

Analyse von Zellkulturmedien in der Biopharmazie durch Flüssigkeitschromatographie



Das Verständnis und die Steuerung von Prozessen sind für die Herstellung eines gleichbleibenden Biotherapeutikums essenziell, und ein wichtiger Aspekt dieses Prozesses sind die Zellkulturbedingungen, darunter auch die für die Zellen verfügbaren Nährstoffe und Metaboliten. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien ist für die Produktausbeute sowie für die Gesundheit und das Überleben der zur Produktion des Biotherapeutikums eingesetzten Zellen von grundlegender Bedeutung. Darüber hinaus können Additive in den Zellkulturmedien kritische Eigenschaften des Biotherapeutikums, wie z. B. Glykosylierungsmuster, beeinflussen.

Eine schnelle Analyse ist bei der Untersuchung von Aminosäuren oft ein entscheidendes Kriterium, wobei der Wunsch nach Online-Überwachung direkt am Bioreaktor zwecks einer schnellen Entscheidungsfindung immer drängender wird.¹ Reproduzierbarkeit, Robustheit und die Lebensdauer der Säule sind bei der Aminosäureanalyse ebenfalls häufige Herausforderungen. Daher bietet Agilent zwei Lösungen an, mit denen diesen Herausforderungen auf unterschiedliche Weise begegnet werden kann.

Die AdvanceBio Amino Acid Analysis-Säule und das entsprechende Reagenzienkit ergeben äußerst zuverlässige und reproduzierbare Resultate. Die Derivatisierung von Aminosäuren im automatischen Probengeber eines LC ist voll automatisiert, sodass sowohl die Schwankungen bei der manuellen Probenvorbereitung als auch Verzögerungen zwischen Vorbereitung und Analyse, die zur Probenzersetzung führen könnten, wegfallen. Derivatisierung ist erforderlich, um Aminosäuren effektiv auf einer Umkehrphasensäule zurückhalten und über UV oder Fluoreszenz detektieren zu können. Die AdvanceBio Amino Acid Analysis-Säule ist eine Umkehrphasensäule, die einer Spezialbehandlung unterzogen wurde, um Schutz bei den hohen pH-Werten zu gewährleisten, die für die Trennung von Aminosäuren bevorzugt werden. Dies gewährleistet eine robuste Säule mit langer Lebensdauer.

Die zweite Lösung von Agilent für die Trennung von Aminosäuren, die AdvanceBio MS Spent Media-Säule, ermöglicht eine HILIC-Trennung in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) als Nachweisverfahren. Dieser alternative Ansatz bezüglich der Retention macht die Derivatisierung überflüssig und ermöglicht eine umfassendere Zellkulturanalyse mit einer einzigen Methode. Proben können aus dem Bioreaktor entnommen und nach nur kurzer Zentrifugation zur Abtrennung von Zelltrümmern rasch analysiert werden. Die Entwicklung von HILIC-Methoden hat ihre eigenen, besonderen Herausforderungen. Werden jedoch die nachstehend beschriebenen bewährten Verfahren befolgt, sind robuste und zuverlässige Ergebnisse erreichbar.

Bei der Wahl eines Arbeitsablaufs für die Analyse gebrauchter Zellkulturmedien kommt es auf eine Kombination analytischer Notwendigkeiten an, und in einigen Fällen auf Präferenzen:

- **Ist MS-Detektion möglich oder vorzuziehen?**
Wenn ja, ermöglicht HILIC-MS die Überwachung eines breiten Spektrums von Analyten. Wenn nur UV- oder Fluoreszenzdetektion möglich ist, ist eine Umkehrphasenmethode für die Aminosäureanalyse empfehlenswert.
- **Ist nur die Überwachung von Aminosäuren erforderlich oder müssen andere Komponenten von Zellkulturmedien überwacht werden?**
Wenn andere Nährstoffe oder zelluläre Abfallprodukte wie B-Vitamine, Zucker, Nukleotide, Polyamine oder Lactat überwacht werden müssen, kann es effizienter sein, einen Multiplex-Assay unter Verwendung von HILIC-MS zu entwickeln, mit dem diese Metaboliten gleichzeitig mit den Aminosäuren bestimmt werden. Ist nur eine Aminosäureanalyse erforderlich, würde eine Umkehrphasen-LC/UV-Methode mit derivatisierten Aminosäuren die Anforderungen erfüllen.
- **Werden Aminosäuren vorzugsweise derivatisiert oder nicht derivatisiert?** Liegen keine anderen Umstände vor, kann dies die Grundlage für die Wahl zwischen Umkehrphasen-LC/UV oder -LC/FLD mit Probenderivatisierung oder HILIC-MS ohne Derivatisierung sein.

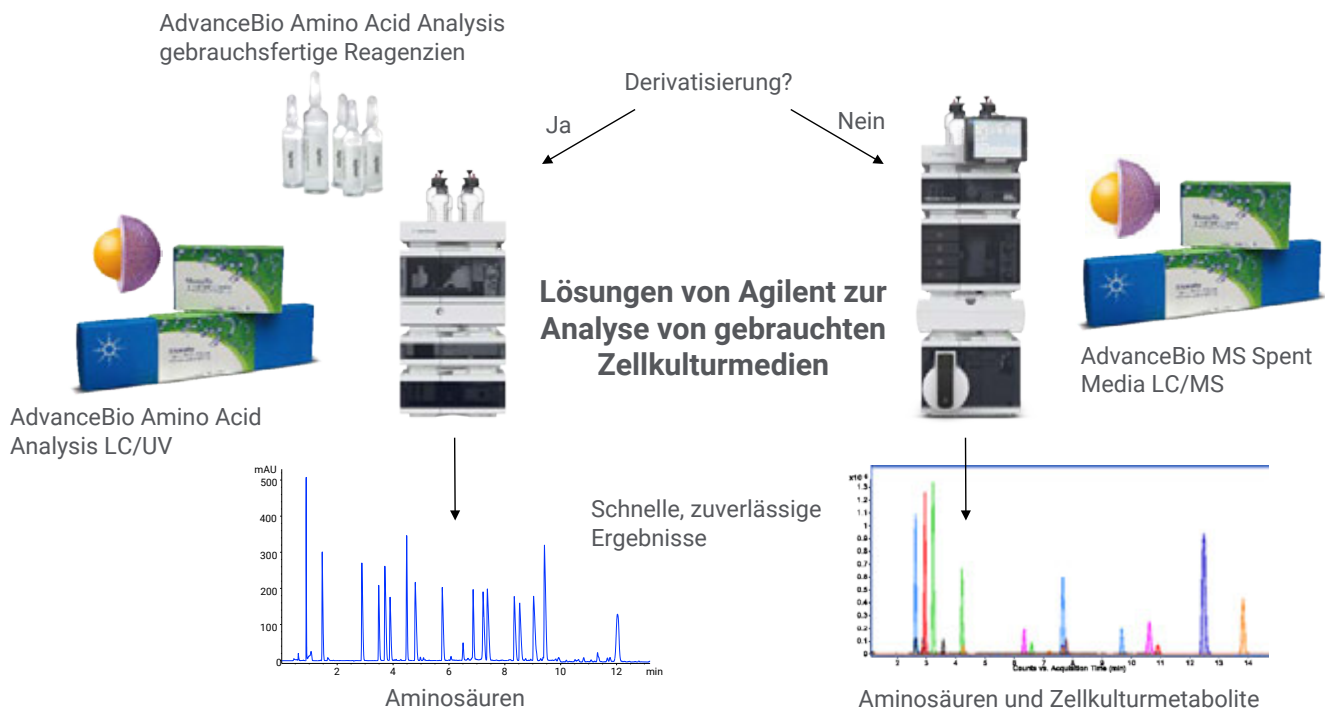


Abbildung 1: Die Auswahl eines Arbeitsablaufs für gebrauchte Medien hängt davon ab, welche Analyten überwacht werden müssen, ob Präferenzen für die Probenderivatisierung bestehen und welche Detektoroptionen verfügbar sind.

Bewährte Verfahren für eine effektive Aminosäureanalyse

Probenvorbereitung

- Zentrifugieren Sie die Proben, um Partikel aus Bioreaktor-Proben zu präzipitieren.
- Tauschen Sie bei markierten Aminosäuren das Derivatisierungsreagenz, den Boratpuffer und die Aminosäurestandards jeden Tag aus.
- Verdünnen Sie bei HILIC-Trennungen die Proben mit Acetonitril, um eine optimale Form der chromatographischen Peaks zu gewährleisten. Weitere Informationen über den Einfluss des Probenlösemittels und des Injektionsvolumens auf die Form der chromatographischen Peaks finden Sie unter [HILIC Method Development Technical Overview](#).²

Chromatographische Trennung – Allgemeines

- Verringern Sie die Anstiegsrate des Durchflusses von der Standardeinstellung auf 1 ml/min oder weniger. Der allmähliche Anstieg der Flussrate verlängert die Lebensdauer der Säule und trägt dazu bei, plötzlichen Überdruck zu vermeiden. In der Agilent Software ist diese Einstellung im Abschnitt „Advanced“ (Erweitert) der LC-Pumpensteuerung zu finden.
- Stellen Sie die maximale Druckbegrenzung in der LC-Methode so ein, dass sie der der Säule entspricht (600 bar für alle hier empfohlenen Säulen). Dies ist immer dann wichtig, wenn die maximale Druckkapazität des LC die der Säule übersteigt.

Chromatographische Trennung – Umkehrphase

- Nehmen Sie wöchentlich eine Neukalibrierung der Retentionszeiten und Response-Faktoren vor.
- Überwachen Sie die Säulen- und die Vorsäulenleistung, indem Sie einige ausgewählte Spezifikationen regelmäßig überprüfen, z. B. die Auflösung zwischen Leucin und Isoleucin.
- Verzichten Sie darauf, während der Derivatisierung die maximale Mischgeschwindigkeit zu verwenden, um einen übermäßigen Verschleiß am automatischen Probengeber zu vermeiden.

Lassen Sie keinesfalls die mobile Phase A (Tabelle 1: 10 mM Na₂HPO₄ und 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8,2) auf der Säule, nicht einmal nur über Nacht! Verwenden Sie für eine kurzzeitige Lagerung der Säule stets die mobile Phase B (Tabelle 1: Acetonitril, Methanol und Wasser (45/45/10 Gew.-%)). Für eine langfristige Lagerung der Säule verwenden Sie Acetonitril/Wasser im Verhältnis 50/50.

Chromatographische Trennung – HILIC

- Aminosäuren sind nicht empfindlich gegenüber Metall; andere Analyten, wie phosphathaltige Moleküle oder Polyamine, können jedoch extrem empfindlich auf im LC-System vorhandenes Metall reagieren. Es wird empfohlen, für die Analyse von Nicht-Aminosäuren eine bioinerte LC-Säule in Betracht zu ziehen oder das Vorhandensein von Metall im Probenflussweg auf andere Weise zu minimieren. Beispielsweise können Metallleitungen durch PEEK-Leitungen oder Lösemittelflaschen aus Glas durch Kunststoffflaschen ersetzt werden, oder es kann ein Deaktivierungsprotokoll befolgt werden, wie es in [HILIC Method Development Technical Overview](#)² angegeben ist. Die AdvanceBio MS Spent Media-Säule weist mit PEEK-ausgekleidete Edelstahl-Hardware auf und ist daher bereits ein metallfreier Flussweg.
- Es wird empfohlen, HILIC-Mobilphasen auf Vorrat aus einer Pufferlösung herzustellen, wie im AdvanceBio MS Spent Media-Säule [Benutzerhandbuch](#)³ und in der nachstehenden Beispielmethode beschrieben. Dies verringert Löslichkeitsprobleme von Salzen in Acetonitril und erhöht die Konsistenz der Ionenstärke zwischen mobiler Phase A und B.
- Der pH-Wert der mobilen Phase sollte überprüft werden, um eine konsistente Säulenchemie und damit reproduzierbare Trennungen sicherzustellen. Wenn der pH-Wert der mobilen Phase innerhalb der Pufferkapazität des gewählten Puffersystems ($pK_a \pm 1$) liegt, führt dies zu einer besseren Reproduzierbarkeit.
- Je höher der Wassergehalt der Probenmatrix ist, desto kleiner sollte das Injektionsvolumen sein, um Peak-Splitting zu vermeiden.
- HILIC-Säulen benötigen zwischen den Injektionen mehr Zeit zur erneuten Äquilibration als Umkehrphasen-Säulen. Eine adäquate erneute Äquilibration ist für die Reproduzierbarkeit entscheidend. Achten Sie stets auf einen H₂O-Anteil von > 3 %, um eine wässrige Schicht auf der festen stationären Phase aufrechtzuerhalten. Es empfiehlt sich, den Gradienten mit dem höchsten Prozentanteil an Wasser zu beginnen, der den am wenigsten polaren Analyten noch zurückhält, um die erneute Äquilibration zu beschleunigen.

Massenspektrometrie

- Verwenden Sie keine phosphathaltigen Puffer für die MS-Detektion!
- Wählen Sie zu diesem Zweck flüchtige Puffer wie Ammoniumacetat oder Ammoniumformiat. Beachten Sie, dass Sie Formiat nicht nachweisen können, wenn Sie eine formiathaltige mobile Phase verwenden. Dasselbe gilt für Acetat.
- Leiten Sie den LC-Fluss außerhalb der relevanten Retentionszeit(en) in den Abfall um, insbesondere während einer Spülung mit hohem organischen Anteil am Ende der Methode und, wenn möglich, während das Leervolumen eluiert.
- Verwenden Sie Lösemittel in HPLC- oder höherer Qualität.
- Führen Sie eine regelmäßige Reinigungsroutine für die MS-Quelle ein.

Parameter	Wert	
Säule	AdvanceBio Amino Acid Analysis 4,6 x 100 mm oder 3,0 x 100 mm	
Gerät	Agilent 1290 Infinity II LC-System	
Flussrate	1,5 ml/min für Säulen mit 4,6 mm ID 0,62 ml/min für Säulen mit 3 mm ID	
Mobile Phase A	10 mM Na ₂ HPO ₄ und 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 8,2	
Mobile Phase B	Acetonitril, Methanol und Wasser (45/45/10 Gew.-%)	
Gradient	Zeit (min)	% B
	0	2
	0,35	2
	13,4	57
	13,5	100
	15,7	100
	18	Ende
Säulentemperatur	40 °C	
Detektor	Signal A: 338 nm, Bandbreite 10 nm; Referenzwellenlänge 390 nm, Bandbreite 20 nm	
	Signal B: 262 nm, Bandbreite 16 nm; Referenzwellenlänge 324 nm, Bandbreite 8 nm	

Erste Schritte

Umkehrphasen-Analyse derivatisierter Aminosäuren

Die Aminosäureanalyse mit automatischer Derivatisierung und LC/UV- oder Fluoreszenzdetektion wird in diesem [Leitfaden](#) ausführlich beschrieben.⁴ Dieser Leitfaden enthält Anweisungen für die Vorbereitung der Standards, die Programmierung des automatischen Probengebers zur Durchführung der Probenderivatisierung sowie für die chromatographische Methode.

Tabelle 1: LC-Methode für die Umkehrphasenanalyse von markierten Aminosäuren unter Verwendung der AdvanceBio Amino Acid Analysis-Säule

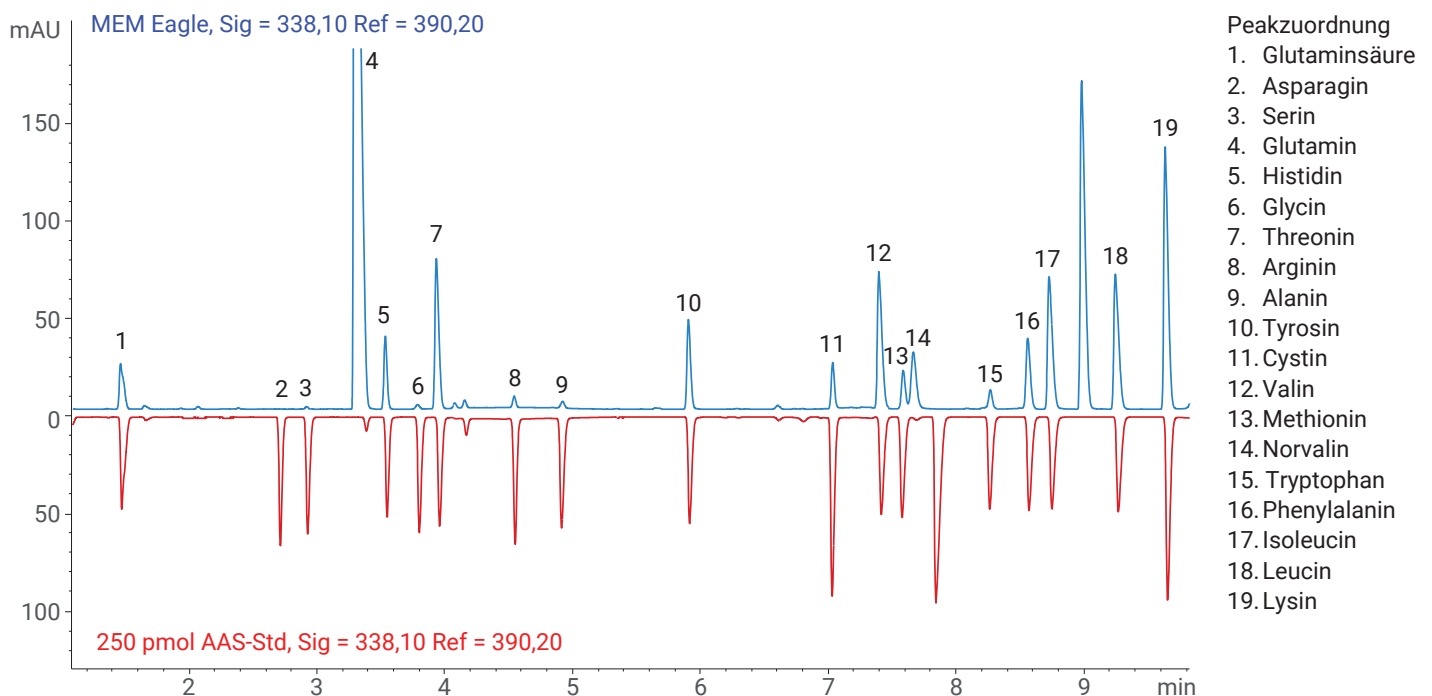


Abbildung 2: Beispiel für eine Trennung von OPA- und Fmoc-markierten Aminosäuren mithilfe der AdvanceBio Amino Acid Analysis-Säule.⁵

HILIC-Analyse nicht derivatisierter Aminosäuren

Eine Beispielmethode zur Analyse einer Vielzahl von Metaboliten zusätzlich zu Aminosäuren ist nachstehend dargestellt. Eine Beispielmethode, die sich auf Aminosäuren konzentriert, finden Sie in dieser [Application Note](#)⁶ oder dieser [Broschüre](#)⁷.

Parameter	Wert														
Säule	AdvanceBio MS Spent Media-Säule, 2,1 x 100 mm														
Gerät	Agilent 1260 Infinity II bioinertes LC-System														
Flussrate	0,5 ml/min														
Mobile Phase	Niedriger pH, MS-Detektion im positiven Ionenmodus: A: 10 % 200 mM Ammoniumformiat in Wasser, pH 3, 90 % Wasser B: 10 % 200 mM Ammoniumformiat in Wasser, pH 3, 90 % Acetonitril <i>Die Salz-Endkonzentration beträgt 20 mM.</i>														
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit (min)</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>	Zeit (min)	% B	0	100	10	75	20	20	21	20	21,1	100	28	100
Zeit (min)	% B														
0	100														
10	75														
20	20														
21	20														
21,1	100														
28	100														
Säulentemperatur	40 °C														
Detektor	Agilent 6230 TOF														

Tabelle 2: LC-Methode für die HILIC-Analyse von Aminosäuren und anderen Analyten aus Zellkulturmedien mithilfe der AdvanceBio MS Spent Media-Säule

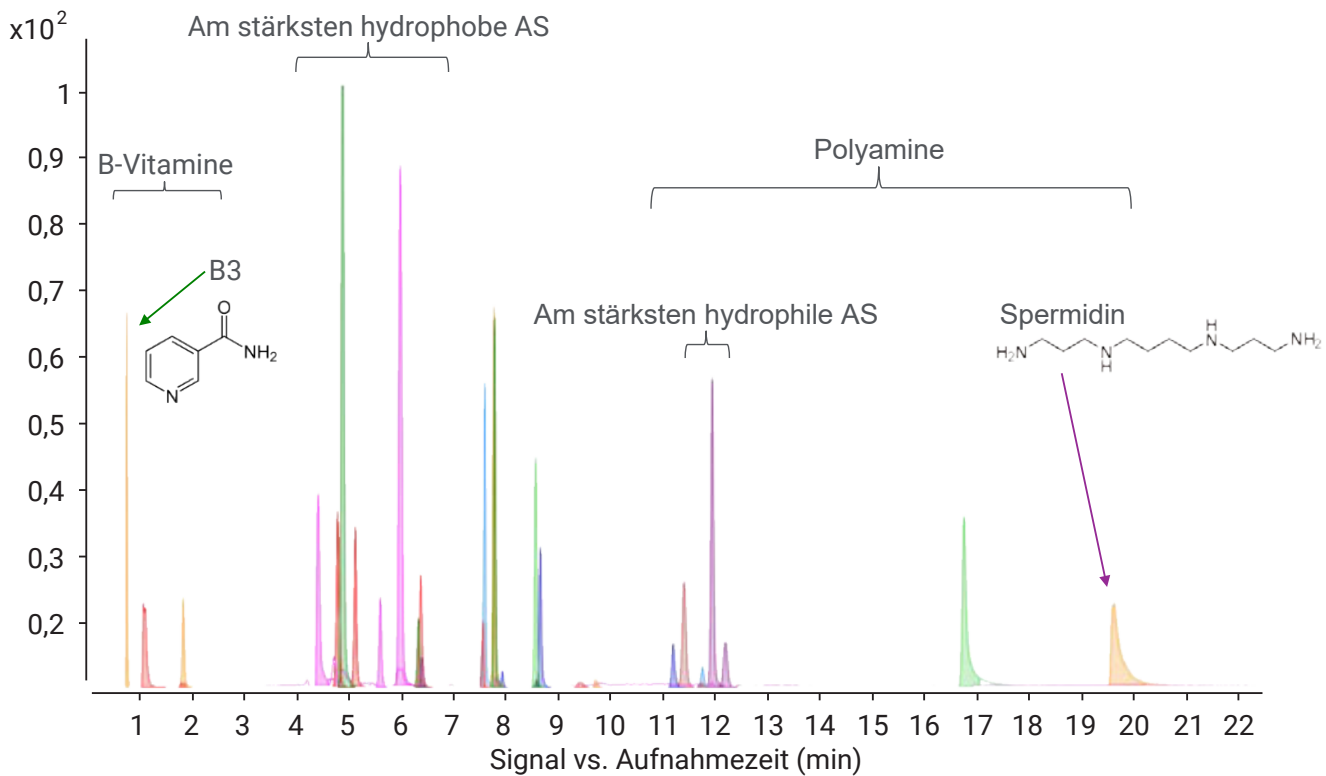


Abbildung 3: Beispieltrennung von Aminosäuren, B-Vitaminen und Polyaminen unter Verwendung der AdvanceBio MS Spent Media-Säule mit TOF-Detektion.⁸

Informationen für eine einfache Auswahl und Bestellung

Zur Bestellung der in den folgenden Tabellen zusammengefassten Artikel im Agilent Online Store nehmen Sie die gewünschten Artikel in Ihre Liste von Produktfavoriten auf. Klicken Sie dazu auf die MeineListe-#-Links in den Überschriften. Anschließend können Sie die erforderliche Produktmenge eingeben, die Produkte in Ihren Warenkorb legen und zur Kasse gehen. Ihre Liste bleibt unter „Produktfavoriten“ für Sie zur Verwendung bei künftigen Bestellungen erhalten.

Wenn Sie „Produktfavoriten“ zum ersten Mal benutzen, werden Sie zur Eingabe Ihrer E-Mail-Adresse aufgefordert, um das Kundenkonto zu bestätigen. Wenn Sie bereits über ein Agilent Konto verfügen, können Sie sich einfach anmelden. Wenn Sie noch kein Agilent Konto eingerichtet haben, müssen Sie sich für eines registrieren. Diese Funktion ist nur in Regionen verfügbar, in denen E-Commerce möglich ist. Alle Artikel können auch über die üblichen Verkaufs- und Vertriebskanäle bestellt werden.

Beschreibung	Best.-Nr.
MeineListe 1: Advance Bio Amino Acid Analysis-Säulen (AAA)	
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 3,0 x 100 mm, LC-Säule	695975-322
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 4,6 x 100 mm, 2,7 µm LC-Säule	655950-802
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 3,0 x 5 mm, Vorsäule, 3 St.	823750-946
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 4,6 x 5 mm, Vorsäule, 3 St.	820750-931
MeineListe 2: AdvanceBio MS Spent Media-Säulen für die Analyse gebrauchter Medien	
AdvanceBio MS Spent Media-Säule 100 Å, 2,1 x 50 mm, 2,7 µm	679775-901
AdvanceBio MS Spent Media-Säule 100 Å, 2,1 x 100 mm, 2,7 µm	675775-901
AdvanceBio MS Spent Media-Säule, 100 Å, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm	673775-901
MeineListe 3: AdvanceBio AAA-Standards und -Reagenzien	
AdvanceBio Aminosäure-Reagenzien-Kit, 1-250 pmol/µl	5190-9426
Boratpuffer, 100 ml	5061-3339
FMOC-Reagenz, 2,5 mg/ml in Acetonitril, 10 x 1 ml	5061-3337
Dithiodipropionsäure, 5 g	5062-2479
Aminosäuren-Standard, 1 nmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3330
Aminosäuren-Standard, 250 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3331
Aminosäuren-Standard, 100 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3332
Aminosäuren-Standard, 25 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3333
Aminosäuren-Standard, 10 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3334
Aminosäuren-Ergänzungskit	5062-2478
MeineListe 4: Zubehör für HPLC	
Agilent InfinityLab Quick Connect-Fitting (für den Anschluss am Säuleneinlass)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect-Kapillare MP35N 0,12 x 105 mm (BioInert, für Quick Connect-Fitting)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Connect-Kapillare, Edelstahl, 0,12 x 105 mm (für Quick Connect-Fitting)	5500-1173
Agilent InfinityLab Quick Turn-Fitting (für den Anschluss am Säulenauslass)	5067-5966
Agilent InfinityLab Quick Turn-Kapillare MP35N 0,12 x 280 mm (für Quick Turn-Fitting)	5500-1596
Agilent InfinityLab Quick Turn-Kapillare, Edelstahl, 0,12 x 280 mm (für Quick Turn-Fitting)	5500-1230
Montagewerkzeug für Quick Turn-Fittings	5043-0915

Beschreibung	Best.-Nr.
MeineListe 5: Probenbehälter	
High-Recovery-Probenflasche, Schraubverschluss, mit festem Einsatz, klar, 300 µl Einsatzvolumen, 100 St. Probenflaschengröße: 12 x 32 mm (12 mm-Deckel)	5188-6591
Deckel, Schraubverschluss, blau, Septen aus PTFE/rotem Silikon, 100 St. Deckelgröße: 12 mm	5182-0717
Probenflasche, Bördel-/Schnappverschluss, Polypropylen, 250 µl, 1000 St. Probenflaschengröße: 12 x 32 mm (11 mm-Deckel)*	5190-3155
Schnappverschlusskappe, klar, Septen aus PTFE/Silikon/PTFE, 100 St. Deckelgröße: 11 mm (für 5190-3155)	5182-0566
InfinityLab 96-Wellplate, 0,5 ml, 30 St.	5043-9310
InfinityLab 96-Wellplate-Dichtungsmatte, 50 St.	5042-1389
MeineListe 6: Lösemittel und Additive	
InfinityLab Reinstwasser für LC/MS, 1 l	5191-4498
InfinityLab Ultrapure Acetonitril für LC/MS-, 1 l	5191-4496
Ameisensäure, 5 ml	G2453-85060
InfinityLab Deaktivator-Zusatz, 25 ml	5191-3940
InfinityLab Deaktivator-Zusatz, 50 ml	5191-4506
MeineListe 7: Lösemittelfiltration	
InfinityLab Lösemittelfiltereinheit	5191-6776
InfinityLab Lösemittelfilterflasche, Glas, 2 l	5191-6781
Filtermembran, Nylon 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4341
Filtermembran, regenerierte Cellulose, 47 mm, Porengröße 0,2 µm, 100 St.	5191-4340
Lösemittelflaschen-Glasfilter, Lösemittleinlass, 20 µm	5041-2168
MeineListe 8: Lösemittelhandhabung	
InfinityLab Stay Safe Verschlusskappe, Starter-Kit	5043-1222
InfinityLab Lösemittelflasche, klar, 1 l	9301-6524
InfinityLab Lösemittelflasche, braun, 1 l	9301-6526
Lösemittelflasche, klar, 2 l	9301-6342
Lösemittelflasche, braun, 2 l	9301-6341
InfinityLab Stay Safe Spülflasche	5043-1339
InfinityLab Abfallbehälter, GL45, 6 l, mit Stay Safe Verschlusskappe	5043-1221
InfinityLab Aktivkohlefilter mit Zeitstreifen, 58 g	5043-1193

Literatur:

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. Analyse nicht derivatisierter Aminosäuren mithilfe von LC/MS im Rahmen der Überwachung von Zellkulturen in Bioreaktoren [5991-8816DEE](#)
7. Agilent AdvanceBio Arbeitsabläufe für die Analyse verbrauchter Medien [5991-8817DEE](#)
8. Analysis of Underivatized Amino Acids and Metabolites in Cell Culture Media by HILIC-LC/MS [ASMS 2018 MP-566](#)

Mehr Infos:

www.agilent.com/chem/advancebio

Hier finden Sie Ihr Agilent Kundeninformationszentrum in Ihrem Land:

www.agilent.com/chem/contactus

Deutschland

0800-603 1000

CustomerCare_Germany@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asien und Pazifik

inquiry_lsca@agilent.com

DE42995938

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Gedruckt in den USA, 30. November 2022
5994-5515DEE