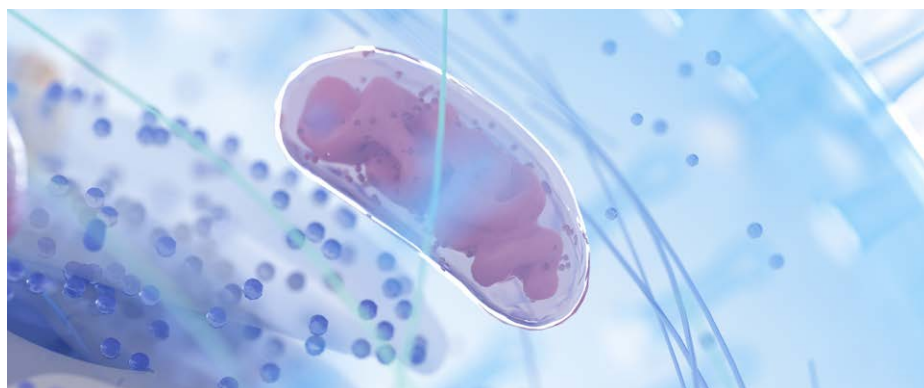


使用快速时间分辨分析 (TRA) ICP-MS 评估单细胞中的元素含量

使用 Agilent 8900 ICP-MS/MS 测定单个酵母、绿藻和
血红细胞中的 Mg、P、Fe 和 Zn



作者

Yu-ki Tanaka¹,
Yasumitsu Ogra¹,
Tetsuo Kubota²

¹日本千叶大学药学研究院,
日本千叶县

²安捷伦科技公司

前言

ICP-MS 技术的进步意味着现在可以更轻松地检测、定量和报告来自纳米颗粒和活细胞等单颗粒中的元素信号。这些技术被称为单颗粒 (SP-) 或单细胞 (SC-) ICP-MS，在半导体、环境、食品和临床研究等一系列行业和研究领域引起了广泛的关注。要实现成功的 SP/SC-ICP-MS 分析，ICP-MS 必须在快速时间分辨分析 (TRA) 模式下运行。将含有颗粒或细胞的悬浮液通过雾化器直接引入 ICP，使其分解、原子化和离子化。离子团需在 1 ms 内实现检测，比传统 ICP-MS 检测所用的信号积分时间 (10–100 ms) 快得多。为了测量单颗粒或单细胞信号，安捷伦单四极杆 ICP-MS 或安捷伦串联四极杆 ICP-MS (ICP-MS/MS) 的快速 TRA 模式采用 0.1 ms 的积分时间。

本研究利用 SC-ICP-MS 开发了一种准确的定量方法，用于测定单个酵母、绿藻和红细胞 (RBC) 中的重要生物元素 Mg、P、Fe 和 Zn。为了验证 SC-ICP-MS 方法测量完整细胞的准确性，还需要在细胞消解后使用传统的“整体” ICP-MS 分析方法获得相应数据。酸消解步骤破坏了细胞结构，因此报告的金属浓度结果为数千个细胞的平均值。与整体分析相比，SC-ICP-MS 方法因快速 TRA 模式下信号的信噪比 (S/N) 增强，所需的细胞数量大幅减少。实现成功分析所需的细胞数量更少是该技术的一大优势，尤其适用于生物和临床研究等样品量有限的领域。

当使用 ICP-MS 分析具有复杂基质的样品时，更有可能发生基质导致的多原子干扰，从而影响某些待测元素的准确测定。例如，在生物样品中，磷 (^{31}P) 可能会受到 m/z 31 处 $^{12}\text{C}^{18}\text{OH}^+$ 、 $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}^+$ 、 $^{15}\text{N}_2\text{H}^+$ 、 $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ 和 $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^+$ 等干扰物质产生的高背景噪声的影响。此外，P 的第一电离势 (IP) 高达 10.5 eV。与 IP 为 6–8 eV 的元素相比，高 IP 意味着在氩等离子体中形成的离子数量相对较少，导致灵敏度较低。

Agilent 8900 ICP-MS/MS 具有高灵敏度、低背景和干扰消除能力，适用于 SC-ICP-MS 研究。Agilent 8900 ICP-MS 是一款串联质谱仪，使用 MS/MS 模式在碰撞/反应池 (CRC) 中通过可靠的化学反应消除多原子离子对 P 等元素的干扰。使用 MS/MS，该仪器可以在“原位质量”或“质量转移”模式下测量，如其他文献所述(1, 2)。在测量 ^{31}P 时，通常会使用 O_2 池气体质量转移模式，通过测量 m/z 47 处的氧化离子 $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ 进行间接测量(3)。MS/MS 模式为避免多原子离子对目标分析元素的干扰提供了一种可靠且可重现的方法。

为了简化使用安捷伦 ICP-MS 或 ICP-MS/MS 仪器进行的 SC-ICP-MS 分析，安捷伦为 Agilent ICP-MS MassHunter 仪器控制软件开发了单纳米颗粒应用模块 (部件号 G5714A)。安捷伦颗粒检测技术已在美国获得专利，即使在细胞悬浮液产生高离子背景的生物样品中，也能提供清晰的信号分布数据。

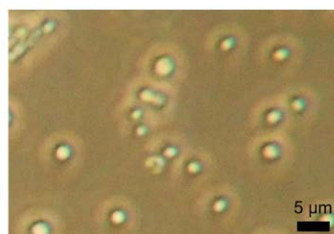
本研究评估了将 SC-ICP-MS 作为一种潜在技术来研究真菌、植物和动物细胞中必需元素的代谢。这是一个重要的研究领域，许多元素对细胞健康至关重要，某些金属不平衡、缺乏或过量可能会破坏细胞代谢。

实验部分

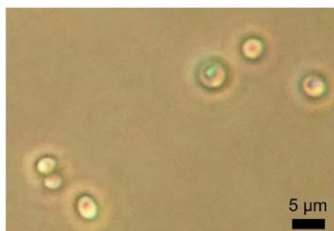
细胞样品和化学品

研究了三种直径约为 1–5 μm 的细胞，如图 1 所示。市售干酵母 (酿酒酵母) 购自 Sala Akita Shirakami Corporation (Akita, Japan)。单细胞绿藻莱茵衣藻 (NIES-3379) 来自日本国立环境研究所的微生物菌种保藏中心 (日本筑波)。红细胞采集自 11 周龄雄性 Wistar 大鼠 (Japan SLC Inc.)。清洗细胞样品并悬浮于 0.9% NaCl 溶液中，然后采用 SC-ICP-MS 进行分析。

(a) 酵母



(b) 绿藻



(c) RBC

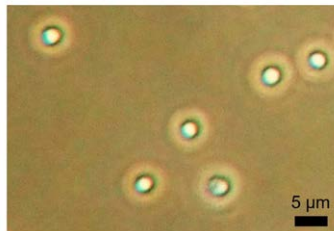


图 1. 悬浮于 0.9% NaCl 溶液中的三种细胞的显微图像

通过混合 Mg、Si、P、Fe 和 Zn 的单元素标准品制备离子标样。详见表 1。为了使标样和样品的基质匹配，向每种离子标样中加入 0.9% NaCl 溶液。

表 1. 元素标准品和校准范围的详细信息

元素	用于 SC-ICP-MS 的离子标样浓度 (ppb)	用于整体浓度分析的校准范围 (ppm)	供应商
Mg	10	0–15	Kanto Chemical
Si	100	-	Kanto Chemical
P	1000	0–20	FUJIFILM Wako Pure Chemical
Fe	10	0–5	Kanto Chemical
Zn	10	0–1	Kanto Chemical

用超纯水将标称直径为 200 nm 的 SiO₂ 纳米颗粒有证标准物质 (Merck Sigma Aldrich) 稀释至 2 ppb。使用 SiO₂ 纳米颗粒和 Si 离子溶液估算雾化效率。

表 2. 用于 SC-ICP-MS 和传统的整体细胞 ICP-MS 方法的 ICP-MS/MS 操作条件

参数	方法					
	SC-ICP-MS			通过 ICP-MS 进行整体浓度分析		
ICP-MS/MS 仪器型号	8900			8800		
RF 功率 (W)	1600			1550		
雾化气/补偿气流量 (L/min)	0.65/0.20			1.0/0.3		
反应池气体模式	无气体	O ₂	H ₂	无气体	O ₂	H ₂
反应池气体流量 (mL/min)	-	0.38	5.5	-	0.38	5.5
分析元素*	²⁴ Mg、 ⁶⁶ Zn	³¹ P**	⁵⁶ Fe、 ²⁸ Si	²⁴ Mg、 ⁶⁶ Zn	³¹ P**	⁵⁶ Fe
测量模式	单颗粒			全定量		
积分时间 (ms)	0.1			100		
雾化效率 (%)	约 55			不适用		

*所有元素均在 MS/MS 模式下测量。 ** 使用 MS/MS 质量转移模式和 O₂ 池气体；四极杆质量过滤器 Q1 和 Q2 分别设置为 m/z 31 和 47。

仪器

在 SC-ICP-MS 研究中，使用 MVX-7100 自动进样器 (Teledyne Cetac Technologies, Omaha, NE, USA) 将单细胞样品进样至 8900 ICP-MS/MS，如图 2 所示。8900 配备 MicroMist 玻璃雾化器和单细胞进样系统 (Glass Expansion, Victoria, Australia) 全消耗型雾化室。

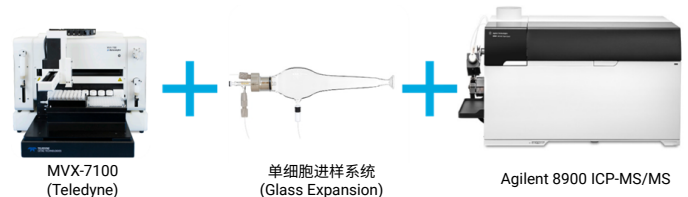


图 2. SC-ICP-MS 系统配置

在进行整体浓度分析时，将消解的细胞样品进样至配备标准进样系统的 Agilent 8800 ICP-MS/MS。两种 ICP-MS/MS 仪器的方法参数设置见表 2。两种方法使用相同的池气体。ICP-MS/MS 在无气体模式下测定 Mg 和 Zn，在 O₂ 质量转移模式下，以生成 ³¹P¹⁶O 产物离子的形式测定 ³¹P，并在 H₂ 模式下对 Fe 和 Si 进行原位质量测定。

样品前处理

样品前处理流程详见其他文献(4)。使用 Bürker-Türk 血细胞计数器对三种类型的细胞进行计数。测量结果用于本简报中整体浓度分析部分的计算。

测定单细胞的元素含量

使用 SC-ICP-MS 测量单细胞中的四种必需元素 (Mg、P、Fe 和 Zn)。使用以下公式 (公式 1) 计算单细胞中每种分析元素的质量 (m)。

$$m = \frac{I_{\text{Cell}}}{(I_{\text{Std}} - I_{\text{Blk}})} \cdot f \cdot C_{\text{Std}} \cdot v \quad (\text{公式 1})$$

I_{Cell} 、 I_{Std} 和 I_{Blk} 分别表示单个细胞、离子标样和 0.9% NaCl 空白溶液的信号强度。f、 C_{Std} 和 v 分别表示样品气溶胶的雾化/传输效率、离子标样溶液的浓度和样品流速 (0.015 mL/min)。

使用公式 (公式 2)，根据在 Si 离子溶液和 SiO_2 纳米颗粒悬浮液中测得的 ^{28}Si 信号强度计算雾化/传输效率 f， I_{Si} 和 I_{Silica} 分别表示 Si 离子溶液的信号强度和 SiO_2 的瞬时信号强度。根据 SiO_2 纳米颗粒溶液的半径 (100 nm)、密度 (2.63 g/cm^3) 和质量分数 (Si/SiO_2 约为 28/60) 计算单个 SiO_2 纳米颗粒中 Si 的质量 (m_{Silica})。 C_{Si} 是 Si 离子溶液的浓度 (100 ng/mL)。总之，通过比较离子溶液 ($(I_{\text{Si}} - I_{\text{Blk}})/C_{\text{Si}} \cdot v$) 和 SiO_2 纳米颗粒溶液 ($I_{\text{Silica}}/m_{\text{Silica}}$) 之间 ^{28}Si 的灵敏度因子，可以计算出雾化/传输效率。

$$f = \frac{m_{\text{Silica}}}{C_{\text{Si}} \cdot v} \cdot \frac{(I_{\text{Si}} - I_{\text{Blk}})}{I_{\text{Silica}}} \quad (\text{公式 2})$$

ICP-MS MassHunter 软件的单纳米颗粒应用模块自动执行所有计算。

整体浓度分析

用 0.5 mL HNO_3 (60%) 消解悬浮于 NaCl 溶液中的一小份 (0.1 mL) 酵母、绿藻和 RBC。在玻璃试管中制备细胞样品，将试管置于 100°C 加热板上加热。用 Milli-Q 水稀释消解后的细胞样品，然后通过 ICP-MS 进行元素分析。使用外标法测试元素的浓度，每个细胞的元素含量计算如下：

ICP-MS 实测浓度 (fg/mL)/细胞计数 (个细胞/mL)

结果与讨论

使用 8900 ICP-MS/MS，在快速 TRA 模式下检测酵母、绿藻和 RBC 中 Mg、P、Fe 和 Zn 的瞬时信号。以 Fe 和 P 为例，典型的信号图如图 3 所示。细胞悬浮液的细胞密度约为 10^6 个细胞/mL，可提供足够强的检测信号。

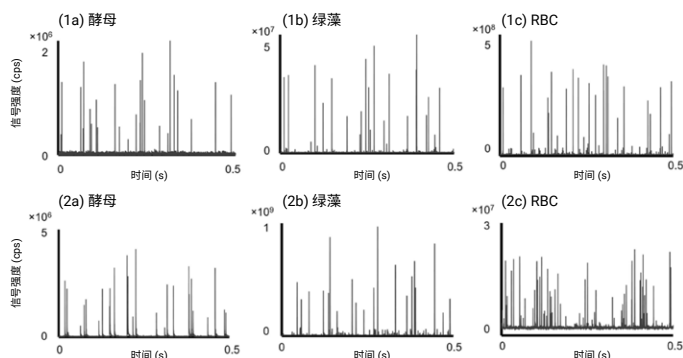


图 3. 通过 ICP-MS/MS 在快速 TRA 模式下获得的三种细胞中 Fe (上图, 1a 至 1c) 和 P (下图, 2a 至 2c) 的信号图

ICP-MS MassHunter 软件可自动计算单个细胞中每种元素的质量 (fg/细胞)。计算结果可显示为每个细胞的质量相对于该质量的频率的柱状图。图 4 显示了单个细胞的 Fe 和 P 含量。在 Y 轴上，可以清楚地区分背景噪音与三种细胞中 Fe 和 P 的质量分布。

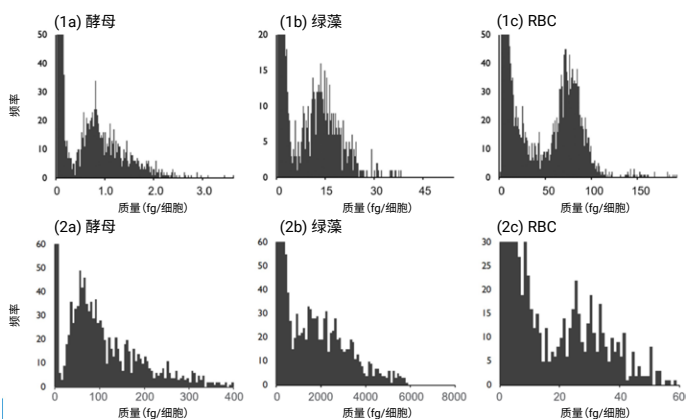


图 4. 单个细胞中 Fe (上图, 1a 至 1c) 和 P (下图, 2a 至 2c) 的质量柱状图

单细胞 (SC-ICP-MS, 蓝色条) 和整体细胞 (ICP-MS, 黄色条) 的 Mg、P、Fe 和 Zn 结果比较如图 5 所示。SC-ICP-MS 结果表明, 三种细胞之间每种元素的平均含量存在显著差异。

绿藻的特点是 Mg 含量高于酵母和 RBC, 这可能是由于绿藻中含有叶绿素。细胞的光合作用需要 Mg。RBC 中的 P 和 Zn 含量低于其他两种细胞, 这是因为 P 和 Zn 大量存在于细胞核中, 而 RBC 在分化过程中会去核。RBC 中 Fe 含量较高, 达到 70 fg, 可能是由于存在血红蛋白。

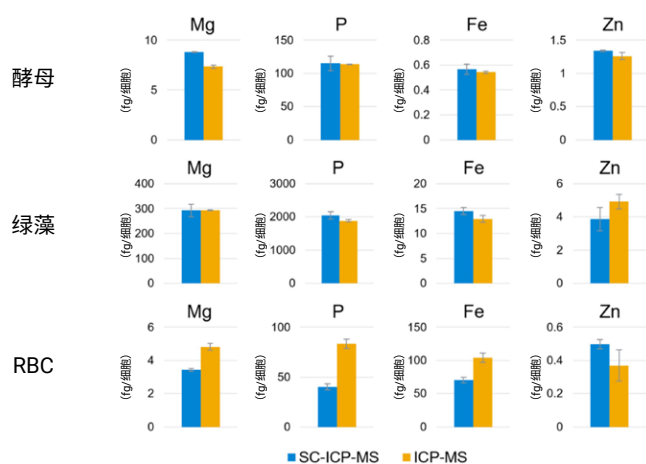


图 5. 酵母 (上图)、绿藻 (中图) 和 RBC (下图) 的元素含量

在酵母和绿藻中, 通过 SC-ICP-MS 和整体分析方法获得的结果基本一致 (图 5) (4)。在 RBC 中, 通过 SC-ICP-MS 方法获得的 P、Fe 和 Zn 含量结果低于整体分析方法的结果。然而, 如图 6 所示, 通过 SC-ICP-MS 获得的 RBC 中 Fe 的结果与使用经认证的平均细胞血红蛋白 (MCH) 值计算得到的参考数据 (66.5 fg/细胞) (5) 一致。整体分析的数据可能包括裂解的 RBC 和/或悬液中血清中的元素, 导致单个 RBC 的结果被高估。Fe 数据的确认结果表明, 对于单细胞元素含量的测定, SC-ICP-MS 提供了比常规酸消解整体细胞分析方法更准确的结果。

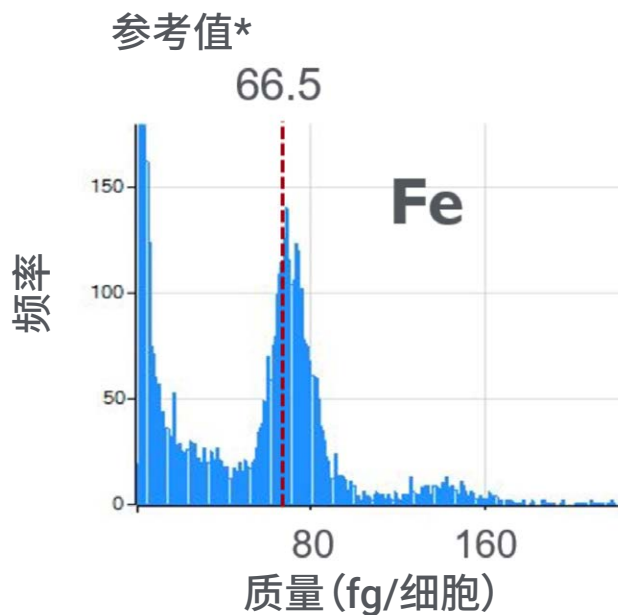


图 6. 使用 SC-ICP-MS 测得的 RBC 中 Fe 的质量

* 参考值根据供应商提供的 11 周龄雄性 Wistar 大鼠的 RBC 中经认证的平均血红蛋白含量计算得出。

结论

Agilent 8900 ICP-MS/MS 具有高灵敏度、低背景、先进的干扰消除能力和快速 TRA 模式，可使用 SC-ICP-MS 对单个酵母、绿藻和红细胞进行多元素分析。通过集成的 ICP-MS MassHunter 单纳米颗粒应用模块数据分析软件自动执行单细胞分析所需的所有计算。

使用 SC-ICP-MS 和传统的整体 ICP-MS 方法分析得到的酵母和绿藻中 Mg、P、Fe 和 Zn 的结果高度一致，验证了 SC-ICP-MS 方法的性能。根据计算的参考值，证实了 SC-ICP-MS 测定 RBC 中 Fe 含量的结果准确度。由于 SC-ICP-MS 提供的 Fe 分析结果比传统的 ICP-MS 方法更可靠，因此 Mg、P 和 Zn 的分析结果也可能更准确。通过测定完整红细胞的元素含量，SC-ICP-MS 可避免来自裂解的 RBC 和/或悬液中血清的元素污染，从而提供更准确的结果。

本研究证明了 SC-ICP-MS 作为一种实用且强大的技术，用于定量分析单个细胞中元素含量的潜力。

参考文献

1. E. Bolea-Fernandez, L. Balcaen, M. Resano, F. Vanhaecke. Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review, *J. Anal. At.Spectrom.*, **2017**, 32, 1660–1679, <https://doi.org/10.1039/C7JA00010C>
2. E. McCurdy, G. Woods, N. Sugiyama. Method Development with ICP-MS/MS: Tools and Techniques to Ensure Accurate Results in Reaction Mode, *Spectroscopy*, 2019 (9):20–27, <http://www.spectroscopyonline.com/method-development-icp-msms-tools-and-techniques-ensure-accurate-results-reaction-mode>
3. K Nakano, 使用 Agilent 8900 ICP-MS/MS 测定超低含量的磷、硫、硅和氯，安捷伦出版物，[5991-6852CHCN](https://doi.org/10.1039/C7JA00010C)
4. Y. K. Tanaka, R. Iida, S. Takada, T. Kubota, M. Yamanaka, N. Sugiyama, Y. Abdelnour, Y. Ogra, Quantitative Elemental Analysis of a Single Cell by Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Fast Time-Resolved Analysis Mode. *Chem Bio Chem*, **2020**, 21 (22), 3266–3272, <https://doi.org/10.1002/cbic.202000358>
5. Japan SLC Inc., Wistar rat mean corpuscular haemoglobin (MCH), accessed October 2021, <http://www.jslc.co.jp/pdf/data/2007/wistar2007.pdf>

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

www.agilent.com/chem

RA44589.3882986111

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, 2022
2022 年 2 月 22 日, 中国出版
5994-4460ZHCN