

액체 크로마토그래피를 이용한 바이오제약 분야에서의 세포 배양 배지 분석



공정 이해와 제어는 일관된 바이오의약품 제품의 생산에 필수적이며, 그 공정의 중요한 측면은 세포에 이용 가능한 영양소 및 대사체를 포함한 세포 배양 조건입니다. 세포 배양 배지의 구성은 제품 생산량과 바이오의약품을 생산하는 데 사용되는 세포의 건강 및 생존에 기초가 됩니다. 세포 배양 배지용 첨가물은 당화 패턴과 같은 바이오의약품의 중요한 특성에도 영향을 미칠 수 있습니다.

신속한 의사 결정을 위해 바이오리액터에서 직접 온라인 모니터링에 대한 요구가 증가함에 따라 분석 속도는 보통 아미노산 분석에 필수적입니다.¹ 재현성, 견고성 및 컬럼 수명 또한 아미노산 분석에서 직면한 일반적인 문제이며 애질런트는 이러한 문제를 다양한 방식으로 해결할 수 있는 두 가지 솔루션을 제공합니다.

AdvanceBio 아미노산 분석 컬럼 및 시약 키트는 매우 신뢰할 수 있고 재현성 있는 결과를 제공합니다. 아미노산 유도체화는 LC의 자동 시료 주입기에서 완전히 자동화되어 수동 시료 전처리의 변동성뿐만 아니라 시료 분해를 초래할 수 있는 전처리와 분석 사이의 지연을 모두 없앨 수 있습니다. 역상 컬럼에 아미노산을 효과적으로 머무르게 하고 UV 또는 형광을 통해 아미노산을 검출하기 위해서는 유도체화가 필요합니다. AdvanceBio 아미노산 분석 컬럼은 아미노산 분리에 선호되는 높은 pH에서 이를 보호하기 위해 특별히 처리된 역상 컬럼으로 수명이 긴 견고한 컬럼입니다.

애질런트의 두 번째 아미노산 분리 솔루션인 AdvanceBio MS Spent Media 컬럼은 질량 분석(MS) 검출과 함께 사용하는 HILIC 분리입니다. 머무름에 대한 이러한 대체 접근법은 유도체화를 불필요하게 만들고 단일 분석법으로 보다 포괄적인 세포 배양 분석을 가능하게 합니다. 시료는 바이오리액터에서 추출할 수 있으며 짧은 원심분리 후 신속하게 분석하여 세포 파편을 침전시킬 수 있습니다. HILIC 분석법 개발은 특유의 난점을 가지고 있지만 아래 설명된 모범 관행을 따름으로써 견고하고 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 수 있습니다.

Spent Media 분석을 위한 워크플로 선택은 분석 요구 사항과 경우에 따라 선호도에 따라 달라집니다.

- **MS 검출이 가능하거나 선호되니까?**
그렇다면 HILIC-MS는 다양한 분석물질을 모니터링할 수 있습니다. UV 또는 형광 검출만 가능한 경우 아미노산 분석을 위한 역상 분석법이 권장됩니다
- **아미노산만 모니터링해야 하니까, 아니면 다른 세포 배양 배지 구성을 모니터링해야 하니까?**
비타민 B, 당, 뉴클레오타이드, 폴리아민 또는 젖산과 같은 다른 영양소 또는 세포 폐기물을 모니터링해야 하는 경우, 해당 대사체를 아미노산과 동시에 측정하는 HILIC-MS를 사용하여 다중 분석을 개발하는 것이 더 효율적일 수 있습니다. 아미노산 분석만 필요한 경우 유도체화된 아미노산을 이용한 역상 LC/UV 분석법이 사용자의 요구를 충족할 것입니다
- **아미노산을 유도체화하는 것을 선호하나요, 아니면 유도체화하지 않는 것을 선호하나요?** 다른 상황을 제외하고 시료가 유도체화하는 역상 LC/UV 또는 LC/FLD 또는 유도체화하지 않는 HILIC-MS 중에서 선택할 수 있는 기준이 될 수 있습니다

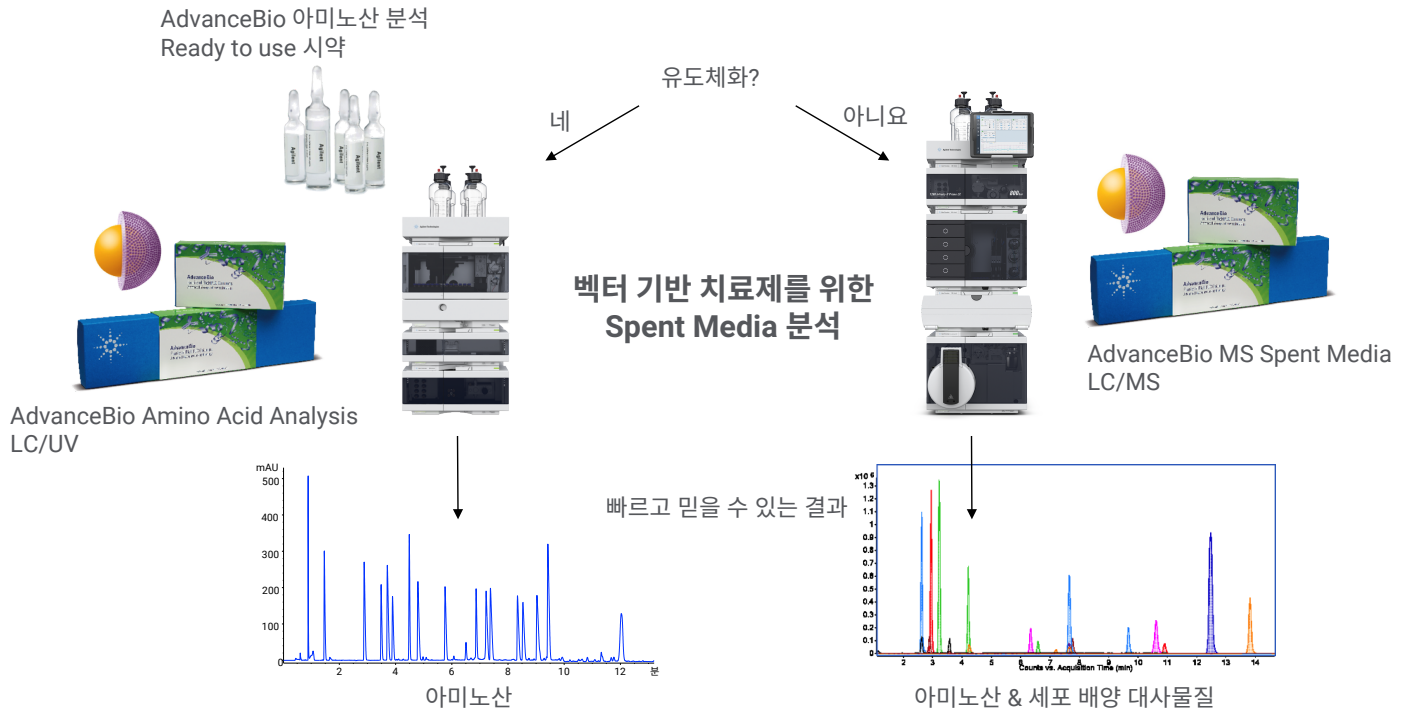


그림 1. Spent Media 워크플로 선택은 모니터링해야 하는 분석물, 시료 유도체화에 대한 선호도 및 사용 가능한 검출기 옵션에 따라 달라집니다.

효과적인 아미노산 분석을 위한 모범 관행

시료 전처리

- 원심분리 시료를 사용하여 바이오리액터 시료에서 미립자 물질을 침전시킵니다
- 라벨링된 아미노산의 경우 유도체화 시약, 봉산염 완충액 및 아미노산 표준용액을 매일 교체합니다
- HILIC 분리의 경우 최상의 크로마토그래피 피크 모양을 위해 아세토니트릴로 시료를 희석합니다. 시료 용매와 주입 부피가 크로마토그래피 피크 모양에 미치는 영향에 대한 자세한 내용은 이 [HILIC 분석법 개발 기술 개요](#)를 참조하세요²

크로마토그래피 분리 - 일반

- 유속 램핑 속도를 기본값에서 1mL/min 이하로 낮춥니다. 유속을 점진적으로 증가시키면 컬럼 수명이 연장되고 갑작스러운 과도 압력을 방지하는 데 도움이 됩니다. 애질런트 소프트웨어에서 이러한 설정은 LC 펌프 제어의 고급 섹션에서 확인할 수 있습니다
- LC 분석법의 최대 압력 한계를 컬럼과 일치하도록 설정합니다 (여기서 권장되는 모든 컬럼의 경우 600bar). 이는 LC의 최대 압력 기능이 컬럼의 압력을 초과하는 모든 경우에 있어 중요합니다

크로마토그래피 분리 - 역상

- 매주 머무름 시간 및 감응 계수를 재검량합니다
- leucine과 isoleucine 간의 분해능과 같은 몇 가지 사양을 선택하고 정기적으로 추적하여 컬럼 및 가드 컬럼의 성능을 모니터링합니다
- 자동 시료 주입기가 과도하게 마모되지 않도록 유도체화 중에는 최대 혼합 속도를 사용하지 마세요

컬럼을 이동상 A에 두지 마세요(표 1: 10mM Na₂HPO₄, 및 10mM Na₂B₄O₇, pH 8.2), 하룻밤만이라도 안됩니다! 단기 보관의 경우 항상 이동상 B에 컬럼을 보관하세요(표 1: 아세토니트릴, 메탄올, 물(45/45/10, v/v/v)). 장기 보관의 경우 컬럼을 50/50 아세토니트릴/물에 보관하세요.

크로마토그래피 분리 - HILIC

- 아미노산은 금속에 민감하지 않지만 인산염을 포함하는 분자나 폴리아민과 같은 다른 분석물질은 LC 시스템의 금속의 존재에 극도로 민감할 수 있습니다. 아미노산이 아닌 물질을 분석하려면 Bio-Inert LC를 고려하거나, 금속 튜브를 PEEK로 교체하거나 유리 용매 용기를 플라스틱으로 교체하거나 [HILIC 분석법 개발 기술 개요](#)²에 설명된 비활성 프로토콜을 따라 시료 유로에 금속이 존재하는 것을 최소화할 것을 권장합니다. AdvanceBio MS Spent Media 컬럼에는 PEEK-lined와 스테인리스 스틸 하드웨어가 있으며 이미 금속이 존재하지 않는 유로입니다
- AdvanceBio MS Spent Media [사용자 가이드](#)³ 및 아래 시료 분석법에서 설명된 대로 HILIC 이동상을 완충 원액에서 준비할 것을 권장합니다. 이는 아세토니트릴 내 염의 용해도 문제를 최소화하고 이동상 A와 B 사이 이온 강도의 일관성을 향상시킵니다
- 이동상 pH는 일관된 컬럼 케미스트리와 재현성 있는 분리를 위해 제어되어야 합니다. 선택한 완충액 시스템의 완충액 용량 (pK_a ± 1) 내 이동상 pH에서 작동하면 재현성이 향상됩니다
- 시료 매트릭스의 수용성 성분이 높을수록 피크 분할을 방지하기 위해 주입 부피가 적어야 합니다
- HILIC 컬럼은 역상 컬럼보다 주입 간 재평형화에 더 오랜 시간이 걸립니다. 적절한 재평형화는 재현성에 매우 중요합니다. 항상 >3% H₂O를 유지하여 고체 고정상에 수용액 층을 유지합니다. 더 빠른 재평형화를 위해 여전히 최소 극성 분석물질을 머무르게 하는 가장 높은 %의 수용액에서 그레디언트를 시작하는 것을 고려하세요

질량 분석

- 인산염 함유 완충액을 MS 검출과 함께 사용하지 마세요!
- MS 검출을 위해 아세트산암모늄 또는 포름산암모늄과 같은 휘발성 완충액을 선택합니다. 포름산염이 포함된 이동상을 사용할 때 포름산염을 검출할 수 없으며 마찬가지로 아세테이트도 검출할 수 없습니다
- 분석이 끝나고 관심성분의 머무름 시간 이후에는 특히 높은 유기용매 세척으로 가능하면 void volume이 용출될 때까지 LC 흐름을 waste로 전환하여 폐기시킵니다
- HPLC 등급 이상의 용매를 사용합니다
- MS 소스에 대해 정기적인 세척 작업을 마련합니다

시작하기

유도체화 아미노산의 역상 분석

자동화된 유도체화 및 LC/UV 또는 형광 분석을 통한 아미노산 분석은 이 "사용법 가이드"에 자세히 설명되어 있습니다. 이 가이드에는 표준물질 전처리, 시료 유도체화를 실행하기 위한 자동 시료 주입기 프로그래밍 및 크로마토그래피 분석법에 대한 지침이 포함되어 있습니다.

파라미터	값
컬럼	AdvanceBio Amino Acid Analysis 4.6 x 100mm 또는 3.0 x 100mm
기기	Agilent 1290 Infinity II LC 시스템
유속	4.6mm id 컬럼의 경우 1.5mL/min 3mm id 컬럼의 경우 0.62mL/min
이동상 A	10mM Na ₂ HPO ₄ 및 10mM Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 8.2
이동상 B	아세트오니트릴, 메탄올, 물(45/45/10, v/v/v)
그라디언트	시간(분) %B
	0 2
	0.35 2
	13.4 57
	13.5 100
	15.7 100
	15.8 2
	18 끝
컬럼 온도	40°C
검출기	신호 A: 338nm, 10nm bandwidth; 참조 파장 390nm, 20nm bandwidth 신호 B: 262nm, 16nm bandwidth; 참조 파장 324nm, 8nm bandwidth

표 1. AdvanceBio 아미노산 분석 컬럼을 사용하여 라벨링된 아미노산의 역상 분석을 위한 LC 분석법.

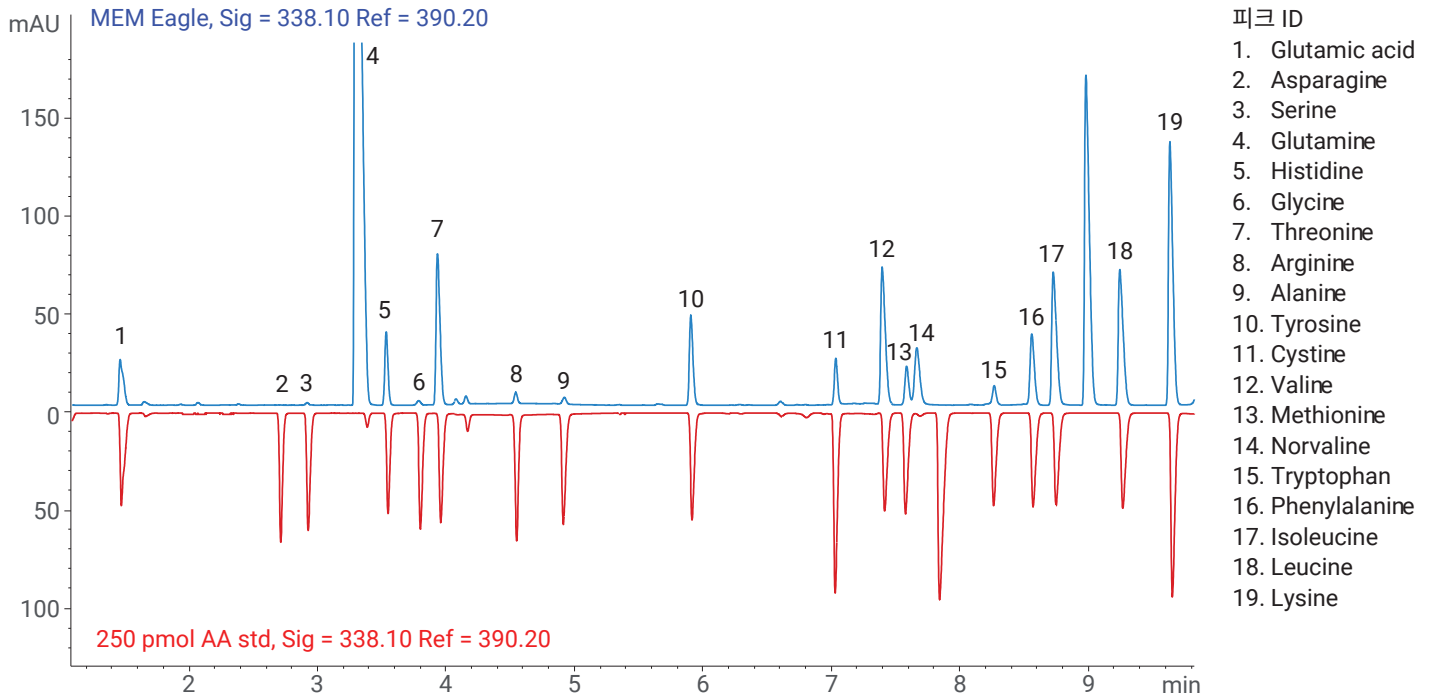


그림 2. AdvanceBio Amino Acid Analysis 컬럼을 사용하여 OPA 및 FMOC 라벨링된 아미노산의 분리 예.5

비유도체화 아미노산의 HILIC 분석

아미노산 외에도 다양한 대사체에 사용되는 시료 분석법이 아래에 나와 있습니다. 아미노산에 초점을 맞춘 시료 분석법은 이 [응용 자료](#)⁶ 또는 이 [브로셔](#)⁷를 참조하세요.

파라미터	값														
컬럼	AdvanceBio MS Spent Media, 2.1x100mm														
기기	Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템														
유속	0.5mL/min														
이동상	낮은 pH, 양이온 모드 MS 검출: A = 10% 200mM 포름산 암모늄 수용액 pH 3, 90% 물 B = 10% 200mM 포름산 암모늄 수용액 pH 3, 90% 아세토니트릴 최종 염 농도: 20mM.														
그라디언트	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</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>	시간(분)	%B	0	100	10	75	20	20	21	20	21.1	100	28	100
시간(분)	%B														
0	100														
10	75														
20	20														
21	20														
21.1	100														
28	100														
컬럼 온도	40°C														
검출기	Agilent 6230 TOF														

표 2. AdvanceBio MS Spent Media 컬럼을 이용한 아미노산 및 기타 세포 배양 배지 분석물질의 HILIC 분석을 위한 LC 분석법.

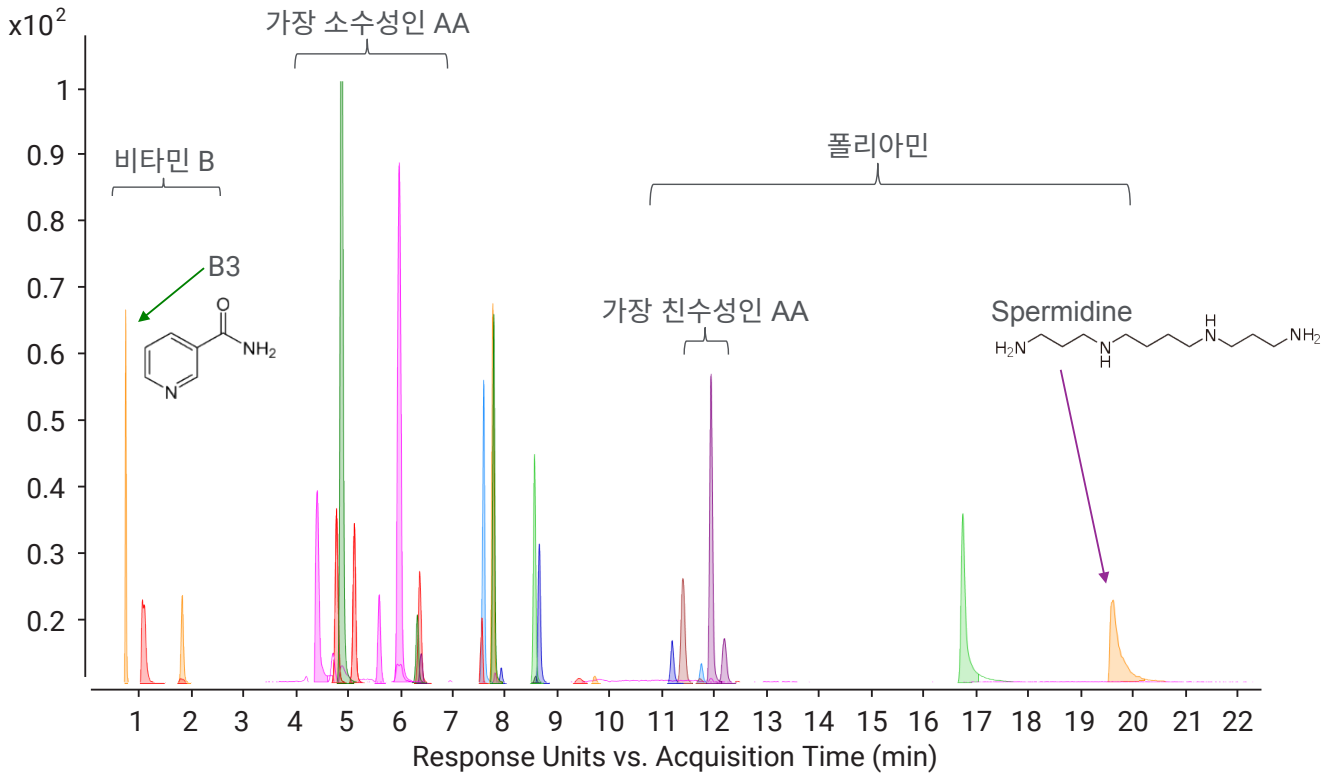


그림 3. TOF 검출과 함께 AdvanceBio MS Spent Media 컬럼을 사용하여 아미노산, 비타민 B, 폴리아민의 시료 분리.⁸

간편한 선택 및 주문 정보

애질런트 온라인 스토어에서 다음 표에 나열된 제품을 주문하려면 MyList # 헤더 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 그런 다음 필요한 제품 수량을 기입하고 장바구니에 추가하면 결제를 진행할 수 있습니다. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다.

즐거찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있는 경우 바로 로그인할 수 있습니다. 등록된 애질런트 계정이 없는 경우 등록해 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다. 모든 품목은 영업 담당자 및 대리점 채널을 통해 주문할 수도 있습니다.

설명	품번
MyList 1: Advance Bio Amino Acid Analysis(AAA) 컬럼	
AdvanceBio amino acid analysis (AAA), 3.0 x 100mm, LC column	695975-322
AdvanceBio amino acid analysis (AAA), 4.6 x 100mm, 2.7µm LC column	655950-802
AdvanceBio amino acid analysis (AAA), 3.0 x 5mm, guard column, 3/pk	823750-946
AdvanceBio amino acid analysis (AAA), 4.6 x 5mm, guard column, 3/pk	820750-931
MyList 2: AdvanceBio MS Spent Media 분석 컬럼	
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2.1 x 50mm, 2.7µm	679775-901
AdvanceBio MS Spent Media 100 Å, 2.1 x 100mm, 2.7µm	675775-901
AdvanceBio MS Spent Media, 100 Å, 2.1 x 150mm, 2.7µm	673775-901
MyList 3: AdvanceBio AAA 표준물질 및 시약	
AdvanceBio amino acid reagents kit; 1-250pmol/µL	5190-9426
Borate Buffer 100mL	5061-3339
FMOc reagent, 2.5mg/mL in acetonitrile, 10 x 1mL	5061-3337
Dithiodipropionic, 5g	5062-2479
AA standard, 1nmol/µL, 10 x 1mL	5061-3330
AA standard, 250 pmol/µL, 10 x 1mL	5061-3331
AA standard, 100 pmol/µL, 10 x 1mL	5061-3332
AA standard, 25 pmol/µL, 10 x 1mL	5061-3333
AA standard, 10 pmol/µL, 10 x 1mL	5061-3334
Amino acids supplement kit	5062-2478
MyList 4: HPLC 공급품	
Agilent InfinityLab Quick Connect Fitting assembly (컬럼 주입구 연결용)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect Capillary MP35N 0.12 x 105mm (BioInert; Quick Connect 피팅용)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Connect Capillary SS 0.12 x 105mm (Quick Connect 피팅용)	5500-1173
Agilent InfinityLab Quick Turn Fitting (컬럼 배출구 연결용)	5067-5966
Agilent InfinityLab Quick Turn Capillary MP35N 0.12 x 280mm (Quick Turn 피팅용)	5500-1596
Agilent InfinityLab Quick Turn Capillary SS 0.12 x 280mm (Quick Turn 피팅용)	5500-1230
Mounting tool for quick turn fittings	5043-0915

설명	품번
MyList 5: 시료 용기	
High recovery vial, screw top, with fixed insert, clear, 300µL insert volume, 100/pk. Vial size: 12 x 32mm (12mm cap)	5188-6591
Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septa, 100/pk. Cap size: 12mm	5182-0717
Vial, crimp/snap top, polypropylene, 250µL, 1,000/pk. Vial size: 12 x 32mm (11mm cap)*	5190-3155
Cap, snap, clear, PTFE/silicone/PTFE septa, 100/pk. Cap size: 11mm(5190-3155용)	5182-0566
InfinityLab Well-plate 96/0.5mL, 30/pk	5043-9310
InfinityLab Well-plate closing mat, 50/pk	5042-1389
MyList 6: 용매 및 첨가제	
InfinityLab Ultrapure LC/MS Water, 1L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS Acetonitrile, 1L	5191-4496
Formic acid, 5mL	G2453-85060
InfinityLab Deactivator Additive, 25mL	5191-3940
InfinityLab Deactivator Additive, 50mL	5191-4506
MyList 7: 용매 여과	
InfinityLab solvent filtration assembly	5191-6776
InfinityLab solvent filtration flask, glass, 2L	5191-6781
Filter membrane, Nylon 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4341
Filter membrane, Regenerated Cellulose 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
MyList 8: 용매 관리	
InfinityLab Stay Safe cap starter kit	5043-1222
InfinityLab solvent bottle, clear, 1L	9301-6524
InfinityLab solvent bottle, amber, 1L	9301-6526
Solvent bottle, clear, 2L	9301-6342
Solvent bottle, amber, 2L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe purging bottle	5043-1339
InfinityLab waste can, GL45, 6L with Stay Safe cap	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g	5043-1193

참고 자료:

1. Online Amino Acid Analysis for Spent Media Control
[5994-4931EN](#)
2. Hydrophilic Interaction Chromatography Method Development and Troubleshooting
[5994-9271EN](#)
3. Agilent AdvanceBio MS Spent Media Column User Guide
[820120-015](#)
4. Amino Acid Analysis, “How-to” Guide
[5991-7694EN](#)
5. Determination of Amino Acid Composition of Cell Culture Media and Protein Hydrolysate Standard
[5991-7922EN](#)
6. 바이오리액터 세포 배양 모니터링을 위한 비유도체화 아미노산의 LC/MS 분석
[5991-8816KO](#)
7. Spent Media 분석을 위한 애질런트 AdvanceBio 워크플로
[5991-8817KO](#)
8. HILIC-LC/MS를 이용한 세포 배양 배지 중 비유도체화 아미노산과 대사체 분석
[ASMS 2018 MP-566](#)

추가 정보:

www.agilent.com/chem/advancebio

국가별 애질런트 고객센터 찾기

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE42995938

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 11월 30일 한국에서 인쇄
5994-5515KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

