

Analyse des milieux de culture cellulaire en Biopharma par chromatographie en phase liquide



La connaissance et le contrôle du procédé sont essentiels à la production d'un produit thérapeutique consistant. Un aspect important du procédé concerne les conditions de culture cellulaire y compris les nutriments et les métabolites disponibles.

La composition des milieux de culture cellulaire est fondamentale au rendement du produit, à la santé et à la survie des cellules utilisées pour produire la biothérapie. La présence d'additifs dans les milieux de culture cellulaire peut également impacter les propriétés critiques de la biothérapie comme les profils de glycosylation.

La vitesse d'analyse des acides aminés est souvent essentielle, avec le souhait croissant de pouvoir surveiller en ligne directement au niveau du bioréacteur pour prendre des décisions rapides¹. La reproductibilité, la robustesse et la durée de vie de la colonne sont également des difficultés couramment rencontrées lors de l'analyse des acides aminés et Agilent propose deux solutions pour relever ces défis de façons différentes.

Le kit de réactifs et colonne LC pour l'analyse des acides aminés (AAA) AdvanceBio produit des résultats extrêmement reproductibles et fiables. La dérivatisation des acides aminés est entièrement automatisée dans le passeur automatique d'échantillons d'un système de LC, éliminant ainsi la variabilité inhérente à la préparation manuelle d'échantillons ainsi que le délai entre préparation et analyse qui peut conduire à une dégradation des échantillons. La dérivatisation est nécessaire pour retenir efficacement les acides aminés sur une colonne à phase inverse et pour les détecter par le biais des UV et de la fluorescence. La colonne LC pour l'analyse des acides aminés (AAA) AdvanceBio est une colonne à phase inverse qui a été spécialement traitée pour être protégée aux pH élevés qui sont privilégiés durant les séparations d'acides aminés. Le résultat est une colonne robuste à durée de vie longue.

La deuxième solution de séparation des acides aminés proposée par Agilent est la colonne AdvanceBio MS Spent Media qui permet une séparation HILIC associée à la spectrométrie de masse (MS). Cette autre approche de rétention rend inutile la dérivation et autorise une analyse des cultures cellulaires plus complète avec une seule méthode. Les échantillons peuvent être récupérés du bioréacteur et être rapidement analysés après une courte centrifugation pour précipiter les éventuels débris cellulaires. Le développement de la méthode HILIC a ses propres difficultés, mais en suivant les bonnes pratiques décrites ci-dessous, l'obtention de résultats robustes et fiables est à portée de main.

Le choix du mode opératoire pour l'analyse en milieux épuisés dépend des besoins analytiques et, dans certains cas, des préférences :

- **La détection par MS est-elle disponible ou préférée ?**
Si oui, HILIC-MS permet de surveiller une vaste gamme de composés. Si seule la détection de fluorescence ou d'UV est disponible, une méthode à phase inverse pour l'analyse des acides aminés est recommandée.
- **Est-il seulement nécessaire de surveiller les acides aminés ou faut-il également surveiller d'autres composants dans les milieux de culture cellulaire ?**
S'il faut surveiller d'autres nutriments ou déchets cellulaires comme les vitamines B, les sucres, les nucléotides, les polyamines ou le lactate, il serait plus efficace de développer une analyse multiplexée reposant sur la technique HILIC-MS au cours de laquelle ces métabolites sont mesurés en même temps que les acides aminés. Si seule l'analyse d'acides aminés est requise, une méthode LC/UV à phase inverse avec acides aminés dérivés devrait suffire.
- **Préférez-vous dériver les acides aminés ou pas ?**
À l'exception d'autres circonstances, cela peut être une base de choix entre la LC/FLD ou LC/UV à phase inverse avec dérivation des échantillons ou la méthode HILIC-MS sans dérivation.

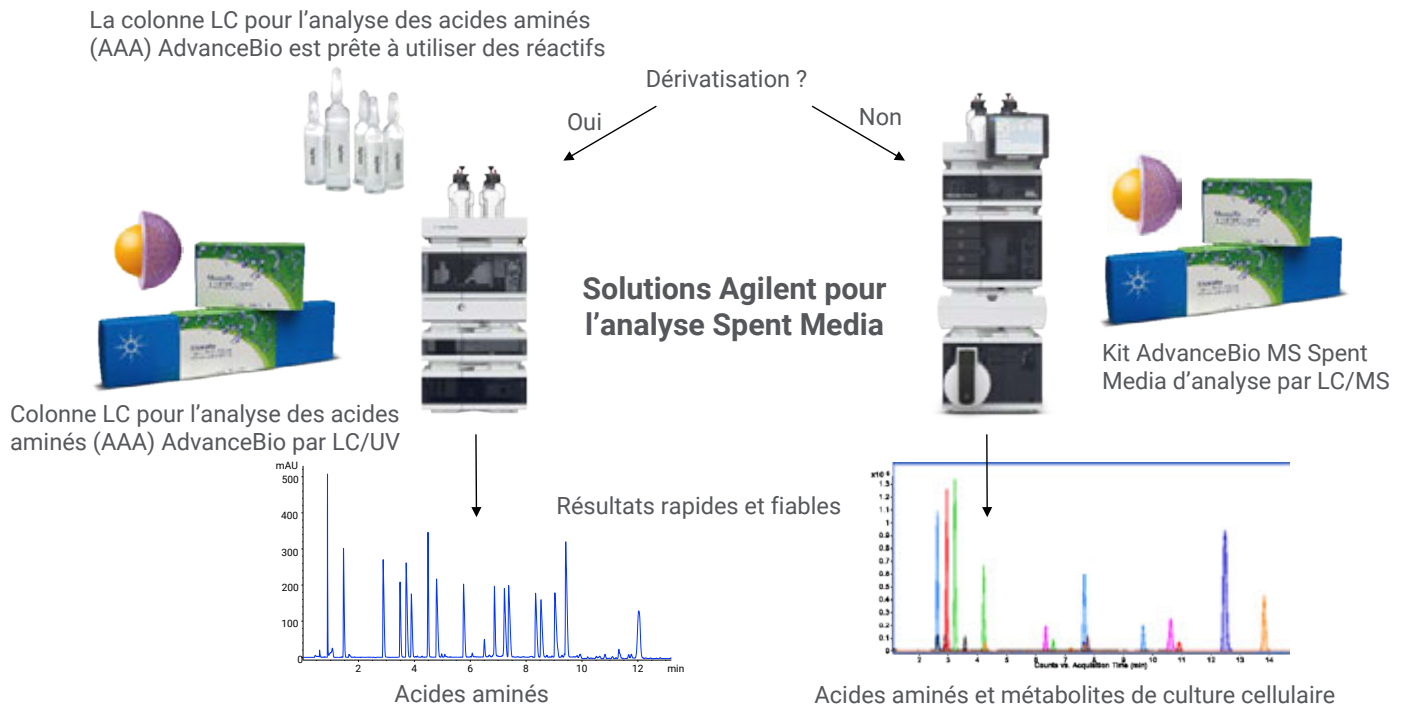


Figure 1. Le choix d'un mode opératoire Spent Media dépend des composés à surveiller, de la dérivation d'échantillon préférée et des options de détection disponibles.

Les bonnes pratiques pour une analyse efficace des acides aminés

Préparation d'échantillons

- Centrifuger les échantillons pour précipiter toutes les particules présentes dans les échantillons du bioréacteur.
- Pour les acides aminés marqués, remplacer quotidiennement le réactif de dérivatisation, le tampon de borate et les étalons d'acides aminés.
- Pour les séparations HILIC, diluer les échantillons avec de l'acétonitrile pour obtenir de meilleurs pics chromatographiques. Pour en savoir plus sur l'impact du solvant et le volume d'injection de l'échantillon sur la forme du pic chromatographique, consulter la présentation technique [HILIC Method Development Technical Overview](#).²

Séparation chromatographique – Généralités

- Abaisser la vitesse de montée du débit depuis sa valeur par défaut jusqu'à 1 mL/min ou moins. L'augmentation graduelle du débit prolongera la durée de vie de la colonne et évitera des surpressions soudaines. Dans le logiciel Agilent, ce paramètre se trouve dans la section Avancé des contrôles de la pompe LC.
- Régler la limite de pression maximale dans la méthode LC pour qu'elle corresponde à celle de la colonne (600 bars pour toutes les colonnes recommandées ici). Cela est essentiel pour tous les cas où les capacités de pression maximale de la LC dépassent celles de la colonne.

Séparation chromatographique – Phase inverse

- Réétalonner chaque semaine pour les temps de rétention et les facteurs de réponse.
- Surveiller les performances de la colonne et de la colonne de garde en choisissant un couple de spécifications et en les suivant régulièrement, par exemple la résolution entre leucine et isoleucine.
- Éviter d'utiliser la vitesse de mélange maximale au cours de la dérivatisation pour prévenir toute usure excessive sur le passeur automatique d'échantillons.

Ne jamais laisser la colonne dans la phase mobile A (Tableau 1 : Na_2HPO_4 , 10 mM et $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 10 mM, pH 8,2), même seulement la nuit ! Pour la conservation à court terme, toujours stocker la colonne dans la phase mobile B (Tableau 1 : Acétonitrile, méthanol et eau (45/45/10, v/v/v). Pour une conservation à long terme, stocker la colonne dans un mélange acétonitrile/eau 50/50.

Séparation chromatographique – HILIC

- Les acides aminés ne sont pas sensibles aux métaux, cependant d'autres composés comme les molécules contenant du phosphate ou les polyamines peuvent être extrêmement sensibles à la présence de métaux dans le système de LC. Pour analyser les non-acides aminés, il est recommandé d'envisager une LC Bio-Inert ou sinon pour minimiser la présence de métaux dans le circuit, de remplacer les tubes en métal par du PEEK, de remplacer les flacons pour solvant en verre par du plastique, ou de suivre un protocole de désactivation comme celui décrit dans [HILIC Method Development Technical Overview](#).² La colonne AdvanceBio MS Spent Media est en acier inoxydable doublée de PEEK, elle a donc déjà un circuit sans métaux.
- Il est recommandé de préparer les phases mobiles HILIC depuis une solution tampon mère, comme décrite dans le [mode d'emploi](#)³ AdvanceBio MS Spent Media et la méthode d'échantillon ci-dessous. Cela minimise les problèmes de solubilité des sels dans l'acétonitrile et augmente l'homogénéité de la force ionique entre les phases mobiles A et B.
- Le pH de la phase mobile doit être contrôlé pour assurer une phase de la colonne homogène et donc des séparations reproductibles. En travaillant à un pH de la phase mobile qui soit dans les limites de capacité du tampon pour le système de tampon choisi ($\text{pK}_a \pm 1$), la reproductibilité sera meilleure.
- Plus le contenu aqueux de la matrice des échantillons est élevé, plus le volume d'injection devrait être faible pour éviter la division des pics.
- Les colonnes HILIC demandent plus de temps pour se stabiliser entre les injections que les colonnes à phase inverses. Une stabilisation adaptée est essentielle pour une bonne reproductibilité. Garder toujours $\text{H}_2\text{O} > 3\%$ pour maintenir une couche aqueuse sur la phase stationnaire solide. Envisager de démarrer le gradient au % aqueux le plus élevé qui retient le moins de composés polaires pour une stabilisation plus rapide.

Spectrométrie de masse

- Ne pas utiliser des tampons contenant du phosphate avec la détection MS !
- Choisir des tampons volatils comme de l'acétate d'ammonium ou du formate d'ammonium pour la détection MS. Notez que vous ne pourrez pas détecter le formate si vous utilisez une phase mobile contenant du formate, de même pour l'acétate.
- Rediriger le flux LC en dehors du ou des temps de rétention d'intérêt vers la collecte des déchets, en particulier au cours d'un rinçage riche en molécules organiques à la fin de la méthode et, si possible, lors de l'élution du volume mort.
- Utiliser des solvants de qualité HPLC ou supérieure.
- Effectuez régulièrement un nettoyage de routine de la source MS.

Prise en main

Analyse en phase inverse d'acides aminés dérivés

L'analyse d'acides aminés avec dérivatisation automatisée et analyse LC/UV ou fluorescence est soigneusement décrite dans le [guide pratique](#).⁴ Ce guide contient des instructions sur la préparation des étalons, la programmation du passeur automatique d'échantillons pour exécuter la dérivatisation des échantillons et sur la méthode chromatographique

Paramètre	Valeur	
Colonne	Colonne LC pour l'analyse des acides aminés (AAA) AdvanceBio 4,6 x 100 mm ou 3,0 x 100 mm	
Instrument	Système LC 1290 Infinity II Agilent	
Débit	1,5 mL/min pour colonnes de d. i. 4,6 mm 0,62 mL/min pour colonnes de d. i. 3 mm	
Phase mobile A	Na ₂ HPO ₄ 10 mM et Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mM, pH 8,2	
Phase mobile B	Acétonitrile, méthanol et eau (45/45/10, v/v/v)	
Gradient	Temps (min)	%B
	0	2
	0,35	2
	13,4	57
	13,5	100
	15,7	100
	15,8	2
18	fin	
Température de colonne	40 °C	
Détecteur	Signal A : 338 nm, bande passante 10 nm ; longueur d'onde de référence 390 nm, bande passante 20 nm	
	Signal B : 262 nm, bande passante 16 nm ; longueur d'onde de référence 324 nm, bande passante 8 nm	

Tableau 1. Méthode de LC pour analyse en phase inverse d'acides aminés marqués à l'aide de la colonne LC pour l'analyse des acides aminés (AAA) AdvanceBio.

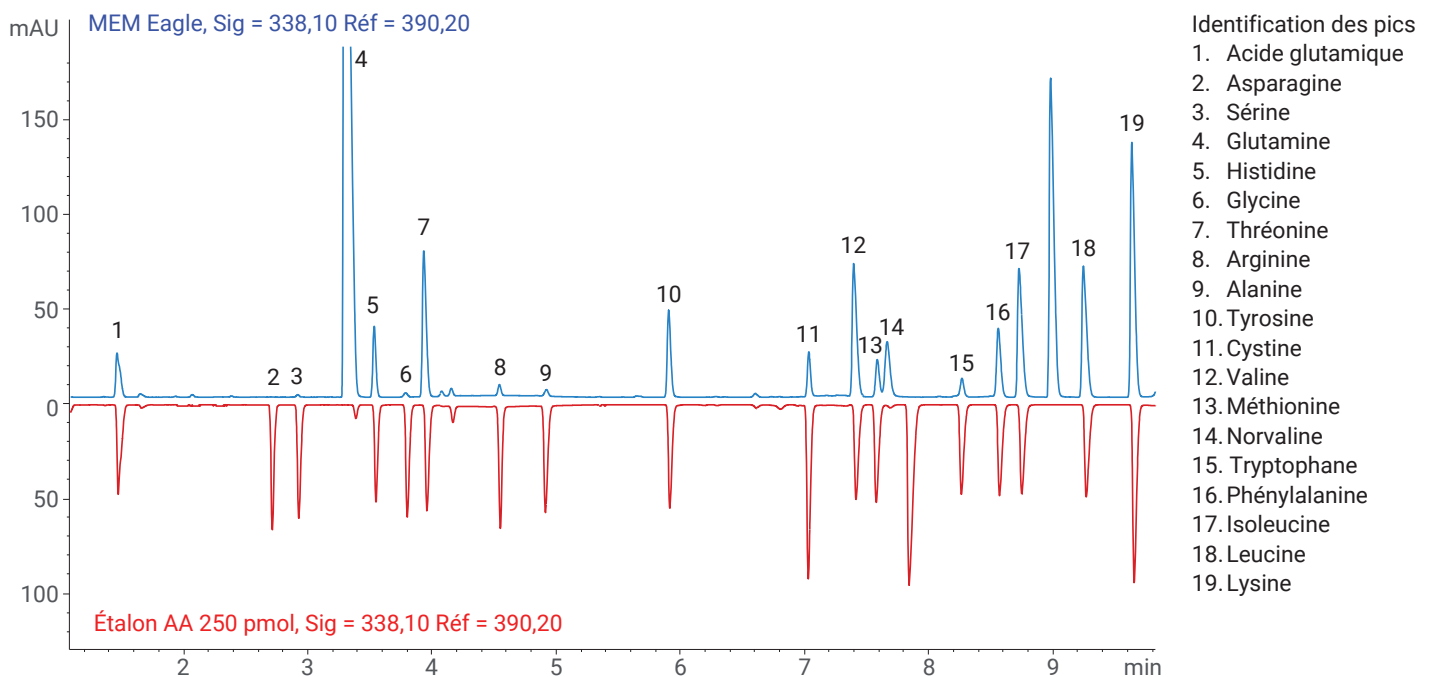


Figure 2. Exemple de séparation des acides aminés marqués par OPA et FMOC à l'aide de la colonne LC pour l'analyse des acides aminés (AAA) AdvanceBio.⁵

Analyse HILIC des acides aminés non dérivés

Une méthode d'échantillons, utilisée pour toute une variété de métabolites en plus des acides aminés, est présentée ci-dessous. Pour une méthode d'échantillons axée sur les acides aminés, voir cette [note d'application](#)⁶ ou cette [brochure](#)⁷.

Paramètre	Valeur	
Colonne	AdvanceBio MS Spent Media, 2,1 x 100 mm	
Instrument	Système LC bio-inerte 1260 Infinity II Agilent	
Débit	0,5 mL/min	
Phase mobile	pH faible, détection MS en mode ions positifs : A = 10 % de formate d'ammonium 200 mM dans de l'eau pH 3, 90 % d'eau B = 10 % de formate d'ammonium 200 mM dans de l'eau pH 3, 90 % d'acétonitrile <i>La concentration finale en sel est de 20 mM.</i>	
Gradient	Temps (min)	%B
	0	100
	10	75
	20	20
	21,1	100
	28	100
Température de colonne	40 °C	
Détecteur	Agilent 6230 TOF	

Tableau 2. Méthode de LC pour l'analyse HILIC des acides aminés et autres composés de milieu de culture cellulaire à l'aide de la colonne AdvanceBio MS Spent Media

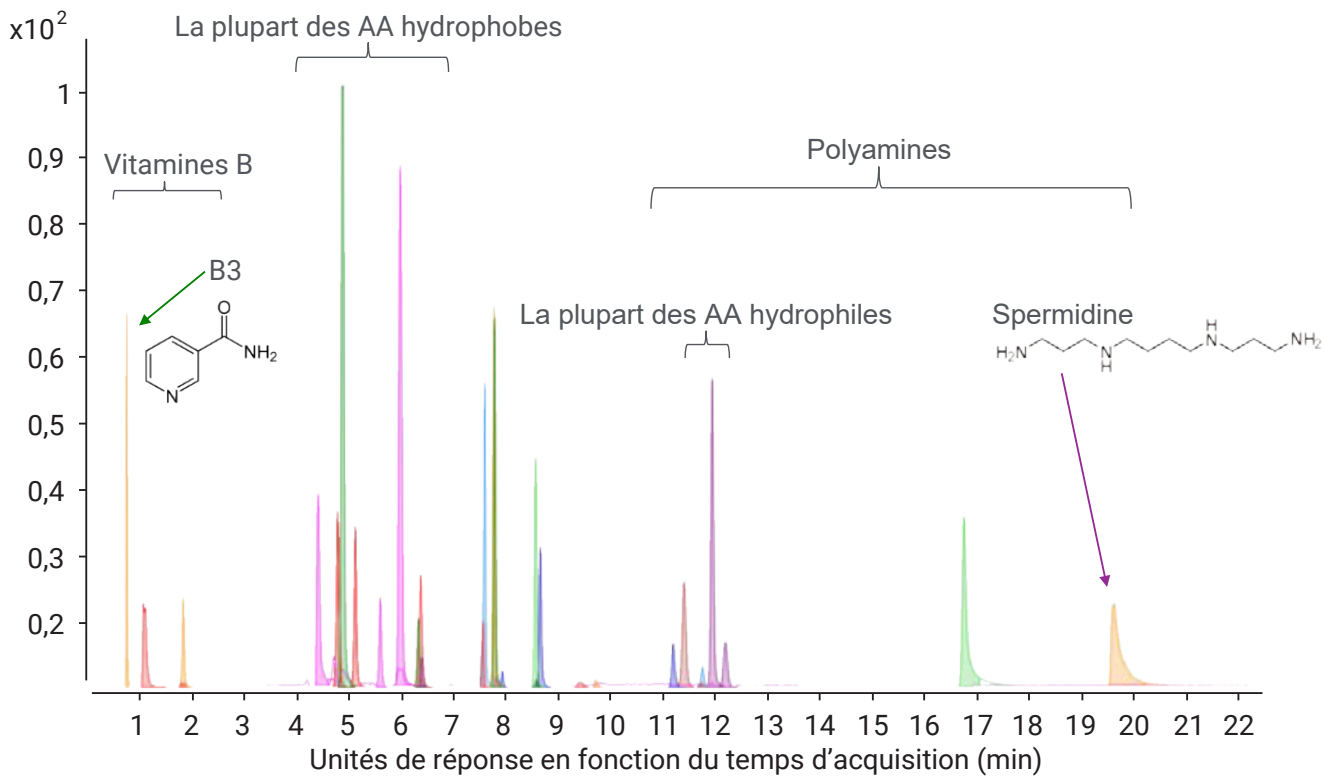


Figure 3. Séparation des acides aminés, vitamines B et polyamines d'un échantillon à l'aide de la colonne AdvanceBio MS Spent Media avec détection TOF.⁸

Sélection simplifiée et informations pour commander

Pour commander les articles indiqués dans les tableaux ci-dessous dans la boutique en ligne d'Agilent, ajoutez ces articles dans votre liste de Produits favoris en cliquant sur les liens d'en-tête « MaListe ». Vous pouvez ensuite saisir les quantités des produits dont vous avez besoin, ajouter les produits à votre panier et procéder au paiement. Votre liste d'articles sera disponible dans la rubrique Produits favoris pour faciliter vos futures commandes.

Si c'est la première fois que vous utilisez les Produits favoris, il vous sera demandé d'entrer votre adresse e-mail pour la vérification de votre compte. Si vous possédez un compte Agilent, vous pourrez vous connecter. Toutefois, si vous n'avez pas de compte Agilent enregistré, vous devrez en créer un. Cette fonctionnalité n'est valide que dans les régions où le commerce en ligne est disponible. Tous les articles peuvent aussi être commandés auprès de vos circuits de vente et de distribution habituels.

Description	Référence
MaListe 1 : Colonnes pour analyse des acides animés (AAA) Advance Bio	
Colonne LC pour l'analyse des acides animés (AAA) AdvanceBio, 3,0 x 100 mm	695975-322
Colonne LC pour l'analyse des acides animés (AAA) AdvanceBio, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm	655950-802
Colonne de garde pour l'analyse des acides animés (AAA) AdvanceBio, 3,0 x 5 mm, 3/pqt	823750-946
Colonne de garde pour l'analyse des acides animés (AAA) AdvanceBio, 4,6 x 5 mm, 3/pqt	820750-931
MaListe 2 : Colonnes d'analyse AdvanceBio MS Spent Media	
AdvanceBio MS Spent Media, 100 Å, 2,1 x 50 mm, 2,7 µm	679775-901
AdvanceBio MS Spent Media, 100 Å, 2,1 x 100 mm, 2,7 µm	675775-901
AdvanceBio MS Spent Media, 100 Å, 2,1 x 150 mm, 2,7 µm	673775-901
MaListe 3 : Étalons et réactifs AdvanceBio AAA	
Kit de réactifs pour acides aminés AdvanceBio ; 1-250 pmol/µL	5190-9426
Tampon de borate 100 mL	5061-3339
Réactif FMOC, 2,5 mg/mL dans de l'acétonitrile, 10 x 1 mL	5061-3337
Acide dithiodipropionique, 5 g	5062-2479
Étalon AA, 1 nmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3330
Étalon AA, 250 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3331
Étalon AA, 100 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3332
Étalon AA, 25 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3333
Étalon AA, 10 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3334
Kit complémentaire pour acides aminés	5062-2478
MaListe 4 : Consommables pour HPLC	
Ensemble Raccord rapide Quick Connect InfinityLab Agilent (à raccorder à l'entrée de colonne)	5067-5965
Capillaire Quick Connect Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 105 mm (BioInert ; pour raccords Quick Connect)	5500-1578
Capillaire Quick Connect Agilent InfinityLab acier inoxydable 0,12 x 105 mm (pour raccords Quick Connect)	5500-1173
Raccord rapide Quick Turn Agilent InfinityLab (à raccorder à la sortie de colonne)	5067-5966
Capillaire Quick Turn Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 280 mm (pour raccords Quick Turn)	5500-1596
Capillaire Quick Turn Agilent InfinityLab acier inoxydable 0,12 x 280 mm (pour raccords Quick Turn)	5500-1230
Outil de montage pour raccords rapides Quick Turn	5043-0915

Description	Référence
MaListe 5 : Contenant	
Flacon à capacité de récupération élevée, capsule à visser, avec insert fixe, transparent, volume d'insert de 300 µL, 100/pqt. Taille de flacon : 12 x 32 mm (capsule de 12 mm)	5188-6591
Capsule, à visser, bleue, septum en PTFE/silicone rouge, 100/pqt. Taille de capsule : 12 mm	5182-0717
Flacon, à sertir/à capsule-pression, polypropylène, 250 µL, 1 000/pqt. Taille de flacon : 12 x 32 mm (capsule de 11 mm)*	5190-3155
Capsule, à pression, transparente, septum en PTFE/silicone/PTFE, 100/pqt. Taille de capsule : 11 mm (pour 5190-3155)	5182-0566
Plaque à puits InfinityLab, 96/0,5 mL, 30/pqt	5043-9310
Tapis de fermeture pour plaque à puits InfinityLab, 50/pqt	5042-1389
MaListe 6 : Solvants et additifs	
Eau ultrapure pour LC/MS InfinityLab, 1L	5191-4498
Acétonitrile ultrapur pour LC/MS InfinityLab, 1L	5191-4496
Acide formique, 5 mL	G2453-85060
Additif de passivation InfinityLab, 25 mL	5191-3940
Additif de passivation InfinityLab, 50 mL	5191-4506
MaListe 7 : Filtration des solvants	
Ensemble de filtration de solvants InfinityLab	5191-6776
Flacon pour filtration de solvants InfinityLab, en verre, 2 L	5191-6781
Membrane de filtre, en nylon, 47 mm, porosité 0,2 µm, 100/pqt	5191-4341
Membrane de filtre, en cellulose régénérée 47 mm, diamètre de pore 0,2 µm, 100/pqt	5191-4340
Filtre en verre de flacon pour solvant, entrée de solvant, 20 µm	5041-2168
MaListe 8 : Manipulation des solvants	
Kit de démarrage avec bouchons Stay Safe InfinityLab	5043-1222
Flacon pour solvant InfinityLab, transparent, 1 L	9301-6524
Flacon pour solvant InfinityLab, ambré, 1 L	9301-6526
Flacon pour solvant, transparent, 2 L	9301-6342
Flacon pour solvant, ambré, 2 L	9301-6341
Flacon de purge Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Bidon de collecte de déchets InfinityLab, GL45, 6 L, avec bouchon Stay Safe	5043-1221
Filtre à charbon InfinityLab avec indicateur de date, 58 g	5043-1193

Références :

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 d'acides aminés non dérivatisés par LC/MS pour la surveillance de cultures cellulaires en bioréacteur [5991-8816FR](#)
7. Procédures de travail Agilent AdvanceBio pour l'analyse de milieux de culture épuisés [5991-8817FR](#)
8. Analysis of Underivatized Amino Acids and Metabolites in Cell Culture Media by HILIC-LC/MS [ASMS 2018 MP-566](#)

Pour en savoir plus :

www.agilent.com/chem/advancebio

Pour trouver un centre de service client Agilent dans votre pays :

www.agilent.com/chem/contactus

France

0810 446 446

customercare_france@agilent.com

États Unis et Canada

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

Europe

info_agilent@agilent.com

Asie et Pacifique

inquiry_lsca@agilent.com

DE42995938

Ces informations sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Imprimé aux États-Unis, le 30 novembre 2022
5994-5515FR

