

## **LIPIDOMICKÁ ANALÝZA S VYUŽITÍM VYSOKOÚČINNÉ SUPERKRITICKÉ FLUIDNÍ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

Ondřej Peterka, Denise Wolrab, Miroslav Lísa a Michal Holčapek

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,  
Studentská 573, 532 10 Pardubice*

### **Abstract**

Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry (UPHSFC/ESI-MS) is suitable for non-polar and polar substances, which is a great advantage in lipidomic analysis. Lipids in plasma were separated into lipid classes using an Acquity BEH UPC<sup>2</sup> column (100 mm x 3 mm, 1,7 μm) and a gradient elution of the mobile phase of CO<sub>2</sub> and methanol-water mixture (99:1, v/v) containing 30 mM ammonium acetate. During the 6 minute analysis, lipids were separated into 9 lipid classes. Subsequent quantification is used to compare lipids in the plasma of healthy and diseased individuals.

### **Souhrn**

Vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací (UPHSFC/ESI-MS) je technika vhodná pro nepolární i polární látky, což je v lipidomické analýze velkou výhodou. Lipidy v krevní plazmě byly separovány do lipidových tříd pomocí kolony Acquity BEH UPC<sup>2</sup> (100 mm × 3 mm, 1,7 μm) a gradientové eluce se složením mobilní fáze CO<sub>2</sub> a směsi methanol – voda (99:1, v/v) obsahující 30 mM octan amonný. Během šestiminutové analýzy došlo k rozdělení lipidů do 9 tříd. Následná kvantifikace slouží ke srovnání lipidů v plazmě zdravých a nemocných jedinců.

### **1. Úvod**

Lipidomika je obor charakterizující lipidy v biologických vzorcích, přičemž je řazena mezi tzv. „omics“ metody. Cílem lipidomiky je zkoumání změn metabolismu lipidů způsobený různými nemocemi a hledání potencionálních biomarkerů [1].

Analýza biologických vzorků představuje důležitou aplikaci, jejichž výsledky mohou výrazně pomoci při včasné indentifikaci různých onemocnění. Úskalím je však vliv matrice, proto je nutná před samotnou analýzou úprava vzorku, přičemž nejčastější úpravou bývá extrakce [2]. Pro analýzu biologických vzorků jsou vhodné různé techniky, jejichž volba se liší v závislosti na povaze látek. Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) umožňuje separaci polárních látek, přičemž nepolární látky se obvykle nezadržují a eluují ve stejném retenčním čase [3,4]. Naopak pro analýzu nepolárních látek je vhodná kapalinová

chromatografie s normálními fázemi. Další často používanou metodou je přímá infuze (shotgun), která využívá charakteristickou fragmentaci iontů zjištěných pomocí MS/MS skenů [4]. Méně používanou metodou je kapilární elektroforéza spojená s hmotnostním spektrometrem nacházející využití při analýze nabitých a polárních metabolitů [3].

Vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie (UPHSFC) je moderní metoda s velkým potenciálem, která využívá výhod superkritických vlastností mobilní fáze. Nadkritická tekutina disponuje nízkou viskozitou, vysokým difúzním koeficientem a hustotou vyšší než plyny [5]. Technika SFC se využívá při analýze široké škály látek, jako jsou metabolity [5,6], toxické látky [6,7], léčiva [8], vitamíny [9], lipidy [10], aj. Jako mobilní fáze je používán oxid uhličitý. Protože snižuje potřebu organických rozpouštědel, je tato metoda řazena do tzv. zelené chemie [7].

## **2. Experimentální část**

### **2.1 Chemikálie a standardy**

Acetonitril, 2-propanol (IPA) a methanol (MeOH) HPLC/MS grade, hexan (HEX), chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) stabilizovaný 0,5 – 1 %ním ethanolem (obě HPLC grade), octan amonný a kyselina mravenčí byly zakoupeny ze Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deionizovaná voda byla připravena pomocí demistanice Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, France). Oxid uhličitý s 99,995% čistotou byl zakoupen od firmy Messer Group GmbH (Bad Soden, Germany). Pro validaci metody a kvantifikaci byly použity lipidy diacylglycerol (DG) 12:1/12:1, monoacylglycerol (MG) 19:1 a triacylglycerol (TG) 19:1/19:1/19:1, všechny od firmy Nu-ChekPrep (Elysian, MN, USA), cholesteryl ester (D7-CE) 16:0, ceramid (Cer) d18:1/12:0, D7-cholesterol, lysofosfatidylcholin (LPC) 17:0, lysofosfatidylethanolamin (LPE) 14:0, lysofosfatidylglycerol (LPG) 14:0, fosfatidylcholin (PC) 14:0/14:0, fosfatidylethanolamin (PE) 14:0/14:0, sfingomyelin (SM) d18:1/12:0 a MonoSulfoGalactosyl( $\beta$ )Ceramid (SulfoHexCer) d18:1/12:0 zakoupeny od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Zásobní roztoky interních standardů (ISTD) byly připraveny o koncentraci uvedené v tabulce 1 zředěním směsi chloroform – IPA (1:4, v/v).

### **2.1 Příprava vzorků**

Vzorek byl připraven smícháním 25  $\mu\text{l}$  krevní plazmy, 17,5  $\mu\text{l}$  interního standardu a 3 ml směsi  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (2:1, v/v). Směs byla homogenizována 10 min v ultrazvuku při teplotě 40 °C. Po ochlazení vzorku na laboratorní teplotu bylo ke směsi přidáno 600  $\mu\text{l}$

Tabulka 1: Koncentrace interních standardů

Standard	Koncentrace (µg/µl)
D7-CE 16:0	2
Cer d18:1/12:0	2
DG 12:1/12:1	2
D7-Chol	2
LPC 17:0	2,1
LPE 14:0	2
MG 19:1	2
PC 14:0/14:0	2
PE 14:0/14:0	2
SM d18:1/12:0	2
Sulfatide d18:1/12:0	0,25
TG 19:1/19:1/19:1	2

deionizované vody (MilliQ). Poté byl vzorek míchán 1 minutu (2 500 otáček/min) a centrifugován 3 minuty (3 000 otáček). Následovalo odstranění vodné vrstvy pomocí skleněné pipety a odpaření organické vrstvy pod dusíkem. Odparek byl uchován v -20 °C. Před analýzou byl odparek rozpuštěn v 500 µl CHCl<sub>3</sub>:IPA (1:1, v/v) a míchaný 15 sekund. Vzorek byl přefiltrován přes filtr (0,2 µm) a pro UHPSFC-MS analýzu byl 20× zředěn roztokem HEX:IPA:CHCl<sub>3</sub> (7:1,5:1,5, v/v/v).

## 2.2 UHPSFC/MS podmínky

Měření bylo provedeno na přístroji Acquity UPC<sup>2</sup> (Waters, Milford, MA, USA) spojeným s hmotnostním spektrometrem Synapt G2Si (Waters) s hybridním analyzátozem doby letu (TOF) - kvadrupól. Jako referenční hmota (Lock Mass) byl použit roztok leucin enkephalinu (Waters). Kolona byla použita Acquity BEH UPC<sup>2</sup> (100 mm × 3 mm, 1,7 µm, Waters) s průtokem 1,9 ml/min, přičemž byla vyhřívána na teplotu 60 °C. Dávkovaný objem byl 1 µl a jehla byla promývaná směsí HEX-IPA-voda (2:2:1, v/v/v).

Mobilní fáze byla složena z CO<sub>2</sub> a směsí methanol – voda (99:1, v/v) obsahující 30 mM octan amonný. Byla použita gradientová eluce 0 min – 1%, 5 min – 51%, 6 min – 51%. Regulátor zpětného tlaku byl nastaven na hodnotu 1 800 psi. Pomocí T-kusu byla k přístroji připojena pumpa HPLC 515 (Waters) dávající přidavnou kapalinu methanol –

voda (99:1, v/v) s průtokem 0,25 ml/min. Vzorky v automatickém dávkovači byly uchovávány při teplotě 8 °C. Hmotnostní spektrometr s ionizačním zdrojem ESI byl nastaven na pozitivní i negativní mód v rozsahu  $m/z$  50 – 1 200. Další parametry byly nastaveny na hodnoty: napětí na kapiláře 3,0 kV, vstupní elektroda 20 V, průtok plynu ve zdroji 0,8 l/min, teplota zdroje 150 °C, teplota sušícího plynu 500 °C, průtok sušícího plynu 17 l/min a tlak zmlžujícího plynu 4 bar.

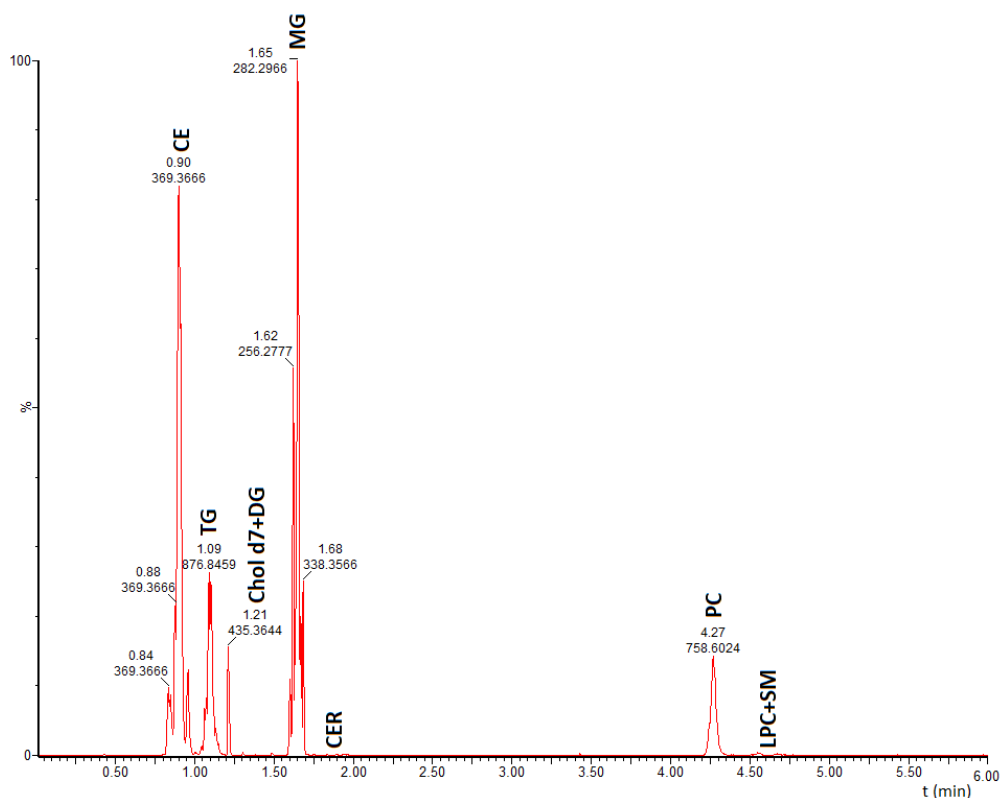
### 3. Výsledky a diskuze

Tato práce vychází z předchozí publikace [4], přičemž bylo převzato nastavení přístroje. Cílem práce bylo analyzovat krevní plazmu a kvantifikovat přítomné lipidy. Výsledky měli sloužit k porovnání množství lipidů v plazmě zdravých dobrovolníků a pacientů s rakovinou ledvin. Pro studii byla využita plazma 112 pacientů s onemocněním rakoviny ledvin a 61 zdravých jedinců.

Nejprve byla provedena validace metody s využitím jednoho ISTD pro každou třídu lipidů. Interní standardy se nesmějí vyskytovat v původních vzorcích, proto byly zvoleny netradiční kombinace sudých a lichých acylů. Použité lipidy jako ISTD jsou shrnuty v tabulce 1. Kontrolní vzorky byly připraveny z 12 vzorků plazmy (6 nemocných/6 zdravých), smícháním a homogenizací 100  $\mu$ l plazmy z každého vzorku. Z výsledků byla vyhodnocena selektivita, přesnost, opakovatelnost, návratnost extrakce, matricový efekt, účinnost procesu a opakovatelnost různými operátory.

Extrakce biologických vzorků byly provedeny dle postupu popsaného v přípravě vzorků. Při analýze byly vzorky měřeny v posloupnosti zdravý/nemocný. Po dvaceti změřených vzorcích byly proměřeny vždy slepé vzorky a vzorky kontroly kvality. Kontrolní vzorky vykazovaly malý rozptyl, což svědčí o dosažení téměř konstantních podmínek měření. Lipidové třídy byly rozseparovány při analýze trvající 6 minut. Výsledný chromatogram je znázorněn na obrázku 1, kde bylo identifikováno 9 tříd lipidů.

Naměřená data byla podrobena automatické redukci šumu s nastavením prahové intenzity 20, MS rozlišení 20 000, šířka chromatografického píku 0,02 min. Následovala korekce pomocí leucin enkephalinu na hodnotu  $m/z$  556,2771. Následná úprava dat výrazně napomohla odstranit chybné identifikace lipidů. Lipidy byly identifikovány pomocí aduktů, jejichž hodnoty  $m/z$  byly porovnávány s tabulkovými hodnotami v LIPID MAPS. Po zpracování dat byly hodnoty  $m/z$  přesnější a odchylka od teoretické hodnoty byla nižší. Po redukci šumu došlo také ke snížení velikosti datového souboru, což usnadnilo uchování

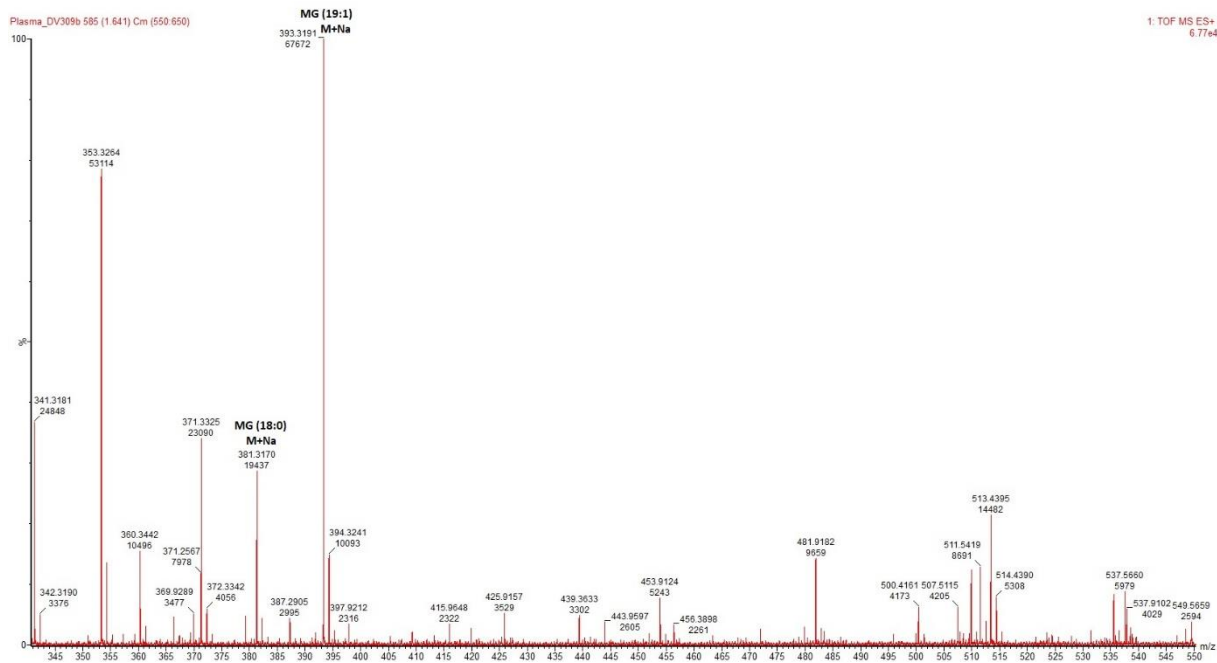


**Obrázek 1:** Chromatogram plazmy pacienta změřen pomocí UHPSFC/ESI-MS. Byly identifikovány lipidové třídy: cholesteryl estery (CE), D7-cholesteroly (D7-Chol), diacylglyceroly (DG), monoacylglyceroly (MG), ceramidy (Cer), fosfatidylcholin (PC), lysofosfatidylcholin (LPC), sfingomyeliny (SM).

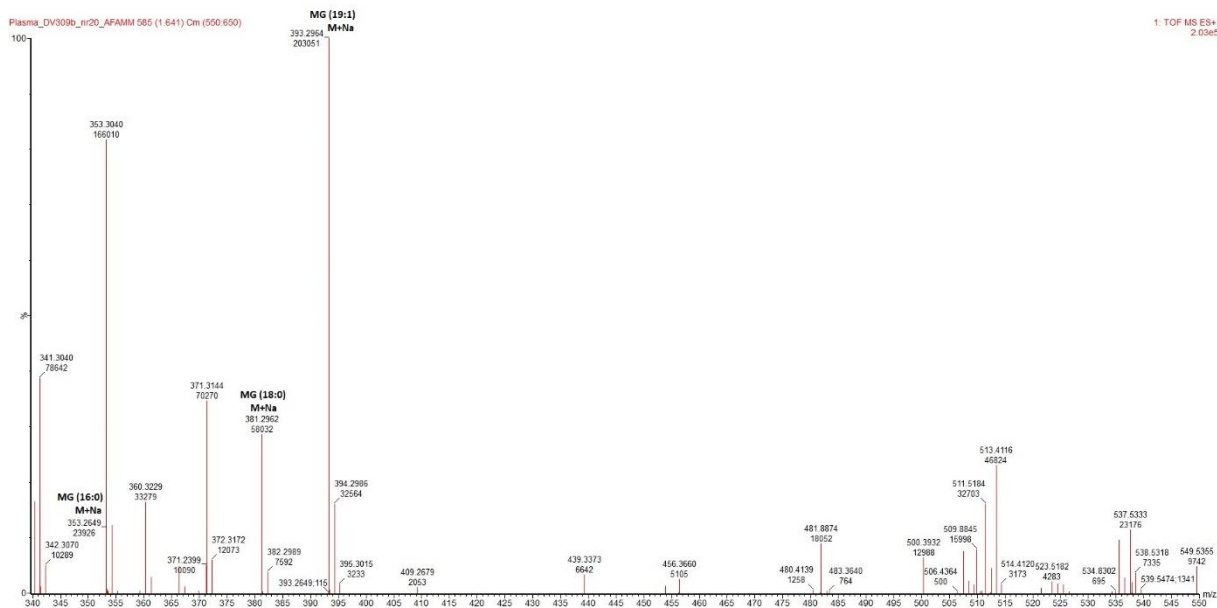
dat a zrychlilo jejich další zpracování. Rozdíl mezi hmotnostními spektry, který je znázorněn na spektrech monoacylglycerolů, je zobrazen na obrázku 2 a obrázku 3. Získaná data byla zpracována pomocí programu LipidQuant, který provedl kvantifikaci jednotlivých lipidů pomocí interních standardů.

## 2. Závěr

Pro analýzu lipidů v biologických vzorcích byla zvolena metoda UHPSFC/ESI-MS, která je vhodná pro polární i nepolární látky. Ve studii byly srovnávány lipidy v plazmě pacientů s rakovinným onemocněním ledvin a zdravých dobrovolníků. Cílem byla kvantifikace lipidů, která byla provedena pomocí interních standardů. Výsledky budou dále podrobeny statistickému zpracování dat, které by mělo napomoci hledání rozdílů mezi oběma skupinami pacientů. Jako vhodné se zdají modely nesupervizovaného rozdělení PCA-X a supervizovaného rozdělení OPLS-DA. Jelikož množství lipidů v krevní plazmě ovlivňuje mnoho faktorů, dalším krokem bude také bližší zkoumání těchto vlivů, což by mohlo výrazně napomoci k určení potencionálních biomarkerů.



**Obrázek 2:** Hmotnostní spektrum MG bez redukce šumu



**Obrázek 3:** Hmotnostní spektrum MG s redukcí šumu a korekcí na referenční hmotu

## Poděkování

Tato práce byla podporována grantovým projektem ERC CZ číslo LL1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

## Literatura

- [1] Liu X., Li J., Zheng P., Zhao X., Zhou Ch., Hu Ch., Hou X., Wang H., Xie P., Xu G.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408** (2016) 6497–6507.
- [2] Penga J., Tanga F., Zhoua R., Xiea X., Li S., Xiea F., Yua P., Mu L.: *Acta Pharmaceutica Sinica B* **6** (2016) 540–551.
- [3] Peiyuan Y., Guowang X.: *Expert Review of Molecular Diagnostics* **14** (2014) 339–348.
- [4] Lída M., Holčapek M.: *Analytical Chemistry* **87** (2015) 7187–7195.
- [5] Bamba T., Lee J. W., Matsubara A., Fukusaki E.: *J. Chromatography A* **1250** (2012) 212–219.
- [6] Geryk, R., Švidrnoch M., Příbylka A., Kalíková K., Maier V., Tesařová. E.: *Analytical Methods* **7** (2015) 6056–6059.
- [7] Jumaah F., Jędrkiewicz R., Gromadzka J., Namieśnik J., Essén S., Turner Ch., Sandahl M.: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65** (2017) 8220–8228.
- [8] Prajapati P., Agrawal Y. K.: *The Journal of Supercritical Fluids* **95** (2014) 597–602.
- [9] Jumaah F., Larssonb S., Essén S., Cunicoa L. P., Holmb C., Turner Ch., Sandahla M.: *J. Chromatography A* **1440** (2016) 191–200.
- [10] Chen Y., Lehotay S. J., Moreaua R. A.: *Analytical Methods* **5** (2013) 6864–6869.





