

ICPMS-2050を用いた培地中の元素分析

仲康佑¹、姜 雨晶¹、黒田 博隆^{1,2,3}

1 島津製作所、2 島津分析イノベーション協働研究所、3 大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻

ユーザーベネフィット

- ◆ 培地中の微量元素から高濃度元素まで一斉分析できます。
- ◆ 培地の分解処理が不要で、希釈のみの簡便な前処理で分析できます。
- ◆ 培地中の元素を長時間安定して正確に分析できます。

■はじめに

培地中には、微量のCo、Cu、Seや数千ppmオーダーのNaなど、幅広い濃度の元素が含まれています。培地中のこれらの元素は細胞に取り込まれて酵素活性や酸化還元反応に寄与するため、細胞培養における重要な要素です。一方、培地製造工程で原料や設備由来の予期せぬコンタミネーションにより、元素濃度のロット間差が発生するリスクが指摘されており、均質な細胞培養の実現には培地中の元素濃度プロファイルの把握が重要と考えられます¹⁾。

本目的には、高感度に多元素を一斉分析でき、広いダイナミックレンジを特長とするICP-MSが適しています。

本アプリケーションニュースでは、ICP-MSを用い希釈のみの前処理で培地中の微量元素から高濃度元素まで一斉分析を行いました。また、希釈のみの前処理で分析値への影響がないことを確認するために添加回収試験、長時間の安定性の評価を行いました。

■測定元素

微量元素：Ag, Al, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ge, Li, Mn, Mo, Ni, Se, Sn, Ti, V, Zn

高濃度元素：Ca, K, Mg, Na, P

■試料および前処理

●分析試料

D-MEM (高グルコース)を分析試料として使用しました。また、培養過程で産生されるタンパク質等の分析への影響を評価するため、最終濃度10 g/Lで精製タンパク質を添加した分析試料を用意しました(以降、高マトリックス培地と呼ぶ)。

●前処理

未添加試料：分析試料を1v/v%硝酸と0.5v/v%塩酸の混合酸で20倍希釈し調製しました。

添加試料：分析試料に市販の単元素標準試料を添加した後、1 v/v%硝酸と0.5v/v%塩酸で20倍希釈し調製しました。

■標準試料

●検量線試料

市販の単元素標準液を混合し、1v/v%硝酸と0.5v/v%塩酸の混合酸で希釈し検量線試料を調製しました。各検量線試料中に含まれる測定元素の濃度を表1に示します。

●内標準溶液

市販のBe, Ga, Sc, Rh, Tlの単元素標準液を混合し、1v/v%硝酸と0.5v/v%塩酸の混合酸で希釈し、調製しました。内標準溶液のBe, Ga, Scの濃度は1 mg/L, Rh, Tlの濃度は0.2 mg/Lとしました。

●CCV試料 (Continuing Calibration Verifications)

STD3と同濃度になるように調製しました。

表1 検量線試料中各元素の濃度

元素	単位	検量線試料					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
Ag, Al, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ge, Li, Mn, Mo, Ni, Se, Sn, V, Zn	μg/L	0	0.5	1	5	10	
Ti	μg/L	0	5	10	50	100	
Ca, Mg, P	mg/L	0		1	5	10	
K	mg/L	0		2.5	12.5	25	
Na	mg/L	0			30	60	300

■装置と分析条件

表2にICP-MSの装置構成を示します。ランニングコストを抑えられるように、一般的なトーチと比較してアルゴンガスの消費量の少ないミニトーチを用いて分析しました。また、試料調製を省力化するために、内標準元素は内標準自動添加キットを使用してオンラインで添加しました。表3に分析条件を示します。

表2 ICP-MS装置構成

装置	:	ICPMS-2050
ネブライザー	:	ネブライザー DC04
チャンバー	:	サイクロンチャンバー
トーチ	:	ミニトーチ
サンプリングコーン	:	ニッケル製
スキマーコーン	:	ニッケル製
オートサンブラ	:	AS-20
内標準元素添加方法	:	内標準自動添加キット (試料:内部標準液 = 約9:1)

表3 分析条件

高周波出力	:	1.20 kW
サンプリング深さ	:	7.0 mm
プラズマガス流量	:	9.0 L/min
補助ガス流量	:	1.10 L/min
キャリアガス流量	:	0.60 L/min
希釈ガス流量	:	0.25 L/min
回転数	:	15 r.p.m.
セルガス	:	He / H ₂

■ 定量分析と添加回収試験

表1の検量線試料を用いて検量線を作成し、各分析試料を定量分析しました。

各分析試料の測定溶液中の定量結果および培地中に換算した定量結果を表4に示します。培地中にサブppbから数千ppmレベルの幅広い濃度で含まれる元素を一斉分析可能であることが分かりました。

また、希釈のみの前処理で分析値への影響がないことを確認するために、D-MEMおよび高マトリックス培地の添加回収試験を行いました。結果を表5に示します。全ての測定元素で94~107%の良好な添加回収率が得られ、ICPMS-2050は希釈のみの前処理で正確に分析可能なことを確認しました。

表4 測定溶液中および培地中に換算した定量結果

元素	セルガス	内標準元素	装置の検出下限*	培地中に換算した検出下限**	D-MEM		高マトリックス培地		
					測定溶液中定量値	培地中定量値	測定溶液中定量値	培地中定量値	
微量元素 ($\mu\text{g/L}$)	^{107}Ag	He	^{103}Rh	0.005	0.1	N.D.***	N.D.	N.D.	N.D.
	^{27}Al	No Gas	^{45}Sc	0.05	1	0.06	1	4.57	91.4
	^{138}Ba	He	^{103}Rh	0.005	0.1	0.016	0.32	0.517	10.3
	^{209}Bi	He	^{205}Tl	0.002	0.04	N.D.	N.D.	0.003	0.06
	^{111}Cd	He	^{103}Rh	0.01	0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	^{59}Co	He	^{71}Ga	0.01	0.2	N.D.	N.D.	0.06	1
	^{52}Cr	He	^{71}Ga	0.02	0.4	0.02	0.4	0.17	3.4
	^{63}Cu	He	^{71}Ga	0.006	0.1	0.007	0.1	0.599	12.0
	^{56}Fe	H_2	^{71}Ga	0.01	0.2	0.73	15	3.87	77.4
	^{72}Ge	He	^{71}Ga	0.03	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	^7Li	No Gas	^9Be	0.003	0.06	0.007	0.1	0.020	0.40
	^{55}Mn	He	^{71}Ga	0.02	0.4	N.D.	N.D.	0.05	1.0
	^{98}Mo	He	^{103}Rh	0.007	0.1	N.D.	N.D.	0.022	0.44
	^{60}Ni	He	^{71}Ga	0.02	0.4	0.02	0.4	0.40	8.0
	^{78}Se	H_2	^{71}Ga	0.01	0.2	N.D.	N.D.	0.07	1
	^{118}Sn	He	^{103}Rh	0.02	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	^{47}Ti	He	^{45}Sc	0.5	10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
^{51}V	He	^{45}Sc	0.03	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
^{66}Zn	He	^{71}Ga	0.02	0.4	N.D.	N.D.	0.11	2.2	
高濃度元素 (mg/L)	^{44}Ca	He	^{45}Sc	0.05	1	3.52	70.4	3.48	69.6
	^{39}K	He	^{45}Sc	0.008	0.2	10.7	214	10.6	212
	^{24}Mg	He	^{45}Sc	0.0008	0.02	0.971	19.4	0.965	19.3
	^{23}Na	He	^{45}Sc	0.04	0.8	178	3560	177	3540
	^{31}P	He	^{45}Sc	0.02	0.4	1.44	28.8	1.40	28.0

*装置の検出下限： $3 \times \sigma$ (STD0の標準偏差) \times 検量線の傾き

**培地中に換算した検出下限：装置検出下限 \times 希釈倍率 (20倍)

***N.D.: 未検出 (検出下限未満)

表 5 添加回収試験の結果

元素	装置の検出下限*	添加濃度	D-MEM			高マトリックス培地			
			溶液中の分析値	添加試料濃度	添加回収率 (%)	溶液中の分析値	添加試料濃度	添加回収率 (%)	
微量元素 (µg/L)	¹⁰⁷ Ag	0.005	5	N.D.**	4.93	99	N.D.	4.94	99
	²⁷ Al	0.05	5	0.06	5.06	100	4.57	9.93	107
	¹³⁸ Ba	0.005	5	0.016	5.10	102	0.517	5.72	104
	²⁰⁹ Pb	0.002	5	N.D.	4.90	98	0.003	4.91	98
	¹¹¹ Cd	0.01	5	N.D.	4.91	98	N.D.	4.92	98
	⁵⁹ Co	0.01	5	N.D.	4.96	99	0.06	4.98	98
	⁵² Cr	0.02	5	0.02	5.09	101	0.17	5.33	103
	⁶³ Cu	0.006	5	0.007	4.85	97	0.599	5.39	96
	⁵⁶ Fe	0.01	5	0.73	5.65	98	3.87	8.98	102
	⁷² Ge	0.03	5	N.D.	4.98	100	N.D.	4.94	99
	⁷ Li	0.003	5	0.007	4.98	98	0.020	4.74	94
	⁵⁵ Mn	0.02	5	N.D.	5.02	100	0.05	5.16	102
	⁹⁸ Mo	0.007	5	N.D.	5.12	102	0.022	5.11	102
	⁶⁰ Ni	0.02	5	0.02	4.92	98	0.40	5.28	98
	⁷⁸ Se	0.01	5	N.D.	4.97	99	0.07	5.37	106
	¹¹⁸ Sn	0.02	5	N.D.	5.03	101	N.D.	5.07	101
	⁴⁷ Ti	0.5	50	N.D.	50.8	101	N.D.	50.6	101
⁵¹ V	0.03	5	N.D.	4.98	100	N.D.	4.90	98	
⁶⁶ Zn	0.02	5	N.D.	4.83	97	0.11	4.99	98	
高濃度 元素 (mg/L)	⁴⁴ Ca	0.05	5	3.52	8.51	100	3.48	8.52	101
	³⁹ K	0.008	12.5	10.7	23.0	98	10.6	23.4	102
	²⁴ Mg	0.0008	5	0.971	5.84	97	0.965	5.91	99
	²³ Na	0.04	100	178	277	99	177	283	106
	³¹ P	0.02	5	1.44	6.56	102	1.40	6.67	105

*装置の検出下限：3 × σ(STD0の標準偏差) × 検量線の傾き
**N.D.: 未検出 (検出下限未満)

■ 長時間安定性の評価

長時間安定性の評価として、約8時間の連続分析を行いました。なお、分析中の検量線の有効性を確認するために、10試料測定毎にCCVを測定し、合計100試料を分析しました。

図1にCCVの回収率を示します。CCVの回収率は全ての測定元素で90~110%以内であり、約8時間にわたる分析中の検量線の有効性を確認することができました。

さらに、約8時間の分析中の内標準元素の強度の変動を図2に示します。なお、STD0の各内標準元素の強度を100%としています。いずれの内標準元素も70~130%以内の変動に収まりました。

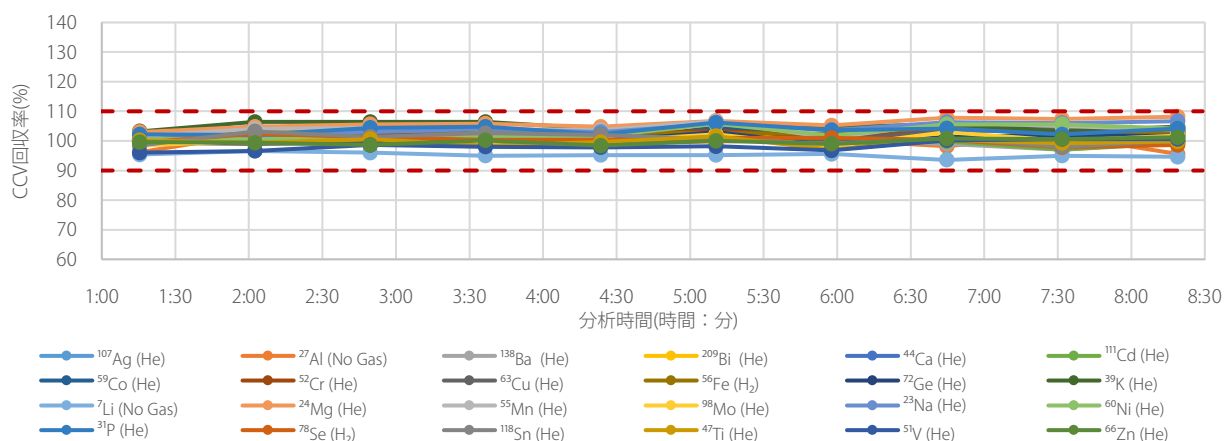


図1 約8時間の連続分析におけるCCVの回収率

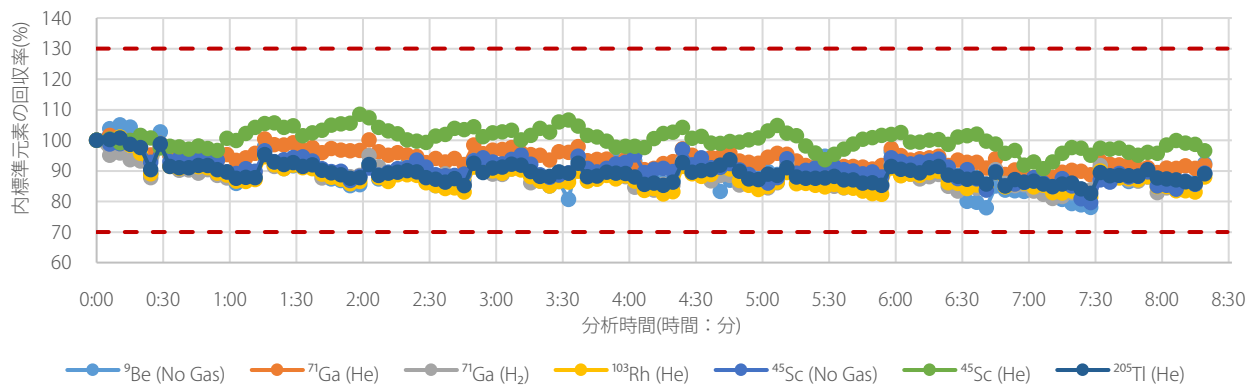


図2 約8時間の連続分析における内標準元素の強度の変動

■まとめ

本アプリケーションニュースでは、ICPMS-2050を用い、希釈のみの前処理で、培地中の微量元素から高濃度元素まで一斉分析を行いました。添加回収試験では良好な結果が得られ、希釈のみの前処理であっても培地中の元素を正確に分析できることを確認しました。また、約8時間の連続分析で良好な分析安定性を得られました。

<参考文献>

- 1) Ryan J. Graham et al, "Consequences of trace metal variability and supplementation on Chinese hamster ovary (CHO) cell culture performance : A review of key mechanism and considerations", Biotechnology and Bioengineering, 2019

<関連アプリケーション>

1. LC-MS/MSとICP-MSを用いた培地分析による抗体生産細胞の代謝解析- [Application News 01-00498](#)

