

## 利用原子吸收光谱法直接分析细胞培养基中的金属元素

### ■ 实验部分

抗体药物的活性成分主要通过培养 CHO（中国仓鼠卵巢）细胞生成。近年的报告指出，正在培养的细胞代谢产物和生成的抗体的一级结构受到培养基营养成分（糖和氨基酸等）及金属元素浓度的影响。例如在培养基中的金属元素方面，当锌（Zn）被吸收到细胞内时，锌（Zn）至少是 300 种酶和转录因子的辅助因子<sup>1)</sup>，以及附加在 IgG 内的糖链的结构糖根据培养基中的 Mn/Zn 比而变化<sup>2)</sup>等。因此，为保证抗体医药品质量的稳定，监测培养基中金属元素的浓度是很重要的。

到目前为止，ICP-MS 或螯合检测技术一直被运用于培养基中金属元素的测定。但是，ICP-MS 的初期和运行成本较高，螯合检测技术需要配位高度特异性的螯合剂，因而需要对每种元素进行样本的预处理，过程特别繁杂。

于是我们采用原子吸收光谱法（AAS）测定了培养基中的金属元素，它能够在较低的成本下简便地分析多个金属元素，下面为您介绍相关内容。

Y. Jiang, H. Kuroda

### ■ 装置原理和特点

原子吸收光谱法在高温下将元素原子化，利用原子化时特定波长的光会被吸收来定量元素浓度的一种技术。原子化法主要有 2 种，包括通过流经电流进行加热的电加热法和利用可燃性气体火焰加热的火焰法。电加热法和火焰法的优势摘录在表 1 当中。

本次测定首先采用高测定灵敏度的电加热法进行分析，然后使用火焰法对培养基中浓度较高的元素进行了评价。

表 1 原子化法的比较

	火焰法	电加热法
灵敏度	ppb ~ ppm	ppt ~ ppb
原子化效率	约 10%	90% 以上
所需试样量 / 1 次分析	1 至 2mL	5 至 50μL
分析时间 / 1 次分析	5 至 10 秒	2 至 5 分钟
重现性	RSD 1% 左右	RSD 3% 左右

### ■ 试样

CHO 细胞用培养基（3 种 \*，A、B、C）

\* 供应商不同

### ■ 装置和测定条件

采用岛津原子吸收光谱仪 AA-7000 和石墨炉原子化器（可自动切换火焰法和电加热法）、以及自动进样器对样品进行了测定。

使用电加热法和火焰法进行测定时的分光器和有关原子化的主要条件如表 2 和 3 所示。

表 2 电加热法的分光器及原子化条件

	分析波长	狭缝宽度	灰化温度	原子化温度	点灯方式	管型
Cu	324.8nm	0.7nm	800°C	2500°C	BGC-D2	热解涂层石墨管
Mn	279.5nm	0.2nm		2200°C		
Co	240.7nm			2300°C		
Fe	248.3nm	0.2nm		2300°C		
Zn	213.9nm	0.7nm	400°C	2200°C		

表 3 火焰法的分光器及原子化条件

	分析波长	狭缝宽度	点灯方式	火焰类型	乙炔流量
Fe	248.3nm	0.2nm	BGC-D2	空气 - 乙炔	2.2L/min
Zn	213.9nm	0.7nm			2.0L/min

## ■ 测定方法

将各细胞培养基按照表 4 所示稀释，分别测定各元素，将硝酸浓度调节至 0.5 w/v%。

各元素的标准液分别稀释原子吸收光分析用的 1000mg/L 标准液，将硝酸浓度调节至 0.5 w/v%。

利用标准曲线法进行了全部分析。

## ■ 测定结果

各细胞培养基的测定结果和加标回收率如表 5 所示。加标回收试验向各样品中添加了含有各元素的一定浓度的标准溶液，进行浓度测定。加标回收率通过加标浓度除以加标试样和无加标试样的浓度差求得。

关于细胞培养基中的 Fe 和 Zn 含量，使用电加热法和火焰法所得结果的相同，因此这里以火焰法的测定结果为例。

将几乎不包含金属元素的培养基反复测定 10 次，根据所得标准偏差 (SD) 计算得出的值  $10 \sigma_L$  标记为定量下限 (LOQ) 的标准。

图 1 和图 2 分别为通过电加热法、火焰法所得的标准曲线。各标准曲线的  $r=0.999$  以上，线性关系良好。

图 3 为利用电加热法测定培养基 B 时的峰谱图摘录。

表 4 细胞培养基的稀释倍数

	电加热法					火焰法	
	Cu	Mn	Co	Fe	Zn	Fe	Zn
A	10 倍	20 倍	10 倍	2000 倍	200 倍	10 倍	2 倍
B		10 倍	20 倍	500 倍	500 倍	2 倍	
C			10 倍		1000 倍		

表 5 细胞培养基的稀释倍数

		电加热法 (μg/L)			火焰法 (mg/L)	
		Cu	Mn	Co	Fe	Zn
A	实际浓度*1	<5*2	28	218	19	0.47
	加标回收率	128%	113%	93%	100%	95%
B	实际浓度*1	<5*2	<4*2	467	3.4	0.73
	加标回收率	93%	110%	106%	107%	93%
C	实际浓度*1	<5*2	<4*2	37.8	1.5	0.34
	加标回收率	93%	118%	91%	112%	101%

\*1 将测定值换算为细胞培养基原液的值。

\*2 表示低于定量下限。

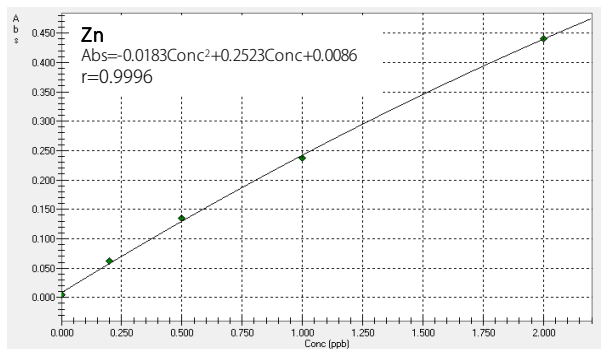
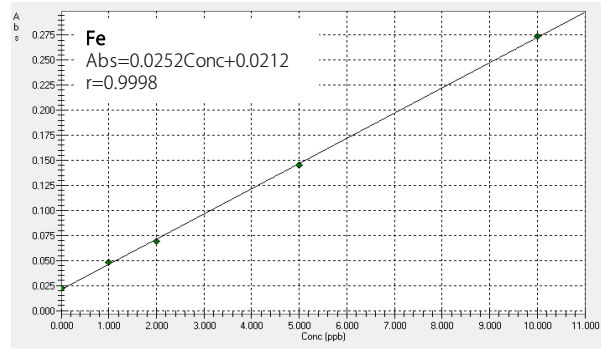
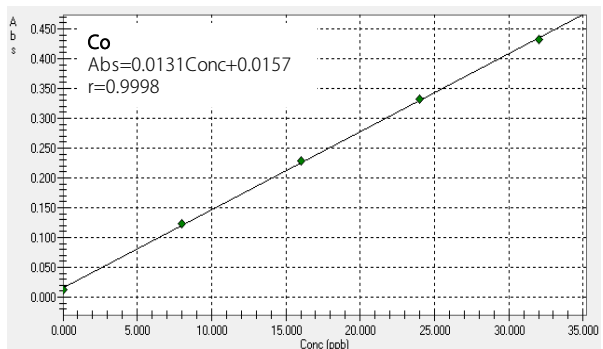
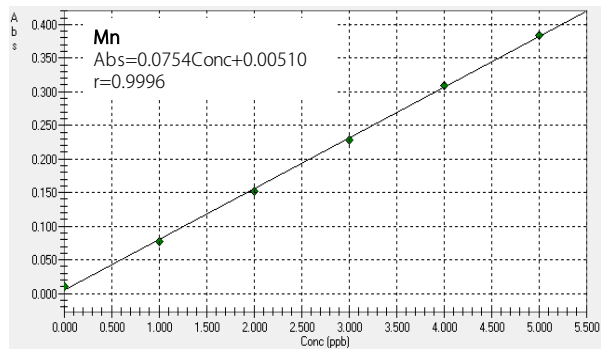
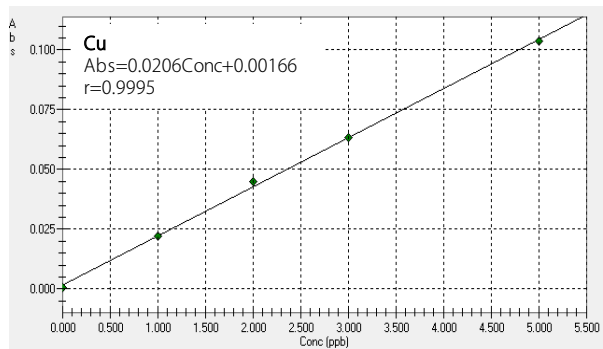


图 1 电加热法的标准曲线

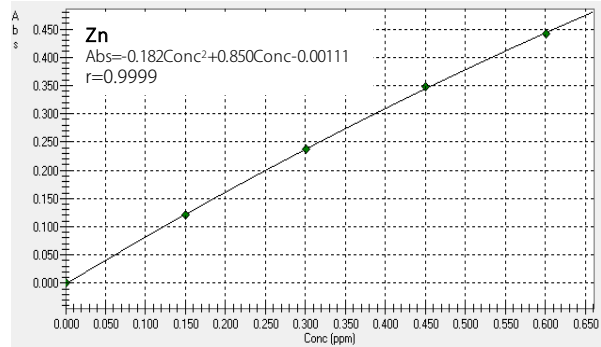
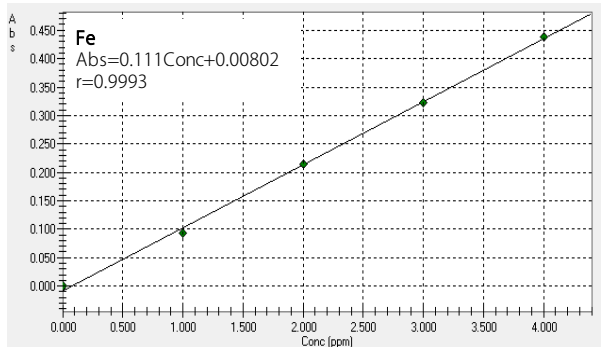


图 2 火焰法的标准曲线

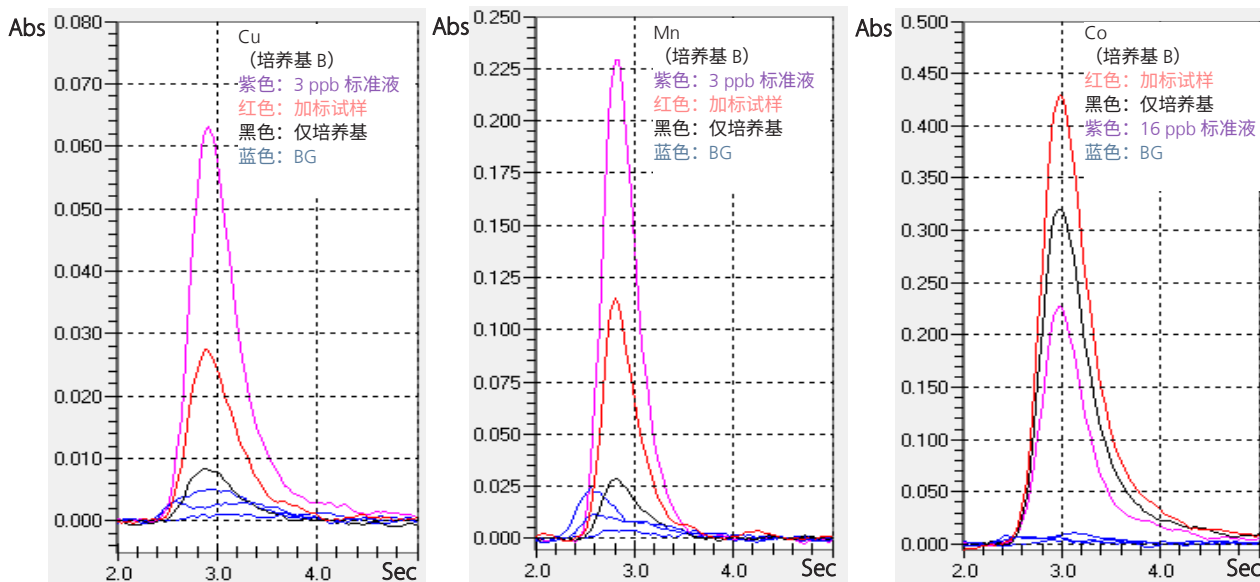


图3 利用电加热法测定样品时的峰谱图摘录

## ■ 结论

通过原子吸收光谱法（电加热法、火焰法）测定了3种CHO细胞培养基的金属元素浓度。结果表明仅稀释培养基即可通过原子吸收光谱法测定金属元素，而且发现不同供应商的CHO细胞培养基中的特定金属元素浓度不同。

综上所述，原子吸收光谱法是一种可以简便测定培养基中金属元素含量的方法。

在此次的加标回收试验当中，加标回收率大体良好，但根据培养基的不同，矿物质组分和有机物的存在可能影响加标回收率。

在这种情况下，可以通过改变稀释倍数或将定量方法改为标准加入法来进行改进。

< 参考文献 >

- 1) Marreiro 等人，“锌与氧化应激：当前机制”，抗氧化物，2017年
- 2) Prabhu 等人，“补锌降低CHO细胞中重组IgG半乳糖化”，应用微生物学与生物技术，2018年

## ■ 相关产品

应用报告C186A中介绍了测定培养基中有机组分的方法。本公司结合本文中介绍的金属分析，提出了培养基分析的总体解决方案。

通过与本公司LC/MS/MS组合，可以在20分钟内，对1个检体中包括培养基组分及分泌代谢产物中所含氨基酸在内的糖、维生素、有机酸等125种组分同时进行分析。



LS/MS/MS 方法包 细胞培养压型 Ver.2

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020年8月