

Análisis de medios de cultivo celular en la industria biofarmacéutica mediante cromatografía líquida



La comprensión y el control de los procesos son esenciales para la fabricación de un producto bioterapéutico uniforme; un aspecto importante de este proceso son las condiciones del cultivo celular, incluidos los nutrientes y metabolitos disponibles para las células. La composición de los medios de cultivo celular es fundamental para el rendimiento del producto y la salud y supervivencia de las células utilizadas para fabricar el producto bioterapéutico. Los aditivos de los medios de cultivo celular también pueden afectar a las propiedades críticas del producto bioterapéutico, como los perfiles de glicosilación.

La velocidad del análisis suele ser una necesidad esencial para el análisis de aminoácidos, siendo cada vez más deseable la monitorización en línea directamente en el biorreactor para una toma rápida de decisiones¹. La reproducibilidad, la robustez y la vida útil de la columna también son desafíos habituales a los que se enfrenta el análisis de aminoácidos, y Agilent ofrece dos soluciones para hacer frente a estos desafíos de diferentes maneras.

El kit de columna y reactivos para el análisis de aminoácidos AdvanceBio produce resultados altamente fiables y reproducibles. La derivatización de aminoácidos está totalmente automatizada en el muestreador automático de un sistema de LC, lo que elimina tanto la variabilidad de la preparación manual de la muestra como los retrasos entre la preparación y el análisis que pudieran provocar la degradación de la muestra. La derivatización es necesaria para retener eficazmente los aminoácidos en una columna de fase reversa y detectarlos mediante UV o fluorescencia.

La columna AdvanceBio Amino Acid Analysis es una columna de fase reversa que ha sido especialmente tratada para protegerla frente al elevado pH preferido para las separaciones de aminoácidos, lo que da como resultado una columna resistente con una larga vida útil.

La segunda solución de Agilent para la separación de aminoácidos, la columna AdvanceBio MS Spent Media, es una separación por HILIC acoplada a detección por espectrometría de masas (MS). Este enfoque alternativo a la retención hace innecesaria la derivatización y permite un análisis más completo del cultivo celular con un solo método. Las muestras pueden extraerse del biorreactor y analizarse rápidamente tras una breve centrifugación para precipitar los restos celulares. El desarrollo de métodos de HILIC tiene sus propios retos, pero, si se siguen las prácticas recomendadas que se describen a continuación, se obtienen resultados robustos y fiables.

La elección de un flujo de trabajo para el análisis de medios consumidos depende de una combinación de necesidades analíticas y, en algunos casos, de preferencias:

- **¿Está disponible o se prefiere la detección por MS?**
En caso afirmativo, HILIC-MS permite la monitorización de una amplia gama de analitos. Si solo se dispone de detección UV o de fluorescencia, se recomienda un método de fase reversa para el análisis de aminoácidos.
- **¿Es necesario monitorizar solo los aminoácidos o también otros componentes del medio de cultivo celular?**
Si es necesario controlar otros nutrientes o desechos celulares, como las vitaminas del grupo B, los azúcares, los nucleótidos, las poliaminas o el lactato, puede ser más eficaz desarrollar un ensayo multiplexado mediante HILIC-MS en el que dichos metabolitos se analicen simultáneamente con los aminoácidos. Si solamente se precisa el análisis de aminoácidos, entonces un método de LC/UV en fase reversa con aminoácidos derivatizados podrá satisfacer sus necesidades.
- **¿Prefiere derivatizar o no derivatizar los aminoácidos?**
Al margen de otras circunstancias, ésta puede ser la base para elegir entre LC/UV en fase reversa o LC/FLD con derivatización de la muestra o HILIC-MS sin derivatización.

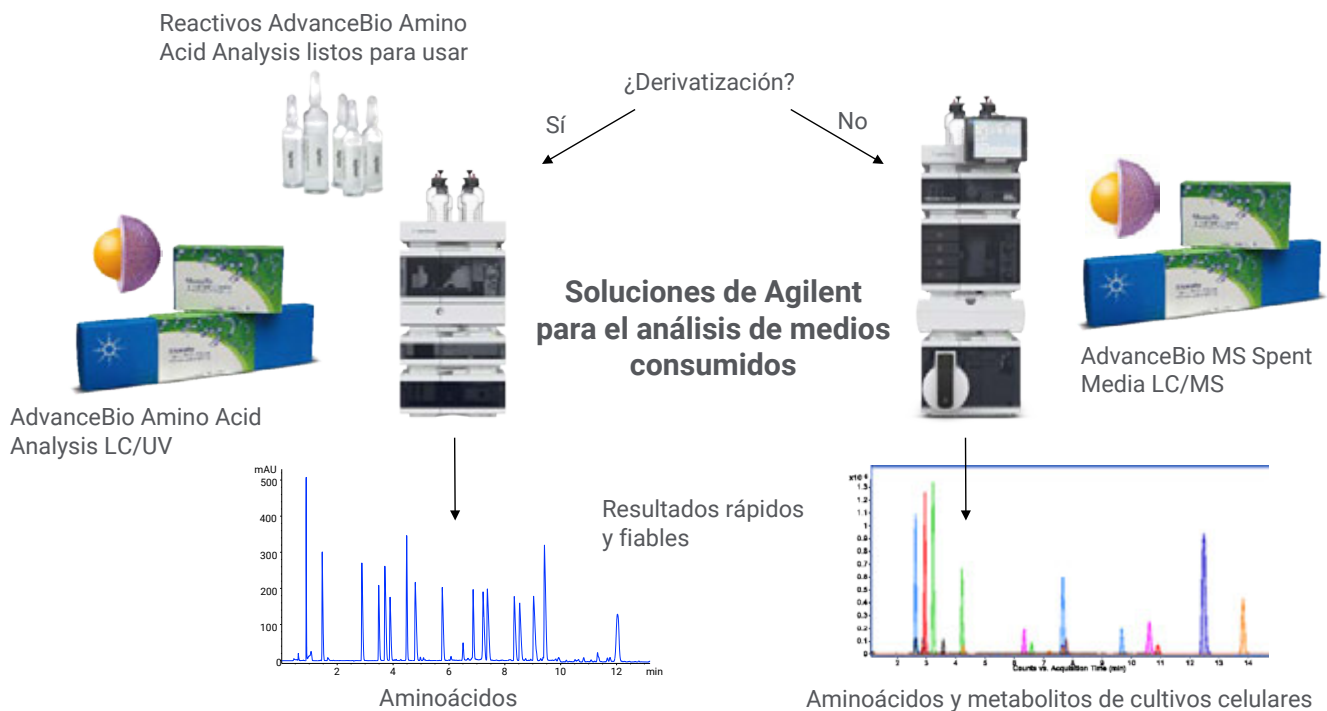


Figura 1. La elección de un flujo de trabajo con medios usados depende de los analitos que deban monitorizarse, de si se prefiere derivatizar la muestra y de las opciones de detector disponibles.

Prácticas recomendadas para llevar a cabo un análisis eficaz de aminoácidos

Preparación de muestras

- Centrifugue las muestras para precipitar cualquier materia particulada de las muestras del biorreactor.
- Para los aminoácidos marcados, sustituya diariamente el reactivo de derivatización, el tampón de borato y los patrones de aminoácidos.
- Para las separaciones por HILIC, diluya las muestras con acetonitrilo para obtener la mejor forma de pico cromatográfico. Para obtener más información sobre el impacto del disolvente de la muestra y el volumen de inyección en la forma del pico cromatográfico, consulte este [Resumen técnico sobre el desarrollo de métodos de HILIC](#).²

Separación cromatográfica - General

- Reduzca la velocidad de incremento del flujo desde el valor predeterminado hasta 1 ml/min o menos. El incremento gradual del flujo prolonga la vida útil de la columna y contribuye a evitar la sobrepresión repentina. En el software Agilent, este ajuste se encuentra en la sección Avanzado de los controles de la bomba para LC.
- Ajuste el límite de presión máxima del método de LC para que coincida con el de la columna (aquí se recomiendan 600 bares para todas las columnas). Esto es esencial si las capacidades de presión máximas del sistema de LC superan las de la columna.

Separación cromatográfica - Fase reversa

- Recalibre semanalmente los tiempos de retención y los factores de respuesta.
- Controle el rendimiento de la columna y de la precolumna eligiendo un par de especificaciones y siguiéndolas periódicamente; por ejemplo, la resolución entre la leucina y la isoleucina.
- Evite utilizar la velocidad máxima de mezclado durante la derivatización para evitar un desgaste excesivo del muestreador automático.

No deje nunca la fase móvil A (Tabla 1: Na₂HPO₄ 10 MM y Na₂B₄O₇ 10 mM, pH 8,2) en la columna, ni siquiera solo durante la noche. Para el almacenamiento a corto plazo, guarde siempre la columna en fase móvil B (Tabla 1: acetonitrilo, metanol y agua (45/45/10, v/v/v). Para el almacenamiento a largo plazo, guarde la columna en acetonitrilo/agua 50/50.

Separación cromatográfica: HILIC

- Los aminoácidos no son sensibles a los metales, sin embargo, otros analitos, como las moléculas que contienen fosfatos o las poliaminas, pueden ser extremadamente sensibles a la presencia de metales en el sistema de LC. Para analizar compuestos que no son aminoácidos, se recomienda considerar una columna para LC bioinerte, o minimizar de otro modo la presencia de metales en el recorrido de la muestra sustituyendo los tubos metálicos por PEEK, sustituyendo las botellas de disolvente de vidrio por plástico, o siguiendo un protocolo de desactivación como el descrito en el [Resumen técnico sobre el desarrollo de métodos de HILIC](#).² La columna AdvanceBio MS Spent Media tiene componentes de acero inoxidable con recubrimiento de PEEK, por lo que ya tiene una ruta de flujo sin metales.
- Se recomienda preparar las fases móviles para HILIC con una disolución madre de tampón, tal y como se describe en la [guía del usuario](#)³ de la columna MS Agilent AdvanceBio Spent Media y en el método de muestreo que figura a continuación. De esta forma se minimizan los problemas de solubilidad de las sales en acetonitrilo y se aumenta la uniformidad de la fuerza iónica entre las fases móviles A y B.
- El pH de la fase móvil debe controlarse para que la fase estacionaria sea uniforme y, en consecuencia, las separaciones reproducibles. Si se trabaja con un pH de la fase móvil que esté dentro de la capacidad amortiguadora del sistema de tampón elegido ($pK_a \pm 1$) se obtendrá una mejor reproducibilidad.
- Cuanto mayor sea el contenido acuoso de la matriz de la muestra, menor deberá ser el volumen de inyección para evitar los picos desdoblados.
- Las columnas de HILIC tardan más en reequilibrarse entre inyecciones que las columnas de fase reversa. Un reequilibrado adecuado es fundamental para la reproducibilidad. Mantenga siempre > 3 % de H₂O para conservar una capa acuosa sobre la fase estacionaria sólida. Considere la posibilidad de iniciar el gradiente en el % acuoso más alto que retenga el analito menos polar para que el reequilibrado sea más rápido.

Espectrometría de masas

- No utilice tampones que contengan fosfatos con la detección por MS.
- Elija tampones volátiles como el acetato de amonio o el formiato de amonio para la detección por MS. Tenga en cuenta que no podrá detectar el formiato cuando utilice una fase móvil que contenga formiato; esto mismo sucede con el acetato.
- Desvíe el efluente de LC a los residuos fuera de los tiempos de retención de interés, especialmente durante un lavado con un contenido elevado de disolventes orgánicos al final del método y, si fuera posible, cuando eluye el volumen básico.
- Utilice disolventes de calidad para HPLC o superior.
- Establezca una rutina periódica de limpieza de la fuente de MS.

Parámetro	Valor	
Columna	AdvanceBio Amino Acid Analysis 4,6 x 100 mm o 3,0 x 100 mm	
Instrumento	Sistema de LC Agilent 1290 Infinity II	
Flujo	1,5 ml/min para columnas de 4,6 mm de d. i. 0,62 ml/min para columnas de 3 mm de d. i.	
Fase móvil A	Na ₂ HPO ₄ 10 mM y Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mM, pH 8,2	
Fase móvil B	Acetonitrilo, metanol y agua (45/ 45/ 10, v/v/v)	
Gradiente	Tiempo (min)	% de B
	0	2
	0,35	2
	13,4	57
	13,5	100
	15,7	100
Detector	Señal A: 338 nm, ancho de banda de 10 nm; longitud de onda de referencia de 390 nm, ancho de banda de 20 nm	
	Señal B: 262 nm, ancho de banda de 16 nm; longitud de onda de referencia de 324 nm, ancho de banda de 8 nm	

Primeros pasos

Análisis en fase reversa de los aminoácidos derivatizados

El análisis de aminoácidos con derivatización automatizada y análisis por LC/UV o fluorescencia se describe minuciosamente en esta [guía práctica](#)⁴. Esta guía contiene instrucciones para la preparación de patrones, la programación del muestreador automático para ejecutar la derivatización de la muestra y el método cromatográfico.

Tabla 1. Método de LC para el análisis en fase reversa de aminoácidos marcados utilizando la columna AdvanceBio Amino Acid Analysis.

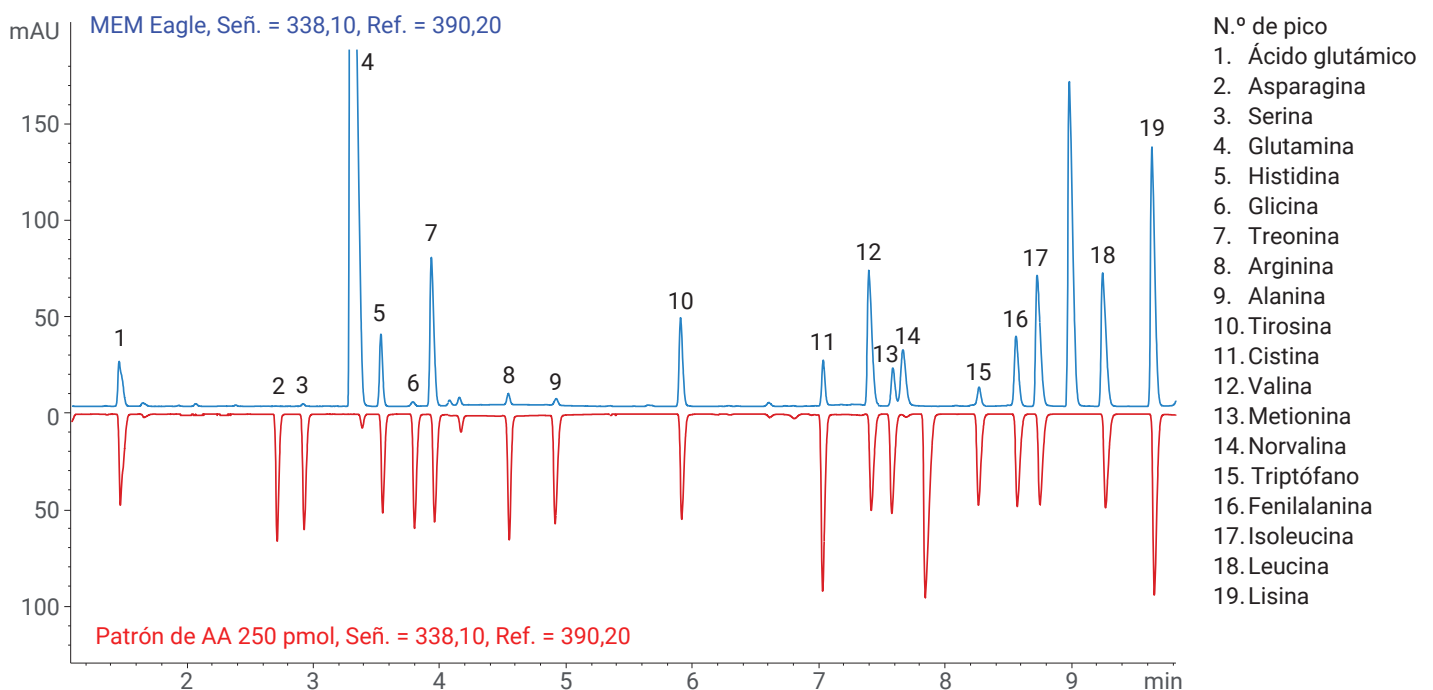


Figura 2. Ejemplo de separación de aminoácidos marcados con OPA y FMOC utilizando la columna AdvanceBio Amino Acid Analysis.⁵

Análisis mediante HILIC de aminoácido sin derivatizar

A continuación se presenta un método de muestreo utilizado para una gran variedad de metabolitos además de los aminoácidos. Para conocer un método de muestreo aplicado a los aminoácidos, consulte esta [nota de aplicación](#)⁶ o este [folleto](#)⁷.

Parámetro	Valor														
Columna	AdvanceBio MS Spent Media, 2,1 x 100 mm														
Instrumento	Sistema de LC bioinerte Agilent 1260 Infinity II														
Flujo	0,5 ml/min														
Fase móvil	pH bajo, detección por MS en modo de ionización positiva: A = 10 % de formiato amónico 200 mM en agua, pH 3, 90 % de agua B = 10 % de formiato amónico 200 mM en agua, pH 3, 90 % de acetonitrilo <i>La concentración salina final es 20 mM.</i>														
Gradiente	<table border="1"><thead><tr><th>Tiempo (min)</th><th>% de 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>	Tiempo (min)	% de B	0	100	10	75	20	20	21	20	21,1	100	28	100
Tiempo (min)	% de B														
0	100														
10	75														
20	20														
21	20														
21,1	100														
28	100														
Temperatura de la columna	40 °C														
Detector	TOF Agilent 6230														

Tabla 2. Método de LC para el análisis por HILIC de aminoácidos y otros analitos de medios de cultivo celular utilizando la columna AdvanceBio MS Spent Media.

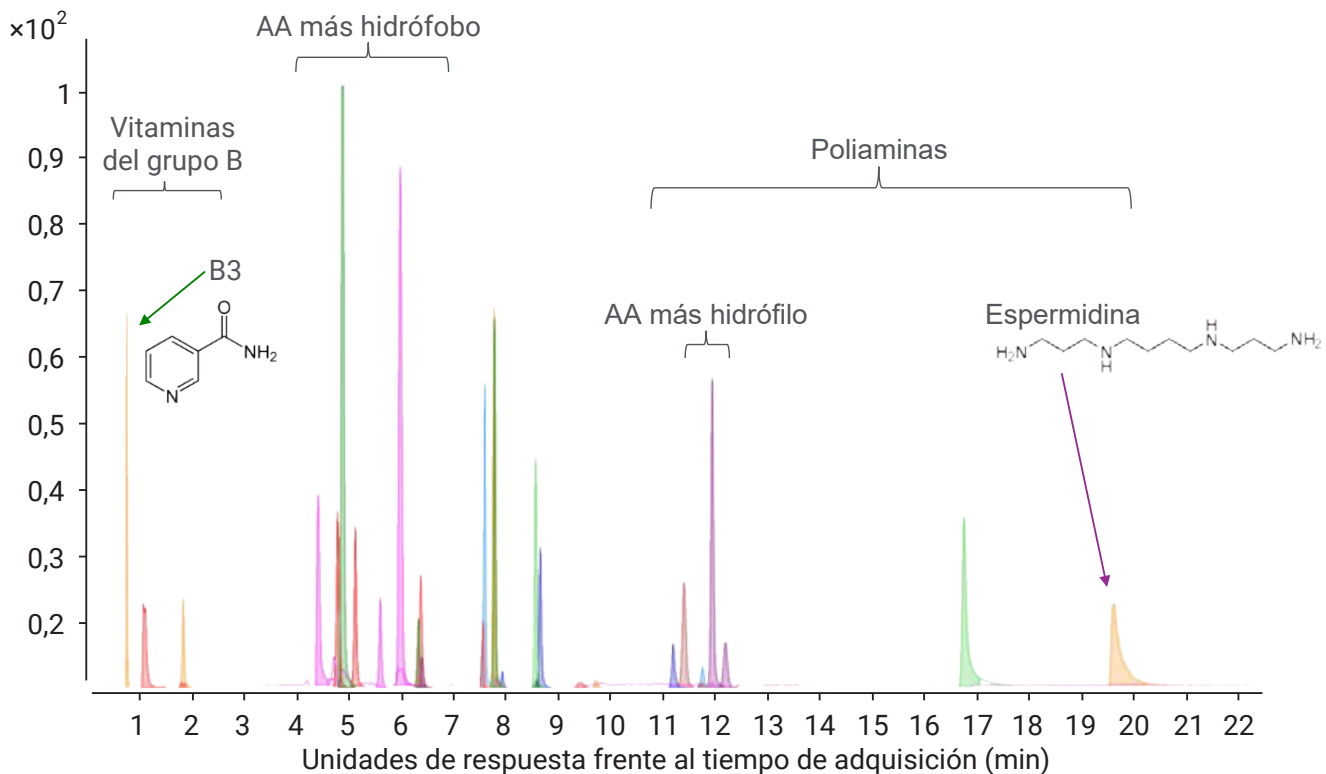


Figura 3. Separación de muestras de aminoácidos, vitaminas del grupo B y poliaminas utilizando la columna AdvanceBio MS Spent Media con detección de TOF.⁸

Selección sencilla e información para pedidos

Para encargar los artículos que se indican en las tablas que aparecen a continuación en la tienda en línea de Agilent, añada los artículos a la lista de Productos favoritos haciendo clic en los enlaces de cada encabezado de Mi lista n.º. A continuación, puede introducir las cantidades de los productos que necesita, añadir los productos a la cesta y proceder a la compra. Su lista permanecerá guardada en Productos favoritos para que pueda usarla para futuros pedidos.

Si es la primera vez que utiliza Productos favoritos, se le pedirá que introduzca su dirección de correo electrónico para verificar la cuenta. Si ya tiene cuenta de Agilent, podrá iniciar sesión. En cambio, si no tiene una cuenta registrada de Agilent, deberá registrarse para hacerse una. Esta función solo es válida en las regiones que tengan habilitado el comercio electrónico. Todos los artículos se pueden pedir también a través de sus canales habituales de venta y distribución.

Descripción	Referencia
Mi lista 1: Columnas Advance Bio Amino Acid Analysis (AAA)	
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 3,0 x 100 mm, columna para LC	695975-322
Columna para LC AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 4,6 x 100 mm, 2,7 µm	655950-802
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 3,0 x 5 mm, precolumna, 3/paq.	823750-946
AdvanceBio Amino Acid Analysis (AAA), 4,6 x 5 mm, precolumna, 3/paq.	820750-931
Mi lista 2: Columnas de análisis 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
Mi lista 3: Patrones y reactivos AdvanceBio AAA	
Kit de reactivos para aminoácidos AdvanceBio; 1-250 pmol/µl	5190-9426
Tampón de borato 100 ml	5061-3339
Reactivo FMOC, 2,5 mg/ml en acetonitrilo, 10 x 1 ml	5061-3337
Ditiodipropiónico, 5 g	5062-2479
Patrón para AA, 1 nmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3330
Patrón para AA, 250 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3331
Patrón para AA, 100 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3332
Patrón para AA, 25 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3333
Patrón para AA, 10 pmol/µl, 10 x 1 ml	5061-3334
Kit complementario de aminoácidos	5062-2478
Mi lista 4: Consumibles para HPLC	
Conjunto de conectores de conexión rápida Agilent InfinityLab (para conexión en el inyector de columna)	5067-5965
Capilar de conexión rápida Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 105 mm (bioinerte, para el conector de conexión rápida)	5500-1578
Capilar de conexión rápida Agilent InfinityLab de acero inoxidable 0,12 x 105 mm (para el conector de conexión rápida)	5500-1173
Conector de giro rápido Agilent InfinityLab (para conexión en la salida de la columna)	5067-5966
Capilar de giro rápido Agilent InfinityLab MP35N 0,12 x 280 mm (para el conector de giro rápido)	5500-1596
Capilar de giro rápido Agilent InfinityLab de acero inoxidable 0,12 x 280 mm (para el conector de giro rápido)	5500-1230
Herramienta de montaje para conectores de giro rápido	5043-0915

Descripción	Referencia
Mi lista 5: Recipientes para muestras	
Vial de alta recuperación, tapón de rosca, inserto fijo, transparente, volumen de inserto de 300 µl, 100/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 12 mm)	5188-6591
Tapón de rosca, azul, séptum de PTFE/silicona roja, 100/paq. Tamaño del tapón: 12 mm	5182-0717
Vial, tapón de encapsulado/a presión, de polipropileno, 250 µl, 1.000/paq. Tamaño del vial: 12 x 32 mm (tapón de 11 mm)*	5190-3155
Tapón a presión, transparente, séptum de PTFE/silicona/PTFE, 100/paq. Tamaño del tapón: 11 mm (para 5190-3155)	5182-0566
Placa de 96 pocillos InfinityLab/0,5 ml, 30/paq.	5043-9310
Almohadilla de sellado para placa de pocillos InfinityLab, 50/paq.	5042-1389
Mi lista 6: Disolventes y aditivos	
Agua ultrapura para LC/MS InfinityLab, 1 l	5191-4498
Acetonitrilo ultrapuro para LC/MS InfinityLab, 1 l	5191-4496
Ácido fórmico, 5 ml	G2453-85060
Aditivo desactivador InfinityLab, 25 ml	5191-3940
Aditivo desactivador InfinityLab, 50 ml	5191-4506
Mi lista 7: Filtración de disolventes	
Dispositivo de filtración de disolventes InfinityLab	5191-6776
Matraz de filtración de disolventes InfinityLab, vidrio, 2 l	5191-6781
Membrana de filtro, 47 mm, de nailon, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4341
Membrana de filtro, 47 mm, de celulosa regenerada, tamaño de poro de 0,2 µm, 100/paq.	5191-4340
Filtro de vidrio para botella de disolvente, entrada de disolvente, 20 µm	5041-2168
Mi lista 8: Manipulación de disolventes	
Kit de inicio de tapas InfinityLab Stay Safe	5043-1222
Botella de disolvente InfinityLab, transparente, 1 l	9301-6524
Botella de disolvente InfinityLab, ámbar, 1 l	9301-6526
Botella de disolvente, transparente, 2 l	9301-6342
Botella de disolvente, ámbar, 2 l	9301-6341
Botella de purga InfinityLab Stay Safe	5043-1339
Depósito de residuos InfinityLab, GL45, 6 l con tapa Stay Safe	5043-1221
Filtro de carbón InfinityLab con lector de tiempo, 58 g	5043-1193

Referencias:

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. Análisis de aminoácidos sin derivatizar por LC/MS para la monitorización de cultivos celulares en biorreactores [5991-8816ES](#)
7. Flujos de trabajo de Agilent AdvanceBio para análisis de medios usados [5991-8817ES](#)
8. Analysis of Underivatized Amino Acids and Metabolites in Cell Culture Media by HILIC-LC/MS [ASMS 2018 MP-566](#)

Para obtener más información:

www.agilent.com/chem/advancebio

Encuentre un centro de atención
al cliente de Agilent en su país:

www.agilent.com/chem/contactus

España

901 11 68 90

customercare_spain@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Asia-Pacífico

inquiry_lsca@agilent.com

DE42995938

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
Impreso en EE. UU., 30 de noviembre de 2022
5994-5515ES