

液体クロマトグラフィーによる バイオ医薬品中の細胞培地の分析



工程を理解して管理することは、一貫性のある生物製剤製品の製造にとって不可欠であり、このような工程の重要な側面として、細胞で使用できる栄養素や代謝物などの細胞培地の条件があります。細胞培地の組成は、製品の歩留まりおよび生物製剤の製造に使用される細胞の状態や生存にとっての基本的な要素です。細胞培地への添加物も、グリコシル化パターンのような、生物製剤の重要な特性に影響を与える場合があります。

アミノ酸分析においては、分析スピードが不可欠な要素になる場合が多く、迅速な意思決定のためにバイオリアクタでの直接のオンラインモニタリングに対する要求が高まっています。¹再現性、堅牢性、およびカラム寿命もアミノ酸分析で直面する一般的な課題であり、アジレントでは、これらの課題に対して別の方法で対応するための2つのソリューションを提供しています。

AdvanceBio アミノ酸分析カラムおよび試薬キットは、信頼性と再現性の高い結果を提供します。アミノ酸の誘導体化は LC のオートサンブラにおいて完全に自動化されており、手動によるサンプル前処理のばらつきを排除すると同時に、サンプルの分解を引き起こす可能性のある、前処理と分析間の遅延も解消しています。誘導体化は、逆相カラムにアミノ酸を効果的に保持し、UV または蛍光によりアミノ酸を検出するために必要な工程です。AdvanceBio アミノ酸分析カラムは逆相カラムであり、アミノ酸の分離において要求される高 pH での保護に対して特別な処理を実行することにより、カラムを長寿命で堅牢な状態に維持します。

アジレントの 2 番目のアミノ酸分離ソリューションである AdvanceBio MS スpentメディアカラムでは、HILIC 分離と質量分析 (MS) 検出を組み合わせることで実行します。リテンションに対するこの代替アプローチにより誘導体化が不要になり、単一メソッドによる包括的な細胞培地分析が実行できるようになります。サンプルは、短時間遠心分離して細胞片を沈殿させた後に、バイオリアクタから採取して即座に分析できます。HILIC メソッド開発には独自の課題が存在していますが、以下に示すベストプラクティスに従うことにより、堅牢で信頼性の高い結果が実現可能です。

spentメディア分析で選択するワークフローは、分析ニーズおよび場合によっては優先事項の組み合わせによって決まります。

- **MS 検出は使用可能または優先事項ですか？**
 そうである場合、HILIC-MS を使用して幅広い成分をモニタリングできます。UV または蛍光検出のみが使用できる場合は、アミノ酸分析で逆相メソッドを使用することを推奨します。
- **アミノ酸のみをモニタリングする必要がありますか、それともその他の細胞培地成分をモニタリングする必要がありますか？**
 ビタミン B、糖、ヌクレオチド、ポリアミン、乳酸などのその他の栄養素または細胞老廃物をモニタリングする必要がある場合は、これらの代謝物をアミノ酸と同時に測定できる HILIC-MS を使用した多重化アッセイを開発することがより効率的です。アミノ酸分析のみが必要な場合は、誘導体化アミノ酸を使用する逆相 LC/UV メソッドが最適です。
- **アミノ酸を誘導体化しますか、それとも誘導体化しませんか？**
 その他の事情がない限り、サンプルを誘導体化する逆相 LC/UV または LC/FLD を選択するか、または誘導体化しない HILIC-MS を選択するかが基本的な原則になります。

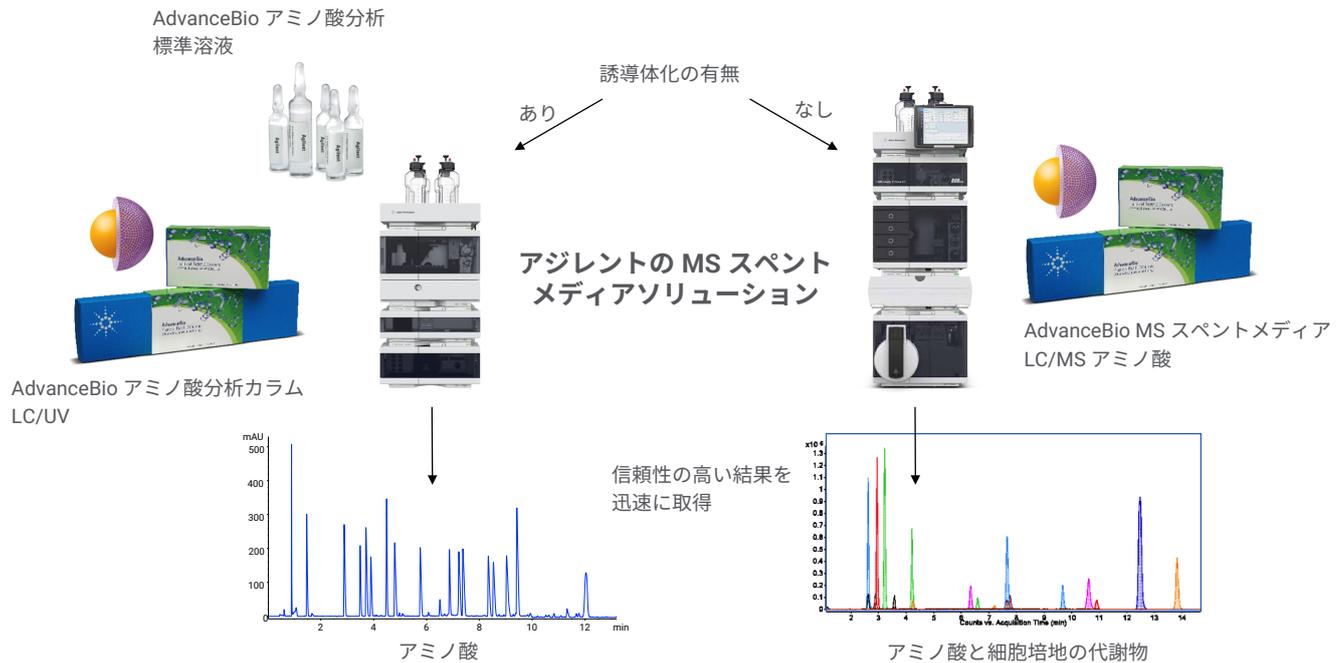


図 1. spentメディアで選択するワークフローは、モニタリングする必要がある成分、サンプル誘導体化の優先度、および使用可能な検出器オプションによって決まります。

効果的なアミノ酸分析のベストプラクティス

サンプル前処理

- サンプルを遠心分離して、バイオリアクタサンプルから粒状物質を沈殿させます。
- ラベル化アミノ酸については、誘導体化試薬、ホウ酸塩バッファ、およびアミノ酸標準を毎日取り替えます。
- HILIC 分離では、最適な分離ピーク形状を得るために、サンプルをアセトニトリルで希釈します。サンプル溶媒と注入量が分離ピーク形状に対して与える影響の詳細については、[HILIC メソッド開発の技術概要²](#)を参照してください。

クロマトグラフィーによる分離 - 一般

- 流量の増加をデフォルトから 1 mL/min 以下に下げます。流量を徐々に増加させるとカラム寿命が延び、突然の過圧を防止するのに有効です。アジレントのソフトウェアでは、この設定は LC ランプ制御の [詳細設定] セクションにあります。
- LC メソッドの圧力上限をカラムの圧力上限に合わせます（ここで推奨するすべてのカラムにおいて 60 MPa）。これは、LC の最大圧力機能がカラムの最大圧力機能より大きい場合に重要です。

クロマトグラフィーによる分離 - 逆相

- リテンションタイムとレスポンスファクタのために、毎週再キャリブレーションを実施してください。
- 例えば、ロイシンとイソロイシンとの分解能など、2、3 の仕様を選択してそれらを定期的に追跡することにより、カラムとガードカラムの性能をモニタリングします。
- 誘導体化時は攪拌速度を最大にせず、オートサンブラが過度に摩耗しないようにします。

カラムはたとえ一晩のみであっても、移動相 A (表 1: 10 mM Na₂HPO₄、および 10 mM Na₂B₄O₇、pH 8.2) 中に放置しないでください。短期保管する場合は、必ずカラムを移動相 B (表 1: アセトニトリル、メタノール、および水 (45:45:10、v/v/v)) 中で保管してください。長期保管する場合は、カラムを 50:50 の アセトニトリル/水中で保管してください。

クロマトグラフィーによる分離 - HILIC

- アミノ酸は金属の影響を受けませんが、リン酸含有分子やポリアミンなどのその他の成分は、LC システム中に存在する金属により多大な影響を受ける場合があります。アミノ酸以外を分析する際には、パイオナート LC について検討するか、または金属チューブを PEEK で置き換えるか、または[HILIC メソッド開発の技術概要²](#)に示されている不活性プロトコルに従って、サンプル流路中に存在する金属を最小限に抑えることを推奨します。AdvanceBio MS スペントメディアカラムには、PEEK ライナ付きステンレスハードウェアが備えられているため、流路には元々金属は使用されていません。
- 『AdvanceBio MS Spent Media [user guide](#) (AdvanceBio MS スペントメディアユーザーガイド)』³および下のサンプルメソッドの説明に従って、原液バッファから HILIC 移動相を前処理することを推奨します。これにより、アセトニトリル中の塩の溶解性に関する課題を最小限に抑え、移動相 A と B 間のイオン強度の一貫性を向上させます。
- 移動相の pH を制御して、一貫性のあるカラムケミストリおよび再現性の高い分離を実現する必要があります。選択したバッファシステムのバッファ能力内の移動相 pH で使用することにより (pK_a ± 1)、高い再現性を実現します。
- サンプルマトリックスの含水量が高くなれば、注入量を減少させて、ピーク割れを防止する必要があります。
- HILIC カラムは逆相カラムと比較して、注入間の再平衡化により長い時間がかかります。再現性にとって重要になるのは、適切な再平衡化です。必ず > 3 % H₂O を維持して、固体固定相に水性層を保持してください。再平衡化を高速化するために、最小の極性対象化合物を保持する最高 % の水性で、グラジエントを開始することを検討してください。

質量分析

- MS 検出では、リン酸含有バッファを使用しないでください。
- MS 検出では、酢酸アンモニウムやギ酸アンモニウムのような揮発性バッファを選択します。酢酸と同様に、ギ酸含有移動相を使用している際には、ギ酸は検出できません。
- 特にメソッドの最後に高有機洗浄を実施する際、および可能な場合はボイドボリュームを溶出させる際には、対象のリテンションタイム外に LC ストリームを廃棄します。
- HPLC グレード以上の溶媒を使用してください。
- MS イオン源では、定期的にクリーニングルーチンを実施してください。

概要

誘導体化アミノ酸の逆相分析

誘導体化が自動化されているアミノ酸分析および LC/UV または蛍光分析については、こちらの[分析の手引き](#)⁴で詳細に説明されています。このガイドには、標準の前処理、オートサンプラをプログラムしたサンプル誘導体化の実行、およびクロマトグラフィーメソッドの手順が記載されています。

パラメータ	設定値
カラム	AdvanceBio アミノ酸分析 4.6 x 100 mm または 3.0 x 100 mm
機器	Agilent 1290 Infinity II LC システム
流量	1.5 mL/min (内径 4.6 mm カラムの場合) 0.62 mL/min (内径 3 mm カラムの場合)
移動相 A	10 mM Na ₂ HPO ₄ 、および 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ 、 pH 8.2
移動相 B	アセトニトリル、メタノール、および水 (45:45:10、v/v/v)
グラジエント	時間 (分) %B
	0 2
	0.35 2
	13.4 57
	13.5 100
	15.7 100
	15.8 2
	18 終了
カラム温度	40 °C
検出器	シグナル A: 338 nm、10 nm バンド幅、 参照波長 390 nm、20 nm バンド幅 シグナル B : 262 nm、16 nm バンド幅、 参照波長 324 nm、8 nm バンド幅

表 1. AdvanceBio アミノ酸分析カラムを使用した、ラベル化アミノ酸の逆相分析用 LC メソッド

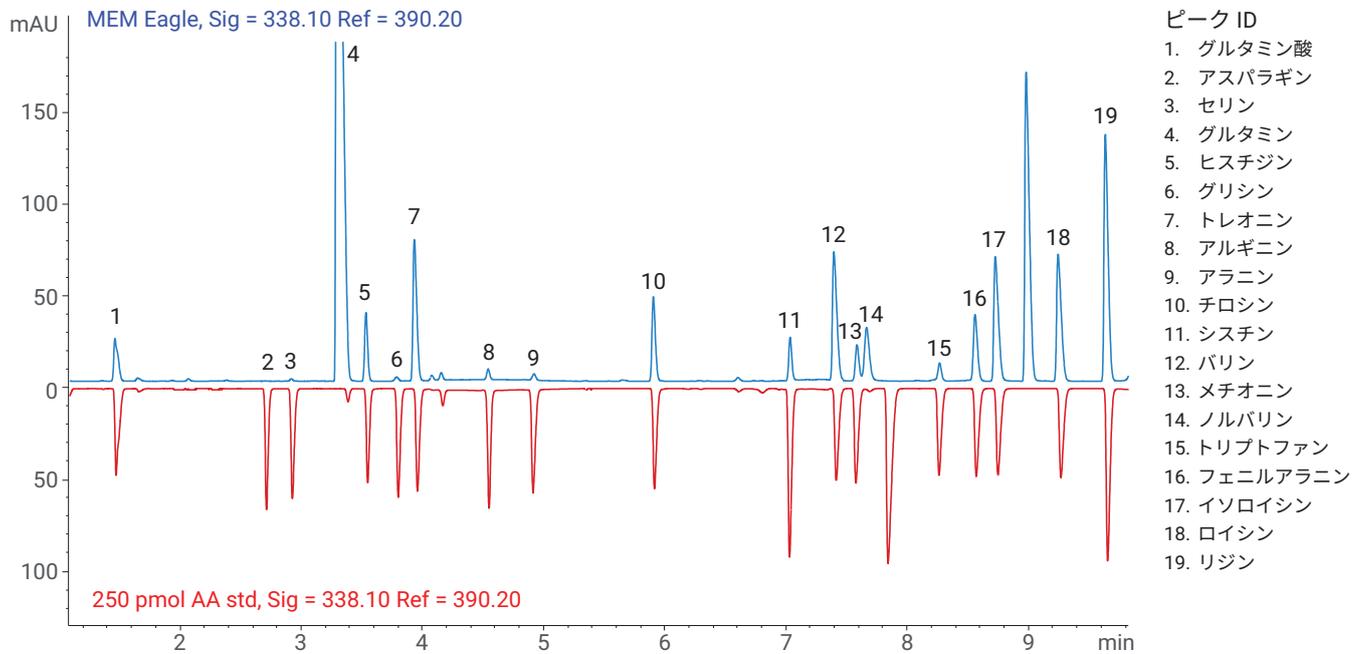


図 2. AdvanceBio アミノ酸分析カラムを使用した、OPA および FMOC ラベル化アミノ酸の分離例⁵

非誘導体化アミノ酸の HILIC 分析

アミノ酸の他にさまざまな代謝物で使用されるサンプルメソッドを下に示します。アミノ酸に注目したサンプルメソッドについては、[アプリケーションノート⁶](#)、または[カタログ⁷](#)を参照してください。

パラメータ	設定値														
カラム	AdvanceBio MS スペントメディア、2.1 x 100 mm														
機器	Agilent 1260 Infinity II バイオイナート LC システム														
流量	0.5 mL/min														
移動相	低 pH、ポジティブイオンモードの MS 検出： A = pH 3 の水に含まれる 10 % 200 mM のギ酸アンモニウム、90 % の水 B = pH 3 の水に含まれる 10 % 200 mM のギ酸アンモニウム、90 % のアセトニトリル 最終塩濃度は 20 mM。														
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>10</td><td>75</td></tr> <tr><td>20</td><td>20</td></tr> <tr><td>21</td><td>20</td></tr> <tr><td>21.1</td><td>100</td></tr> <tr><td>28</td><td>100</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0	100	10	75	20	20	21	20	21.1	100	28	100
時間 (分)	%B														
0	100														
10	75														
20	20														
21	20														
21.1	100														
28	100														
カラム温度	40 °C														
検出器	Agilent 6230 TOF														

表 2. AdvanceBio MS スペントメディアカラムを使用した、アミノ酸およびその他の細胞培地成分の HILIC 分析用 LC メソッド

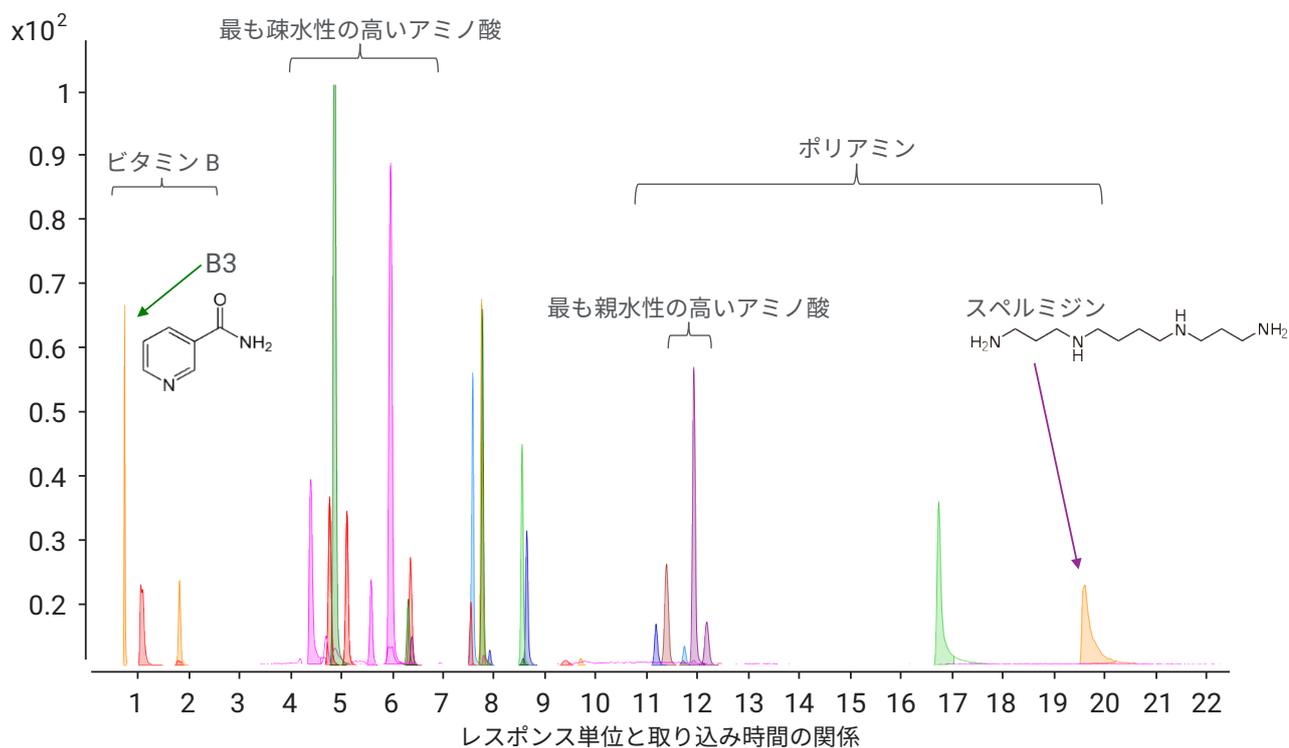


図 3. AdvanceBio MS スペントメディアカラムと TOF 検出を使用した、アミノ酸、ビタミン B、およびポリアミンのサンプル分離⁸

標準品、カラム、消耗品などの情報

すべての商品は、通常のアジレント営業所や販売店から注文できます。

説明	部品番号
List 1 : AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA) カラム	
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)、3.0 x 100 mm、LC カラム	695975-322
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)、4.6 x 100 mm、2.7 μm LC カラム	655950-802
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)、3.0 x 5 mm、ガードカラム、3 個	823750-946
AdvanceBio アミノ酸分析 (AAA)、4.6 x 5 mm、ガードカラム、3 個	820750-931
List 2 : AdvanceBio MS スペントメディア分析カラム	
AdvanceBio MS スペントメディア 100 Å、2.1 x 50 mm、2.7 μm	679775-901
AdvanceBio MS スペントメディア 100 Å、2.1 x 100 mm、2.7 μm	675775-901
AdvanceBio MS スペントメディア、100 Å、2.1 x 150 mm、2.7 μm	673775-901
List 3 : AdvanceBio AAA 試薬および標準溶液	
AdvanceBio アミノ酸試薬キット (1 ~ 250 pmol/μL)	5190-9426
ホウ酸塩バッファ 100 mL	5061-3339
FMOC 試薬、2.5 mg/mL、アセトニトリル中、10 x 1 mL	5061-3337
ジチオジプロプリオニック、5 g	5062-2479
AA 標準、1 nmol/μL、10 x 1 mL	5061-3330
AA 標準、250 pmol/μL、10 x 1 mL	5061-3331
AA 標準、100 pmol/μL、10 x 1 mL	5061-3332
AA 標準、25 pmol/μL、10 x 1 mL	5061-3333
AA 標準、10 pmol/μL、10 x 1 mL	5061-3334
アミノ酸消耗品キット	5062-2478
List 4 : HPLC 消耗品	
Agilent InfinityLab クイックコネクティングアセンブリ (カラム注入口での接続用)	5067-5965
Agilent InfinityLab クイックコネクティングキャピラリー MP35N 0.12 x 105 mm (バイオイナート、クイックコネクティング用) ※別途クイックコネクティングが必要	5500-1578
Agilent InfinityLab クイックコネクティングキャピラリー SS 0.12 x 105 mm (クイックコネクティング用) ※別途クイックコネクティングが必要	5500-1173
Agilent InfinityLab クイックターンフィッティング (カラム出口での接続用) ※別途クイックコネクティングが必要	5067-5966
Agilent InfinityLab クイックターンキャピラリー MP35N 0.12 x 280 mm (クイックターンフィッティング用) ※別途クイックコネクティングが必要	5500-1596
Agilent InfinityLab クイックターンキャピラリー SS 0.12 x 280 mm (クイックターンフィッティング用) ※別途クイックコネクティングが必要	5500-1230
クイックターンフィッティング用取り付けツール	5043-0915

説明	部品番号
List 5 : サンプル容器	
高回収率バイアル、スクリュートップ、固定インサート付き、透明、300 µL インサート容量、100 個。バイアルサイズ：12 x 32 mm (12 mm キャップ)	5188-6591
キャップ、スクリュー、青、PTFE/赤シリコンセプタム、100 個。キャップサイズ：12 mm	5182-0717
バイアル、クリンプ/スナップトップ、ポリプロピレン、250 µL、1,000 個。バイアルサイズ：12 x 32 mm (11 mm キャップ) *	5190-3155
キャップ、スナップ、透明、PTFE/シリコン/PTFE セプタム、100 個。キャップサイズ：11 mm (5190-3155 用)	5182-0566
InfinityLab ウェルプレート 96/0.5 mL、30 個	5043-9310
InfinityLab ウェルプレートクロージングマット、50 個	5042-1389
List 6 : 溶媒と添加物	
InfinityLab UltraPure LC/MS 純水、1 L	5191-4498
InfinityLab UltraPure LC/MS 用アセトニトリル、1 L	5191-4496
ギ酸、5 mL	G2453-85060
InfinityLab ピークシャープナー、25 mL	5191-3940
InfinityLab ピークシャープナー、50 mL	5191-4506
List 7 : 溶媒ろ過	
InfinityLab 溶媒ろ過アセンブリ	5191-6776
InfinityLab 溶媒ろ過フラスコ、ガラス、2 L	5191-6781
メンブレンフィルタ、ナイロン 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4341
メンブレンフィルタ、再生セルロース 47 mm、ポアサイズ 0.2 µm、100 個	5191-4340
溶媒ボトルガラスフィルタ、溶媒インレット、20 µm	5041-2168
List 8 : 溶媒処理	
InfinityLab セーフティキャップスターターキット	5043-1222
InfinityLab 溶媒ボトル、透明、1 L	9301-6524
InfinityLab 溶媒ボトル、茶色、1 L	9301-6526
溶媒ボトル、透明、2 L	9301-6342
溶媒ボトル、茶色、2 L	9301-6341
InfinityLab セーフティバージボトル ※キャップ仕様：GL45	5043-1339
InfinityLab 廃液ボトル、GL45、6 L、セーフティキャップ付き	5043-1221
タイムストリップ付き InfinityLab 活性炭フィルタ、58 g	5043-1193

参考文献：

1. Online Amino Acid Analysis for Spent Media Control
[5994-4931EN](#)
2. 親水性相互作用クロマトグラフィーのメソッド開発およびトラブルシューティング
[5994-9271JAJP](#)
3. Agilent AdvanceBio MS Spent Media Column User Guide
[820120-015](#)
4. 自動プレカラム誘導体化アミノ酸分析 分析の手引き
[5991-7694JAJP](#)
5. Determination of Amino Acid Composition of Cell Culture Media and Protein Hydrolysate Standard
[5991-7922EN](#)
6. 非誘導体化アミノ酸の LC/MS 分析によるバイオリアクタ細胞培地のモニタリング
[5991-8816JAJP](#)
7. Agilent AdvanceBio ワークフローによる細胞培地成分の分析
[5991-8817JAJP](#)
8. Analysis of Underivatized Amino Acids and Metabolites in Cell Culture Media by HILIC-LC/MS
[ASMS 2018 MP-566](#)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

DE42995938

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, November 30, 2022

5994-5515JAJP