

# Solución Cuantitativa LC-MS para el Análisis Dirigido de Medios de Cultivo Celular

Con el sistema **SCIEX QTRAP® 6500+ LC-MS/MS**

Zuzana Demianova<sup>1</sup> and Lei Xiong<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>SCIEX, Brea, CA; <sup>2</sup>SCIEX, Redwood City, CA

La optimización de los medios de cultivo celular (CCM) es un paso crítico durante el desarrollo y el escalamiento de la producción bioterapéutica. En particular, el énfasis en la calidad por diseño (QbD) ha hecho necesario comprender cómo cambian los componentes de CCM durante la producción y cómo estos cambios se relacionan con la calidad del producto. Existe una necesidad vital de desarrollar ensayos analíticos que puedan proporcionar un perfil de medios de cultivo celular completo y exacto para una amplia gama de tipos de bioterapéuticos producidos a partir de células vivas.

En comparación con las técnicas analíticas y de biosensores tradicionales (p. Ej., Espectrofotometría UV-visible, resonancia magnética nuclear y espectroscopía Raman; las técnicas de cromatografía líquida de espectrometría de masas (LC-MS) proporcionan una solución efectiva para el análisis de medios de cultivo celular. Alta sensibilidad, selectividad, velocidad y robustez; permite la identificación y cuantificación inequívoca de una gran cantidad de analitos en un solo análisis.

Para permitir el análisis rápido de una amplia gama de componentes de medios de cultivo celular, SCIEX ha desarrollado un método para CCM en el sistema QTRAP 6500+ acoplado al sistema ExionLC™. Este nuevo método para CCM se dirige a nutrientes importantes, incluidos aminoácidos, vitaminas, carbohidratos, ácidos grasos, ácido nucleico, ácidos inorgánicos y otros compuestos esenciales que se encuentran en los medios. Al ofrecer una cuantificación sensible, reproducible y robusta, se pueden analizar 110 componentes



clave de medios de cultivo celular en un único método LC-MS / MS.

## Principales Ventajas del método para Medios de Cultivo Celular

- SCIEX QTRAP® 6500+ acoplado al sistema ExionLC ofrece velocidad, alta sensibilidad, reproducibilidad y funcionalidad lineal de trampa de iones
- La columna Phenomenex Kinetex® F5 proporciona una excelente resolución de analitos objetivo y diferentes interferencias químicas
- La biblioteca MRM identifica 110 nutrientes clave del cultivo celular y contiene dos MRM por compuesto con algunas excepciones.
- La biblioteca precisa de espectros de metabolitos en masa para la confirmación de compuestos con más de 550 metabolitos esenciales para procesos biológicos
- Potente solución de software integral: el Software SCIEX OS-Q ofrece flujos de trabajo cualitativos y cuantitativos versátiles

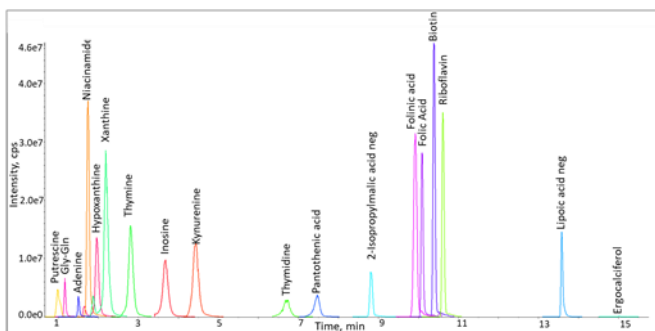


Figura 1. Cromatogramas de iones extraídos representativos de componentes seleccionados de la biblioteca de compuestos analizados utilizando un algoritmo Scheduled MRM™.

## Seccion Experimental

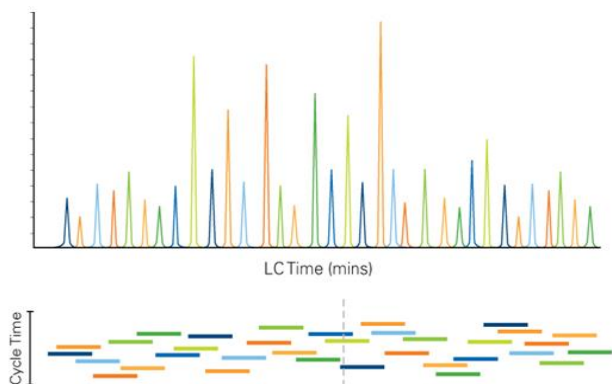
**Preparación de la muestra:** Se preparó una mezcla maestra de cultivo celular usando estándares de varios grupos que se enumeran en la Tabla 1 y contenía los componentes individuales enumerados en la Tabla 2. Se preparó una solución madre de estándares individuales (1 mg/mL) con diferentes solventes dependiendo de la solubilidad. Se preparó una mezcla maestra final que contenía todos los estándares (6.67-20 µg/mL dependiendo de la señal del analito).

El medio de cultivo celular (medio CD CHO, Gibco) se diluyó 5 veces con ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo al 50% y se centrifugó, el sobrenadante se diluyó adicionalmente 60 veces con ácido fórmico al 0.1%.

**Tabla 1: Resumen de la cobertura del componente de medios de cultivo celular entre varios grupos de compuestos.**

Grupo de componentes	Numero de componentes
Aminoácidos	39
Vitaminas	15
Carbohidratos	4
Ácidos grasos	5
Ácidos nucleicos	17
Otros	32

**Cromatografía:** Los analitos se separaron en un sistema ExionLC usando una columna Phenomenex Kinetex F5 (100 mm x 2.1 mm ID, tamaño de partícula 2.6 µm). El tiempo total del método fue de 20 min a un flujo de 200 µL/min. La fase móvil A era ácido fórmico al 0.1% en agua, y la fase móvil B era



**Figura 2. Algoritmo Scheduled MRM Pro.** Usando el conocimiento del tiempo de elución de cada analito, cada transición MRM se monitorea solo durante un breve período de tiempo de retención. Esto permite monitorear muchas más transiciones MRM en una sola inyección de LC, mientras se mantienen los tiempos de permanencia maximizados y los tiempos de ciclo optimizados.

acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%. La temperatura del horno de columna fue de 40°C. El volumen de inyección fue de 5 µL.

**Especificaciones de masa:** Los parámetros MRM para 110 componentes de cultivo celular fueron optimizados por estándares químicos para un sistema SCIEX QTRAP 6500+ y un sistema Triple Quad™ 6500+. El algoritmo Schedule MRM Pro (sMRM) se utilizó para optimizar los tiempos de ciclo y maximizar el dwell time para cada transición MRM. Al programar las transiciones alrededor del tiempo de retención esperado de un analito, el método sMRMs permite monitorear significativamente más transiciones MRM simultáneamente sin sacrificar la precisión analítica superior (Figura 2). Se monitorearon dos transiciones MRM para cada analito, con algunas excepciones cuando solo un MRM estaba disponible o los analitos ionizan en modo positivo y negativo. Esto permite realizar comparaciones con las proporciones estándar para ayudar a identificar los problemas de integración. Este método contiene 178 MRM positivos y 54 MRM negativos.

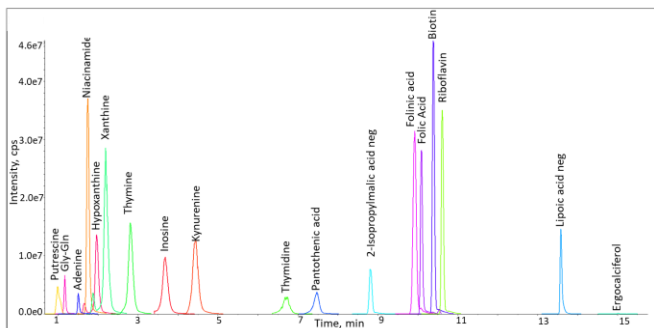
El flujo de trabajo MIDAS™ se utilizó para confirmar los componentes de la mezcla maestra en función de su patrón de fragmentación MS / MS completo de cada analito.

Los ajustes del espectrómetro de masas fueron: gas cortina 30 psi, GS1 50 psi, GS2 50 psi, ISVF 4500 V o -4500 V, TEM. 400°C. El cambio rápido de polaridad permitió el análisis en modos de ionización positiva y negativa dentro del método.

**Procesamiento de datos:** Los datos Scheduled MRM se procesaron utilizando el Software SCIEX OS-Q 1.5 con un flujo de trabajo cuantitativo específico. El algoritmo MQ4 se utilizó para la integración de los picos de analito. La confirmación de los componentes se llevó a cabo utilizando el patrón completo de fragmentación MS/MS (MIDAS) en el Software SCIEX OS-Q 1.5 con flujo de trabajo cualitativo y la Biblioteca de espectros de metabolismo de masa precisa (AMMSL).

## Resultados y Discusión

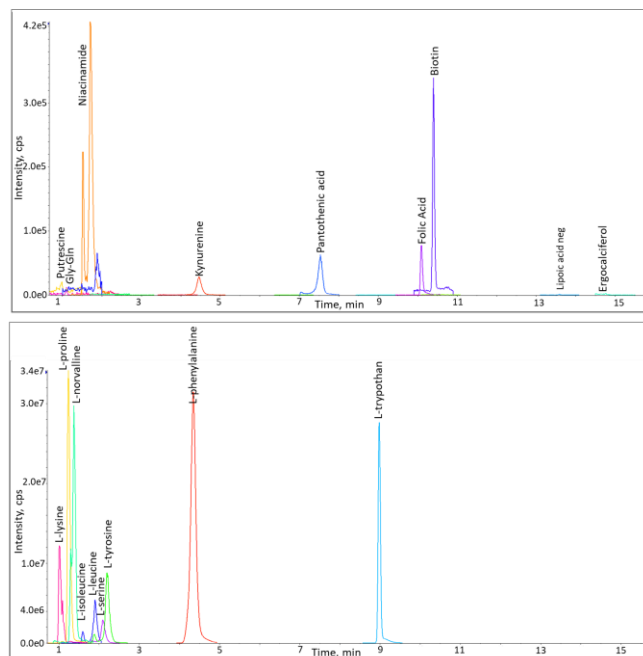
Un desafío importante encontrado en el análisis de medios de cultivo celular es la separación y retención cromatográfica de varios grupos de componentes, incluidos los isómeros y los analitos polares. Recientemente, el uso de HILIC se ha convertido en un enfoque para la separación de algunas clases de componentes del CCM. A medida que aumenta la diversidad de los componentes, la ventaja de HILIC disminuye en comparación con los enfoques tradicionales de fase inversa. Además, los tiempos de ejecución generales con HILIC son con frecuencia más largos debido al reequilibrio prolongado y, como tal, la reproducibilidad del tiempo de retención puede verse afectada.



**Figura 3. Cromatogramas de iones extraídos representativos de componentes seleccionados de la biblioteca de componentes MRM.** El panel A muestra varios XIC de componentes de la mezcla de cultivo celular estándar.

SCIEX desarrolló un método para CCM que separa varias clases de compuestos (Tabla 1) utilizando la cromatografía de fase inversa. Para este propósito, seleccionamos la columna Kinetex F5. La química de esta columna proporciona una separación con alto poder de resolución para analitos químicamente diferentes en función de cinco interacciones diferentes (enlaces hidrófobos, aromáticos, electrostáticos, estéricos / planos e hidrógeno) que permiten una separación eficiente en una amplia gama de propiedades moleculares.

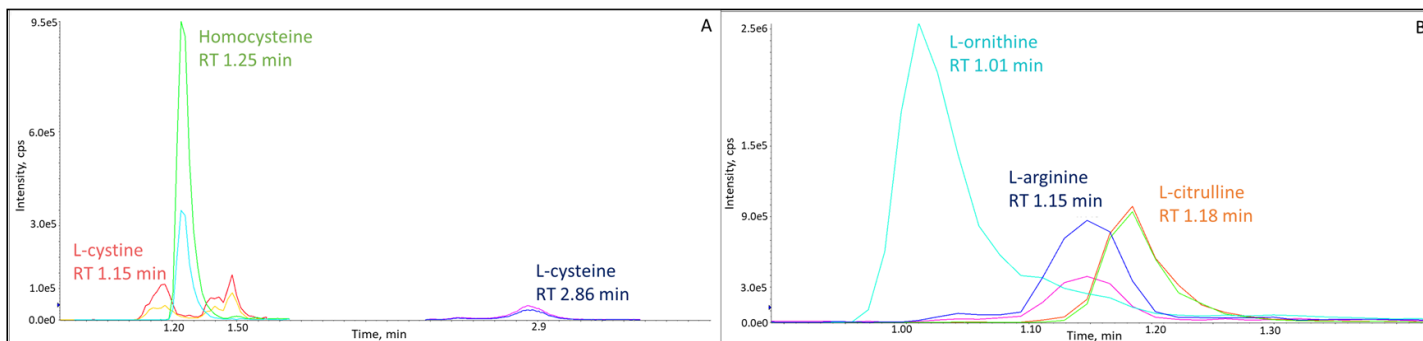
La Figura 3 ilustra cromatogramas de iones extraídos de componentes representativos de la mezcla maestra estándar de medios de cultivo celular, para mayor claridad, solo se muestra un MRM por componente para componentes seleccionados. Como prueba de concepto, el medio de cultivo celular Gibco (CD CHO) se analizó utilizando este método para CCM. Como se muestra en la Figuras 4, se encuentran varios componentes en el medio CD CHO que se alinean con la mezcla maestra estándar utilizada para el desarrollo del método. Debido a las diferencias de concentración, los componentes de baja abundancia se muestran en el panel superior de la Figura 4



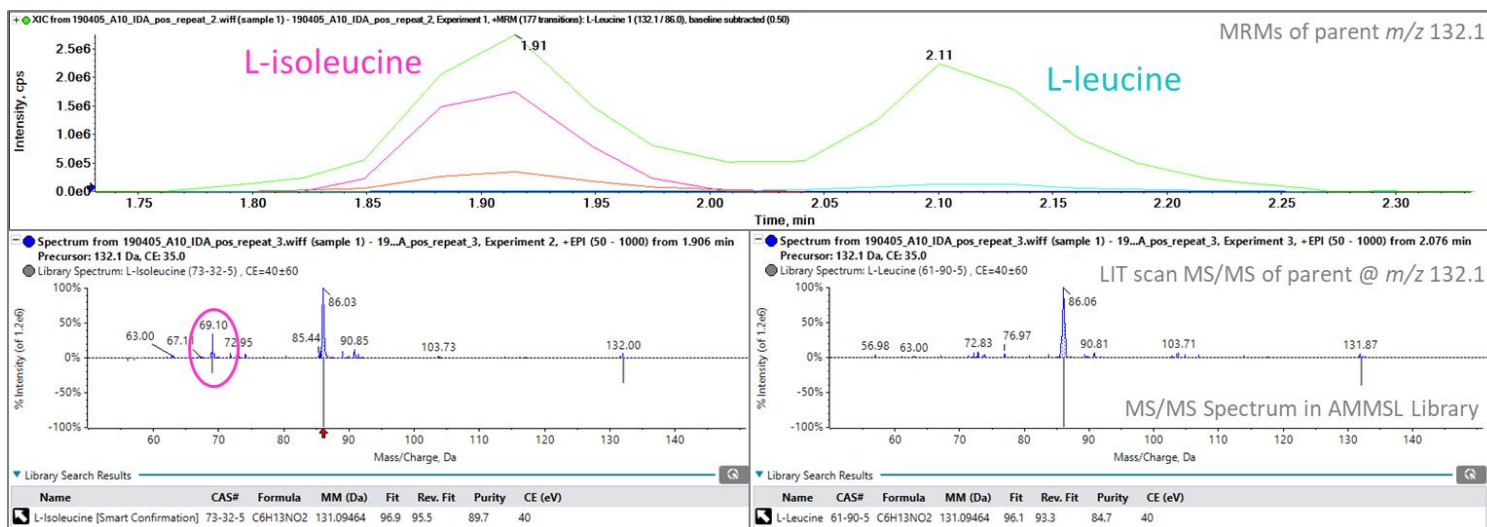
**Figura 4. El panel superior muestra varias XIC de componentes poco abundantes de los medios de cultivo celular de Gibco (medio CD CHO).** El panel inferior muestra los aminoácidos de los medios de cultivo celular de Gibco (medio CD CHO).

mientras que los aminoácidos se presentan por separado en el panel inferior.

Un desafío particular con los métodos genéricos para el análisis CCM es la separación de compuestos estrechamente relacionados. Un ejemplo es la capacidad de distinguir entre L-cisteína y L-cistina debido a patrones de fragmentación similares. La L-cistina es uno de los cinco aminoácidos (arginina, cistina, glutamina, histidina, tirosina) que son esenciales para la supervivencia y el crecimiento de las células en cultivo.<sup>1</sup> La L-cistina, el dímero de la L-cisteína, se elabora de forma no enzimática a través de la oxidación reversible del residuo de tiol. Monitorear las formas en que las células usan estos



**Figura 5. Ejemplo de separación entre el aminoácido y sus homólogos, su metabolito y dímero.** El panel A muestra cromatogramas de iones extraídos de MRM de cisteína, cistina y homocisteína. El panel B muestra cromatogramas de iones extraídos de MRM de L-Arginina, L-Ornitina y L-Citrulina. Estos ejemplos se extrajeron de la separación de la mezcla maestra estándar de cultivo celular en la columna Kinetex F5 en 20 minutos.

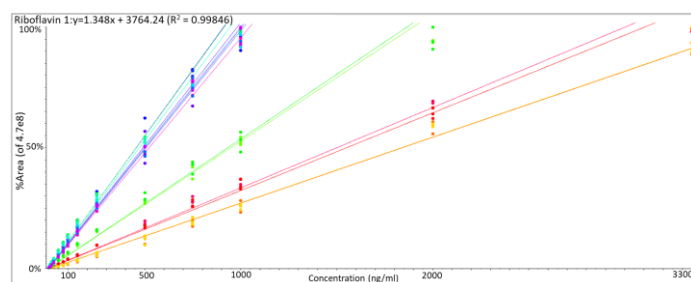


**Figura 6. Flujo de trabajo representativo de MIDASTM para L-leucina y L-isoleucina con coincidencia de compuestos de la biblioteca SCIEX Accurate Metabolite Spectra (AMMSL).** El panel superior ilustra la separación de las isoformas de L-leucina con XIC de los MRM correspondientes. Los paneles inferiores muestran en el espectro azul el escaneo LIT de todos los iones MS / MS medidos de iones parentales L-leucina y L-isoleucina y el espectro gris muestra el espectro de la biblioteca de L-isoleucina y L-leucina de la biblioteca AMMSL.

componentes puede ser importante durante el desarrollo de un medio exitoso.

Usando el método presentado aquí, la L-cistina y la L-cisteína están bien separadas entre sí, y también se distinguen por MRM únicos (Figura 5A). Otro ejemplo es la detección de L-Arginina y sus metabolitos, como L-ornitina y L-citrulina. La L-citrulina se convierte en L-arginina2 durante la biosíntesis. La separación de estos componentes se muestra en la Figura 5B usando MRM para cada uno.

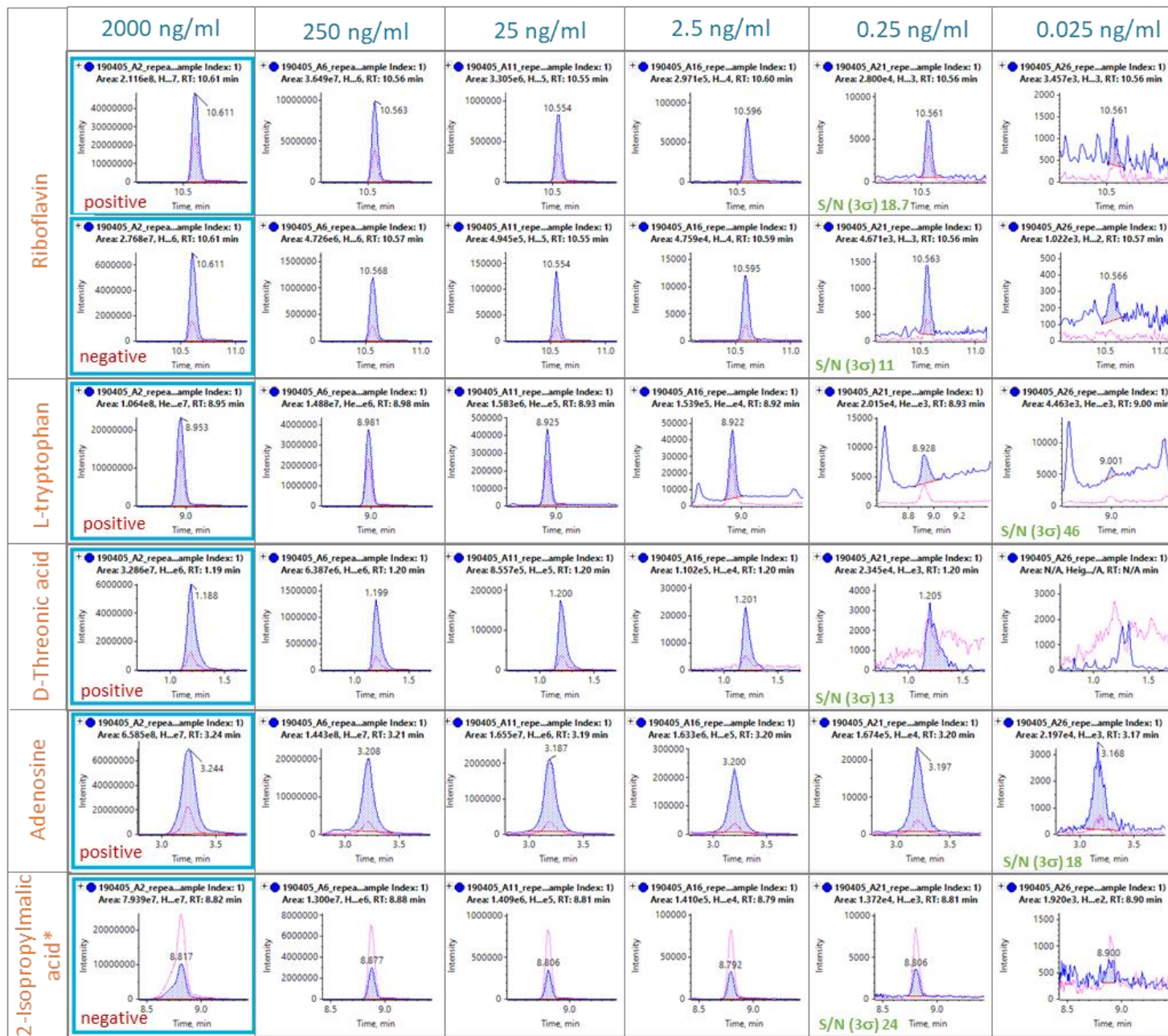
La separación de isómeros es un buen indicador de una selectividad de columna suficiente. La Figura 6, panel superior, muestra una buena separación basal de L-leucina y L-isoleucina. La separación de línea base y los MRM únicos permiten la asignación correcta de cada isómero.



**Figura 7. Curvas de calibración lineal del componente de cultivo celular representativo por grupo medido en modo positivo y negativo.** La pendiente de concentración para T-triptófano y ácido linoleico es de 0.001 ng/mL a 3350 ng/mL (líneas naranja y roja), la adenosina es de 0.001 ng/mL a 2000 ng/mL (líneas verdes), ácido D-treónico y riboflavina pos / neg es de 0.001 ng/mL a 1000 ng/mL, y el ácido 2-isopropilmálico 1.5 ng / mL a 2000 ng/mL (líneas azul, púrpura y turquesa). Se eliminaron los valores atípicos y el valor promedio de R2 de estos componentes es 0.98893. El eje Y se presenta como % de área de 4.7e8 y el eje X es la concentración en ng/mL.

En los casos en que se requiera la asignación del componente correcto o la identificación de un nuevo componente, el flujo de trabajo MIDAS™ permite la recopilación de datos MRM e IDA dentro de la misma adquisición. La Figura 6 inferior ilustra la confirmación de L-leucina y L-isoleucina usando los datos adquiridos usando el flujo de trabajo MIDAS. Como se muestra, la identificación de cada isómero se basa en la correspondencia espectral MS / MS entre los espectros MS / MS experimentales y teóricos de la biblioteca AMMSL. En este ejemplo, la posición del isómero se confirma mediante un fragmento específico de L-isoleucina MS / MS (69.10 m / z) que no está presente en el patrón de L-leucina MS / MS. Para cada componente, el puntaje de coincidencia fue superior a 90, lo que proporciona una alta confianza en la asignación y, por lo tanto, su uso en la cuantificación.

La cuantificación de los componentes del medio de cultivo celular puede ser un desafío y depender del analito, especialmente cuando se analizan simultáneamente diferencias sustanciales de concentración y múltiples componentes. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el rango dinámico lineal (LDR) se investigaron durante la evaluación del método. En la Figura 7, las curvas de calibración representan la respuesta lineal del componente seleccionado por grupo. Como ejemplo, el L-triptófano tiene un rango lineal de 0.001 ng/mL a 3350 ng/mL y un LLOQ de 0.025 ng/mL con señal a ruido (S / N) de 46. En promedio LDR en todos los componentes del método rango de 2.5 a 6 órdenes de magnitud.



**Figura 8.** Los cromatogramas de iones extraídos muestran dos MRM por compuesto seleccionado de la clase de grupo de cultivo celular. En la mezcla estándar de cultivo celular, la LDR varía de 2 a 6 órdenes de magnitud dependiendo. El XIC azul es MRM y el XIC rosa es MRM2 para el compuesto seleccionado. Los valores de la relación señal / ruido que indican el LLOQ del compuesto. \* 2 veces mayor carga en la columna.

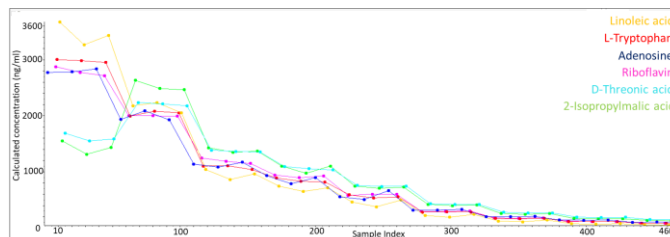
Para monitorear los niveles de los componentes de los medios de cultivo celular durante las diferentes etapas de la producción de bioterapéuticos, el software SCIEX OS ofrece una forma visual de medir el nivel de nutrientes disponibles para el crecimiento celular a través de su funcionalidad de gráfico integrado (gráfico métrico de concentración), la representación gráfica de los resultados a través de diferentes etapas se muestra en la Figura 9.

Esta herramienta de visualización compara diversos medios de cultivo celular en las diferentes etapas del cultivo para la producción exitosa de bioterapéuticos a gran escala. La cantidad medida desde el punto de calibración más alto al más bajo se normaliza a la concentración más alta y se representa gráficamente frente al tiempo (Figura 9). En la herramienta, los componentes representativos para cada grupo de componentes de medios de cultivo celular están representados por diferentes colores: aminoácidos - L-triptófano (rojo), vitaminas - riboflavina (rosa), carbohidratos - ácido D-treónico (azul claro), ácidos grasos - ácido linoleico (amarillo), ácidos nucleicos - adenosina (línea azul) y ácidos orgánicos - ácido 2-isopropílico (línea verde). Inicialmente, el gráfico muestra una menor concertación de carbohidratos (ácido D-treónico) y ácido orgánico (ácido 2-isopropílico) en el punto más alto de calibración, lo que probablemente sea el resultado de la saturación del detector (Figura 9).

## Conclusiones

Aquí, se presentó una solución cuantitativa LC-MS para el análisis de medios de cultivo celular dirigido. Esta solución se basa en el uso de un espectrómetro de masas SCIEX QTRAP 6500+ acoplado al sistema ExionLC, y fue diseñada específicamente para satisfacer las demandas de la industria y superar los desafíos técnicos para el desarrollo de ensayos. Este método de análisis de medios de cultivo celular ofrece:

- Separación superior de los componentes críticos de los medios de cultivo celular en una amplia gama de productos químicos
- Medición de componentes polares y no polares, así como de polaridad positiva y negativa dentro de un solo método
- Un método impulsado por MRM que es fácilmente convertible a otros sistemas cromatográficos
- Alta sensibilidad y rango dinámico cuando se utiliza un sistema SCIEX QTRAP 6500+ y Triple Quad 6500+
- Una solución de software completa para la cuantificación directa y la visualización gráfica basada en componentes principales
- Robustez mejorada debido a la fuente Ion Drive™ Turbo V que ofrece una alta sensibilidad para análisis positivos y negativos
- Un kit estándar interno que permitirá una cuantificación exacta de los grupos de componentes individuales dentro de los medios de cultivo celular (próximamente)



**Figura 9. Los gráficos métricos reflejan la variación de concentración entre muestras.** Componentes del cultivo celular: - ácido linoleico (amarillo), L- triptófano (rojo), adenosina (azul), riboflavina (rosa), ácido D-treónico (azul claro), ácido 2-isopropílico (verde). La cantidad de componentes se muestra desde el punto de calibración más alto al más bajo normalizado a la concentración más alta.

## Referencias

1. Eagle, H. (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130 (3373)**, 432-437.
2. Schinke, R. (1964) Enzymes of Arginine metabolism in mammalian cell culture. *The Journal of Biological Chemistry*, **239 (1)**, 136-145.

## Observaciones

Si está interesado en este método, póngase en contacto con un representante de ventas de SCIEX para obtener más información. El método se comparte después de la firma del acuerdo de confidencialidad, y la instalación del método será coordinada por un especialista en soporte de aplicaciones.

Tabla 2. Lista de componentes en la biblioteca MRM.

Cell Culture compound	Group		
L-Alanine	Amino acid	Sucrose	Sacharides
Beta-Alanine	Amino acid	D-(+)-glucose	Sacharides
L-Arginine	Amino acid	D-(+)-glucosamine hydrochloride	Sacharides
L-Aspartic Acid	Amino acid	(-)-Tocopherol acetate	Vitamin
L-Cystine	Amino acid	Biotin	Vitamin
L-Glutamic acid	Amino acid	Cyanocobalamin	Vitamin
Glycine	Amino acid	D-Pantothenic acid hemicalcium	Vitamin
L-Histidine	Amino acid	Folic acid	Vitamin
L-Isoleucine	Amino acid	L-Ascorbic acid	Vitamin
L-Leucine	Amino acid	L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt	Vitamin
L-Lysine	Amino acid	Niacinamide	Vitamin
L-Methionine	Amino acid	Nicotinic acid (niacin)	Vitamin
L-Phenylalanine	Amino acid	Pyridoxal hydrochloride	Vitamin
L-Proline	Amino acid	(-)-Riboflavin	Vitamin
L-Serine	Amino acid	ergocalciferol	Vitamin
L-Threonine	Amino acid	sodium ascorbate	Vitamin
L-Tyrosine	Amino acid	pyridoxine	Vitamin
L-Valine	Amino acid	(-)-alpha-Lipoic acid	Vitamin
L-Tryptophan	Amino acid	Taurine	Others
γ-Amino-n-butyric acid	Amino acid	2-isopropyl Malic acid	Others
L-alpha-Amino-n-butyric acid	Amino acid	2-oxovaleric acid	Others
DL-β-Aminoisobutyric acid	Amino acid	Citric acid	Others
L-Carnosine	Amino acid	DL-A-Keto-B-methyl-n-valeric acid sodium	Others
L-Citrulline	Amino acid	DL-Isocitric acid trisodium hydrate	Others
L-Cystathionine	Amino acid	DL-P-Hydroxyphenyllactic acid	Others
Ethanolamine	Amino acid	Fumaric acid	Others
L-Homocystine	Amino acid	Lactic acid	Others
δ-Hydroxylysine	Amino acid	Pyruvic acid	Others
Hydroxy-L-proline	Amino acid	Succinic acid	Others
1-Methyl-L-histidine	Amino acid	malic acid	Others
3-Methyl-L-histidine	Amino acid	D-gluconic acid sodium	Others
L-Ornithine	Amino acid	L-Anserine	Others
L-Sarcosine	Amino acid	ALA-GLN	Others
L-Asparagine	Amino acid	gly-gln monohydrate	Others
L-Glutamine	Amino acid	4-Aminobenzoic acid	Others
L-Methionine sulfoxide	Amino acid	Choline chloride	Others
L-pyroGlutamic acid	Amino acid	L-2-Aminoadipic acid	Others
N-Acetyl-L-aspartic acid	Amino acid	L-Pipecolic acid	Others
N-Acetyl-L-cysteine	Amino acid	Uric acid	Others
trans-4-hydroxy-L-Proline	Amino acid	Folinic acid calcium salt hydrate	Others
L-Norvaline	Amino acid	Penicillin G sodium	Others
sarcosine	Amino acid	2-Aminoethanol (monoethanolamine)	Others
L-Kynurenine	Amino acid	Ethylenediamine	Others
linolenic acid	Fatty acid	Histamine free base	Others
linoleic acid	Fatty acid	O-Phosphoethanolamine	Others
oleic acid	Fatty acid	Putrescine	Others
stearic acid	Fatty acid	Phosphocholine chloride calcium salt tetrahydrate	Others
palmitic acid	Fatty acid	Glutathione oxidized	Others
Adenine	Nucleobase	L-glycerophosphocholine	Others
Guanine	Nucleobase	D-Threonic acid lithiumsalt	Others
thymine	Nucleobase		
Uracil	Nucleobase		
hypoxanthine	Nucleobase		
Xanthine	Nucleobase		
2'-Deoxycytidine	Nucleoside		
Adenosine free base	Nucleoside		
Adenosine 5'-monophosphate	Nucleoside		
Cytidine	Nucleoside		
Cytidine 5'-monophosphate	Nucleoside		
Guanosine	Nucleoside		
Guanosine 5'-monophosphate disodium hydrate	Nucleoside		
Inosine	Nucleoside		
Thymidine	Nucleoside		
Uridine	Nucleoside		
Xanthosine dihydrate	Nucleoside		

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries. © 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. Related to RUO-MKT-02-9746-A. AB SCIEX™ is being used under license.