

HILIC/MS ANALÝZA KYSELINY FOSFATIDOVÉ, FOSFATIDYLSERINU JEJICH LYSO DERIVÁTŮ A OSTATNÍCH LIPIDICKÝCH TŘÍD

Roman Hájek, Eva Cífková, Miroslav Lída a Michal Holčapek

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 53210 Pardubice*

Abstract

Lipidomics is a discipline dealing with studies of biochemical pathways of lipids in biological systems. The goal of lipidomics is to understand the function of lipids in biological metabolism, to explain the mechanism of the development and progress of some metabolic diseases. The aim of this work was the optimization of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation of the greatest number of classes of lipids using conditions compatible with the mass spectrometry. A special attention of this optimization has been paid to lipid classes not yet analyzed by HILIC so far, i.e. phosphatidylserines, phosphatidic acids and their lyso-derivatives. Effects of stationary phases, the composition of mobile phase, additives, pH value of the mobile phase, separation temperature and the gradient steepness have been studied to achieve a better separation efficiency. The highest impact on the separation of lipid classes had the type of stationary phase and pH value of the mobile phase. All lipid classes were identified by using MS in connection with the electrospray ionization in positive-ion and negative-ion mode. The optimized method was used to describe particular lipids in extracts of porcine brain and kidney.

Souhrn

Lipidomika je obor zabývající se studiem biochemických drah lipidů v biologických systémech. Cílem lipidomiky je pochopení funkce lipidů v biologickém metabolismu, vysvětlení mechanismu vzniku a průběhu některých metabolických chorob. Cílem této práce byla optimalizace separace co největšího počtu tříd lipidů s využitím kapalinové chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) za podmínek vhodných pro spojení s hmotnostní spektrometrií. Zvláštní důraz byl při optimalizaci HILIC podmínek kladen na ty třídy polárních lipidů, které se dosud touto technikou nedařilo analyzovat, fosfatidylseriny, kyseliny fosfatidové a jejich lysoderiváty. V této práci byly studovány vlivy typu náplně kolony, složení mobilní fáze, aditiva, pH mobilní fáze, teploty kolony a sklonu gradientu na účinnost separace. Největší vliv na separaci těchto tříd lipidů má typ náplně kolony a pH mobilní fáze. Jednotlivé třídy lipidů byly identifikovány díky spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) s využitím ionizace elektrosprejem v kladném i záporném módu záznamu iontů. Optimalizovaná metoda byla použita pro charakterizaci jednotlivých lipidů v extraktu prasečího mozku a ledviny.

1. Úvod

Kyselina fosfatidová (PA) se nachází v malém množství v biologických membránách a je rozhodující biosyntetický prekurzor všech fosfolipidů (PL). PA je signální molekula biochemických a fyziologických procesů v buňkách [1-3]. PA jsou zdrojem

diacylglycerolů (DG), které jsou zdrojem triacylglycerolů (TG), fosfatidylcholinů (PC) a fosfatidylethanolaminů (PE) podle dráhy Kennedy [4], a prekurzorem fosfatidylglycerolů (PG), fosfatidylserinů (PS), fosfatidylinositolů (PI) a kardiolipidů prostřednictvím cytidin difosfátu DG (CDP-DG) dráhy [1]. Lysofosfatidové kyseliny (LPA) jsou biosyntetickým prekurzorem s regulační funkcí v savčích reprodukčních systémech. PS jsou důležité složky buněčných membrán, kde tvoří 5-10% z celkového počtu PL, kde tvoří významnou roli v regulaci apoptózy, syntéze a transportu lipidů [1,3]. Lysofosfatidylseriny (LPS) patří k signálním PL, které hrají důležitou roli v průběhu zánětlivých procesů [5]. PA a PS jsou kyselé lipidy, které mají potenciál nést dva záporné náboje, v případě PA jsou oba náboje na fosfátové skupině a v případě PS je jeden náboj na fosfátové skupině a druhý na karboxylové skupině.

Komplexní lipidomická analýza různých biologických vzorků je náročný úkol vzhledem k extrémní složitosti jednotlivých tříd lipidů, které se mění strukturou, polaritou, disociačním a ionizačním chováním atd. Důležitou součástí lipidomické analýzy je kvantita, která může být provedena za použití MS s přímou infuzí (shotgun) [6-8] nebo ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC) [9,10]. Shotgun analýza umožňuje rychlé a robustní stanovení lipidů pomocí prekurzorového iontu a skenu neutrálních ztrát [6-8]. LC/MS přístup může být rozdělen v závislosti na režimu polarit, HILIC mód je pro separaci polárních tříd lipidů [9-11] a normální fáze (NP) LC se využívají pro nepolární třídy lipidů [12,13]. Jednotlivé lipidy mohou být separována podle navázaného acylového řetězce pomocí reverzních fází (RP) LC [11,14-16]. V poslední době byla zavedena ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) ve spojení s MS pro analýzu polárních a nepolárních tříd lipidů [17]. Kvantitativní analýza pomocí LC/MS se provádí pomocí interních standardů (IS) a to buď přidáním standardu pro každou třídu lipidů [9] nebo kombinací jednoho IS s faktorem odezvy [18]. Separace tříd lipidů pomocí HILIC nebo NP modu je více konvenční pro LC/MS kvantifikaci, protože každý IS eluuje s jednotlivými lipidy dané třídy a jsou tak ionizovány ve stejných podmínkách matrice jako tomu je u shotgun analýzy. Tento způsob lipidomické kvantifikace by měl poskytovat nejspolehlivější údaje. Byla provedena úspěšná separace třídy PA a PS [19-21], ale byly použity látky, které nejsou dobře kompatibilní s MS detekcí, jako jsou ion párová činidla, například alkyl amoniové sole [22].

Hlavním cílem této práce byla optimalizace HILIC/MS metody pro analýzu vysokého počtu tříd lipidů s důrazem kladeným na kyselé lipidy jako jsou PA, PS a jejich lysoderiváty. V této práci popisujeme separaci v režimu HILIC za pomoci hydridové kolony, která umožňuje

separaci 18 tříd lipidů včetně PA, PS a jejich lysoderivatů v jedné analýze. Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu prasečího mozku a ledviny.

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie a standardy

Pro měření byla použita rozpouštědla acetonitril, methanol, 2-propanol o HPLC/MS čistotě ($\geq 99,9\%$) dodané firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dále byla používána voda, která byla redestilována pomocí demineralizačního přístroje Milli-Q® Reference system (Molsheim, Francie). K extrakci lipidů byl použit chloroform o HPLC čistotě $\geq 99,9\%$ stabilizovaný 0,5-1% ethanolem (Sigma-Aldrich) a chlorid sodný (PENTA s.r.o., Praha, ČR). Do mobilní fáze byl přidáván octan amonný o čistotě $\geq 99,995\%$ a mravenčan amonný o čistotě $\geq 99,0\%$ od firmy Sigma-Aldrich. Pro úpravu pH byla použita kyselina octová o čistotě $\geq 99,99\%$ a kyselina mravenčí o čistotě $\sim 98\%$ od firmy Sigma-Aldrich a vodný roztok amoniaku (PENTA). Pro kalibraci pH metru byly použity kalibrační roztoky o pH = 7 a pH = 4 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Pro optimalizaci separace byly použity standardy: PC 18:1/18:1, LPC 18:1, PE 18:1/18:1, LPE 18:1, PG 18:1/18:1, LPG 18:1, PS 18:1/18:1, LPS 18:1, PA 18:1/18:1, LPA 18:1, Cer 18:1/18:1, HexCer 18:1/18:1, Hex2Cer 18:1/18:1 a SM 18:1/18:1, které byly zakoupeny z Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) a Nu-chek Prep (Elysian, MN, USA).

2.2 Příprava vzorků a standardů

Standardy byly připraveny rozpuštěním 1 mg standardu ve 200 μ l chloroformu a 800 μ l 2-propanolu. Pro analýzu byly použity vzorky prasečí ledviny a mozku. Vzorky byly připraveny extrakcí dle Folche. 0,25 g tkáně bylo homogenizováno v 5 ml směsi chloroform/methanol (2:1, v/v) po dobu 3 minut. Poté byla směs přefiltrována přes filtr z regenerované celulosy s porositou 0,22 μ m (Teknokroma, Barcelona, Španělsko). Po filtraci bylo přidáno 1 ml 1 mol/l vodného roztoku NaCl. Následně byla směs centrifugována 3 minuty při 2500 ot./min na centrifuze EBA 20 (Fisher Scientific). Ze vzniklého dvoufázového roztoku byla horní (vodná) fáze odstraněna a dolní (organická) fáze byla odpařena do sucha pod proudem dusíku. Po odpaření byl vzorek rozpuštěn ve směsi chloroform/2-propanol (1:1, v/v) a přefiltrován přes filtr, který byl použit při předchozí filtraci.

2.3 Optimalizace LC/MS podmínek

Experimenty byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu iontové pasti Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Brémy, Německo). Vliv typu náplně kolony na separaci jednotlivých lipidických tříd byl testován na kolonách: Acquity UPLC BEH HILIC (150 × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters, Milford, MA, USA), Ascentis Si (150 × 2.1 mm, 3 μm, Sigma–Aldrich), Kinetex HILIC (150 × 2.1 mm, 2 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), Spherisorb Si (150 × 4.6 mm, 10 μm, Waters), Acquity UPC²Torus DEA (100 × 3 mm, 1.7 μm, Waters), Acquity UPC²Torus 2-PIC (100 × 3 mm, 1.7 μm, Waters), Acquity UPC²Torus Diol (100 × 3 mm, 1.7 μm, Waters), Acquity UPC²Torus 1-AA (100 × 3 mm, 1.7 μm, Waters), a Cogent Diamond Hydride (250 × 4.6 mm, 4 μm, Microsolv, Eatontown, NJ, USA). Dále byl sledován vliv složení mobilní fáze (acetonitril, 2-propanol, methanol a redestilované vody), aditiv (mravenčan a octan amonný, kyselina mravenčí a kyselina octová), pH (2 až 8,5) teploty (30 °C, 40 °C, 50 °C) a sklon gradientu.

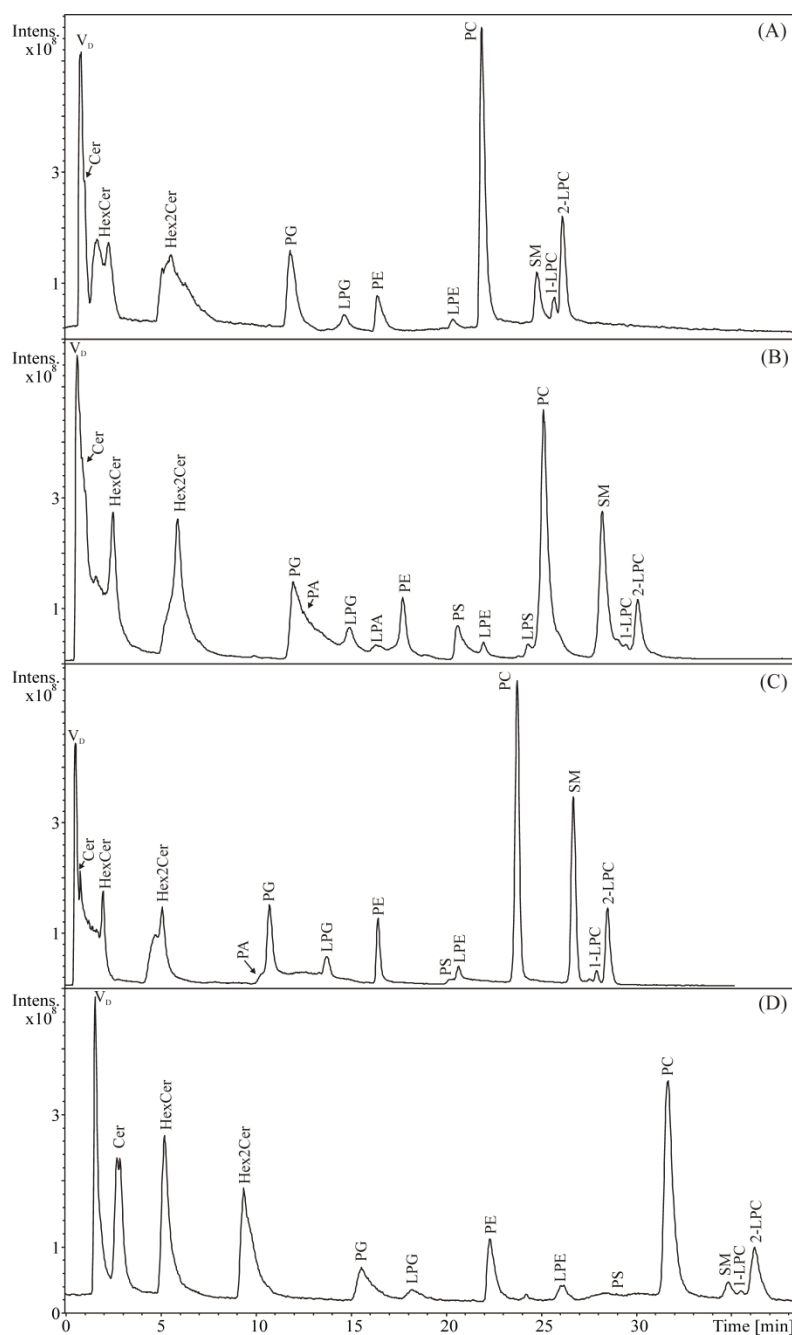
Finální podmínky HPLC/MS metody byly následující: hydridová kolona Cogent Diamond Hydride (250 × 4,6 mm, 4 μm), průtok mobilní fáze 1 ml/min, dávkovaný objem 3 μl rozpuštěného extraktu lipidů, teplota kolony 40 °C. Byla použita mobilní fáze se složkami A acetonitril s kyselinou mravenčí a B 40 mM vodný roztok mravenčanu amonného s kyselinou mravenčí. pH vodného roztoku bylo 4,0 a přídavek kyseliny do acetonitrilu byl stejný jako do vodné fáze. Byl zvolen gradient: 0 min—99.7 % A + 0.3 % B, 60 min—75 % A + 25 % B. Pro identifikaci jednotlivých tříd lipidů byla použita ionizace ESI při záznamu kladných i záporných iontů v rozsahu m/z 50-1000, teplota sušícího plynu 365 °C, tlak zmlžujícího plynu 60 psi a průtok sušícího plynu 10 ml/min.

3. Výsledky a diskuze

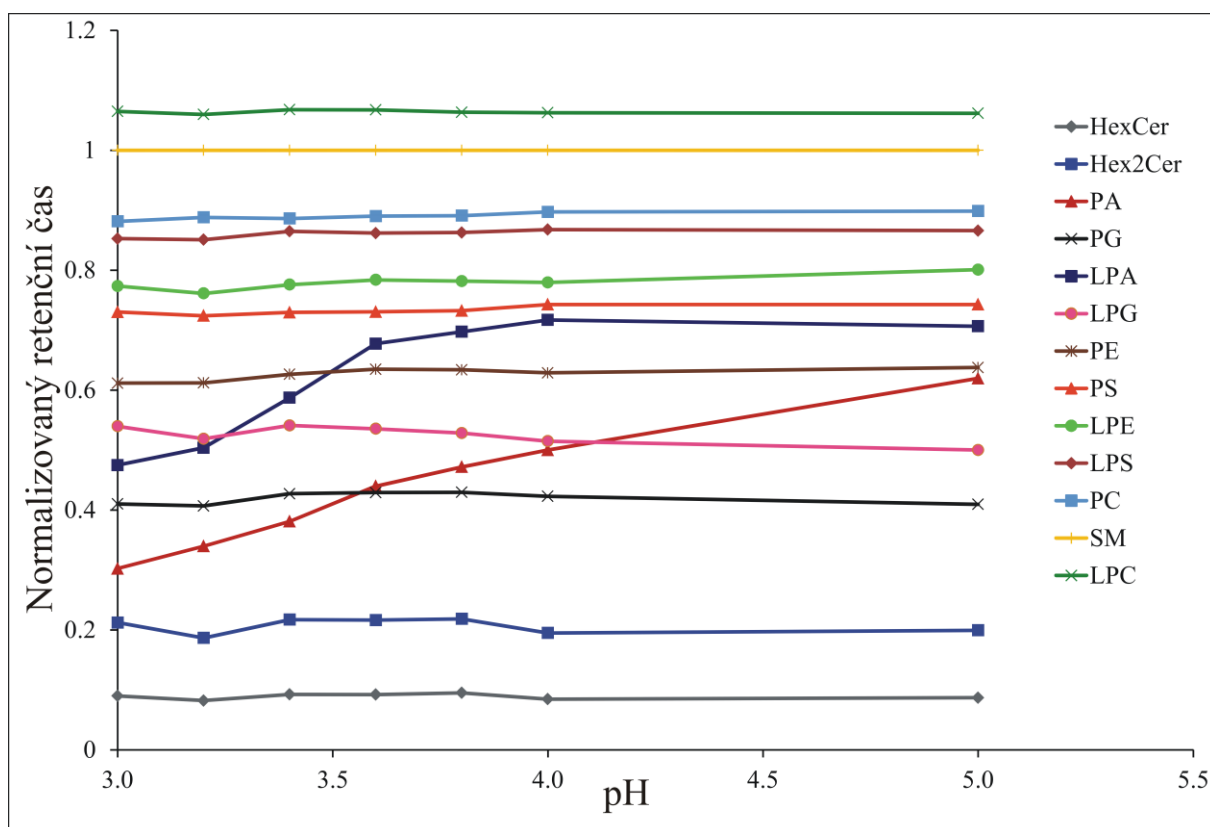
Předchozí HILIC metoda [11] umožnila separaci nejčastěji se vyskytujících polárních lipidů s výjimkou kyselých lipidů jako je PA, LPA, PS, LPS. Byla použita kolona Spherisorb Si (250 × 4,6 mm, 4 μm, Waters), jako mobilní fáze byl použit acetonitril a 5 mmol/L vodný octan amonný. Cílem této práce je vylepšit tuto separaci zejména pro velmi problematické třídy lipidů, jako jsou PS, PA, LPS a LPA.

Nejprve byly testovány 4 komerčně dostupné silikagelové kolony na směsi standardů (obrázek 1) za stejných LC/MS podmínek s výjimkou průtoku mobilní fáze (1.A Acquity UPLC BEH HILIC 0,5 ml/min; 1.B Ascentis Si 0,6 ml/min; 1.C Kinetex HILIC 0,6 ml/min; 1.D Spherisorb Si 1 ml/min). Jako mobilní fáze byl použit acetonitril a 20 mmol/L vodný

mravenčan amonný, pH bylo upraveno pomocí kyseliny mravenčí. Testované silikagelové kolony poskytovaly odlišné tvary píku separovaných tříd, ale bylo zachováno pořadí jednotlivých separovaných tříd. Dalším krokem byla optimalizace složení mobilní fáze. Pro testování byla použita kolona Ascentis Si a bylo testováno pH a koncentrace vodného roztoku mravenčanu amonného. Účinky pH mobilní fáze jsou znázorněny na obrázku 2, který ukazuje závislost normalizovaný retenčního času na hodnotě pH. Graf znázorňuje výrazné zvýšení retenčních časů se zvyšujícím se pH u třídy PA a LPA.



Obrázek 1. HILIC/ESI-MS separace směsi standardů pomocí kolon: (A) Acquity UPLC BEH HILIC (150 × 2.1 mm, 1.7 μm) průtok 0,5 mL/min, (B) Ascentis Si (150 × 2.1 mm, 3 μm) průtok 0,6 mL/min, (C) Kinetex HILIC (150 × 2.1 mm, 2.6 μm) průtok 0,6 mL/min, and (D) Spherisorb Si (150 × 4.6 mm, 10 μm) průtok 1 mL/min. ESI-MS detekce při záznamu kladných iontů. HPLC podmínky: gradient 0 min—99.7% A + 0.3% B, 40 min—79.9% A + 20.1% B, kde A je acetonitril a B je 20 mmol/l vodný mravenčan amonný s kyselinou mravenčí pH=3,5.



Obrázek 2. Závislost normalizovaných retenčních časů jednotlivých lipidů na pH za použití kolony Ascentis Si.

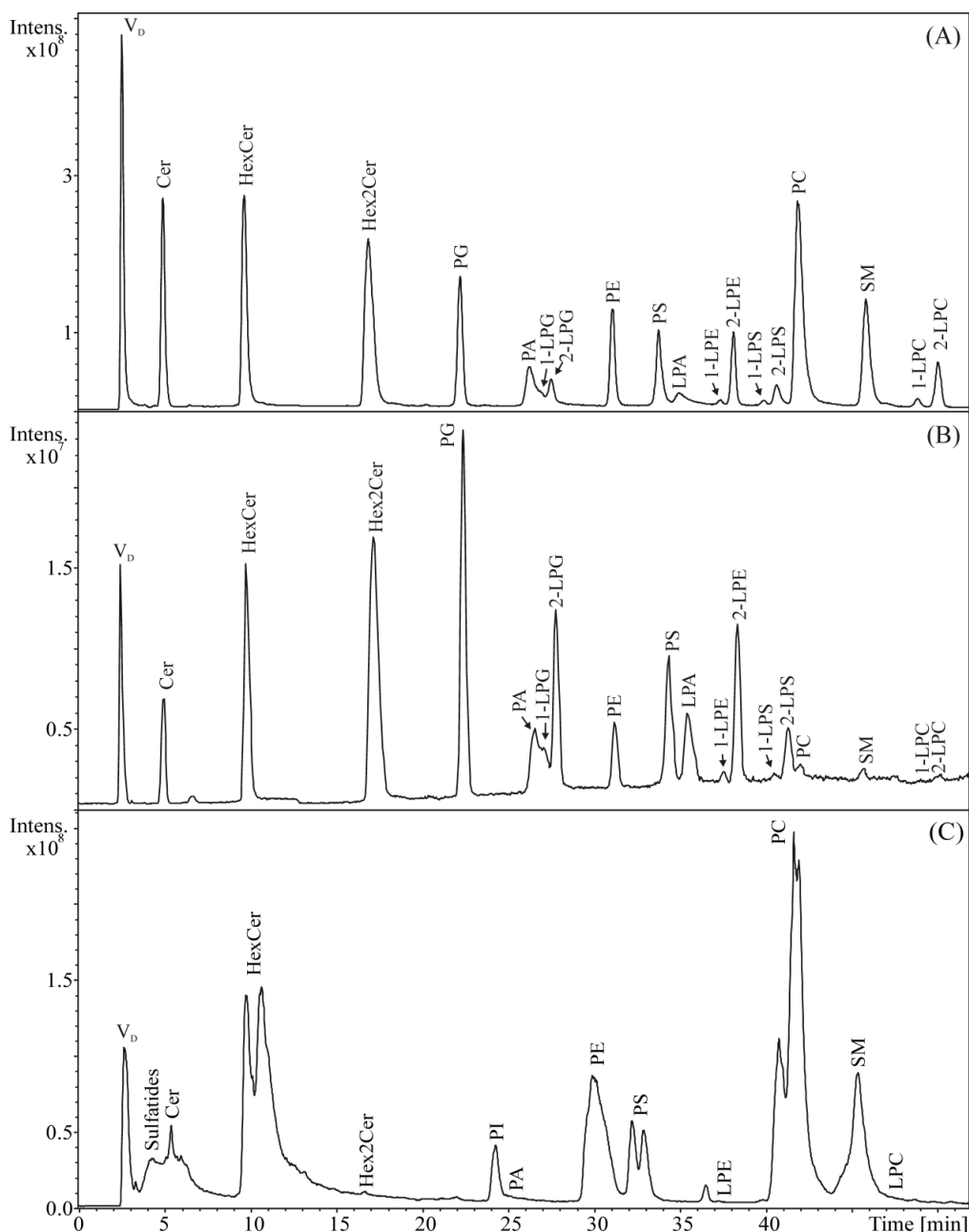
Obsáhlá optimalizace HILIC separace popsaná výše nevedla k uspokojivým výsledkům, proto byly testovány další typy stacionárních fází: kolona ACQUITY UPC Diol obsahující navázanou diolovou skupinu, kolona ACQUITY UPC 2-PIC obsahující navázaný 2-picolylamin, kolona ACQUITY UPC DEA obsahující navázaný diethylamin a kolona ACQUITY UPC 1-AA obsahující navázaný 1-aminoanthracen. Na těchto kolonách byla testována směs standardů pro zoptimalizovanou mobilní fázi, která obsahovala acetonitril s kyselinou mravenčí a 20 mM vodný roztok mravenčanu amonného s kyselinou mravenčí. Vlivem změny typu stacionární fáze docházelo ke změně retenčního chování, ale i k různým poměrům intenzity signálu jednotlivých tříd lipidů v hmotnostních spektrech. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo na koloně ACQUITY UPC 2-PIC, kde došlo ke zlepšení tvaru a intenzity píků PS a LPS, ale třídy PA a LPA nebyly identifikovány ani na jedné z uvedených kolon. Modifikované silikagelové kolony neposkytly požadované výsledky, proto bylo od další optimalizací na těchto kolonách upuštěno.

Další testovanou kolonou byla kolona Cogent Diamond Hydride, která je určena pro polární i nepolární látky. Silanolové skupiny (-Si-OH) jsou nahrazeny hydridovými (-Si-H) skupinami. Na této koloně byl testován vliv koncentrace použitých aditiv v mobilní fázi. Byla testována mobilní fáze obsahující 5 mM, 10 mM a 20 mM octanu amonného při pH 4, kdy se zvyšující se koncentrací rostla intenzita signálu třídy Cer, dále docházelo ke zvyšování retenčního času u třídy PS a LPS. U třídy PA a LPA za použití různých koncentrací octanu amonného nedocházelo k uspokojivé separaci, proto byla testována mobilní fáze obsahující vodný roztok mravenčanu amonného. Byla testována koncentrace mravenčanu amonného 20 mM, 30 mM, 40 mM a 50 mM. Ze srovnání získaných výsledků měl mravenčan amonný lepší separační vlastnosti, a proto byl zvolen jako aditivum do mobilní fáze. Při testování mravenčanu amonného byl pozorován významný vliv pH mobilní fáze na tvar píků a intenzity signálů tříd PA, LPA, PS, LPS. Dále bylo testováno pH vodného roztoku mravenčanu amonného, kdy bylo zajímavé chování třídy Cer, kdy se snižujícím se pH mobilní fáze roste intenzita signálu této třídy, což může být způsobeno vznikem pufru přidávkem kyseliny pro dosažení nižšího pH. Při testování koncentrace mravenčanu amonného v mobilní fázi byl pozorován významný vliv na třídu PA, kdy s vyšší koncentrací mravenčanu amonného je lepší tvar píků a vyšší intenzita signálu této třídy. U třídy LPA byl pozorován posun k vyšším retenčním časům se zvyšující se koncentrací mravenčanu amonného a docházelo ke zlepšení tvaru píků. Vyšší koncentrace má pozitivní vliv na celou separaci, ale použití koncentrace 50 mM mravenčanu amonného zvyšuje kontaminaci iontového zdroje a snižuje signál, proto jsme zvolili výslednou koncentraci 40 mM (Obrázek 3A a 3B).

Byla vypracována LC/MS metoda pro komplexní analýzu 14 tříd polárních lipidů pomocí hydridové kolony. Pomocí optimalizované metody byla provedena lipidomická analýza prasečího mozku a ledvin. V analyzovaných orgánech prasete (Obrázek 3 C) bylo nalezeno 13 tříd lipidů: sulfatides, Cer, HexCer, Hex2Cer, PG, PI, PA, PE, LPE, PS, PC, LPC a SM. Bylo identifikováno více jak 140 jednotlivých lipidů na základě pozitivního a negativního iontového ESI módu.

4. Závěr

Optimalizovaná HILIC separace kyselých lipidů PA, LPA, PS a LPS je vhodná pro LC/MS lipidomickou analýzu biologických vzorků. Celá optimalizace je založena pouze na podmínkách plně kompatibilních s MS detekcí, jako je použití těkavých organických pufrů a kyselin v nejnižší možné koncentraci. Byla provedena optimalizace několika parametrů jako je typ kolony, koncentrace a pH mobilní fáze kyselin v nejnižší možné koncentraci.



Obrázek 3. Finální HILIC/ESI-MS metoda pomocí hydridové kolony: (A) směs standardů při záznamu kladných iontů, (B) směs standardů při záznamu záporných iontů, (C) extrakt prasečího mozku při záznamu kladných iontů. Podmínky: Cogent Diamond Hydride kolona (250×4.6 mm, $4 \mu\text{m}$), průtok mobilní fáze 1 mL/min, gradient: 0 min—99.7% A + 0.3% B, 60 min—75% A + 25% B, kde A je acetonitril a B je 40 mmol/L vodného mravenčanu amonného s kyselinou mravenčí pH=4.

Nejllepšího výsledku bylo dosaženo pomocí hydridové kolony Cogent Diamond Hydride o délce 250 mm, průměru 4,6 mm a velikosti částic $4 \mu\text{m}$ s využitím gradientu acetonitril s kyselinou mravenčí a vodný roztok mravenčanu amonného 40 mmol/L s kyselinou mravenčí, o hodnotě pH 4.

Poděkování

Tato práce byla podpořena ERC CZ grantovým projektem LL1302 podporovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

- [1] Haucke V., Di Paolo G.: *Curr. Opin. Cell Biol.* **19** (2007) 426-435.
- [2] Kooijman E.E., Burger K.N.: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1791** (2009) 881-888.
- [3] Stace C.L., Ktistakis N.T.: *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1761** (2006) 913-926.
- [4] Gibellini F., Smith T.K.: *IUBMB Life* **62** (2010) 414-428.
- [5] Frasch S.C., Bratton D.L.: *Progr. Lipid Res.* **51** (2012) 199-207.
- [6] Han X., Yang K., Gross R.W.: *Mass Spectrom. Rev.* **31** (2012) 134-178.
- [7] Schwudke D., Liebisch G., Herzog R., Schmitz G., Shevchenko A.: *Meth. Enzymol.* **433** (2007) 175-191.
- [8] Yang K., Han X.: *Metabolites* **1** (2011) 21-40.
- [9] Scherer M., Leuthäuser-Jaschinski K., Ecker J., Schmitz G., Liebisch G.: *J. Lipid Res.* **51** (2010) 2001-2011.
- [10] Axelsen P.H., Murphy R.C.: *J. Lipid Res.* **51** (2010) 660-671.
- [11] Lísa M., Cífková E., Holčapek M.: *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 5146-5156.
- [12] Holčapek M., Cífková E., Červená B., Lísa M., Vostálová J., Galuszka J.: *J. Chromatogr. A* **1377** (2015) 85-91.
- [13] McLaren D.G., Miller P.L., Lassman M.E., Castro-Perez J.M., Hubbard B.K., Roddy T.P.: *Anal. Biochem* **414** (2011) 266-272.
- [14] Ioffe V., Kalendarev T., Rubinstein I., Zupkovitz G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30** (2002) 391-403.
- [15] Sandra K., dos Santos Pereira A., Vanhoenacker G., David F., Sandra P.: *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 4087-4099.
- [16] Sato Y., Nakamura T., Aoshima K., Oda Y.: *Anal. Chem.* **82** (2010) 9858-9864.
- [17] Lísa M., Holčapek M.: *Anal. Chem.* **87** (2015) 7187-7195.
- [18] Cífková E., Holčapek M., Lísa M., Ovčáčíková M., Lyčka A., Lynen F., Sandra P.: *Anal. Chem.* **84** (2012) 10064-10070.
- [19] Abidi S., Mounts T.: *J. Chromatogr. B* **671** (1995) 281-297.
- [20] Buré C., Ayciriex S., Testet E., Schmitter J.-M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **405** (2013) 203-213.
- [21] Triebel A., Trötz Müller M., Eberl A., Hanel P., Hartler J., Köfeler H.C.: *J. Chromatogr. A* **1347** (2014) 104-110.
- [22] Kolářová L., Holčapek M., Jambor R., Dostal L., Nadvorník M., Růžička A.: *J. Mass Spectrom.* **39** (2004) 621-629.

