作为代谢废物，随时间推移而逐渐积累（图 3，第 1 列）。此外，在监测过程中，有关 TCA 循环的其他有机酸（即苹果酸、

$\alpha$ -酮戊二酸 ( $\alpha$ -KG)、谷氨酸和柠檬酸) 在生长培养基中分泌并逐渐累积（图 3）。相比之下，细胞在代谢过程中消耗了糖，因此葡萄糖浓度随时间推移逐渐降低（图 3，第 2 列），直至完全耗尽（图 3，第 2 列，第 6 天）。氨基酸浓度

也随时间推移而逐渐降低，这是因为细胞消耗了生长培养基中的养分（图 4）。结果表明，在单次 HILIC LC/MS 运行中，可对哺乳动物细胞培养基中包括有机酸与氨基酸在内的各种代谢物进行分析和监测。

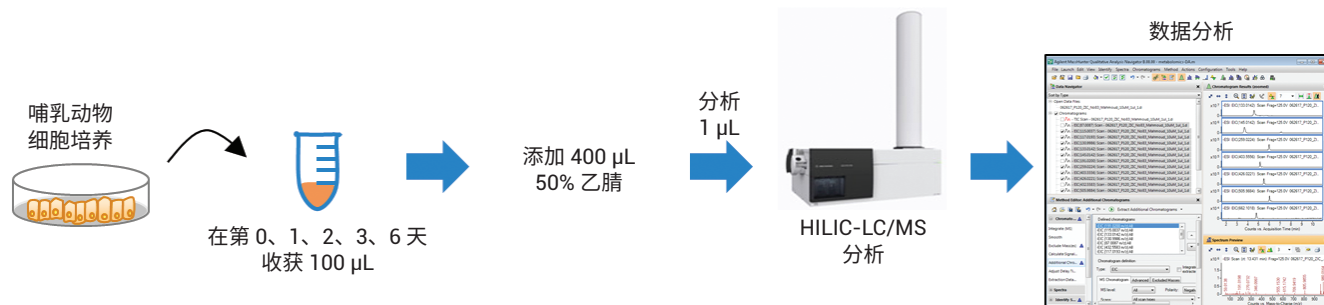


图 2. 用于监测哺乳动物细胞培养基中代谢物的时序研究的实验设计

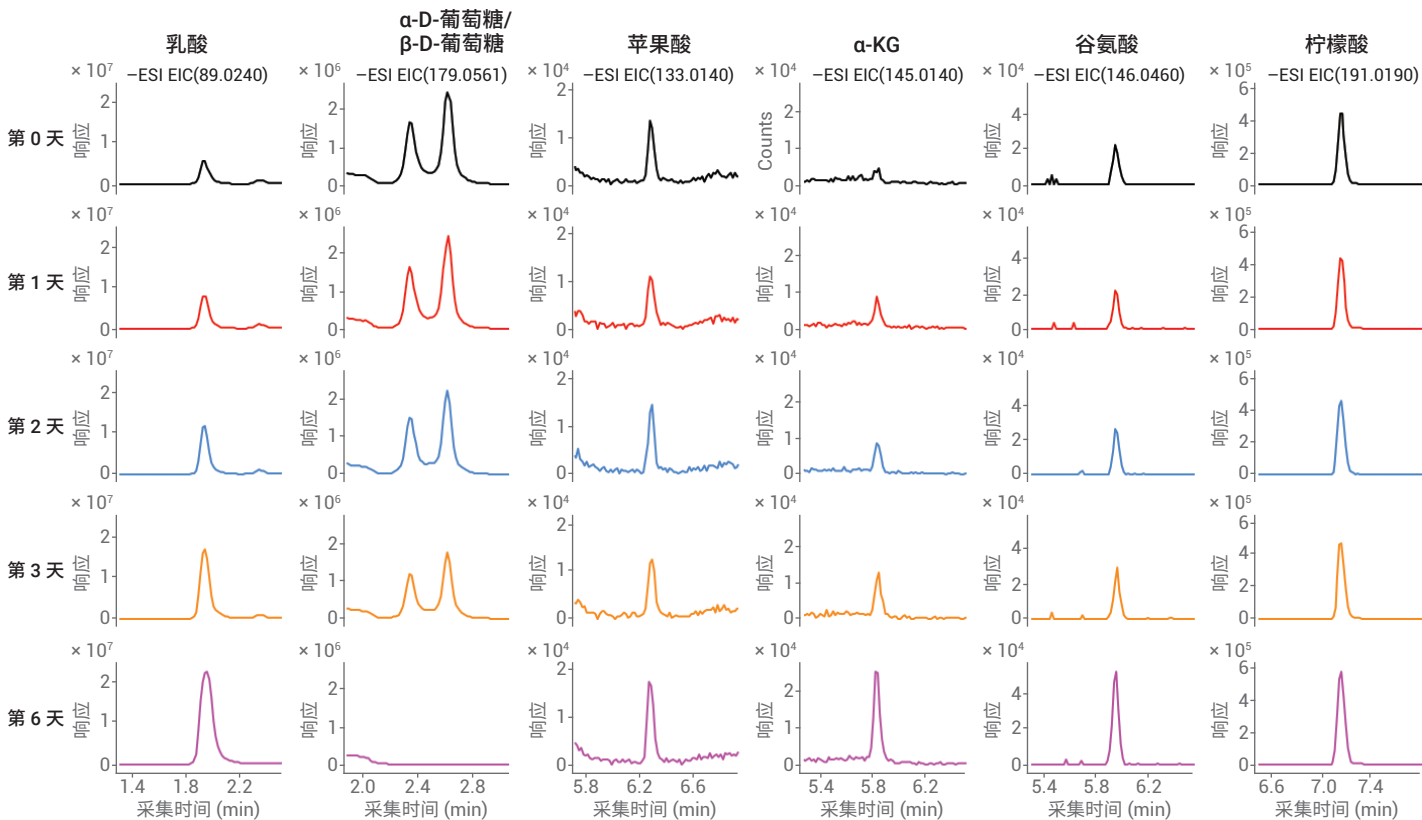


图 3. 对生长培养基中积累的细胞代谢废物分泌的追踪



图 4. 对细胞培养基中氨基酸养分消耗的监测

## 结论

在进行哺乳动物细胞培养基中各种代谢物的分析时，基于 HILIC 的色谱方法与 6545 Q-TOF LC/MS 联用，提供了卓越的分析性能。带 PEEK 内衬硬件的 InfinityLab Poroshell HILIC-Z 色谱柱可为高盐样品提供可靠的保留时间重现性与灵敏度。PEEK 内衬 HILIC-Z 色谱柱与 1290 Infinity 液相色谱系统和 6545 Q-TOF 系统联用，具有卓越性能，是代谢组学分析的理想平台。总之，这些特征能够在单一方法中对阴离子和疏水性更强的产物进行检测与分离，并可用于监测生物制造过程。

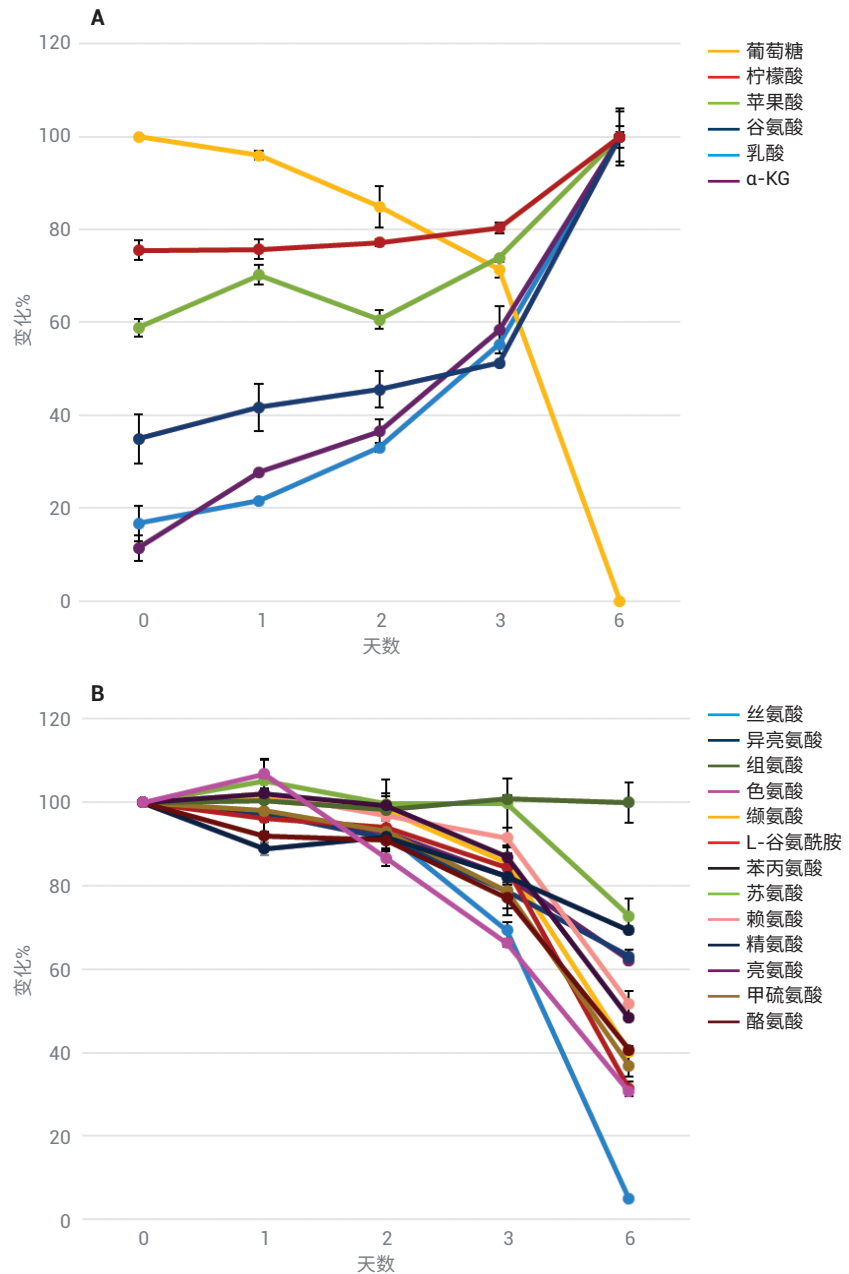


图 5. 对哺乳动物细胞培养基中的养分消耗与代谢分泌物的定量分析

## 参考文献

1. Wishart, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*(7), 473-484
2. Silva, L. P.; et al. Exometabolomics and MSI: deconstructing how cells interact to transform their small molecule environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 209-216
3. Garcia-Manteiga J. M.; et al. Metabolomics of B to plasma cell differentiation. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*(9), 4165-76
4. Zhang, Z.; et al. Evaluation of coupling reversed phase, aqueous normal phase, and hydrophilic interaction liquid chromatography with Orbitrap mass spectrometry for metabolomic studies of human urine. *Anal. Chem.* **2012**, *84*(4), 1994-2001
5. Panuwet, P.; et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46*(2), 93-105
6. Pesek, J. J.; et al. Improvement of peak shape in aqueous normal phase analysis of anionic metabolites. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*(24), 3509-3516

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018  
2018年6月27日，中国出版  
5994-0024ZHCN

