

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

著者

Jordy Hsiao, Te-Wei Chu,
Andrew Kennedy, Adam Bivens,
and Anne Blackwell

概要

このアプリケーションノートでは、細胞培養培地におけるアミノ酸の LC/MS 分析のためのソリューションについて説明します。極性があるアミノ酸では逆相液体クロマトグラフィーによる分析が困難です。そのため、多くの場合、誘導体化を用いてリテンションを向上させます。しかし、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) は従来の逆相液体クロマトグラフィーと同様のワークフローを維持しながら、誘導体化していない複雑なアミノ酸混合物を保持し、分離することができます。HILIC と質量分析を組み合わせることで、非誘導体化アミノ酸の分析における非常にシンプルで強力なソリューションとなります。

はじめに

バイオリアクタや発酵槽に存在するさまざまな極性化合物のモニタリングには、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を適用するのが理想です。高 pH 条件下でネガティブモードの LC/MS 検出を用いることにより、1 回の分析でアミノ酸、原料、廃棄物をモニタリングすることができます。Agilent AdvanceBio MS Spent Media のケミストリは高 pH で安定性を示すため、混合物を分離するのに最適です。

分析困難なマトリックスであっても、注入間の再現性は優れていました。ホローファイバーおよび回転式バイアルリアクターの試験から、培養細胞によるグルコースおよびアミノ酸の消費と乳酸の分泌が明らかになりました。

分析方法

試薬および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。超 LC/MS グレードのアセトニトリルは J.T. Baker (センターバレー、ペンシルベニア州、米国) から購入しました。水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用して純水化しました。試薬グレードのギ酸 (FA、部品番号 G2453-85060) は Agilent Technologies から入手しました。ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、水酸化アンモニウムおよびアミノ酸標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。DMEM 培地は Thermo Scientific (ウォルサム、マサチューセッツ州、米国) から購入しました。アミノ酸は使用日まで -70 °C で保管しました。

装置と材料

- Agilent InfinityLab フィッティング
 - カラム前部:**Agilent クイックコネク (部品番号 5067-5965)
 - カラム後部:**Agilent クイックターン (部品番号 5067-5966)
- アジレントのバイアル、スクリュートップ、茶色、ラベル付、認定、2 mL、100 個 (部品番号 5182-0716)
- アジレントの圧着スクリュューキャップ、PTFE/赤シリコンセパタム (部品番号 5190-7024)
- アジレントのバイアルインサート、250 µL、不活性化ガラス、樹脂足付 (部品番号 5181-8872)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- 超遠心機 (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- HDPE 溶媒ボトル (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- 回転式バイアルバイオリアクタ (Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国)
- ホローファイバーバイオリアクタ (FiberCell Systems、ニューマーケット、メリーランド州、米国)

装置構成

- Agilent 1290 Infinity II バイナリポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity LC シリーズ用超低分散キット (5067-5189)
- Agilent 6545 四重極飛行時間型 (Q-TOF) 質量分析システム
- Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース

ソフトウェア

Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア B.08.00

サンプル前処理

細胞培地サンプルを 50 % ACN で 1:4 に希釈し、10,000 x g で 10 分間遠心分離しました。上澄みを採取し、さらなるサンプル前処理を行わずに注入しました。

移動相

100 mM 酢酸アンモニウム原液を水で作成し、水酸化アンモニウムで pH 9 に調整しました。移動相 A は原液を水で 9:1 に希釈して作成しました。移動相 B は原液を ACN で 9:1 に希釈して作成しました。両移動相中の酢酸アンモニウムの最終濃度は 10 mM でした。

移動相はガラス容器に長期曝露されると、MS 検出を妨げ、抑制するイオン種を取り込むことがわかりました。移動相をガラス容器に保管する場合は定期的に交換するか、HDPE ボトルに移す必要があります。

機器条件

HPLC 条件																	
カラム	Agilent AdvanceBio MS Spent Media、 2.1 × 150 mm (部品番号 673775-901)																
移動相 A	10 % (100 mM 酢酸アンモニウム水溶液、pH = 9) / 90 % 水																
移動相 B	10 % (100 mM 酢酸アンモニウム水溶液、pH = 9) / 90 % アセトニトリル																
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>90</td></tr> <tr><td>2</td><td>90</td></tr> <tr><td>12</td><td>40</td></tr> <tr><td>13</td><td>20</td></tr> <tr><td>16</td><td>20</td></tr> <tr><td>17</td><td>90</td></tr> <tr><td>25</td><td>90</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	0	90	2	90	12	40	13	20	16	20	17	90	25	90
時間 (分)	% B																
0	90																
2	90																
12	40																
13	20																
16	20																
17	90																
25	90																
流量	0.25 mL/min																
カラム温度	30 °C																
注入量	1 µL																
総分析時間	25 分																
MS 条件																	
イオン化モード	ESI ネガティブ																
ガス温度	200 °C																
ガス流量	10 L/min																
ネブライザ	40 psi																
ソースガス温度	300 °C																
ソースガス流量	12 L/min																
キャピラリー電圧	3,000 V																
ノズル電圧	0 V																
フラグメンタ電圧	125 V																
スキマー電圧	65 V																
Oct RF Vpp	750 V																
取り込みパラメータ	2 GHz 拡張ダイナミックレンジでデータを取り込み MS 質量範囲 50 ~ 1,000 m/z																

バイオリアクタ条件

パラメータ	設定
バイオリアクタの設定	回転式バイアルバイオリアクタ ホローファイバーバイオリアクタ
細胞株	チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞
培地	DMEM 増殖培地
温度	30 °C

表 1. 細胞培地マトリックス (DMEM 増殖培地) の組成

成分	濃度 (mg/L)
グリシン	30.0
L-アルギニン塩酸塩	84.0
L-シスチン二塩酸塩	63.0
L-グルタミン	584.0
L-ヒスチジン塩酸塩-水和物	42.0
L-イソロイシン	105.0
L-ロイシン	105.0
L-リジン塩酸塩	146.0
L-メチオニン	30.0
L-フェニルアラニン	66.0
L-セリン	42.0
L-トレオニン	95.0
L-トリプトファン	16.0
L-チロシン二ナトリウム二水和物	104.0
L-バリン	94.0
塩化コリン	4.0
D-パントテン酸カルシウム	4.0
葉酸	4.0
ナイアシンアミド	4.0
ピリドキシン塩酸塩	4.0
リボフラビン	0.4
チアミン塩酸塩	4.0
ト-イノシトール	7.2
塩化カルシウム (CaCl ₂) (無水)	200.0
硝酸第二鉄 (Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O)	0.1
硫酸マグネシウム (MgSO ₄) (無水)	97.67
塩化カリウム (KCl)	400.0
重炭酸ナトリウム (NaHCO ₃)	3,700.0
塩化ナトリウム (NaCl)	6,400.0
一塩基性リン酸ナトリウム (NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	125.0
D-グルコース (デキストロース)	4,500.0
フェノールレッド	15.0
ビルビン酸ナトリウム	110.0

結果

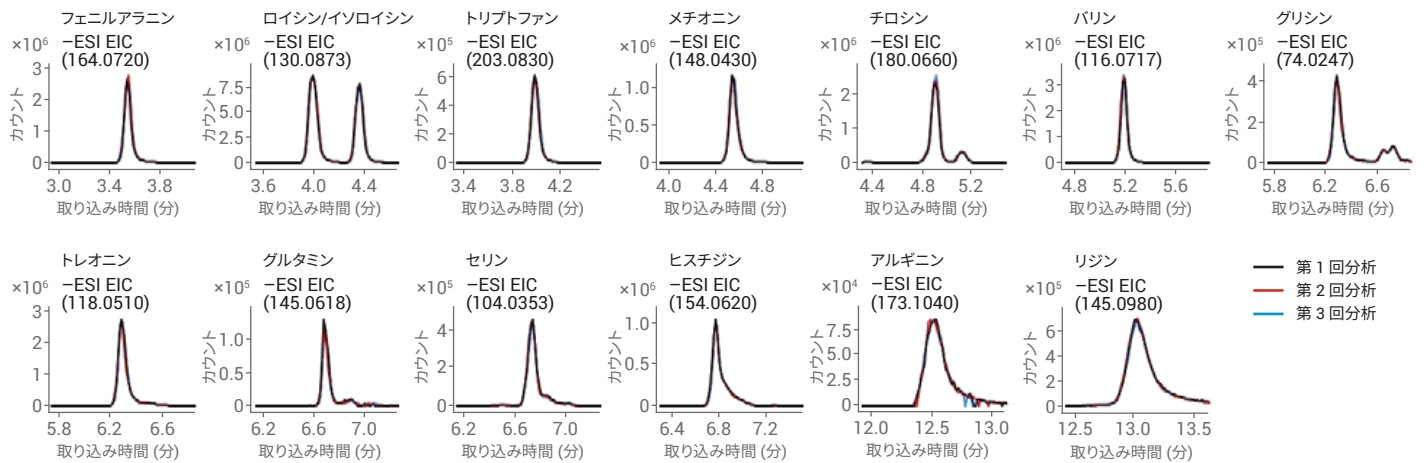


図 1. 再現性試験

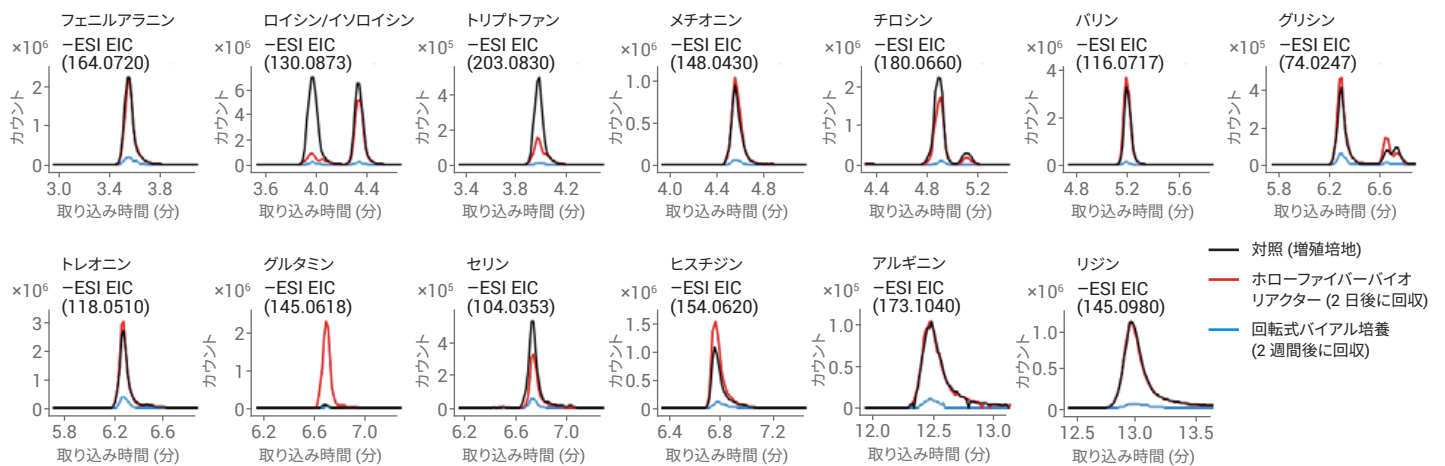


図 2. アミノ酸の消費を示した細胞培地の分析。ホローファイバーバイオリアクターでは増殖培地に 6 mM グルタミンを添加しました。そのため、ホローファイバーバイオリアクターにおけるグルタミンのレベルが対照増殖培地や栄養素が枯渇した回転式バイアルバイオリアクターより高くなりました。

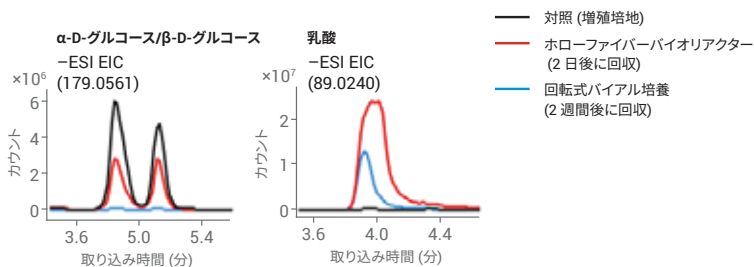


図 3. グルコースフィードの消費と乳酸の分泌を示した細胞培地の分析

表 2. 各成分の細胞培地リテンションタイムおよび主なイオン

モニタリングした成分	リテンションタイム (分)	プリカーサイオン (m/z)
フェニルアラニン	3.55	164.072
乳酸	3.95	89.024
ロイシン	3.98	130.087
トリプトファン	3.98	203.083
イソロイシン	4.35	130.087
メチオニン	4.53	148.043
D-グルコース (α)	4.87	179.056
チロシン	4.91	180.066
D-グルコース (β)	5.13	179.056
バリン	5.19	116.071
グリシン	6.28	74.0247
トレオニン	6.29	118.051
グルタミン	6.67	145.06
セリン	6.73	104.03
ヒスチジン	6.75	154.062
アルギニン	12.53	173.104
リジン	13.01	145.098

結論

使用済みの培地におけるアミノ酸をネガティブイオンモードで HILIC-MS によって分析することに成功しました。通常は分析困難なロイシン/イソロイシン同重体が 1.6 の分解能でベースライン分離されました。アミノ酸は両性イオンであるため、ポジティブイオンモードでもネガティブイオンモードでも容易にイオン化しますが、高 pH のネガティブモードによって細胞培地、原料、細胞廃棄物を同時にモニタリングすることが可能になりました。

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おりません。
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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2018
Printed in Japan, January 29, 2018
5991-8816JAJP

