

Analisi di terreno di coltura cellulare nel settore biofarmaceutico mediante cromatografia liquida



La comprensione e il controllo del processo sono essenziali per la produzione di un prodotto bioterapeutico uniforme; un aspetto significativo di tale processo è rappresentato dalle condizioni di coltura cellulare, inclusi i nutrienti e i metaboliti disponibili per le cellule. La composizione del terreno di coltura cellulare è fondamentale per la resa del prodotto e per il benessere e la sopravvivenza delle cellule impiegate per produrre il prodotto bioterapeutico. Anche gli additivi del terreno di coltura cellulare possono influenzare proprietà critiche del prodotto bioterapeutico, come i pattern di glicosilazione.

La velocità è spesso un'esigenza vitale nell'analisi degli amminoacidi, con una crescente esigenza di un monitoraggio in linea direttamente in corrispondenza del bioreattore, per favorire la rapidità del processo decisionale.¹ Anche riproducibilità, robustezza e durata della colonna sono problematiche che si affrontano tipicamente nell'analisi degli amminoacidi e Agilent offre due soluzioni per risolverle in modi differenti.

I reagenti e la colonna AdvanceBio per l'analisi degli amminoacidi generano risultati altamente affidabili e riproducibili. La derivatizzazione degli amminoacidi è completamente automatizzata nell'autocampionatore di un sistema LC, eliminando sia la variabilità legata alla preparazione manuale dei campioni che eventuali ritardi tra preparazione e analisi, che potrebbero portare a una degradazione del campione. La derivatizzazione è necessaria al fine di trattenere in modo efficace gli amminoacidi in una colonna a fase inversa e rilevarli mediante UV o fluorescenza. La colonna AdvanceBio Amino Acid Analysis è una colonna a fase inversa che è stata trattata in modo speciale per proteggerla nelle condizioni di pH elevato preferibili per le separazioni di amminoacidi, dando come risultato una colonna robusta e di lunga durata.

La seconda soluzione di Agilent per la separazione degli aminoacidi, la colonna AdvanceBio MS Spent Media, combina una separazione HILIC con una rivelazione mediante spettrometria di massa (MS). Questo approccio alternativo alla ritenzione rimuove la necessità della derivatizzazione e permette un'analisi più completa della coltura cellulare con un unico metodo. I campioni possono essere prelevati dal bioreattore e prontamente analizzati dopo solamente una breve centrifugazione per indurre la precipitazione di eventuali detriti cellulari. Lo sviluppo del metodo HILIC presenta le proprie specifiche difficoltà, ma attenendosi alle migliori prassi descritte nel seguito è possibile ottenere con poco sforzo risultati robusti e affidabili.

La scelta del flusso di lavoro per l'analisi con terreni di coltura esausti dipende da una combinazione di esigenze analitiche e, in alcuni casi, preferenze:

- **La tecnica di rivelazione MS è disponibile o preferibile?**
In caso affermativo, la tecnica HILIC-MS permette il monitoraggio di un'ampia schiera di analiti. Se è disponibile solamente la rivelazione mediante UV o fluorescenza, allora si raccomanda un metodo con fase inversa per l'analisi degli aminoacidi.
- **È sufficiente il monitoraggio degli aminoacidi o è necessario monitorare anche altri componenti del terreno di coltura cellulare?**
Se è necessario monitorare anche altri nutrienti o prodotti di scarto cellulari, come vitamine B, zuccheri, nucleotidi, poliammine o lattati, può essere più efficiente sviluppare un'analisi multipla mediante HILIC-MS in cui questi metaboliti vengono misurati contemporaneamente agli aminoacidi. Se è richiesta solamente l'analisi degli aminoacidi, allora la scelta più adatta è un metodo di LC/UV a fase inversa con aminoacidi derivatizzati.
- **Si preferisce derivatizzare gli aminoacidi oppure no?**
Escluse altre circostanze, questo può essere il punto di partenza per scegliere tra LC/UV o LC/FLD a fase inversa con derivatizzazione del campione oppure HILIC-MS senza derivatizzazione.

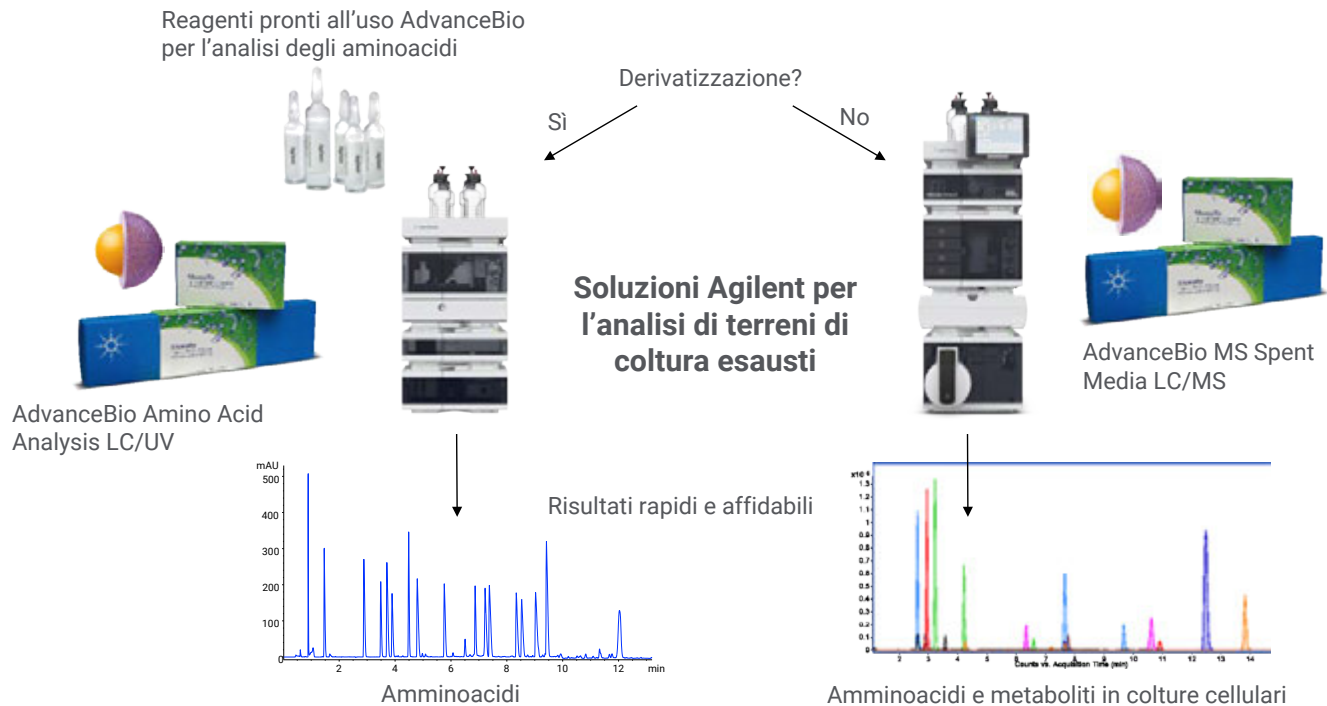


Figura 1. La scelta del flusso di lavoro con terreni di coltura esausti dipende dagli analiti da monitorare, dalle preferenze per la derivatizzazione del campione e dalle opzioni di rivelazione disponibili.

Buone prassi per un'analisi efficace degli aminoacidi

Preparazione del campione

- Centrifugare i campioni per indurre la precipitazione di eventuale particolato proveniente dai campioni del bioreattore.
- In caso di aminoacidi marcati, sostituire quotidianamente il reagente di derivatizzazione, il tampone borato e gli standard di aminoacidi.
- Per separazioni HILIC, diluire i campioni con acetonitrile per ottenere una forma ottimale dei picchi cromatografici. Per un approfondimento riguardo agli effetti del solvente del campione e del volume di iniezione sulla forma dei picchi cromatografici, si veda il documento [HILIC Method Development Technical Overview](#).²

Separazione cromatografica - In generale

- Ridurre la velocità della rampa del flusso dal valore predefinito a 1 mL/min o meno. L'aumento graduale del flusso aumenta la durata della colonna e aiuta a prevenire eccessi di pressione improvvisi. Nel software Agilent questa impostazione è disponibile nella sezione Advanced (Avanzate) dei comandi della pompa LC.
- Impostare il limite di pressione massimo nel metodo di LC in modo che corrisponda a quello della colonna (600 bar per tutte le colonne qui raccomandate). Ciò è fondamentale per tutti i casi in cui le capacità di pressione massima del sistema LC sono superiori a quelle della colonna.

Separazione cromatografica - Fase inversa

- Ripetere la calibrazione dei tempi di ritenzione e dei fattori di risposta una volta alla settimana.
- Monitorare le prestazioni della colonna e della precolonna scegliendo alcune specifiche, come per esempio la risoluzione tra leucina e isoleucina, e tenendone regolarmente traccia.
- Evitare di usare la velocità di miscelazione massima durante la derivatizzazione per evitare un'usura eccessiva dell'autocampionatore.

Non lasciare assolutamente la colonna nella fase mobile A (Tabella 1: 10 mM di Na_2HPO_4 e 10 mM di $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8,2), nemmeno solo per una notte. Per la conservazione a breve termine, conservare sempre la colonna nella fase mobile B (Tabella 1: acetonitrile, metanolo e acqua, 45/45/10, vol/vol/vol). Per la conservazione a lungo termine, conservare la colonna in acetonitrile/acqua, 50/50.

Separazione cromatografica - HILIC

- Gli aminoacidi non sono sensibili ai metalli, tuttavia altri analiti, come le molecole contenenti fosfati o le poliammine, possono essere estremamente sensibili alla presenza di metalli nel sistema LC. Per analizzare sostanze differenti dagli aminoacidi, si raccomanda di prendere in considerazione un sistema LC BioInert, o altrimenti di ridurre al minimo la presenza di metalli nel percorso del campione sostituendo i tubi in metallo con tubi in PEEK, sostituendo le bottiglie per solvente in vetro con bottiglie in plastica, oppure attenendosi a un protocollo di disattivazione come delineato nel documento [HILIC Method Development Technical Overview](#).² La colonna AdvanceBio MS Spent Media presenta hardware in acciaio inossidabile con rivestimento in PEEK, quindi si tratta di un percorso del flusso già privo di metalli.
- Si raccomanda di preparare le fasi mobili per la HILIC da una soluzione tampone stock, come descritto nel documento [AdvanceBio MS Spent Media user guide](#)³ e nel metodo di campionamento riportato di seguito. In questo modo si riducono al minimo i problemi di solubilità dei sali in acetonitrile e si aumenta l'uniformità della forza ionica tra fase mobile A e B.
- Il pH della fase mobile deve essere controllato per assicurare che il riempimento della colonna sia uniforme e pertanto che le separazioni siano riproducibili. Lavorando con un pH della fase mobile che rientra nella capacità tampone del sistema tampone scelto ($\text{pK}_a \pm 1$) si ottiene una migliore riproducibilità.
- Maggiore è il contenuto acquoso della matrice del campione, minore deve essere il volume di iniezione per evitare lo sdoppiamento dei picchi.
- Le colonne HILIC richiedono più tempo rispetto alle colonne a fase inversa per riequilibrarsi tra un'iniezione e la successiva. Una riequilibrio adeguata è fondamentale per la riproducibilità. Mantenere sempre una percentuale di $\text{H}_2\text{O} > 3\%$ per conservare uno strato acquoso sulla fase stazionaria solida. Prendere in considerazione la possibilità di far iniziare il gradiente in corrispondenza della massima percentuale d'acqua che è ancora in grado di ritenere l'analita meno polare per ottenere una riequilibrio più veloce.

Spettrometria di massa

- Non utilizzare tamponi contenenti fosfati con la rivelazione MS.
- Scegliere tamponi volatili, come l'acetato di ammonio o il formiato di ammonio, per la rivelazione MS. Si noti che non è possibile rilevare il formiato quando si utilizza una fase mobile contenente formiato e che un discorso analogo vale per l'acetato.
- Deviare il flusso proveniente dal sistema LC verso lo scarico al di fuori del/i tempo/i di ritenzione di interesse, specialmente durante un lavaggio ad alto contenuto di composti organici al termine del metodo e, se possibile, durante l'eluizione del volume vuoto.
- Utilizzare solventi di grado per HPLC o superiore.
- Stabilire una routine regolare di pulizia della sorgente del sistema MS.

Per iniziare

Analisi in fase inversa di aminoacidi derivatizzati

L'analisi degli aminoacidi con derivatizzazione automatizzata e analisi mediante LC/UV o fluorescenza è descritta in modo approfondito nel documento "How-to" [Guide](#) (Guida pratica).⁴ Tale guida contiene istruzioni per la preparazione degli standard, la programmazione dell'autocampionatore per l'esecuzione della derivatizzazione del campione e il metodo cromatografico.

Parametro	Valore	
Colonna	AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi 4,6 x 100 mm o 3,0 x 100 mm	
Strumento	Sistema LC Agilent 1290 Infinity II	
Flusso	1,5 mL/min per colonne con d.i. 4,6 mm 0,62 mL/min per colonne con d.i. 3 mm	
Fase mobile A	10 mM di Na ₂ HPO ₄ e 10 mM di Na ₂ B ₄ O ₇ , pH 8,2	
Fase mobile B	Acetonitrile, metanolo e acqua (45/45/10, vol/vol/vol)	
Gradiente	Tempo (min)	%B
	0	2
	0,35	2
	13,4	57
	13,5	100
	15,7	100
	15,8	2
18	Fine	
Temperatura della colonna	40 °C.	
Rivelatore	Segnale A: 338 nm, larghezza di banda di 10 nm; lunghezza d'onda di riferimento 390 nm, larghezza di banda 20 nm	
	Segnale B: 262 nm, larghezza di banda di 16 nm; lunghezza d'onda di riferimento 324 nm, larghezza di banda 8 nm	

Tabella 1. Metodo di LC per l'analisi in fase inversa di aminoacidi marcati utilizzando la colonna AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi.

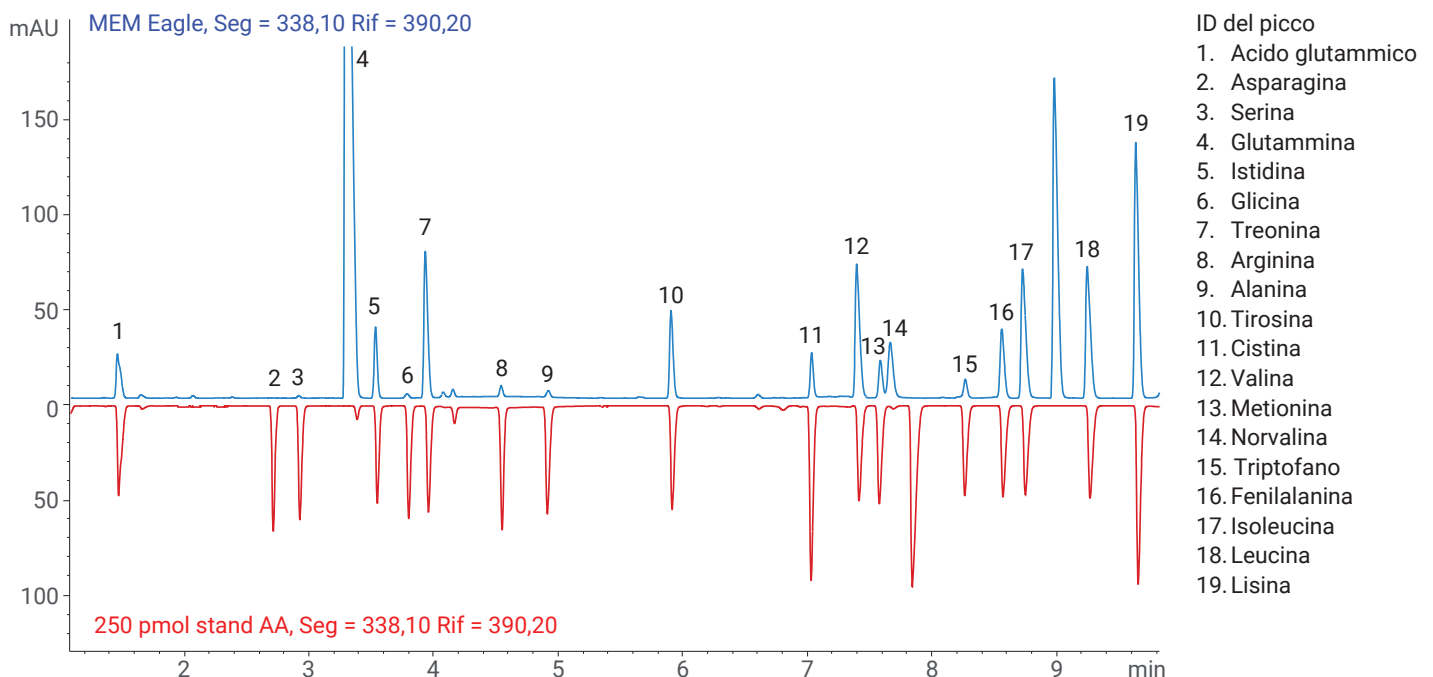


Figura 2. Esempio di separazione di aminoacidi marcati con OPA e FMOC utilizzando la colonna AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi.⁵

Analisi HILIC di aminoacidi non derivatizzati

Un metodo di campionamento usato per un'ampia varietà di metaboliti in aggiunta agli aminoacidi è mostrato nel seguito. Per un metodo di campionamento mirato per gli aminoacidi, consultare questa [nota applicativa](#)⁶ o questa [brochure](#)⁷.

Parametro	Valore														
Colonna	AdvanceBio MS Spent Media, 2,1x100 mm														
Strumento	Sistema LC 1260 Infinity II Bio-Inert Agilent														
Flusso	0,5 mL/min														
Fase mobile	Basso pH, rivelazione MS in modalità di ionizzazione positiva: A = 10% di 200 mM di formiato di ammonio in acqua con pH 3, 90% di acqua B = 10% di 200 mM di formiato di ammonio in acqua con pH 3, 90% di acetonitrile <i>La concentrazione salina finale è di 20 mM.</i>														
Gradiente	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo (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>	Tempo (min)	%B	0	100	10	75	20	20	21	20	21,1	100	28	100
Tempo (min)	%B														
0	100														
10	75														
20	20														
21	20														
21,1	100														
28	100														
Temperatura della colonna	40 °C.														
Rivelatore	Agilent 6230 TOF														

Tabella 2. Metodo LC per analisi HILIC di aminoacidi e altri analiti del terreno di coltura cellulare utilizzando la colonna AdvanceBio MS Spent Media.

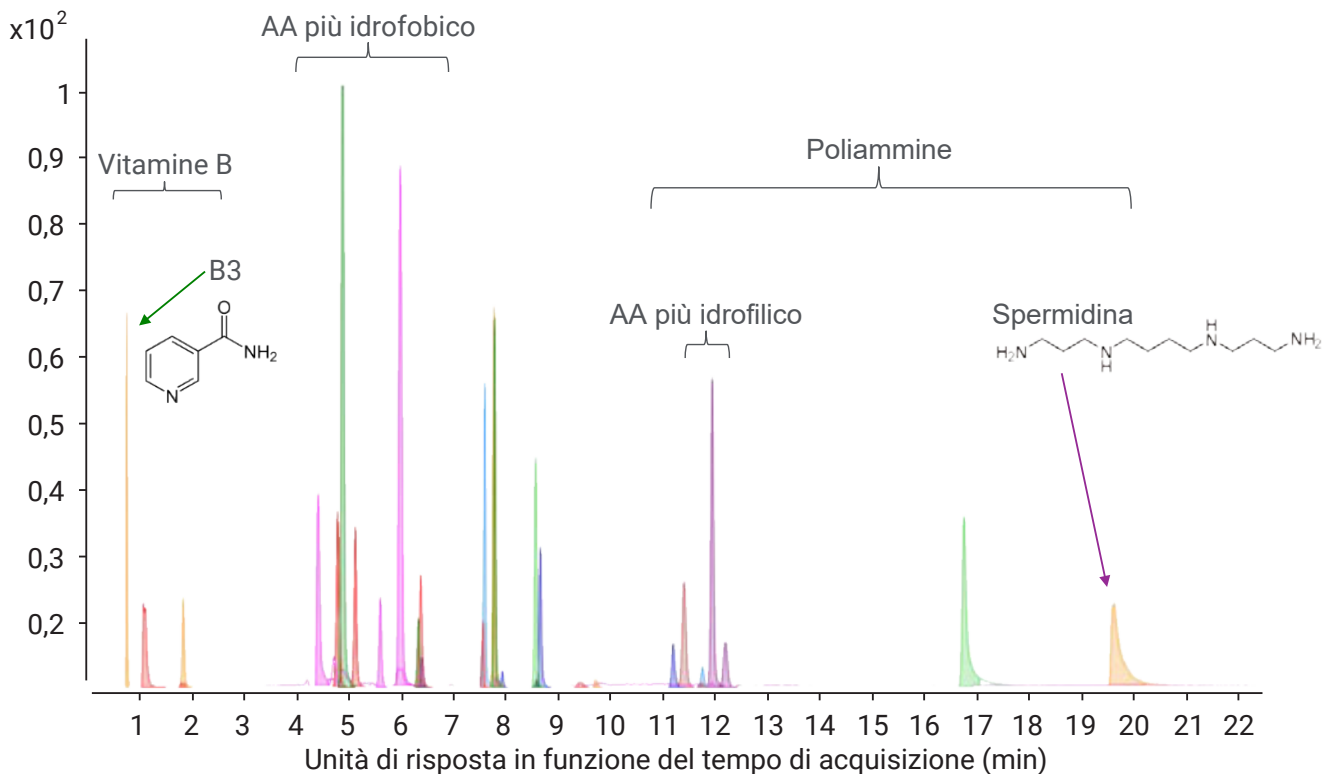


Figura 3. Separazione in un campione di aminoacidi, vitamine B e poliammine utilizzando la colonna AdvanceBio MS Spent Media con rivelazione TOF.⁸

Informazioni per scegliere e ordinare facilmente

Per ordinare gli articoli elencati nelle tabelle riportate di seguito su Agilent Online Store, aggiungere gli articoli al proprio elenco Prodotti preferiti facendo clic sui collegamenti presenti nelle intestazioni delle tabelle Il mio elenco #. Dopodiché potrai immettere le quantità dei prodotti necessari, aggiungere i prodotti al carrello e procedere al pagamento. L'elenco rimarrà tra i Prodotti preferiti in modo che tu possa disporre per gli ordini futuri.

Se questa è la prima volta che usi i Prodotti preferiti, ti verrà chiesto di inserire il tuo indirizzo e-mail per la verifica dell'account. Se sei titolare di un account Agilent esistente, potrai eseguire l'accesso. Se ancora non disponi di un account Agilent registrato, dovrai registrarne uno. Questa funzione è disponibile soltanto nelle regioni in cui è abilitato l'e-commerce. Tutti gli articoli possono essere ordinati anche tramite i normali canali di vendita e distribuzione.

Descrizione	Codice
Il mio elenco 1: Colonne Advance Bio Amino Acid Analysis (AAA)	
AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi (AAA), 3,0 x 100 mm, colonna per LC	695975-322
AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi (AAA), 4,6 x 100 mm, 2,7 µm, colonna per LC	655950-802
AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi (AAA), 3,0 x 5 mm, precolonna, 3/conf.	823750-946
AdvanceBio per l'analisi degli aminoacidi (AAA), 4,6 x 5 mm, precolonna, 3/conf.	820750-931
Il mio elenco 2: Colonne 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
Il mio elenco 3: Standard e reagenti AdvanceBio AAA	
Kit di reagenti AdvanceBio Amino Acid; 1-250 pmol/µL	5190-9426
Tampone borato 100 mL	5061-3339
Reagente FMOC, 2,5 mg/mL in acetonitrile, 10 x 1 mL	5061-3337
Ditiodipropionico, 5 g	5062-2479
Standard AA, 1 nmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3330
Standard AA, 250 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3331
Standard AA, 100 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3332
Standard AA, 25 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3333
Standard AA, 10 pmol/µL, 10 x 1 mL	5061-3334
Kit supplementare per aminoacidi	5062-2478
Il mio elenco 4: Prodotti di consumo per HPLC	
Gruppo di raccordo Agilent InfinityLab Quick Connect (per collegamento sull'ingresso della colonna)	5067-5965
Capillare Agilent InfinityLab Quick Connect in MP35N 0,12 x 105 mm (Biolnert; per raccordo Quick Connect)	5500-1578
Capillare Agilent InfinityLab Quick Connect in acciaio inossidabile 0,12 x 105 mm (per raccordo Quick Connect)	5500-1173
Raccordo Agilent InfinityLab Quick Turn (per collegamento sull'uscita della colonna)	5067-5966
Capillare Agilent InfinityLab Quick Turn in MP35N 0,12 x 280 mm (per raccordo Quick Turn)	5500-1596
Capillare Agilent InfinityLab Quick Turn in acciaio inossidabile 0,12 x 280 mm (per raccordo Quick Turn)	5500-1230
Utensile di montaggio per raccordi Quick Turn	5043-0915

Descrizione	Codice
Il mio elenco 5: Contenitori per campioni	
Vial a elevato recupero, chiusura a vite, con inserto fisso, trasparente, volume dell'inserto 300 µL, 100/conf. Dimensioni vial: 12 x 32 mm (tappo 12 mm)	5188-6591
Tappo, a vite, blu, setti in PTFE/silicone rosso, 100/conf. Dimensione tappo: 12 mm	5182-0717
Vial, a chiusura meccanica/a scatto, polipropilene, 250 µL, 1.000/conf. Dimensioni vial: 12 x 32 mm (tappo 11 mm)*	5190-3155
Tappo, a scatto, trasparente, setti in PTFE/silicone/PTFE, 100/conf. Dimensione tappo: 11 mm (per 5190-3155)	5182-0566
Piastra a pozzetti InfinityLab, 96 pozzetti da 0,5 mL, 30/conf.	5043-9310
Coperchio di chiusura per piastra a pozzetti InfinityLab, 50/conf.	5042-1389
Il mio elenco 6: Solventi e additivi	
Acqua ultra pura per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4498
Acetonitrile ultra puro per LC/MS InfinityLab, 1 L	5191-4496
Acido formico, 5 mL	G2453-85060
Additivo disattivatore InfinityLab, 25 mL	5191-3940
Additivo disattivatore InfinityLab, 50 mL	5191-4506
Il mio elenco 7: Filtrazione del solvente	
Gruppo di filtrazione del solvente InfinityLab	5191-6776
Matraccio di filtrazione del solvente InfinityLab, vetro, 2 L	5191-6781
Membrana del filtro, nylon, 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4341
Membrana del filtro, cellulosa rigenerata, 47 mm, dimensione dei pori 0,2 µm, 100/conf.	5191-4340
Filtro in vetro per bottiglie di solvente, ingresso solvente, 20 µm	5041-2168
Il mio elenco 8: Gestione dei solventi	
Kit di avvio tappo InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Bottiglia per solvente InfinityLab, trasparente, 1 L	9301-6524
Bottiglia per solvente InfinityLab, ambrata, 1 L	9301-6526
Bottiglia per solvente, trasparente, 2 L	9301-6342
Bottiglia per solvente, ambrata, 2 L	9301-6341
Bottiglia di spurgo Stay Safe InfinityLab	5043-1339
Contentore di scarico InfinityLab, GL45, 6 L, con tappo Stay Safe	5043-1221
Filtro al carbone InfinityLab con striscia time strip, 58 g	5043-1193

Bibliografia:

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. Analisi di amminoacidi non derivatizzati in LC/MS per il monitoraggio di colture cellulari in bioreattori [5991-8816ITE](#)
7. Flussi di lavoro Agilent AdvanceBio per l'analisi di terreni di coltura esausti [5991-8817ITE](#)
8. Analysis of Underivatized Amino Acids and Metabolites in Cell Culture Media by HILIC-LC/MS [ASMS 2018 MP-566](#)

Per maggiori informazioni:

www.agilent.com/chem/advancebio

Per trovare un centro assistenza clienti Agilent nel tuo Paese:

www.agilent.com/chem/contactus

Italia

numero verde 800 012 575

customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia Pacifico

inquiry_lsca@agilent.com

DE42995938

Le informazioni fornite potrebbero variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Stampato negli Stati Uniti, 30 novembre 2022
5994-5515ITE