

1260 Infinity III LC で  
同等の結果を得られます

## Agilent オンライン LC 用 Flownamics サンプリングデバイスの性能評価

Agilent 1260 Infinity II オンライン LC と Flownamics  
SegFlow S3 および SampleMod の組み合わせ

### 著者

Edgar Naegele, Haiko  
Herschbach  
Agilent Technologies  
Waldbronn, Germany

Scott Baldeshwiler,  
Michael Biksacky  
Flownamics  
Madison, WI, USA

### 概要

この技術概要では、Agilent 1260 Infinity II オンライン LC を Flownamics SegFlow S3 および SampleMod モジュールと組み合わせて使用し、バイオリアクタからサンプリングする方法を紹介します。配管、エレクトロニクス、ソフトウェアのセットアップについて説明し、重要な性能データをいくつか測定して考察します。この組み合わせにより、バイオリアクタからの自動サンプリングと希釈を無人で行い、生物学的反応を継続的にモニタリングすることが可能になります。

## はじめに

今日、モノクローナル抗体などの現代のバイオ医薬品は通常、バイオリアクタ内の生きた細胞によって生産されています。成長培地の生産と品質を最適化する目的では、特別なサンプリング装置を使用したバイオリアクタからの無菌条件下でのサンプリングがますます有用になってきています。サンプルを希釈して 1260 Infinity II オンライン LC に移すことで、予想される生産物を測定することができます。

本技術概要では、Agilent 1260 Infinity II オンライン LC と Flownamics SegFlow S3 および SampleMod モジュールを組み合わせて、バイオリアクタのサンプリングを自動化する方法について説明します。配管、エレクトロニクス、ソフトウェアのセットアップについて示します。希釈精度、直線性、リアクタ間キャリアオーバーなどの重要な性能データを測定し考察します。

## 実験

本検討で使用する機器を表 1 に、メソッドパラメータの概要を表 2 および 3 に示します。

表 1. 装置構成

製品タイプ	アジレント製品名
装置	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)</li> <li>- Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャセット (G3167AA) :</li> <li>- Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ (G3167A) Agilent 1290 Infinity パルプドライブ (G1170A) の外部バルブ (部品番号 5067-6680) でクラスタ化、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア</li> <li>- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)</li> <li>- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)、Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル (10 mm、部品番号 G4212-60008) 付属</li> </ul>
追加のハードウェア	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flownamics SegFlowS3 : プロセス分析装置への統合のための自動サンブラ*</li> <li>- Flownamics Sample-Mod S3 : サンプルの事前希釈と分析装置への分配用*</li> </ul>
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、3.0 × 50 mm、1.8 μm (部品番号 959757-302)
ソフトウェア	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agilent OpenLab CDS、バージョン 2.6 以降</li> <li>- Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア、バージョン 1.2</li> <li>- FlowWeb (制御ソフトウェア、Flownamics)</li> </ul>

\* 部品番号は Flownamics を参照してください

表 2. メソッドパラメータ

パラメータ	値
<b>分析メソッドの条件</b>	
溶媒	A) 水 + 0.1 % 酢酸 (FA) B) アセトニトリル (ACN) + 0.1 % FA
分析流量	1.0 mL/min
溶媒組成	イソクラティック 15 % B
カラム温度	45 °C
フィード速度	分析流量の 80 %
溶媒のフラッシュアウト	水:ACN 9:1 + 0.1 % FA (S2)
フラッシュアウト容量	自動
注入量	1 μL
ニードル洗浄	3 秒、水:ACN 1:1 + 0.1 % FA (S1)
ダイオードアレイ検出器	273 ± 4 nm、リファレンス：オフ、データレート 20 Hz
<b>オンライン LC モニタリングソフトウェア</b>	
サンプリングモード	ダイレクト注入 バイアルに希釈 そのままバイアルへ
吸引スピード	設定 2 - 吸引スピード：100 μL/min - 待機時間：3.6 秒
スケジュール	不要、Flownamics ソフトウェアが制御

表 3. Flownamics ソフトウェアとハードウェアの設定

Flownamics ソフトウェアの SegFlow S3 用設定	
希釈	1:1、1:2、1:5、1:10、1:20
パーズおよびサンプル量	0.5 および 4.0 mL
頻度	30 分毎
繰り返し	通常 10 回
ASR までのチューブ長さ	10 ft (3 m)
Flownamics ソフトウェアの SampleMod 用設定	
Presample Volume	0.5 mL
Sample Volume	3 mL
Flownamics ハードウェア	
SegFlowS3 および SampleMod における溶媒	SAN (消毒剤、iPrOH 20 %) DET (洗剤、水) DI (脱イオン水) DIL (希釈剤、水)

## 機器の設定

Flownamics サンプルングデバイスを介したバイオリアクタから Agilent 1260 Infinity II オンライン LC までのエレクトロニクスおよび流路接続のセットアップを図 1 に示します。オンライン LC と Flownamics SegFlow S3 は、LAN とハブで PC に接続します。Flownamics SegFlow S3、SampleMod、ASR (Aseptic Sample Regulator) はシステムとして相互接続されます。流路は、ASR から SegFlow S3、次に SampleMod、そして最後に Agilent 1260 Infinity II オンライン LC のリアクタインタフェースバルブへとつながっています。洗浄用の溶媒が、SegFlow S3 と SampleMod に接続されています。ASR と SegFlow S3 で、周囲の空気を吸い込むことができます。

## サンプリングプロセス

バイオリアクタからのサンプリングは、Flownamics In-situ Sampling Probe (FISP) で行われ、必要に応じて細胞を含まないサンプルと細胞を含むサンプルを採取できます。プローブはバイオリアクタに設置された ASR に直接接続されています。ASR は、特別に構成された滅菌チューブセットによって SegFlow S3 に接続されます。ASR は、リアクタから SegFlow S3 へのサンプル流量を制御するための複数のバルブと流量センサーで構成されています。また、SegFlow S3 から ASR への洗浄液の流量も調整します。

SegFlow S3 の流量は、内蔵のペリスタルティックポンプによって制御されます。最大 8 台の異なるリアクタ (各々 ASR 1 台と FISP 1 台) を 3 メートルまたは 7 メートルの距離で接続できます (構成済みのチューブとソフトウェアの設定によります)。サンプルは、ASR、SegFlow S3、および SampleMod の流体/空気センサーによって制御されるエアギャップによって配置されます。エアギャップは ASR で設定され、SegFlow S3 と SampleMod 間、および SampleMod と 1260 Infinity II オンライン LC 間の距離を柔軟に設定できます。この制御の下で、サンプルプラグが希釈のために Flownamics SampleMod に渡されます。

サンプルカップにサンプルを収集した後、シリンジを使用してサンプル希釈カップで適切な量を混合します。このシリンジは、サンプルプラグを 1260 Infinity II オンライン LC のリアクタインタフェースバルブに送るのにも使用されます。このシリンジを使用すると、オンライン LC インタフェースまでの圧力抵抗を克服することができます。オンライン LC インタフェースへのサンプルプラグの送達も、オンライン LC インタフェースと廃液ボトルの間にある液体/空気センサーによって制御されます。

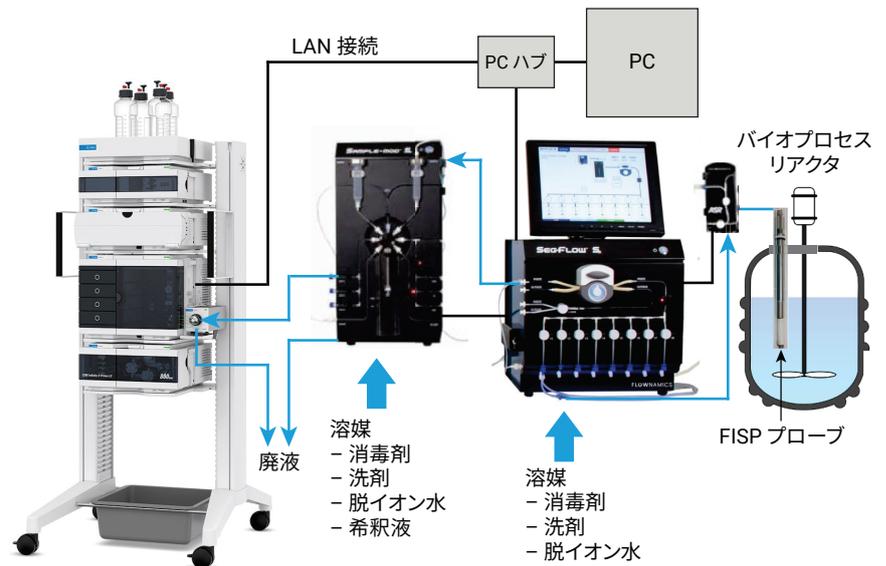


図 1. Flownamics S3 および SampleMod と組み合わせた Agilent 1260 Infinity II オンライン LC のセットアップ (黒：電気接続、青：フロー接続)

## ソフトウェアの設定

- **Agilent OpenLab CDS** : 取り込みおよびデータ解析メソッドは OpenLab CDS によって実行されます。実験が始まる前に、CDS を外部制御用に開放する必要があります。
- **Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア** : OpenLab CDS で事前に作成した取り込みメソッドとデータ解析メソッドを選択して、実験メソッドを設定します。サンプリングには、**Direct Injection (直接注入)**、**Dilution to Vial (バイアルへの希釈)**、または**Pure to Vial (そのままバイアルへ)** を選択できます。実験設定には複数のサンプリング設定を含めることはできませんが、ブランクや品質管理サンプルを含めることもできます。スケジュールには時間ベースのエントリを含めることはできません。
- **Flownamics 制御ソフトウェア** : Flownamics 制御ソフトウェアと Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア間の通信を有効にするには、Web API (アプリケーションプログラミングインターフェース) を起動する必要があります。これは、Microsoft Windows サービスを使用して実行できます。ユーザーがログインした後にアクセスする Flownamics 制御ソフトウェアのメイン画面を図 2 に示します。この画面から、目的のバイオリアクタ容器を選択すると、標準制御に移ります。これでサンプリングが開始または停止され、実験用の一般的な値を入力できるようになります (図 3A)。詳細は Settings タブ (図 3B) で入力できます。

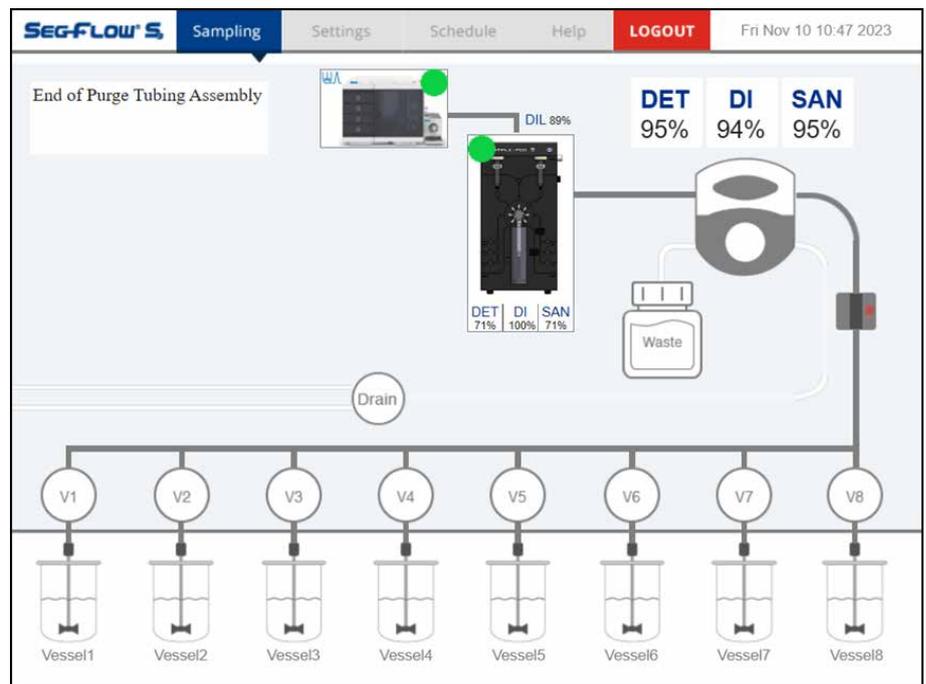


図 2. Flownamics 制御ソフトウェア FlowWeb のメイン画面。8 つの個別バイオリアクタへの制御アクセスを備えています。SegFlow S3 はペリスタルティックポンプとしてシンボリックに、SampleMod は機器の写真として示され、Agilent 1260 Infinity II オンライン LC はサンプリングインタフェースバルブを備えたオンラインサンプルマネージャとして示されています。溶媒トルの個々の充填量はパーセント値で表されます。



図 3A. 接続されている各バイオリアクタ容器にアクセスできる標準のリアクタ制御設定

Standard Status Data Settings

Agilent InfinityLab Experiment: Flownamics Test Direct Inject 01

Agilent Vial Settings

Vessel Identification

Batch ID: Batch2

Vessel ID: Vessel2

Agilent InfinityLab Settings

Agilent InfinityLab: ON

Agilent InfinityLab Sample Prep: ON

Agilent InfinityLab Sample Stream: CellFree

Diluted Cell-Free Sample: ON

Diluted Cell-Containing Sample: ON

Dilution Output 1:X: 1:20

Tubing Settings

Tubing Assembly (ft): 10

図 3B. 使用されている各バイオリアクタの詳細な設定。接続されている Agilent オンライン Monitoring Software と Agilent オンライン LC の条件を指定します。

オンラインモニタリングソフトウェアで設定されるサンプル設定は、**Agilent InfinityLab Experiment** として選択可能です。**Direct Inject** 設定を選択した場合、Agilent Vial Settings でバイアル位置に関する情報は必要ありません。**Dilute to Vial** または **Pure to Vial** 設定を選択した場合は、サンプリング用のバイアル位置を JavaScript Object Notation (JSON) 形式でここに入力する必要があります (付録を参照)。バイアルまたは QC サンプルから追加のブランク注入を行う場合は、JSON スクリプトを変更できます (付録を参照)。Agilent オンライン LC を含めるには、適切な Agilent InfinityLab 設定を選択する必要があります。

InfinityLab 設定では、希釈率を設定できます (希釈率 1:1 は、希釈されていないサンプルが Agilent オンライン LC に送られることを意味します)。図 3B では、ASR と SegFlow S3 間のチューブの長さが 10 フィート (3 m) に設定されています。

**Sample Mod** を選択すると、Agilent InfinityLab Presample Volume と Agilent InfinityLab Sample Volume の設定が有効になり、最終的に Agilent オンライン LC インタフェースバルブに送られるサンプル量が定義されます。

### サンプル

カフェイン：1 および 15 g/L, 水溶液

### 溶媒と試薬

- すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。
- 試薬はドイツの VWR 社から購入しました。
- 超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22  $\mu\text{m}$  メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を装着した Milli-Q Integral システムで精製しました。

## 結果と考察

Flownamics SegFlow S3 と Flownamics SampleMod を Agilent Infinity II オンライン LC と組み合わせて性能評価を行うにあたって、3つの性能パラメータを確認しました。ピーク面積精度を、オンラインモニタリングソフトウェアで利用可能なさまざまな希釈モードとサンプリングモードに対して測定しました。Flownamics SampleMod を使用した希釈については、直線性を測定しました。最後に、1つのリアクタのサンプリングから別のリアクタへのキャリーオーバーを測定しました。

SampleMod を使用して希釈のピーク面積精度を求め、その後オンライン LC から直接注入するために、希釈係数 1 (希釈なし)、2、5、10、および 20 を適用しました。リアクタサンプル (1 g/L カフェイン溶液) を SampleMod のサンプリングカップに移し、それぞれの量の希釈溶液と混合しました。得られた希釈反応溶液をオンライン LC インタフェースバルブに移し、直接注入しました。ピーク面積精度は、それぞれ 10 回の繰り返し測定で得られた相対標準偏差 (RSD) として表され、代表的な値は 0.4 ~ 0.8 % でした (図4、青いバー)。

SampleMod では希釈係数が 20 を超える希釈はできませんが、オンライン LC からは直接行うことができます。このアプリケーションでは、希釈されていないリアクタサンプルを SampleMod によってオンライン LC インタフェースバルブに直接渡すことができます。

希釈はオンライン LC サンプルマネージャ内で完全に行われ、その後注入が行われました。典型的なピーク面積精度は 0.4 ~ 0.7 % RSD でした (図4、オレンジ色のバー)。10 倍未満の希釈は SampleMod で行うことが推奨されます。希釈率が低いほど精度の高い値が得られるためです。より低い希釈率のサンプルを保持するために、オンライン LC の「Pure to Vial」サンプリング機能もテストしました。この場合、SampleMod で希釈されたサンプルはオンラインサンプルマネージャのバイアルに収集され、その後注入されました。精度は概して 0.4 ~ 1.0 % RSD でした (図4、灰色のバー)。

SampleMod を使用した希釈直線性の測定のために、希釈係数 1、2、5、10、20 で得られたピーク面積を、各希釈度の計算濃度に対してプロットしました (図5)。 $R^2$  は 0.9992 であり、検討を行った SampleMod 希釈範囲で得られた直線性は優れたものでした。

得られた面積精度と直線性の値は、オンライン LC サンプルマネージャで以前に測定された値と一致しました。<sup>1</sup>

ここで議論した面積精度 (図4) は再現性に関する性能を説明するものですが、精度は説明しません。精度は、測定値が期待値にどれだけ近いかを表します。精度の測定には、カフェイン溶液 (1.0 g/L 水溶液) を使用しました。期待値は、一連の手作りの希釈液 (希釈なし、1:2、1:5、1:10、および 1:20) から測定され、10 回の注入を行いました。

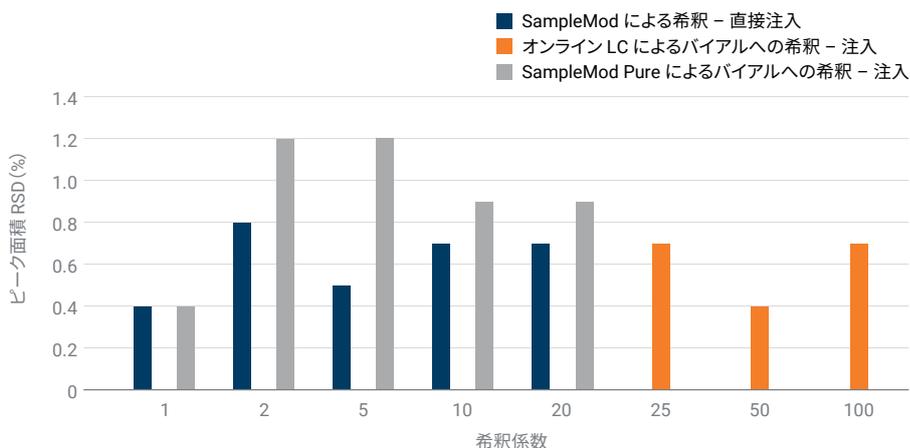


図4. SampleMod による希釈後に得られたピーク面積の RSD 値 (n = 10)。直接注入 (青)、オンライン LC によるバイアルへの希釈後に注入 (オレンジ)、および SampleMod によるオンライン LC Pure での希釈後にバイアルサンプリングしてから注入 (灰色)

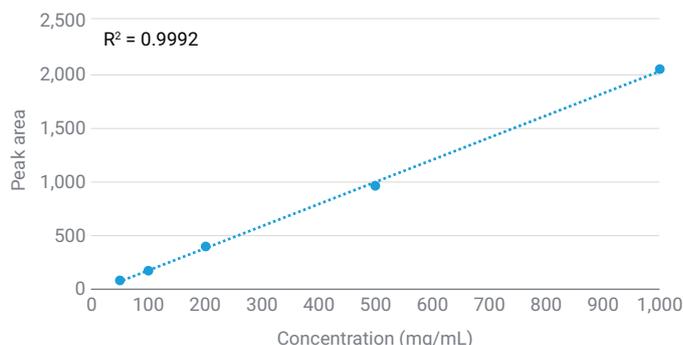


図5. SampleMod を使用して希釈係数 1、2、5、10、20 で混合することにより得られた希釈度の直線性

SampleMod を接続した Flownamics S3 を使用して、同一の希釈系列を測定しました。SampleMod は、希釈系列の調製にステップモーター駆動のシリンジを使用しますが、この操作はデフォルト値で行いました。希釈されていないカフェイン溶液をオンライン LC のサンプリングインタフェースバルブに送った場合、LC のサンプルバイアルから直接注入したときのピーク面積と比較して、91 % の精度が測定されました。その他の希釈度では 81 ~ 88 % の精度となりました (図 6)。これらの値は、シリンジのモーターステップの値を変更し、希釈液の量を増減することで最適化できます。

Flownamics S3 モジュールは、最大 8 台のリアクタを接続して取り扱うことができます。これらのリアクタは、S3 モジュールから SampleMod、そこからオンライン LC インタフェースバルブまで同じ流路を使用するため、1 つのリアクタの内容物の分析から次のリアクタの分析へのキャリアオーバーが生じる可能性があります。Flownamics サンプリングデバイスのキャリアオーバーをテストするために、2 番目の ASR を S3 モジュールに接続しました。第 1 の反応容器には高濃度カフェイン溶液 (15 g/L) を入れ、2 番目のリアクタ容器には純粋な脱イオン水を入れました。高濃度カフェイン溶液が入った容器から 3 回のサンプリングサイクルを実施しました。これらのサンプルは SampleMod で 1:20 に希釈され、オンライン LC インタフェースバルブに送られました。キャリアオーバーを計算するには、ピーク面積検出に適用されるダイオードアレイ検出器の線形範囲内に希釈が入らなければなりません。次のサンプルサイクルは、純水が入った 2 番目の容器から実施しました。この例では、0.44 % のキャリアオーバーが測定されました (図 7)。一方、異なるバイアル間の注入におけるオンライン LC サンプルマネージャの典型的なキャリアオーバーは 30 ppm 未満です。<sup>2</sup>

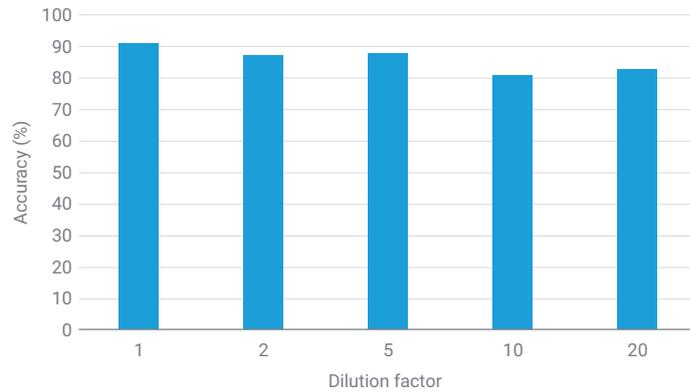


図 6. シリンジステップモーターのデフォルト条件を適用し、Flownamics SampleMod を使用して実施した希釈の精度

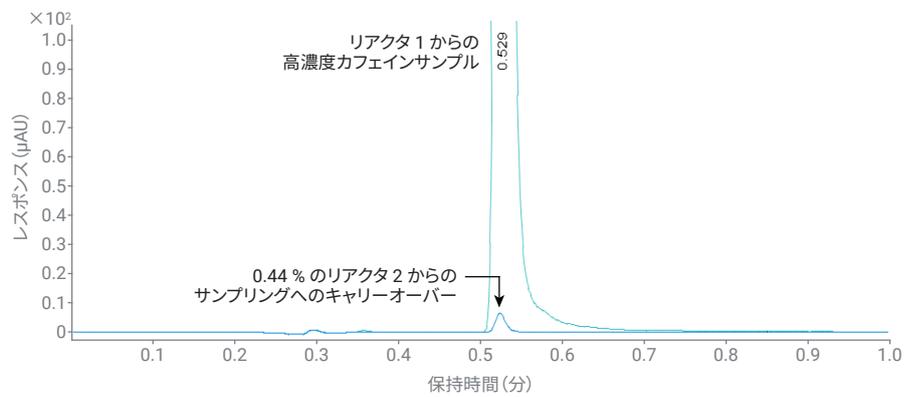


図 7. リアクタ 1 の内容物からリアクタ 2 の内容物の分析へのキャリアオーバーの測定

## 結論

本技術概要では、Agilent 1260 Infinity II オンライン LC と Flownamics S3 および SampleMod モジュールを用いて、バイオリアクタのサンプリングを行う設定について説明しました。設定全体について、希釈ありと希釈なし（さまざまなサンプリングモードとの組み合わせ）のピーク面積精度、精度、希釈直線性、キャリアオーバーなどの最も重要な性能パラメータを測定しました。得られた値は、適用された設定に対して予想されたとおり、すべて良好な範囲内でした。

## 参考文献

1. Herschbach, H.; Kutscher, D.; Naegle, E.; Ortmann, T.; Wouters, S. Reactor Sample Dilution and Mixing Performance of the Agilent 1260 Infinity II Online Sample Manager. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-3679EN, **2021**.
2. Herschbach, H.; Kutscher, D.; Naegle, E.; Ortmann, T.; Spuling, I.; Wouters, S. Performance Characteristics of the Agilent 1260 Infinity II Online Sample Manager. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-3529EN, **2021**.

## 付録

Agilent Vial Settings の JavaScript オブジェクト構文に基づいて、構造化データを表す標準テキストベースの形式である JSON フォーマットの例。これらのテキストファイルは、選択したバイアル位置をオンラインモニタリングソフトウェア から .txt ファイルにエクスポートすることによって生成できます。

### 例 1

Diluted to Vial メソッドのフォーマット。位置は引き出し 1、背面、ウェル B1 から B10 です。

```
{
  "Locations": [
    {
      "Name": "DilutedToVialSetting 01",
      "SourceLocation": "",
      "TargetLocations": [
        "D1B-B1",
        "D1B-B2",
        "D1B-B3",
        "D1B-B4",
        "D1B-B5",
        "D1B-B6",
        "D1B-B7",
        "D1B-B8",
        "D1B-B9",
        "D1B-B10"
      ]
    }
  ]
}
```

### 例 2

Diluted to Vial メソッドのフォーマット。場所は引き出し 1、背面、ウェル B1 ~ B10 で、ブランク注入用のバイアルが位置 1 にあります。

```
{
  "Locations": [
    {
      "Name": "BlankSampleSetting 01",
      "SourceLocation": "1"
    },
    {
      "Name": "DilutedToVialSetting 01",
      "SourceLocation": "",
      "TargetLocations": [
        "D1B-B1",
        "D1B-B2",
        "D1B-B3",
        "D1B-B4",
        "D1B-B5",
        "D1B-B6",
        "D1B-B7",
        "D1B-B8",
        "D1B-B9",
        "D1B-B10"
      ]
    }
  ]
}
```

### 例 3

Diluted to Vial メソッドのフォーマット。位置は引き出し 1、前面、ウェル B1 から B10 です。また、位置 1 にはブランク注入用のバイアルがあり、位置 2 には QC 用のバイアルがあります。

```
“Locations”:[  
  {  
    “Name” : “BlankSampleSetting 01” ,  
    “SourceLocation” : “1”  
  },  
  {  
    “Name” : “PureToVialSetting 01” ,  
    “TargetLocations” : [  
      “D1F-B1” ,  
      “D1F-B2” ,  
      “D1F-B3” ,  
      “D1F-B4” ,  
      “D1F-B5” ,  
      “D1F-B6” ,  
      “D1F-B7” ,  
      “D1F-B8” ,  
      “D1F-B9” ,  
      “D1F-B10”  
    ]  
  },  
  {  
    “Name” : “QCSampleSetting 01” ,  
    “SourceLocation” : “2”  
  }  
]
```

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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。

DE50146389

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, October 15, 2024

5994-7394JAJP