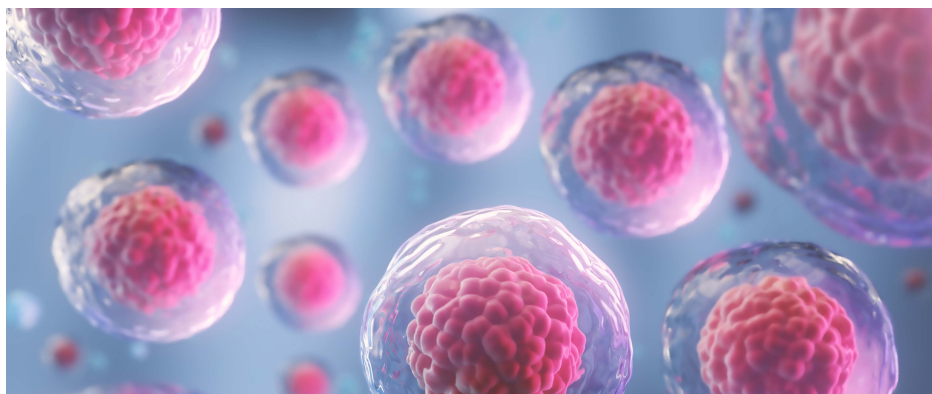


利用 ICP-MS 对化学成分明确的 细胞培养基进行元素分析

利用 Agilent 7900 ICP-MS 进行细胞培养基开发、
优化、生产和质量控制的多元素方法



作者

Yulan Bian 和 Aimei Zou
安捷伦科技有限公司

前言

细胞培养是生物药物、疫苗以及细胞和干细胞疗法等其他更复杂的治疗方法（药物形式）生产中使用的主要技术。细胞在人为控制的环境（通常是生物反应器）中培养以产生目标产物。选择合适的生长培养基（天然或合成）是这一体外过程中最重要的步骤之一。细胞培养基通常由氨基酸、维生素、无机盐、碳水化合物、脂质和生长因子等组成。由于天然培养基批次间存在差异，并且可能导致微生物和病毒污染，因此无血清、化学成分明确的细胞培养基 (CDM) 越来越受欢迎。每批 CDM 按各种已知的培养基成分的配方浓度生产^[1]。

在 CDM 中添加无机盐有助于维持其 pH 和渗透平衡。更重要的是，金属离子是必需的酶辅因子，参与细胞信号转导通路，调节细胞的生物过程。例如，锌、铜和锰影响单克隆抗体糖基化^[2]，锌还充当细胞凋亡抑制因子^[3]。因此，CDM 中金属离子的组成一致性对于生物药物产品的产量、质量和性能至关重要。

尽管使用了事先确定的配方，但由于原料来源不同、容器材料中金属的浸出或生产过程中的污染，CDM 的元素含量在不同生产批次之间可能会有所不同。为确保药品的质量和安全，美国药典 (USP) 和国际人用药品注册技术协调会 (ICH) 等监管机构发布了相关指南。这些指南规定了患者可能接触的污染物 (包括元素杂质) 的最大限值。但是，目前没有针对 CDM 中元素的质量和安全的法规、指南或标准方法。随着 CDM 用于更复杂的生物药物形式，可能需要更好地了解金属含量及其对产量和产品安全性的影响。

为了鉴定和定量 CDM 中的元素，我们利用 Agilent 7900 ICP-MS 开发了一种多元素方法。选择了两种无血清生长培养基 — Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 和 Ham's F-12 培养基。与基础培养基 DMEM 不同，Ham's F-12 已知含有铁、钴和锌。对不同批次、品牌和培养基类型进行了比较分析。这项研究突出了 7900 ICP-MS 在分析 CDM 样品方面的灵敏度、稳定性和易用性优势。该方法适用于培养基成分的开发和优化以及 CDM 的质量监测。

实验部分

样品前处理

三个不同批次的 DMEM 购自两家制造商 (称为制造商 A 和 B)。另一批 Ham's F-12 培养基来自制造商 A，痕量金属级硝酸 (纯度 ≥ 99.999%) 购自 Sigma Aldrich。使用产自 Milli-Q 水纯化系统、电阻率为 18.2 MΩ 的超纯水 (UPW) 进行样品前处理和标样配制。

使用 2% HNO₃ 直接将样品稀释 10 倍。将每个样品取 5 g 加入 50 mL Falcon 管中，并用 2% HNO₃ 稀释至 50 g。

仪器

使用包含 ORS⁴ 碰撞/反应池 (CRC) 的 7900 ICP-MS 进行分析。ORS⁴ 在氦 (He) 模式下运行，该模式可通过动能歧视 (KED) 去除所有常见分析物离子的典型多原子离子干扰。KED 选择性地过滤掉较大、能量较低的多原子离子，从而检测速度更快的分析物离子，显著提高了检测的准确性^[4]。

使用配备镍采样锥和截取锥、MicroMist 玻璃同心雾化器，在 2 °C 下冷却的石英雾化室以及带 2.5 mm 中心管的石英炬管的标准 ICP-MS 进样系统。使用安捷伦 I-AS 自动进样器 (配备具有 89 个瓶位的样品架) 将样品引入 7900 ICP-MS。在 Agilent ICP-MS MassHunter 软件中选择通用应用的预设方法。预设方法自动设置应用所需的等离子体条件和其他分析参数，从而简化方法开发。表 1 阴影行中的参数由软件自动设置，并且仅针对所有元素自动调谐一次透镜电压。

表 1. Agilent 7900 ICP-MS 操作条件。阴影行的参数通过在 ICP-MS MassHunter 中选择通用预设方法自动定义

参数	设置
池模式	氦气
RF 功率 (W)	1550
雾化室温度 (°C)	2
采样深度 (mm)	10
载气流速 (L/min)	1.08
提取电压 1 (V)	0.0
提取电压 2 (V)	-170.0
Omega 偏置电压 (V)	-90
Omega 透镜电压 (V)	10.6
偏转电压 (V)	2.0
氦气流速 (mL/min)	5.0
动能歧视电压 (V)	5.0

结果与讨论

校准、质量控制和内标

采用安捷伦多元素标准品（部件号 5183-4688）和铟单标（部件号 5190-8581）制备中间工作标样和校准标样。内标 (ISTD) 溶液由适用于 ICP-MS 系统的安捷伦内标储备液（部件号 5188-6525）配制。利用标准在线 ISTD 系统将 ISTD 加入样品中。

校准标样用 2% HNO₃ 配制，以匹配样品溶液。常量元素的校准范围为 0、0.005、0.01、0.05、0.25、1、5、20、40 ppm。痕量元素的范围为 0、0.05、0.1、0.5、2.5、10、50、200、400 ppb。常量元素和痕量元素的质量控制 (QC) 标样分别为 10 ppm 和 100 ppb。ISTD 标准品用 2% HNO₃ 配制，浓度为 100 ppb。常量元素和痕量元素的代表性校准曲线如图 1 所示。

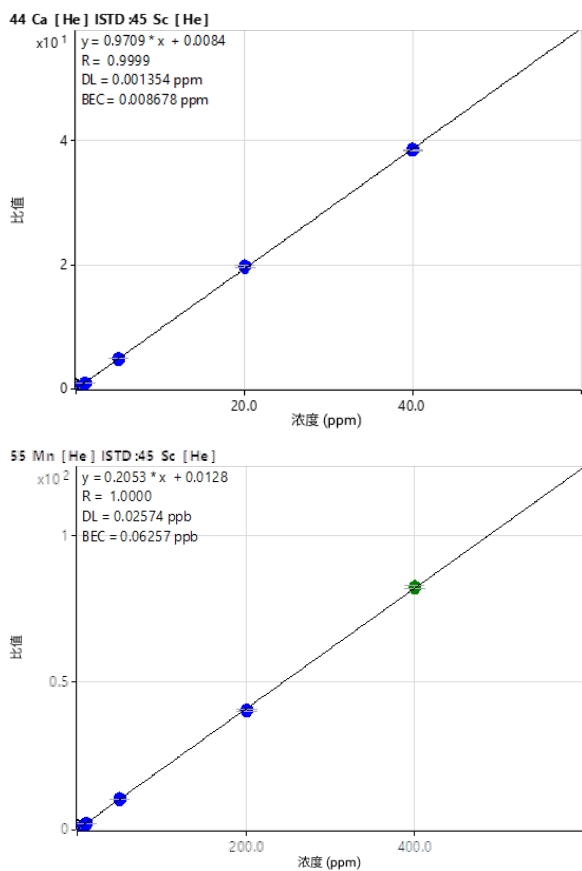


图 1. 常量元素 (Ca) 和痕量元素 (Mn) 的代表性校准曲线

分析序列

首先，分析校准标样，然后分析一系列校准空白和初始校准验证 (ICV) 溶液。重复分析上述样品组，然后分析加标样品组。每分析 10 个样品后，分析一个连续校准验证 (CCV) 样品。

根据 ICP-MS MassHunter 校准情况计算的典型 7900 ICP-MS 仪器检测限 (DLs) 如表 2 所示。校准系数表明，在整个校准范围内，所有元素都表现出良好的线性 (> 0.999)。7900 的宽动态范围支持在一次运行中测量常量元素和痕量元素。

表 2. 检测限和校准系数

元素	同位素	单位	DL	R
Mg	24	ppm	0.0002	0.9998
K	39	ppm	0.0023	0.9999
Ca	44	ppm	0.0013	0.9999
Fe	56	ppm	0.0001	0.9998
Al	27	ppb	0.3416	1.0000
V	51	ppb	0.0013	0.9998
Cr	52	ppb	0.0804	0.9997
Mn	55	ppb	0.0257	1.0000
Co	59	ppb	0.0028	0.9998
Ni	60	ppb	0.1056	0.9999
Cu	63	ppb	0.0028	0.9998
Zn	66	ppb	0.0593	0.9999
As	75	ppb	0.0036	0.9999
Se	78	ppb	0.0969	1.0000
Sr	88	ppb	0.0096	0.9998
Cd	114	ppb	0.0004	0.9999
Sb	121	ppb	0.0021	1.0000
Ba	137	ppb	0.0065	1.0000
Tl	205	ppb	0.0003	1.0000
*Pb	208	ppb	0.0005	1.0000

* Pb 含量通常以三种丰度最高的同位素 206、207 和 208 之和进行报告

加标回收率

由于没有可用于 CDM 的有证标准物质，因此通过对样品基质加标并测量回收率来评估方法的准确性。向来自制造商 A 的 DMEM 样品（批次 2）和 Ham's F-12 样品中加入的痕量元素浓度为 5 ppb，常量元素浓度为 5 ppm。细胞培养基加标样品中所有元素的平均加标回收率结果范围为 95%–115%（表 3）。出色的加标回收率数据证明了 7900 ICP-MS 定量方法在分析 CDM 中常量元素和痕量元素方面的准确性。

表 3. DMEM A2 和 Ham's F-12 的平均加标回收率结果，(n = 2)

元素	单位	加标浓度	DMEM A2			Ham's F-12		
			未加标样品的实测浓度	加标样品的实测浓度	回收率 (%)	未加标样品的实测浓度	加标样品的实测浓度	回收率 (%)
Mg	ppm	5	1.97	7.10	103	1.42	6.57	103
K	ppm	5	22.30	27.90	112	12.68	17.85	103
Ca	ppm	5	6.77	12.27	110	1.21	6.57	107
Fe	ppm	5	< DL	5.29	106	0.01	5.28	105
Al	ppb	5	< DL	5.52	110	< DL	5.06	101
V	ppb	5	0.04	5.25	104	0.01	5.14	103
Cr	ppb	5	< DL	5.15	103	< DL	5.13	103
Mn	ppb	5	0.19	5.31	102	< DL	5.17	103
Co	ppb	5	< DL	5.27	105	4.18	8.91	95
Ni	ppb	5	< DL	4.87	97	< DL	4.86	97
Cu	ppb	5	< DL	5.26	105	0.07	5.32	105
Zn	ppb	5	< DL	5.58	112	19.58	25.33	115
As	ppb	5	< DL	5.60	112	< DL	5.47	109
Se	ppb	5	< DL	5.72	114	< DL	5.48	110
Sr	ppb	5	1.94	6.97	101	0.37	5.49	102
Cd	ppb	5	< DL	4.99	100	< DL	4.98	100
Sb	ppb	5	0.03	5.20	103	0.02	5.15	103
Ba	ppb	5	0.29	5.57	106	0.08	5.37	106
Tl	ppb	5	< DL	5.44	109	< DL	5.42	108
Pb	ppb	5	0.02	5.40	108	< DL	5.40	108

长期稳定性测试

图 2 显示了在整个 8 小时的分析序列中 ISTD 信号的稳定性。所有样品的 ISTD 回收率均在校准空白标样的 80%–120% 范围内。校准标样的中点浓度用作 CCV 标样。

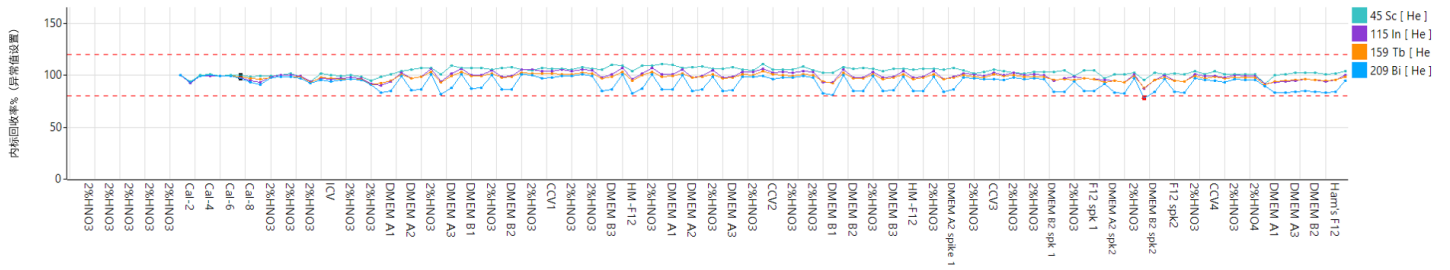


图 2. Agilent 7900 ICP-MS 在 8 小时内测得的 ISTD 信号稳定性。红色虚线表示 $\pm 20\%$

8 小时内得到的所有元素的 CCV 回收率均处于标准值 $\pm 10\%$ 以内，如图 3 所示。两组回收率均证明了 7900 ICP-MS 的长期稳定性和高基质耐受性，以及在细胞培养基样品的长时间分析方面的适用性。

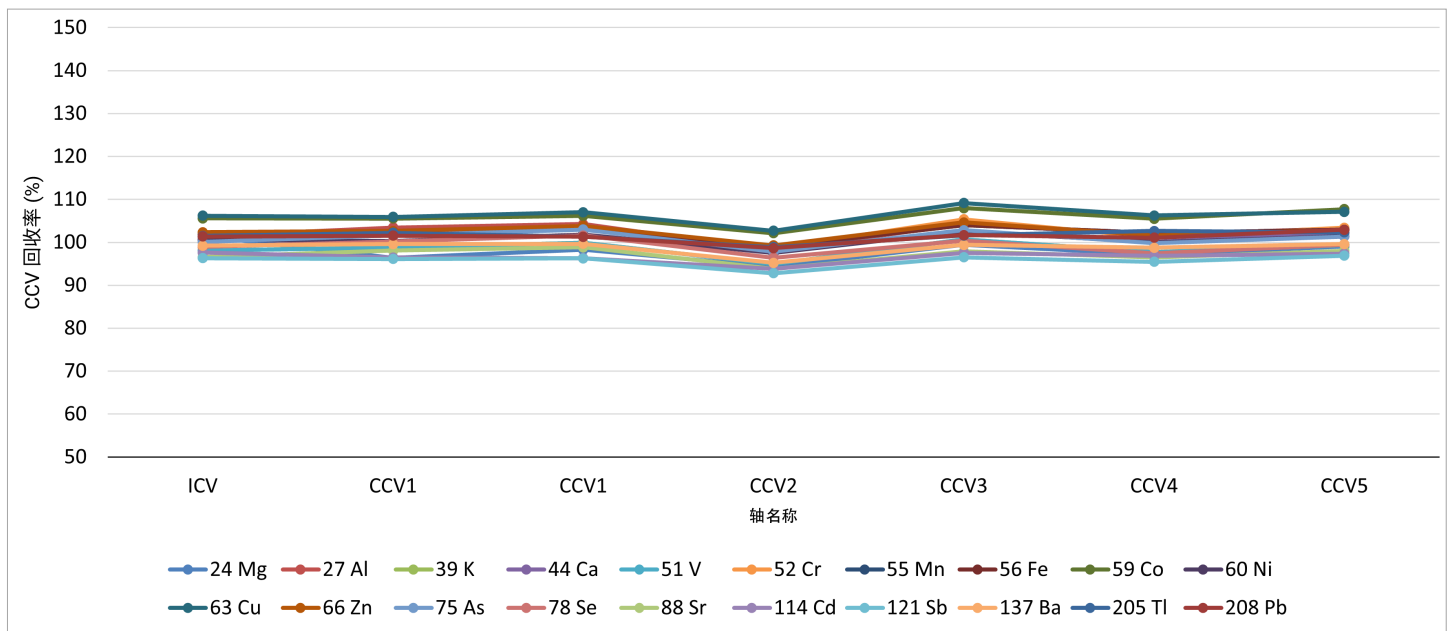


图 3. 通过 8 小时分析获得的所有元素的 CCV 回收率

样品定量分析结果

表 4 给出了 DMEM 和 Ham's F-12 样品中所有元素的定量结果（针对稀释倍数进行了校正）。对于所有未检测到的元素，均报告为小于其 DL。

表 4. 两个品牌、各三个批次的 DMEM 和 Ham's F-12 的平均定量结果, (n = 4)

元素	单位	DMEM						HAM's F-12
		品牌 A			品牌 B			
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	
Mg	ppm	19.33 ± 0.72	19.75 ± 0.13	20.00 ± 0.76	17.3 ± 0.41	17.79 ± 0.09	18.58 ± 0.30	14.23 ± 0.31
K	ppm	220.18 ± 2.62	223.00 ± 1.25	222.98 ± 1.25	223.31 ± 5.38	218.29 ± 1.15	220.56 ± 2.46	126.88 ± 3.23
Ca	ppm	70.25 ± 0.99	67.70 ± 0.30	68.35 ± 2.61	65.40 ± 1.25	66.47 ± 0.26	69.27 ± 0.65	12.06 ± 0.29
Fe	ppm	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.12 ± 0.003
Al	ppb	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41
V	ppb	0.20 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Cr	ppb	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80
Mn	ppb	< 0.25	1.93 ± 0.08	3.36 ± 0.17	1.64 ± 0.09	1.98 ± 0.09	3.16 ± 0.07	< 0.25
Co	ppb	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	41.81 ± 4.23
Ni	ppb	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05
Cu	ppb	< 0.03	< 0.03	< 0.30	0.76 ± 0.09	< 0.030	< 0.030	0.74 ± 0.001
Zn	ppb	< 0.59	< 0.59	< 0.59	21.64 ± 1.01	21.07 ± 0.33	23.28 ± 0.54	195.83 ± 1.74
As	ppb	0.20 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.01	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03
Se	ppb	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96
Sr	ppb	30.97 ± 0.69	19.36 ± 0.26	21.01 ± 0.86	21.85 ± 0.8	21.62 ± 0.24	23.61 ± 0.22	3.69 ± 0.06
Cd	ppb	< 0.004	< 0.004	< 0.004	0.05 ± 0.002	0.05 ± 0.002	0.04 ± 0.004	< 0.004
Sb	ppb	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.21 ± 0.01
Ba	ppb	3.02 ± 0.05	2.93 ± 0.07	3.07 ± 0.05	0.91 ± 0.06	0.89 ± 0.03	0.57 ± 0.08	0.76 ± 0.05
Tl	ppb	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003
Pb	ppb	0.10 ± 0.03	0.16 ± 0.008	0.22 ± 0.005	0.20 ± 0.005	0.28 ± 0.005	0.18 ± 0.008	< 0.005

细胞培养基中的常量元素

表 4 中的结果表明, 两个品牌的 DMEM 中常量元素的浓度分布相似。从批次间结果来看, DMEM 中常量元素的浓度是一致的, 同一品牌批次之间的差异 < 4%。品牌 A 的批次间一致性似乎略好于品牌 B, 如图 4 所示。常量元素以缓冲盐的形式添加到培养基中, 以维持培养基的 pH 值和渗透压。保持培养基批次间的 pH 值和渗透压一致是创造稳定的细胞培养环境以促进细胞生长的基础。

在比较不同类型的培养基时, 可以观察到 DMEM 和 Ham's F-12 的常量元素分布具有显著差异。如数据所示, Ham's F-12 添加了 Fe, 而在 DMEM 中没有检测到 Fe。Ham's F-12 中 K 和 Ca 的浓度远低于 DMEM。这种差异可归因于每种培养基的具体用途不同。DMEM 是一种通用的基础培养基, 而 Ham's F-12 最初是为克隆中国仓鼠卵巢和肺细胞而开发的, 培养环境中离子更少可能更有益于这些细胞。

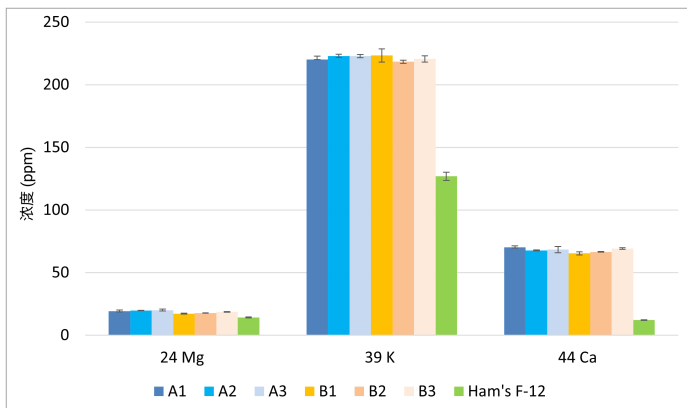


图 4. 比较所有细胞培养基样品中的 Mg、K 和 Ca 元素。A1、A2 和 A3 代表制造商 A 的 DMEM 批次，B1、B2、B2 代表制造商 B 的 DMEM 批次

细胞培养基中的微量元素

两个品牌的 DMEM 之间最明显的区别是品牌 B 中存在 Zn，但品牌 A 中不存在，如图 5 所示。根据文献，Zn 会参与关键的细胞生化过程^[3]。品牌 B 的 DMEM 样品中 Zn 的浓度表明，培养基添加了 Zn 来增强性能。支持干细胞生产的 Sr^[5] 在所有 DMEM 样品中均检测到，且含量水平相似。

两种类型的细胞培养基中 Co、Zn 和 Sr 的浓度存在明显差异（图 5）。Ham's F-12 中 Co 和 Zn 含量相对较高，因为这些元素被用作无机营养物质来促进 CHO 细胞和其他癌细胞的生长。在 Ham's F-12 中也检测到 Sr，但与 DMEM 相比浓度较低。

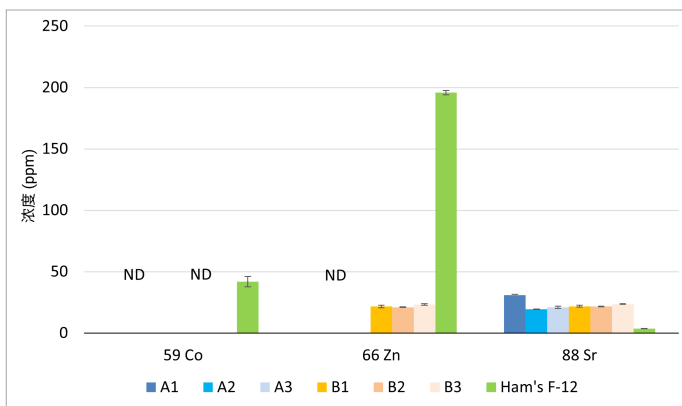


图 5. DMEM 和 Ham's F-12 细胞培养基样品中 Co、Zn 和 Sr 的浓度比较。ND = 未检测到，浓度低于 DL

检测到的其他低 ppb 级或亚 ppb 水平的元素，如 V、Mn、As、Cd、Sb、Ba 和 Pb，可能是从制备培养基的原料中引入的杂质。DMEM 中这些元素浓度的批次间比较存在一定的一致性。例如，在品牌 A DMEM 的三个批次中，检测到 As 和 Ba 的含量分别约为 0.2 ppb 和 3.0 ppb。如果从更多批次中收集足够的数据，则可以利用统计置信度构建痕量元素参考分布图，作为细胞培养基质量控制的基准。

使用 IntelliQuant 获得半定量数据

ICP-MS MassHunter 中的预设方法可在 He 模式^[6]下使用 IntelliQuant 快速扫描采集功能自动采集样品的全质谱数据，除非未选择扫描。IntelliQuant 无需特殊设置或单独校准，简化了分析过程。IntelliQuant 自动采集每个样品的全质谱数据，只需额外两秒钟的测量时间，分析人员即可快速查看样品中存在哪些元素。由于 IntelliQuant 数据是在 He 模式下采集的，因此分析物没有常见的多原子离子重叠干扰，从而确保了数据的质量。

在本研究中，采集了每个细胞培养基样品的 IntelliQuant 数据。数据可显示为元素周期表热图，如图 6 所示。元素的颜色强度表示实测浓度，颜色越深表示浓度越高。Na、K、P、S 和 Cl 等元素未包含在定量方法中，但在 DMEM 中通过 IntelliQuant 进行了鉴定和半定量。分析人员可以使用 IntelliQuant 数据快速查看任何样品间的差异，并识别样品中存在的任何非预期元素。与 DMEM B3 相比，在 HAM's F-12 中检测到更高水平的 Fe、Co、Cu 和 Zn（图 6），这与完全定量的结果一致（表 4）。

