



Evaluierung der Leachables in TPP TubeSpin® Bioreaktoren: Eine Migrationsstudie mit Methanol, 10% DMSO und WFI

Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben mehrere Studien gezeigt, dass bestimmte Stoffe, so genannte Leachables, aus Kunststoffen freigesetzt werden können ^[1]. *Leachables* sind Verbindungen, die bei bestimmungsgemäßer Verwendung in Prozessflüssigkeiten migrieren. Diese Leachables können potentiell unerwünschte Auswirkungen auf die Qualität und Sicherheit der Produkte haben, da sie bioaktiv sein können.

Um die Sicherheit von Proben in TPP-Gefässen für den Anwender zu gewährleisten, wurde eine Migrationsstudie mit TPP TubeSpin® Bioreaktoren durchgeführt.

Die Studie zeigte, dass weder unter dem Einfluss von 100 % Methanol, 10 % DMSO noch von WFI (Wasser für Injektionszwecke) Leachables aus den TPP TubeSpin® Bioreaktoren freigesetzt wurden.

Einleitung

In den letzten Jahren haben zahlreiche Studien gezeigt, dass aus verschiedenen Kunststoffartikeln austretende Leachables einen erheblichen Einfluss auf Experimente haben können. Betroffen von Leachables können alle Kunststoffartikel sein, wie z.B.: Petrischalen, Reaktionsgefässe, Pipettenspitzen sowie Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur. Diese können *das Wachstum von Neuronen verändern* ^[5], *zu Anomalien und inkonsistenten Ergebnisse bei enzymatischen Assays* ^[1-3], *zu Systemkontaminationen und Probenverlusten in der Analytik* ^[6], *als auch zu verfälschten DNA-Konzentrationen führen* ^[7]. *Leachables stören auch in der Zellkultur* und können das Zellwachstum negativ beeinflussen ^[8,9].

Um einen negativen Einfluss auf das Zellwachstum in den TPP-Bioreaktoren auszuschließen, wurde von einem externen, unabhängigen Labor eine Migrationsstudie durchgeführt. Als Migrationslösungen wurden gewählt

1. 10% DMSO; wird in der Zellkultur in Gefriermedien für die Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen verwendet.
2. Methanol; wird häufig als kostengünstige Alternative zu Ethanol zur DNA-Extraktion eingesetzt
3. WFI; ist ein Wasser von besonders reiner Qualität, das zur Herstellung von Parenteralia (z. B. Infusions- oder Injektionslösungen) verwendet wird.

Mit den entnommenen Migrationsproben wurde sowohl ein Target Screening als auch ein Non-Target Screening (NTS) durchgeführt. Unter Target Screening versteht man die gezielte Suche nach bekannten Substanzen. In dieser Studie wurde gezielt nach DiHEMDA und Oleamiden gesucht.

Eine NTS ist eine analytische Methode, bei der alle in einer Probe enthaltenen Substanzen, ob bekannt oder nicht, erfasst werden, um unbekannte Verbindungen zu entdecken. NTS wird eingesetzt, um komplexe Zusammensetzungen von Zellkulturmedien, Extrakten oder Proben zu analysieren, um unbekannte Metaboliten oder Stoffwechselprodukte zu identifizieren. Automatisierte Softwareunterstützung ermöglicht eine präzise Analyse komplexer Massenspektrometriedaten, wodurch unbekannte Verbindungen quantifiziert und ihre biologische Relevanz verstanden werden kann.



Material und Methoden

Die folgende Migrationsstudie wurde mit 50 ml und 600 ml TPP TubeSpin® Bioreaktoren durchgeführt. Jeweils drei TPP TubeSpin® Bioreaktoren (n=3) wurden zu 40% des Röhrchenvolumens mit 100% Methanol, 10% DMSO oder WFI befüllt. Die gefüllten Röhrchen wurden bei Raumtemperatur bis zu 8 Tage unter Schütteln inkubiert. Die Proben (n=3) wurden nach 0, 3, 24 und 192 Stunden entnommen und gepoolt. Die Konzentration der gesuchten Zielverbindungen DiHEMDA und Oleamide wurde mittels LC-MC quantifiziert.

Für das NTS wurde eine Full-Scan-HPLC-HRMS-Analyse der gepoolten Migrationsproben durchgeführt. Die Strukturaufklärung von auffälligen UV- und/oder Massenpeaks wurde mit verschiedenen Datenbanken durchgeführt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Quantifizierung von Oleamid und DiHEMDA zeigen keine signifikante Migration unter den getesteten Versuchsbedingungen (Tabellen 1 und 2). Die in der Zielanalyse gemessenen Konzentrationen wurden auch in den Waschleerproben mit hohen Signalen detektiert und daher als nicht nachweisbar eingestuft. Alle Proben wurden ebenfalls einer NTS unterzogen. Sowohl für WFI als auch für 10% DMSO und 100% Methanol waren keine Signale nachweisbar, was darauf hindeutet, dass mit dem getesteten Lösungsmittel keine Leachables extrahierbar waren.

Tab. 1: Ergebnisse der Quantifizierung von Oleamid in MeOH, WFI und DMSO-Migrationsexperimenten. Die gemessenen Konzentrationen (*) in der LC-HPLC waren jedoch auch in den Waschleerproben mit hohen Signalen nachweisbar und werden daher nicht als Migrationsverbindungen des TPP TubeSpin® 50 und 600 eingestuft.

Tubespin Bioreactor	Timepoint (h)	Oleamide concentration 100% MeOH [ng/mL]	Oleamide concentration WFI [ng/mL]	Oleamide concentration 10% DMSO[ng/mL]
50	0	7,6*	n.a.	12,3*
	3	n.a	10,6*	5,7*
	24	n.a.	n.a.	n.a.
	192	n.a.	n.a.	n.a.
600	0	7,6*	n.a.	12,3*
	3	5,5*	n.a.	n.a.
	24	n.a.	10,4*	10,5*
	192	n.a.	n.a.	n.a.



Tab.2: Ergebnisse der Quantifizierung von DiHEMDA in MeOH, WFI und DMSO-Migrationsexperimenten. Es waren keine Konzentrationen von DiHEMDA in allen Proben nachweisbar.

TubeSpin® Bioreactor	Timepoint (h)	DiHEMDA concentration ng/mL	DiHEMDA concentration ng/mL	DiHEMDA concentration ng/mL
50	0	n.a.	n.a.	n.a.
	3	n.a.	n.a.	n.a.
	24	n.a.	n.a.	n.a.
	192	n.a.	n.a.	n.a.
600	0	n.a.	n.a.	n.a.
	3	n.a.	n.a.	n.a.
	24	n.a.	n.a.	n.a.
	192	n.a.	n.a.	n.a.

Fazit

TPP TubeSpin® Bioreaktoren werden aus hochreinem Polypropylen hergestellt. Bei der Herstellung werden keine Trennmittel, Weichmacher, Biozide oder Schmiermittel verwendet. Durch die vorliegende Studie kann gezeigt werden, dass durch die Verwendung von hochreinem Polypropylen der USP Klasse VI und der speziellen TPP-Herstellung keine Auslaugung von bioaktiven Substanzen aus den Kunststoffchemikalien erfolgt. Somit wird für den Anwender das Risiko reduziert, dass durch unerwünschte Substanzen, die das Zellwachstum hemmen, Versuchsergebnisse durch enzymatisch aktive Leachables verfälscht werden oder gar Assays nicht reproduzierbar sind.

Glossar & Erläuterung

DiHEMDA	di(2-hydroxyethyl)methyldodecylammonium
DMSO	Dimethylsulfoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
LC	Liquid Chromatography
MeOH	Methanol
n.a.	Not Applicable, analyte not found
ng	Nanogram
NTS	Non-Target-Screening
NVOC	Non-Volatile Compound
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultra Violet



Literatur

- [1] McDonald, G Reid et al. "Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware." *Science (New York, N.Y.)* vol. 322,5903 (2008): 917. doi:10.1126/science.1162395
- [2] McDonald, Reid et al. "Bioactive Leachates from Lab Plastics Use of Plastic Disposables May Compromise Bioassay Results." *GIT laboratory journal Europe* 13 (2009): 24-26.
- [3] Olivieri, Aldo et al. "On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware." *Canadian journal of physiology and pharmacology* vol. 90,6 (2012): 697-703
- [4] Watson, John et al. "Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips." *Journal of biomolecular screening* vol. 14,5 (2009): 566-72.
- [5] Lee, Tet Woo et al. "Chemicals eluting from disposable plastic syringes and syringe filters alter neurite growth, axogenesis and the microtubule cytoskeleton in cultured hippocampal neurons." *Journal of neurochemistry* vol. 133,1 (2015): 53-65.
- [6] Schauer KL, Broccardo CJ, Webb KM, Covey PA, Prenni JE. Mass spectrometry contamination from Tinuvin 770, a common additive in laboratory plastics. *J Biomol Tech.* 2013 Jul;24(2):57-61
- [7] Lewis, L Kevin et al. "Interference with spectrophotometric analysis of nucleic acids and proteins by leaching of chemicals from plastic tubes." *BioTechniques* vol. 48,4 (2010): 297-302.
- [8] Budde, Dana et al. "Interaction of leachable model compounds and their impact on Chinese hamster ovary cell cultivation." *Biotechnology progress* vol. 37,4 (2021)
- [9] Eibl R, Steiger N, Fritz C, et al. Recommendation for leachables studies: standardized cell culture test for the early identification of critical films for CHO cell lines in chemically defined culture media. *Dechema.* 2014;1-22.

Disclaimer

TPP products are for research use only and not for clinical, diagnostic or therapeutic use. All products are intended for use by trained personnel that are familiar with safe laboratory practices.

TPP assumes no responsibility for damage or defects resulting from improper or unauthorized use. It is the responsibility of the user to store, handle, and use the products in accordance with the instructions provided.

TPP does not warrant the completeness or accuracy of this TechDoc. TPP's recommendations are intended as general guidelines and may not cover all possible scenarios. TPP shall not be liable for any indirect, incidental, consequential, or special damages arising out of the use or inability to use the information in this TechDoc.

Swiss law governs these terms of use and any resulting legal matters.