

Alexander Triebel

**Entwicklung einer HPLC-MS-Methode zur Bestimmung
von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure**

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Studiengang Biochemie und molekulare Biomedizin

im Juli 2013

VORWORT

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von April 2012 bis Februar 2013 in der Core Facility Massenspektrometrie/Lipidomics am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz.

Ich möchte Mag. Dr. Hans-Jörg Leis für die unkomplizierte Betreuung dieser Arbeit danken.

Großer Dank geht an Mag. Dr. Harald Köfeler, der mir diese Masterarbeit in seiner Core Facility ermöglicht hat.

Ich möchte ganz besonders DI Dr. Martin Trötzmüller für seine Geduld und seine unzähligen Tipps bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Weiters möchte ich mich bei Astrid Knopf, Ing. Birgit Reiter und Christine Pein für großartige technische Unterstützung und bei DI Dr. Jürgen Hartler für die Weiterentwicklung des Lipid Data Analyzer bedanken.

Danke auch an BSc Rebecca Ruedl für die Bereitstellung und PhD Andreas Üllen für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Gewebeprouen.

Vielen Dank an das gesamte Team des ZMF für das äußerst angenehme Arbeitsumfeld.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Lipide	1
1.1.1	Fettsäuren	1
1.1.2	Glycerolipide	2
1.1.3	Glycerophospholipide	2
1.1.4	Sphingolipide	3
1.1.5	Sterole	4
1.1.6	Prenole	4
1.1.7	Saccharolipide	4
1.1.8	Polyketide	4
1.2	Struktur und biologische Funktion von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure	5
1.3	Chromatographie und HPLC	7
1.3.1	Komponenten einer HPLC-Anlage	7
1.3.1.1	Mobile Phase	7
1.3.1.2	Pumpe	8
1.3.1.3	Autosampler	8
1.3.1.4	Säule	8
1.3.1.5	Detektor	9
1.3.2	Das Chromatogramm	9
1.4	Massenspektrometrie	10
1.4.1	Ionisationsmethoden	10
1.4.1.1	Elektronenionisation (EI)	10
1.4.1.2	Chemische Ionisation (CI)	10
1.4.1.3	Atmospheric-Pressure Chemical Ionization (APCI)	11
1.4.1.4	Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)	11
1.4.1.5	Elektrospray-Ionisation (ESI)	11
1.4.2	Nieder- und hochauflösende Massenspektrometrie	12
1.4.3	Arten von Massenspektrometern	13
1.4.3.1	Sektorfeldgeräte	13
1.4.3.2	Quadrupol-Massenspektrometer	13
1.4.3.3	Ionenfallen	13
1.4.3.4	Time Of Flight (TOF)-Massenspektrometer	14
1.4.3.5	Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS)	14
1.4.3.6	Orbitrap-Massenspektrometer	14
1.4.4	Detektion	14
1.4.5	Scanmodi	15
1.4.5.1	Fullscan	15
1.4.5.2	Tandem-Massenspektrometrie	15
1.4.5.3	Data Dependent Acquisition	17
1.5	Schwierigkeiten bei der Analyse von PA und LPA	18
1.5.1	Extraktion	18
1.5.2	Chromatographische Trennung	19
1.5.3	Detektion	19

1.5.4 Isotopenkorrektur	20
1.6 Literaturbekannte HPLC-Methoden zur Bestimmung von PA und LPA.....	23
2 ZIELSETZUNG	24
3 MATERIALIEN.....	25
3.1 Chemikalien.....	25
3.2 Geräte.....	25
3.3 HPLC-MS	26
3.4 Labormaterialien.....	26
3.5 Lipidstandards.....	27
4 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG.....	28
4.1 Herstellung der Laufmittel.....	28
4.2 Herstellung der Lipid-Standardlösungen	28
4.3 Extraktionen	29
4.3.1 MTBE	29
4.3.2 Bligh and Dyer	29
4.3.3 Bligh and Dyer HCl.....	30
4.3.4 Butanol	30
4.4 HPLC	30
4.4.1 Methodenentwicklung.....	30
4.4.2 RP-Methode.....	30
4.4.3 HILIC-Methode	31
4.4.3.1 Retentionszeitstabilität.....	31
4.5 Massenspektrometrie	31
4.6 Auswertung.....	32
4.7 Realproben.....	32
5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	33
5.1 Extraktion	33
5.2 RP-Methodenentwicklung.....	38
5.2.1 Chromatographie von PA und PI zu Beginn der Methodenentwicklung.....	38
5.2.2 Evaluierung verschiedener RP-Säulen	39
5.2.2.1 Hypersil Gold.....	39
5.2.2.2 Hypersil Gold aQ	40
5.2.2.3 BEH C8.....	40
5.2.2.4 HSS C18	41
5.2.3 Einfluss des Injektionslösungsmittels auf die Chromatographie.....	42
5.2.4 Einfluss von pH-Wert und Salzkonzentration auf die Chromatographie.....	42
5.2.5 Finale Methode	44
5.2.6 Vergleich verschiedener Injektionsvolumina	46
5.3 HILIC-Methodenentwicklung.....	47
5.3.1 Finale Methode	49
5.3.2 Retentionszeitstabilität der HILIC-Methode	50
5.4 Vergleich der entwickelten Methoden	52
5.5 Detektion.....	53

5.6	Notwendigkeit einer Isotopenkorrektur	56
5.7	Anwendung der entwickelten Methoden auf Realproben.....	57
5.7.1	quantitative Auswertung.....	59
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	63
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
8	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	70

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phospholipide.....	3
Abbildung 2: Strukturformel von Cholesterin.....	4
Abbildung 3: Zentrale Rolle von Phosphatidsäure im Lipidstoffwechsel	5
Abbildung 4: Strukturformel von Lysophosphatidsäure.....	6
Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage	7
Abbildung 6: Chromatogramm eines Phospholipid-Gemisches	9
Abbildung 7: Schema der Elektrospray-Ionisation.....	12
Abbildung 8: Massenspektrum.....	15
Abbildung 9: Product Ion Scan	16
Abbildung 10: Precursor Ion Scan.....	16
Abbildung 11: Neutral Loss Scan.....	17
Abbildung 12: Ladungszustände von Phosphatidsäure	18
Abbildung 13: Isotopenverteilung von PA 24:0.....	20
Abbildung 14: Massenspektrum von PA 34:1 und PA 34:2	21
Abbildung 15: Extraktionseffizienz für Phosphatidsäure	35
Abbildung 16: Extraktionseffizienz für Lysophosphatidsäure.....	35
Abbildung 17: Extraktionseffizienz für Phospholipide I.....	36
Abbildung 18: Extraktionseffizienz für Phospholipide II.....	36
Abbildung 19: Chromatographie zu Beginn der Methodenentwicklung.....	38
Abbildung 20: Chromatographie von LPA, PA und PI auf Hypersil Gold	39
Abbildung 21: Chromatographie von LPA, PA und PI auf Hypersil Gold aQ.....	40
Abbildung 22: Chromatographie von LPA, PA und PI auf BEH C8	40
Abbildung 23: Chromatographie von LPA, PA und PI auf HSS C18.....	41
Abbildung 24: Einfluss des Injektionslösungsmittels auf die Chromatographie	42
Abbildung 25: Einfluss des pH-Wertes auf die Chromatographie	43
Abbildung 26: Einfluss der Salzkonzentration auf die Chromatographie	43
Abbildung 27: Finale RP-Methode.....	44
Abbildung 28: Vergleich Hypersil Gold – Hypersil Gold aQ.....	45
Abbildung 29: Einfluss des Injektionsvolumens auf die Peakform.....	46
Abbildung 30: Finale HILIC-Methode	49
Abbildung 31: Retentionszeitstabilität.....	50
Abbildung 32: Fragmentierung von LPA	53
Abbildung 33: Chromatogramm von PA 40:6 bei verschiedenen m/z-Isolations-Fenstern	54
Abbildung 34: Fragmentspektrum und Fragmentierungsschema von PA 34:1	55
Abbildung 35: Isotopenüberlappung	56
Abbildung 36: Ausgewählte PA-Spezies in murinem Hirn I.....	57
Abbildung 37: Ausgewählte PA-Spezies in murinem Hirn II.....	58
Abbildung 38: Ausgewählte LPA-Spezies in murinem Hirn.....	59
Abbildung 39: PA-Konzentrationen in murinem Hirn	61
Abbildung 40: LPA-Konzentrationen in murinem Hirn.....	61

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Einteilung der Lipide.....	1
Tabelle 2: Nötige Auflösung, um Isosopenpeaks zu unterscheiden	22
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	25
Tabelle 4: Geräte.....	25
Tabelle 5: Komponenten der verwendeten HPLC-MS-Systeme.....	26
Tabelle 6: Labormaterialien	26
Tabelle 7: Lipidstandards	27
Tabelle 8: Zusammensetzung des PL-Mastermix für die Methodenentwicklung.....	28
Tabelle 9: Zusammensetzung der Standardlösungen für die Extraktionsversuche	28
Tabelle 10: Gradient für RP-Trennung	31
Tabelle 11: Gradient für HILIC-Trennung.....	31
Tabelle 12: Extraktionseffizienz für PA und LPA	33
Tabelle 13: Extraktionseffizienz für die restlichen untersuchten Phospholipide	34
Tabelle 14: Einfluss der Säurekonzentration auf die Peakform von PA und LPA.....	48
Tabelle 15: Retentionszeiten bei unterschiedlicher Äquilibrationszeit	51
Tabelle 16: Vergleich der entwickelten Methoden.....	52
Tabelle 17: PA- und LPA-Konzentrationen in murinem Hirn	60

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
CI	Chemische Ionisation
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
CL	Cardiolipin
DDA	Data Dependent Acquisition
DG	Diacylglycerol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
FWHM	Full Width at Half Maximum
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPS	Lipopolysaccharid
MG	Monoacylglycerol
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NP	Normal Phase (Normalphase)
ODS	Octadecylsilan
PA	Phosphatidsäure
PAP	Phosphatidat-Phosphatase
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
ppm	parts per million
PS	Phosphatidylserin
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SRM	Selected Reaction Monitoring
StAbw	Standardabweichung
TG	Triacylglycerol
TOF	Time of Flight

1 EINLEITUNG

1.1 Lipide

Als Lipide werden Verbindungen bezeichnet, die sich durch ihre schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln und gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln auszeichnen (Löffler 2004). Eine genauere Klassifikation wurde von Fahy et al. vorgenommen, die Lipide als hydrophobe oder amphipatische Moleküle definieren, die teilweise oder zur Gänze durch die Kondensation von Thioestern und/oder Isopren-Einheiten entstanden sind (Fahy et al. 2005). Die Lipidklassen mit Beispielen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Einteilung der Lipide

Kategorie	Beispiele
Fettsäuren	Palmitinsäure, Arachidonsäure
Glycerolipide	Triacylglycerole
Glycerophospholipide	Phosphatidylcholin
Sphingolipide	Sphingomyelin
Sterole	Cholesterin
Prenole	Vitamin A
Saccharolipide	Lipopolysaccharide
Polyketide	Aflatoxin B1

Lipide haben vier Hauptaufgaben; sie dienen als Energiespeicher und Wärmeisolatoren im Fettgewebe, bilden Zellmembranen, sind Vitamine und spielen wichtige Rollen in der Signaltransduktion (Lottspeich 1998).

1.1.1 Fettsäuren

Fettsäuren sind Carbonsäuren mit einer Kettenlänge von vier bis 36 Kohlenstoffatomen. In höheren Organismen treten größtenteils geradzahlige, unverzweigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12-26 Kohlenstoffatomen auf. Man unterscheidet gesättigte Fettsäuren, die keine Doppelbindungen enthalten, und ein- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die eine oder mehrere Doppelbindungen, meist in der *cis*-Konfiguration, besitzen.

In der Schreibweise für Fettsäuren wird die Anzahl der Kohlenstoffatome durch einen Doppelpunkt von der Anzahl der Doppelbindungen getrennt (z.B. 18:0 für Stearinsäure, eine gesättigte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen; oder 20:4 für Arachidonsäure, eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen).

In einer alternativen Bezeichnung wird das Kohlenstoffatom nach der Carboxylgruppe als α (Alpha)-Kohlenstoff und das Kohlenstoffatom am Methylende der Fettsäure als ω (Omega)-Kohlenstoff bezeichnet. Als Omega-3-Fettsäure wird somit eine Fettsäure bezeichnet, die eine Doppelbindung zwischen dem dritt- und viertletzten Kohlenstoffatom besitzt.

Linolsäure (eine Omega-6-Fettsäure) und Linolensäure (eine Omega-3-Fettsäure) können vom menschlichen Körper nicht selbst synthetisiert werden. Sie werden als essentielle Fettsäuren bezeichnet und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden (Nelson & Cox 2009).

Fettsäuren sind in veresterter Form Bestandteil vieler anderer Lipidklassen (D. Voet et al. 2002).

1.1.2 Glycerolipide

Glycerolipide besitzen als Grundgerüst Glycerin (1,2,3-Propantriol), das mit einer, zwei oder drei Fettsäuren verestert ist, wodurch sich Mono-, Di- oder Triacylglycerole ergeben. Triacylglycerole (TG) können durch Hydrolyse unter Abspaltung freier Fettsäuren in Diacylglycerole (DG) und diese weiter in Monoacylglycerole (MG) umgewandelt werden. Triacylglycerole dienen der Energiespeicherung und werden im Körper in Adipocyten (Fettzellen) gespeichert. Bei Bedarf werden durch Lipasen Fettsäuren abgespalten, die zur Energiegewinnung verwendet werden (Lottspeich 1998; Nelson & Cox 2009).

1.1.3 Glycerophospholipide

Ein Glycerinmolekül, das am ersten und zweiten Kohlenstoffatom mit einer oder zwei Fettsäuren und am dritten Kohlenstoff mit einem Phosphatrest verbunden ist, wird als Glycerophospholipid oder Phospholipid bezeichnet. Phospholipide können am Phosphatrest mit einer weiteren Kopfgruppe verbunden sein, anhand derer sie weiter eingeteilt werden. Abbildung 1 zeigt die Struktur ausgewählter Phospholipide. Phospholipide können sich zu Phospholipiddoppelschichten zusammenlagern und so Zellmembranen bilden.

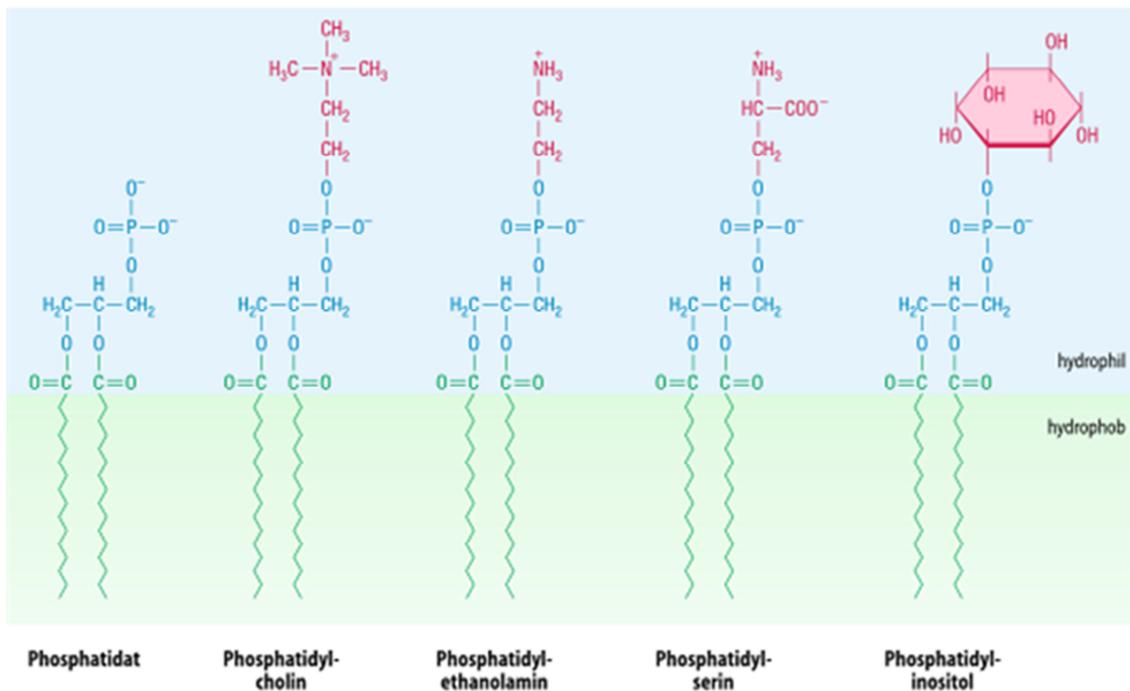


Abbildung 1: Phospholipide (Löffler 2004)

1.1.4 Sphingolipide

Sphingolipide bestehen aus einem Aminoalkohol (z.B. D-erythro-Sphingosin, Sphinganin oder 4-Hydroxysphingonin), einer Fettsäure und einer Kopfgruppe. Je nach Kopfgruppe werden Ceramide, Sphingomyeline und Glycosphingolipide unterschieden.

Bei Ceramiden ist Sphingosin über Säureamidbindung mit einer Fettsäure verbunden. Ceramide sind an der Regulation von Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt.

Sphingomyeline sind an der Hydroxygruppe des Sphingosins mit Phosphocholin oder Phosphoethanolamin verbunden und ähneln in ihrer Struktur den Glycerophospholipiden. Sie kommen in der Myelinscheide, einer Membranscheide, die die Fortsätze von Nervenzellen umgibt, vor.

Glycosphingolipide besitzen als Kopfgruppe ein oder mehrere Zuckermoleküle. Cerebroside tragen ein einzelnes Zuckermolekül, Ganglioside hingegen komplexe Oligosaccharide (Nelson & Cox 2009; Löffler 2004).

1.1.5 Sterole

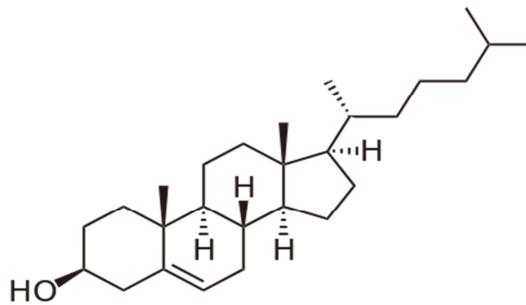


Abbildung 2: Strukturformel von Cholesterin
(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9a/Cholesterol.svg>)

Sterole besitzen ein Steroidgrundgerüst aus vier fusionierten Kohlenstoffringen.

Zu den Sterolen gehört Cholesterin (Abbildung 2), das im menschlichen Körper eine wichtige Rolle für Struktur und Fluidität von Membranen spielt, und eine wichtige Vorstufe für Steroidhormone (Geschlechtshormone, Gluco- und Mineralcorticoide) und Gallensäuren ist.

Gallensäuren sind Cholesterinester, die in der Leber hergestellt werden und eine wichtige Rolle bei der Fettverdauung spielen. Sie emulgieren Fette und ermöglichen so deren Resorption (Nelson & Cox 2009; D. Voet et al. 2002; Fahy et al. 2005).

Auch Vitamin D, das im Calciumstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt, gehört zu den Sterolen und wird aus 7-Dehydroxycholesterin synthetisiert.

1.1.6 Prenole

Zu den Prenolen gehören die fettlöslichen Vitamine A, E und K. Vitamin A (Retinol) ist ein Sehpigment, Vitamin E und seine Derivate dienen als Antioxidantien und Vitamin K ist wichtig für die Blutgerinnung (Fahy et al. 2005; Nelson & Cox 2009).

1.1.7 Saccharolipide

Sind Fettsäuren mit einem Zuckerrückgrat verbunden, spricht man von Saccharolipiden. Zu diesen gehört das Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien (Fahy et al. 2005).

1.1.8 Polyketide

Zu den Polyketiden gehören beispielsweise das Antibiotikum Tetracyclin oder das Mycotoxin Aflatoxin (Nelson & Cox 2009).

1.2 Struktur und biologische Funktion von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure

Phosphatidsäure (PA) ist das am einfachsten aufgebaute Phospholipid. Es besteht aus einem Glycerin-Rückgrat, das an der sn-3-Position mit Phosphorsäure und an der sn-1- und sn-2-Position mit je einer Fettsäure verestert ist. PA hat im Unterschied zu anderen Phospholipiden keine Kopfgruppe und besitzt daher eine konische Form (Kooijman et al. 2005).

Die Synthese von Phosphatidsäure kann entweder von Glycerol-3-Phosphat oder von Dihydroxyacetonphosphat ausgehen. Glycerol-3-Phosphat wird zu 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat (=Lysophosphatidsäure, LPA) umgewandelt und weiter zu Phosphatidsäure acyliert. Dihydroxyacetonphosphat wird zu 1-Acyl-Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt und dann zu 1-Acyl-Glycerol-3-Phosphat reduziert. LPA wird durch eine weitere Acylierung zu Phosphatidsäure umgewandelt. Die Synthese aus Glycerol-3-Phosphat kann von Prokaryonten, Pflanzen, Hefen und Eukaryonten durchgeführt werden, während die notwendigen Enzyme für die Synthese aus Dihydroxyacetonphosphat nur in Hefen und Säugetieren vorkommen (Athenstaedt & Daum 1999).

Phosphatidsäure ist die zentrale Synthesestufe für andere Phospholipide und Neutrallipide und spielt somit eine wichtige Rolle sowohl bei der Bildung von Zellmembranen als auch im Energiestoffwechsel (Abbildung 3). Aufgrund dieser Rolle als Intermediat im Lipidstoffwechsel sind die Konzentrationen von Phosphatidsäure sehr niedrig und machen nur etwa 1 % des zellulären Lipidgehalts aus (Shin & Loewen 2011).

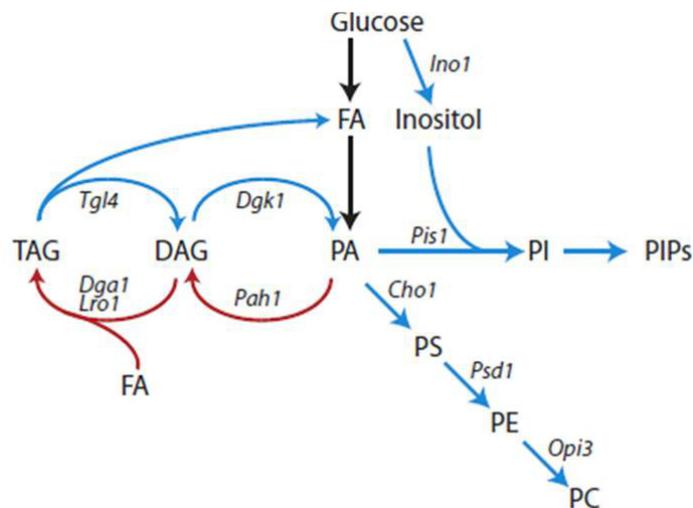


Abbildung 3: Zentrale Rolle von Phosphatidsäure im Lipidstoffwechsel (Loewen 2012)

Phosphatidsäure ist ein wichtiges Signalmolekül, in dieser Funktion wird es meist durch Phospholipase D, durch Abspaltung der Kopfgruppe von einem anderen Phospholipid,

synthetisiert. In seiner Signalfunktion hat PA beispielsweise Einfluss auf Zellwachstum, -proliferation und Membranfluidität (Wang et al. 2006; Kooijman et al. 2005). Die Termination dieser Signalwege und der Abbau von Phosphatidsäure zu 1,2-Diacylglycerol und Phosphat wird durch Phosphatidat-Phosphatase (PAP) katalysiert (Athenstaedt & Daum 1999).

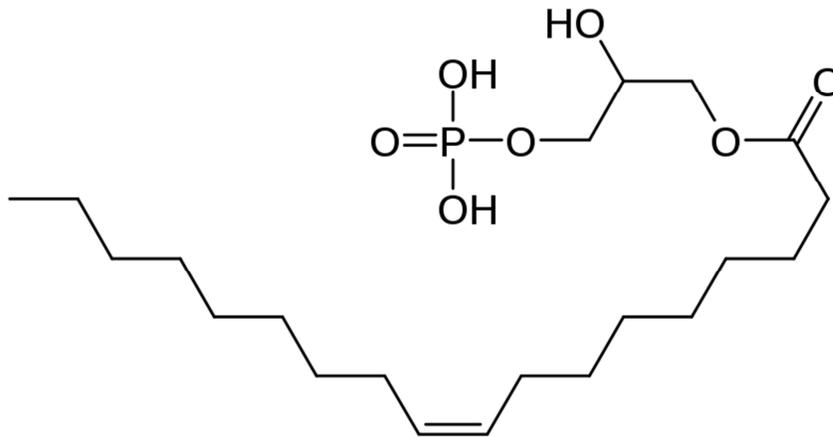


Abbildung 4: Strukturformel von Lysophosphatidsäure
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lysophosphatidic_acid.svg)

Lysophosphatidsäure (Abbildung 4) hat die gleiche chemische Grundstruktur wie Phosphatidsäure, besitzt aber nur einen Fettsäurerest. Im Unterschied zu anderen Phospholipiden ist LPA aufgrund seiner hohen Polarität wasserlöslich. LPA kann entweder aus PA durch die Hydrolyse eines Fettsäurerestes, katalysiert durch Phospholipase A1 oder Phospholipase A2, entstehen, oder durch die Abspaltung der Cholin-Kopfgruppe von Lysophosphatidylcholin (LPC) durch Phospholipase D (Autotaxin) (Aoki et al. 2002).

Plasma-Konzentrationen von LPA sind sehr gering (<100 nM), können jedoch im Laufe von Schwangerschaften oder bestimmten Krankheiten (Ovarialkarzinom, Prostatakrebs) ansteigen. LPA stimuliert Zellproliferation und -migration und wirkt dabei über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Inaktivierung von exogenem LPA erfolgt durch Lipid-Phosphat-Phosphohydrolasen unter Entstehung von Monoacylglycerol (Mills & Moolenaar 2003; Umezū-Goto et al. 2002; Goldsmith et al. 2011).

1.3 Chromatographie und HPLC

Die Chromatographie kann als physikalisches Trennverfahren, bei dem Analyten zwischen zwei Phasen verteilt werden, betrachtet werden. Eine Phase ruht und wird als stationäre Phase bezeichnet, die andere Phase bewegt sich durch die stationäre Phase und wird mobile Phase genannt. Die Trennung erfolgt unter anderem aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Stoffe zwischen den beiden Phasen (Meyer 2006).

Je nach Art der Verteilung und der Phasenzustände der stationären und mobilen Phase (fest, flüssig oder gasförmig) ergeben sich verschiedene Kombinationen, beispielsweise Dünnschicht-, Säulen-, Gas- oder Ionenaustauschchromatographie. HPLC (high pressure liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Flüssigkeitschromatographie, bei der verbesserte Materialien und Fertigungstechniken anspruchsvollere Trennleistungen ermöglichten (Falbe & Regitz 1998).

1.3.1 Komponenten einer HPLC-Anlage

In Abbildung 5 sind die prinzipiellen Komponenten einer HPLC-Anlage dargestellt.

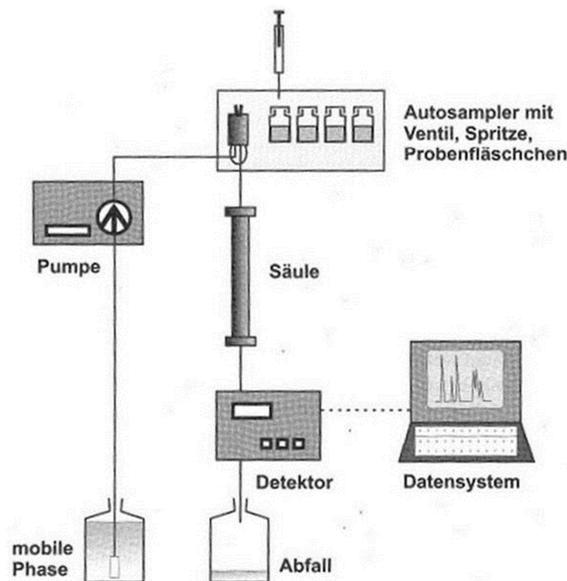


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (Meyer 2006)

1.3.1.1 Mobile Phase

Die Verteilung der Analyten zwischen der mobilen und der stationären Phase wird im Wesentlichen durch die Stärke der polaren Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der mobilen und stationären Phase bestimmt.

Wird eine polare stationäre Phase und eine unpolare mobile Phase verwendet, spricht man von Normalphasenchromatographie (NP). Polare Verbindungen eluieren aufgrund ihrer starken Wechselwirkungen mit der stationären Phase später als unpolare.

Umkehrphase (Reversed Phase, RP), bedeutet, dass eine unpolare stationäre Phase und eine polare mobile Phase verwendet wird. In diesem Modus eluieren polare Verbindungen früher als unpolare (Lindsay 1996).

Es ist auch möglich, eine polare stationäre Phase in Kombination mit einer relativ polaren mobilen Phase zu verwenden. Der Retentionsmechanismus bei diesem Modus, der als HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) bezeichnet wird, ist komplizierter als bei NP- oder RP-Chromatographie und noch nicht eindeutig erforscht. Es wird jedoch angenommen, dass die Trennung darauf beruht, dass sich an den polaren Gruppen der stationären Phase eine benetzende Wasserschicht bildet und die Analytenmoleküle sich je nach ihrer Polarität zwischen dem unpolaren Teil der mobilen Phase und der Wasserschicht an der stationären Phase verteilen. Hierbei spielen sowohl Dipol-Dipol-Interaktionen als auch Wasserstoffbrückenbindungen eine Rolle (Buszewski & Noga 2012).

Bleibt während einer chromatographischen Trennung die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant, spricht man von isokratischer Elution. Ändert sie sich, handelt es sich um Gradientenelution. Gradientenelution ist beispielsweise dann notwendig, wenn die Analyten ein breites Spektrum an Polarität abdecken, sodass eine isokratische Trennung nicht oder nur sehr schwer möglich ist (Lindsay 1996).

1.3.1.2 Pumpe

Die Aufgabe der Pumpe besteht darin, die mobile Phase durch die Säule zu befördern. Sie muss in der Lage sein, selbst bei hohen Drucken (bis über 1000 bar) den eingestellten Lösungsmittelfluss konstant zu halten (Meyer 2010).

1.3.1.3 Autosampler

Ein Autosampler ist für die Aufgabe der Probe in den Lösungsmittelfluss verantwortlich. In modernen Autosamplern können viele Proben gekühlt gelagert und automatisiert nacheinander analysiert werden (Meyer 2006).

1.3.1.4 Säule

In der HPLC-Säule, deren Hülle meist aus Edelstahl besteht, befindet sich die stationäre Phase, meist in Form poröser, sphärischer Kieselgelteilchen. Diese kleinen Teilchen, die Durchmesser von weniger als 2 µm besitzen können, setzen dem Lösungsmittelstrom einen

beträchtlichen Widerstand entgegen, wodurch in der Säule ein sehr hoher Gegendruck bestehen kann (Lindsay 1996).

Die meisten Säulen bestehen aus Silica (Kieselgel), das freie Silanol (OH-)Gruppen besitzt und dadurch sehr polar ist, oder aus chemisch modifiziertem Silica, bei denen die OH-Gruppen z.B. mit einem Alkohol verbunden sind. Beim unpolaren C18-Typ ist das Kieselgel mit ODS (Octadecylsilan) modifiziert.

Einer analytischen HPLC-Säule kann eine Vorsäule vorgeschaltet werden, die eine Verschmutzung der analytischen Säule durch Verunreinigungen vermindert (Lindsay 1996; Meyer 2010).

1.3.1.5 Detektor

Nach dem Austritt aus der Säule (Elution) werden die chromatographisch getrennten Probenmoleküle durch einen Detektor registriert.

Es gibt viele verschiedene Arten von Detektoren, beispielsweise UV-Absorptionsdetektoren, Diodenarraydetektoren, Fluoreszenzdetektoren, elektrochemische Detektoren, Brechungsindexdetektoren oder Massenspektrometer (Lindsay 1996).

1.3.2 Das Chromatogramm

Das Ergebnis einer chromatographischen Trennung ist das Chromatogramm, hier wird auf der x-Achse die Zeit und auf der y-Achse das Detektorsignal, das proportional der Menge des Analyten ist, aufgetragen. Die Zeit, nach der eine Substanz aus der Säule austritt, wird als Retentionszeit bezeichnet und ist ein charakteristisches Merkmal für diese Substanz (Lindsay 1996). Abbildung 6 zeigt das Chromatogramm einer Trennung mehrerer Phospholipidklassen.

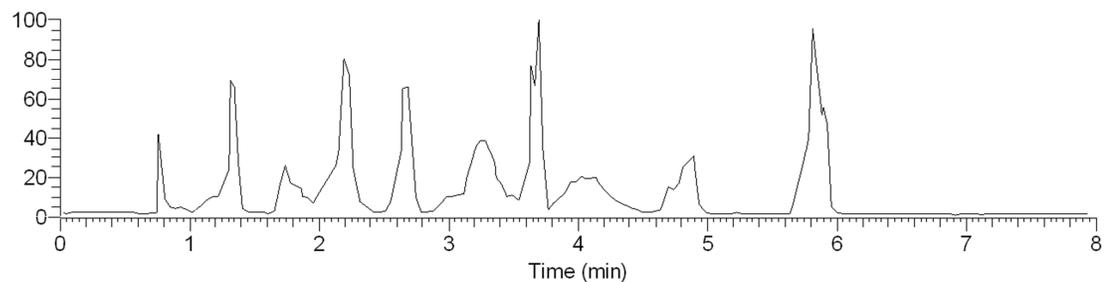


Abbildung 6: Chromatogramm eines Phospholipid-Gemisches

1.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren, bei dem Ionen entsprechend ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z -Verhältnis) aufgetrennt und detektiert werden.

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der Ionen erzeugt werden, einem Analysator, in dem die Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt werden und einem Detektor, der die entstandenen Ionen registriert (Falbe & Regitz 1998).

1.4.1 Ionisationsmethoden

Die Wahl der verwendeten Ionisationsmethode ist unter anderem von der Art und dem Phasenzustand der zu analysierenden Substanz abhängig. Liegen die Analyten in gelöster Form vor, muss gleichzeitig mit der Ionisation das Lösungsmittel verdampft werden; dazu kann ESI oder APCI verwendet werden, selbst eine Kopplung von Chromatographie mit MALDI ist möglich (Perlman et al. 2007). EI und CI hingegen können nur in Kombination mit einer gaschromatographischen Trennung verwendet werden.

Je nach verwendetem Ionisationsmodus können entweder positive oder negative Ionen erzeugt werden. Im positiven Ionisationsmodus können beispielsweise protonierte Ionen ($m/z = [M+H]^+$) oder Addukte, z.B. Ammoniumaddukte ($m/z = [M+NH_4]^+$), generiert werden. Dem Lösungsmittel wird oft eine schwache organische Säure zugegeben, um die Protonierung zu begünstigen. Im negativen Modus wird im Allgemeinen ein Proton abgespalten ($m/z = [M-H]^-$) oder es kommt zu Adduktbildung (z.B. $[M+CH_3COO]^-$ bei entsprechenden Lösungsmitteladditiven) (Falbe & Regitz 1998; Ashcroft).

1.4.1.1 Elektronenionisation (EI)

Elektronen kollidieren in der Ionenquelle mit Analyt-Molekülen; durch die hohe kinetische Energie der Elektronen (70 eV) wird ein Elektron aus dem Molekül entfernt und es entstehen Radikal-Kationen. Es handelt sich hierbei um eine harte Ionisierungstechnik, bei der kaum noch Molekülionen zu beobachten sind (Herbert & Johnstone 2003).

1.4.1.2 Chemische Ionisation (CI)

In der Ionenquelle befindet sich Methan im Überschuss, das von einem Elektronenstrahl ionisiert wird. Dadurch entstehen Carboniumionen (CH_5^+), die ein Proton auf Analytenmoleküle übertragen können, wodurch protonierte Analyt-Ionen entstehen. CI ist eine weiche Ionisierungstechnik, bei der Fragmentierungsreaktionen in den Hintergrund treten (Herbert & Johnstone 2003).

1.4.1.3 Atmospheric-Pressure Chemical Ionization (APCI)

Die Analytenlösung wird durch eine meist erhitzte Edelstahlkapillare befördert; das Lösungsmittel wird durch eine Kombination von hoher Temperatur und Trägergasfluss verdampft. In der Verdampfungskammer befindet sich eine Nadel-Elektrode, die durch Koronaentladung Lösungsmittelmoleküle und Analytmoleküle ionisiert. Ionisierte Lösungsmitteltröpfchen können weiters chemisch mit Analytmolekülen reagieren, um diese zu ionisieren. Die Ionisierung findet in der Gasphase statt (Prakash et al. 2007).

1.4.1.4 Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)

Die Probe ist in einer Matrix eingebettet und wird mit einem UV-Laser beschossen. Die Energie des Lasers wird von der Matrix absorbiert und teilweise auf die Probenmoleküle übertragen, sodass neutrale und ionisierte (protonierte oder deprotonierte) Matrix- und Probenbestandteile entstehen. MALDI wird hauptsächlich für die massenspektrometrische Analytik von Proteinen und Peptiden verwendet (Knochenmuss 2006).

1.4.1.5 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Im Unterschied zu den anderen Ionisierungstechniken findet bei Elektrospray die Ionisierung in der flüssigen Phase statt. Im Eluat befinden sich zugegebene ionische Additive, wodurch Ladungsträger bereits vorhanden sind. Die Lösung wird durch eine Stahlkapillare gepumpt, an deren Ende ein elektrisches Potential angelegt wird. Erreicht die Flüssigkeit das Ende der Kapillare, bildet sich durch die Kombination von Oberflächenspannung und elektrostatischer Anziehung der sogenannte „Taylor Cone“; die Flüssigkeitsoberfläche läuft kegelförmig zusammen. Von der Spitze dieses Kegels werden einzelne Flüssigkeitströpfchen freigesetzt, die aus Lösungsmittel, Analyt-Molekülen und Ladungsträgern bestehen. Der Elektrospray-Prozess ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Für die Entstehung von Ionen während des ESI-Prozesses gibt es zwei Modelle, das charge residue model und das ion evaporation model: Nach dem ion evaporation model führt das Verdampfen von Lösungsmittel zu einer Verringerung der Radien der Tröpfchen. Die Tröpfchen werden immer kleiner, bis die Feldstärke an der Oberfläche ausreichend groß ist, dass einzelne Ionen in die Gasphase desorbiert werden. Das charge residue model besagt, dass während des Elektrospray-Prozesses Tröpfchen entstehen, die nur ein Analyt-Ion enthalten, welche nach dem Verdampfen des Lösungsmittels freigesetzt werden. Dieses Modell erklärt die Stabilität nonkovalenter Komplexe („Addukte“), da diese durch das Verdampfen des Lösungsmittels gekühlt und somit stabilisiert werden.

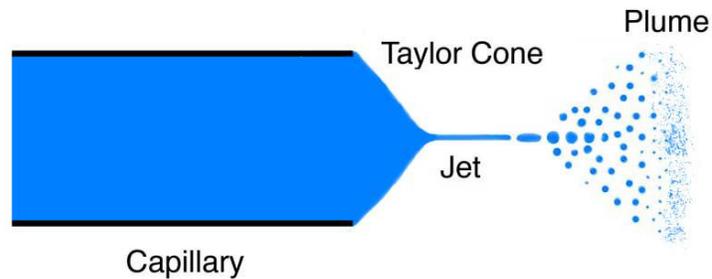


Abbildung 7: Schema der Elektrospray-Ionisation
 (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Taylor_cone.jpg)

ESI wird als „sanfte“ Ionisationsart bezeichnet; die entstehenden Ionen befinden sich nicht in einem angeregten Zustand und werden durch den Ionisierungsprozess weitgehend nicht fragmentiert. Weitere Vorteile sind die geringe chemische Spezifität und die Möglichkeit zur einfachen Kopplung mit Flüssigkeitschromatographie (Fenn et al. 1989; Wilm 2011).

1.4.2 Nieder- und hochauflösende Massenspektrometrie

Unter Auflösung versteht man in der Massenspektrometrie den Unterschied im Masse-Ladungs-Verhältnis, der mit einem Massenspektrometer messbar ist. Die Formel für die Auflösung lautet:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

R...Auflösung

M...m/z-Wert

Während dieser Wert früher anhand zweier gleich hoher, nebeneinander liegenden Peaks berechnet wurde, wird er heute meist durch FWHM (Full Width at Half Maximum) bestimmt, was die Peakbreite (in m/z) bei der halben Peakhöhe im Spektrum bezeichnet.

Ist ein Massenspektrometer in der Lage, m/z 1000 und m/z 1001 als zwei voneinander getrennte Signale zu messen, beträgt seine Auflösung 1000. Mit derselben Auflösung können aber auch m/z 100,0 und m/z 100,1 getrennt voneinander gemessen werden. Die Auflösung ist massenabhängig, daher muss bei ihrer Angabe immer der entsprechende m/z-Wert angegeben werden. Beispielsweise wird die maximale Auflösung eines LTQ-FT-Massenspektrometers der Firma Thermo Scientific von 1 000 000 für m/z-Werte von 400 angegeben; bei höheren Werten ist sie entsprechend geringer (Thermo Fisher Scientific Inc. 2007b).

Quadrupol- und Ionenfallen-Massenspektrometer besitzen „Einheitsauflösung“, das bedeutet, dass die Nachkommastellen nicht mehr präzise gemessen werden können (Holčápek et al. 2012). Andere Bauarten, beispielsweise TOF-, Orbitrap- und besonders FT-ICR-

Massenspektrometer erreichen viel höhere Auflösungen, die Werte von über 1 000 000 annehmen können. Gleichzeitig bieten sie auch sehr hohe Massengenauigkeit, was bedeutet, dass das theoretische und das gemessene m/z -Verhältnis nur um einen sehr geringen Wert voneinander abweichen (≤ 2 ppm). Dies ermöglicht Analysetechniken, bei der aus dem gemessenen m/z -Verhältnis auf die elementare Zusammensetzung geschlossen werden kann. Dafür sind jedoch eine entsprechend hohe Auflösung und Massengenauigkeit nötig (Scigelova et al. 2011).

1.4.3 Arten von Massenspektrometern

1.4.3.1 Sektorfeldgeräte

Beim ältesten Typ von Massenspektrometern werden Ionen in einem Magnetfeld nach ihrem m/z -Verhältnis unterschiedlich stark abgelenkt (Falbe & Regitz 1998).

1.4.3.2 Quadrupol-Massenspektrometer

Quadrupol-Analysatoren bestehen aus vier im Idealfall hyperbolischen Stabelektroden (Quadrupole), die parallel angeordnet sind. An jedes Paar gegenüberliegender Elektroden wird eine Gleichspannung angelegt, die von einer variablen Wechselspannung überlagert wird. Im Raum zwischen den Quadrupolen entsteht ein elektrisches Feld, in dem sich die Ionen auf einer kornenzieherartigen Bahn bewegen. Nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses können das System passieren, alle anderen besitzen eine instabile Flugbahn und treffen auf die Elektroden, an denen sie entladen werden. Durch Veränderung der angelegten Spannungen ist es möglich, dass nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses zum Detektor gelangen. Bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern sind drei Quadrupole hintereinander angeordnet, was besondere Analysetechniken ermöglicht (Falbe & Regitz 1998; Herbert & Johnstone 2003).

1.4.3.3 Ionenfallen

Ähnlich wie bei Quadrupol-Massenspektrometern befinden sich die Ionen auch hier in einem Quadrupolfeld; bei Ionenfallen ist es jedoch möglich, alle Ionen in einem bestimmten m/z -Bereich im Quadrupolfeld zu halten. Dort verlieren sie durch Kollision mit Heliummolekülen kinetische Energie (sie werden „gekühlt“) und können nun nach ihrem m/z -Verhältnis nacheinander ausgeworfen und detektiert werden. Während die Trennung von Ionen in einem Quadrupol-Massenspektrometer also auf massenselektiver Stabilität beruht, arbeitet eine Ionenfalle nach dem Prinzip der massenselektiven Instabilität. Ionenfallen sind weiters zur Durchführung von Tandem-Massenspektrometrie und MS^n -Experimenten fähig. Dabei wird das Kühlungsgas gleichzeitig als Kollisionsgas benutzt (March 1997).

1.4.3.4 Time Of Flight (TOF)-Massenspektrometer

Die Ionen werden durch einen Spannungsstoß beschleunigt und bewegen sich durch eine evakuierte Flugröhre, an deren Ende sich ein Detektor befindet. Da die Geschwindigkeit der Ionen nur von ihrer kinetischen Energie und ihrer Masse abhängig ist, kann aus der Flugzeit das m/z -Verhältnis berechnet werden (Falbe & Regitz 1998).

1.4.3.5 Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS)

Eine technisch sehr aufwändige Form der Massenspektrometrie ist die FT-ICR-Massenspektrometrie. Sie basiert auf der Bestimmung des m/z -Verhältnisses durch Fourier-Transformation. Ionen werden in ein starkes Magnetfeld (z.B. 7 T) eingebracht und bewegen sich auf Kreisbahnen. Dabei hängt ihre Rotationsfrequenz nur von der Stärke des Magnetfeldes und dem m/z -Verhältnis ab. Die Ionen werden nun durch ein elektrisches Feld angeregt, wodurch sich ihr Radius vergrößert. Sie bewegen sich an Detektorplatten vorbei und induzieren in diesen eine Spannung. Durch Fourier-Transformation der überlagerten Frequenzen können nun mit sehr hoher Genauigkeit die Masse-Ladungs-Verhältnisse bestimmt werden. FT-ICR-Massenspektrometer können sehr hohe Massenauflösungen erreichen, erfordern jedoch eine aufwändige Kühlung der supraleitenden Magnete mit flüssigem Helium (Marshall & Hendrickson 2002).

1.4.3.6 Orbitrap-Massenspektrometer

Im Unterschied zu FT-ICR-Massenspektrometern basieren Orbitrap-Massenspektrometer nicht auf Oszillationen der Ionen in einem Magnetfeld, sondern in einem elektrostatischen Feld. Das Herzstück einer Orbitrap besteht aus einer zylindrischen Außenelektrode und einer spindelförmigen Innenelektrode. Ionen werden tangential zu diesen Elektroden eingebracht und bewegen sich, abhängig von ihrem m/z -Verhältnis, zwischen den beiden Elektroden. Die Frequenzen der Oszillationen entlang der z -Achse der Elektroden ist nur von ihrem m/z -Verhältnis abhängig und wird, ähnlich wie bei FT-ICR-Massenspektrometern, durch Fourier-Transformation bestimmt. Orbitrap-Massenspektrometer erreichen sehr hohe Auflösungen (bis zu 240 000), wobei zu beachten ist, dass (wie auch bei FT-ICR-Massenspektrometern) die Zykluszeit mit der Auflösung steigt (Makarov 2000; Hu et al. 2005; Thermo Fisher Scientific Inc. 2011).

1.4.4 Detektion

Bei den meisten Typen von Massenspektrometern erfolgt die Detektion durch einen Elektronenvervielfacher, der unselektiv alle auftreffenden Ionen detektiert. Die Detektion ist mit der Entladung der Ionen verbunden. Bei FT-ICR- und Orbitrap-Massenspektrometern

hingegen erfolgt die Detektion durch Vorbeibewegung der Ionen an Detektorplatten. Die Detektion der Ionen führt nicht zu ihrer Entladung.

1.4.5 Scanmodi

1.4.5.1 Fullscan

Im Fullscan entsteht ein komplettes Massenspektrum des/der Analyten. In einem Massenspektrum (Abbildung 8) wird auf der x-Achse das m/z -Verhältnis und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen, wobei der Peak mit der höchsten Intensität als Basispeak bezeichnet wird.

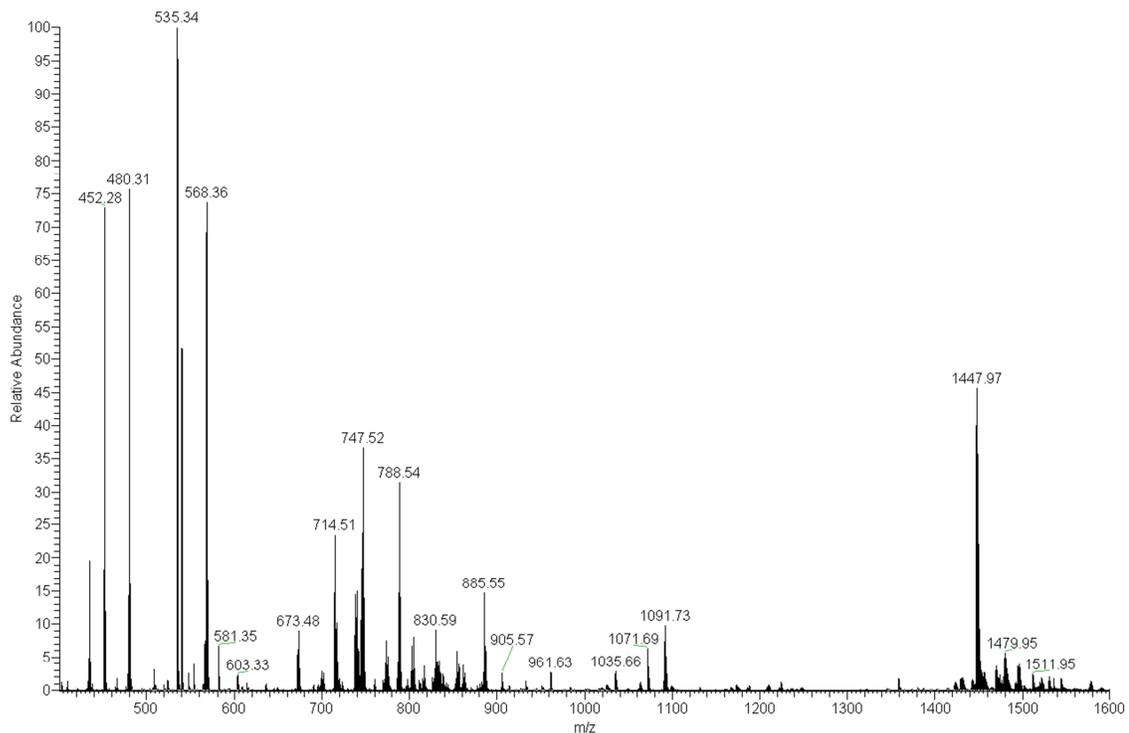


Abbildung 8: Massenspektrum; Basispeak bei m/z 535,34

1.4.5.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionenfallen-, Triple Quadrupol- und verschiedene Hybrid-Massenspektrometer sind zu Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) fähig. In einem Triple-Quadrupol sind drei Quadrupole in Serie angeordnet. Der erste und der dritte Quadrupol dienen als Massenfilter, die selektiv nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses durchlassen. Der zweite Quadrupol wird als Kollisionskammer benutzt. Hier werden eintreffende Ionen durch kollisionsinduzierte Dissoziation (collision induced dissociation, CID) gespalten. Hierbei kollidieren Analyt-Ionen mit Molekülen eines Kollisionsgases, wobei Energie übertragen wird und intramolekulare Bindungen gespalten werden. Auf diese Weise entsteht aus einem Vorläuferion (parent ion,

precursor ion) ein Produktion (product ion). Die Anzahl der Ladungen kann sich dabei nicht verändern; aus einem Vorläuferion, das eine Ladung trägt, kann nur ein geladenes Produktion (und ein oder mehrere ungeladene Neutralteilchen) entstehen. Die Analyse derartiger Zerfallsreaktionen wird als Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet (Thermo Fisher Scientific Inc. 2010a; Thermo Electron Corporation 2003) und ermöglicht verschiedene Analysemodi:

Im Product Ion Scan (Abbildung 9) werden im ersten Quadrupol nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses durchgelassen, die im zweiten Quadrupol fragmentiert werden. Im dritten Quadrupol werden die entstandenen Produktionen analysiert (Pulfer & Murphy 2003).

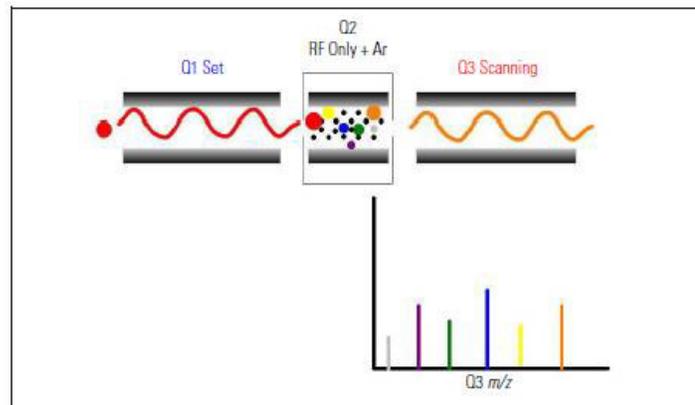


Abbildung 9: Product Ion Scan (Thermo Fisher Scientific Inc. 2010b)

In einem Precursor Ion Scan (Abbildung 10) werden alle Ionen angezeigt, bei deren Fragmentierung ein bestimmtes Produktion entsteht. Dadurch ist es möglich, Verbindungen mit einer gemeinsamen Struktur, z.B. bestimmte Phospholipide, zu analysieren (Pulfer & Murphy 2003).

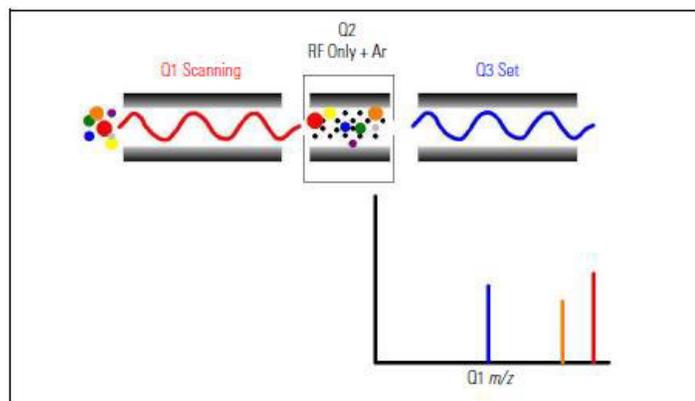


Abbildung 10: Precursor Ion Scan (Thermo Fisher Scientific Inc. 2010b)

Im Neutral Loss Scan (Abbildung 11) wird der Verlust eines ungeladenen Teilchens beobachtet. In einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer sind dazu der erste und der dritte Quadrupol jeweils um einen bestimmten Wert versetzt, der der Masse der gemeinsamen abgespaltenen Gruppe entspricht (z.B. CO₂, H₂O, bei Lipiden auch ganze Kopfgruppen) (Thermo Electron Corporation 2003; Pulfer & Murphy 2003).

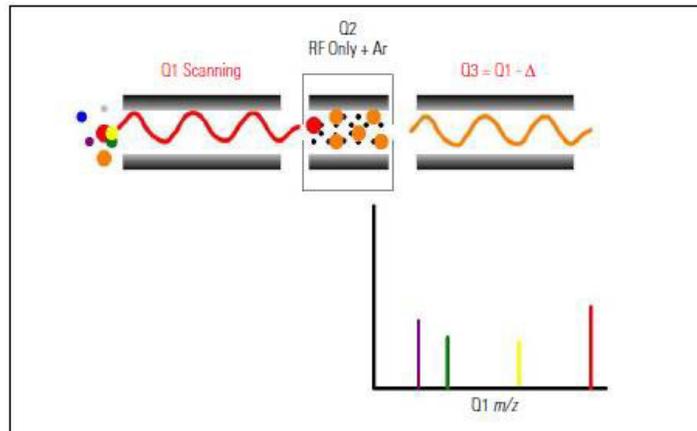


Abbildung 11: Neutral Loss Scan (Thermo Fisher Scientific Inc. 2010b)

Der Scanmodus mit der höchsten Spezifität ist der SRM (Selected Reaction Monitoring)-Modus. Hier wird die Fragmentierung eines bestimmten Vorläuferions zu einem bestimmten Produkt beobachtet. SRM ermöglicht sehr kurze Zykluszeiten und wird oft zur Spurenanalyse verwendet (Thermo Electron Corporation 2003).

1.4.5.3 Data Dependent Acquisition

Bei Verwendung von Data Dependent Acquisition (DDA) kann festgelegt werden, welche Analysen beim Eintreten bestimmter Kriterien durchgeführt werden. Dies kann z.B. zur Strukturaufklärung verwendet werden, indem von allen Ionen, die eine bestimmte Intensität überschreiten, automatisch Produkionspektren aufgenommen werden (Thermo Electron Corporation 2003).

1.5 Schwierigkeiten bei der Analyse von PA und LPA

1.5.1 Extraktion

Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure gehören zu den polarsten Phospholipiden. Standard-Protokolle für die Lipidextraktion (z.B. nach Bligh and Dyer oder nach Folch) beruhen auf einer besseren Löslichkeit von Lipiden in Chloroform als in Wasser. Im entstehenden zweiphasigen System besteht die organische Phase aus Chloroform und den darin gelösten Lipiden und die wässrige Phase aus einem Wasser-Methanol-Gemisch und darin gelösten polaren Substanzen (z.B. Kohlenhydraten) (Folch et al. 1957; Bligh & Dyer 1959).

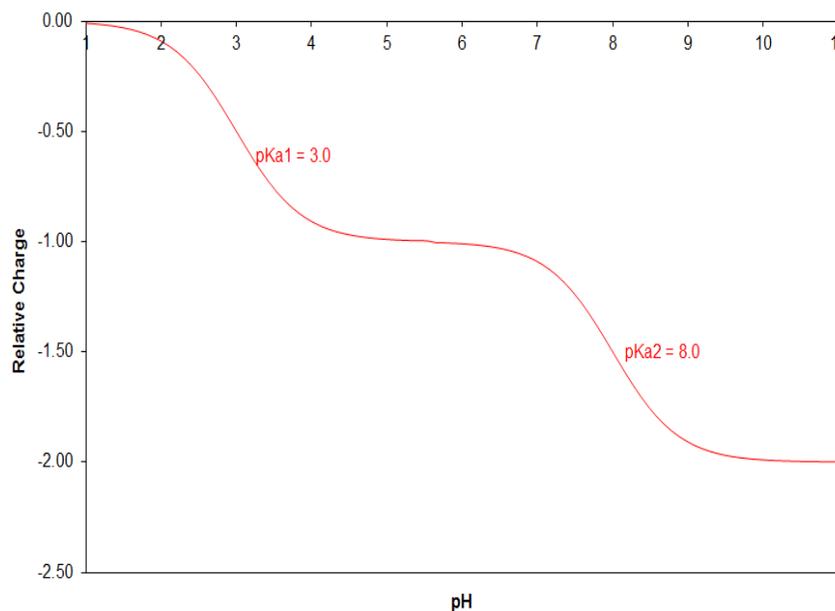


Abbildung 12: Ladungszustände von Phosphatidsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert (http://www.avantilipids.com/images/PKA/PA_ION_SM.gif)

Abbildung 12 zeigt das Ionisationsverhalten von Phosphatidsäure. Abhängig vom pH-Wert und dem Protonierungszustand der beiden Hydroxygruppen kann Phosphatidsäure in drei verschiedenen Ladungszuständen vorliegen; ungeladen, einfach oder zweifach negativ geladen. Der pKa-Wert entspricht dem pH-Wert, bei dem die Hälfte der jeweiligen Hydroxygruppen protoniert bzw. deprotoniert sind.

Phosphatidsäure ist bei einem pH-Wert von 4 bis 7 einfach negativ und ab einem pH-Wert von 9 zur Gänze zweifach negativ geladen. Werden klassische Extraktionsmethoden (nach Folch oder nach Bligh and Dyer) verwendet, hat das Extraktionsgemisch einen pH-Wert von ca. pH 5. Bei diesem pH-Wert ist Phosphatidsäure einfach negativ geladen (ionisch) und würde sich somit besser in der wässrigen Phase als in der organischen Phase (Chloroform)

lösen, was zu einer schlechten Extraktionseffizienz führen kann. Lysophosphatidsäure besitzt die gleichen protonierbaren Gruppen am Phosphatrest, sollte also ein vergleichbares Ionisationsverhalten zeigen. Da die Gesamtpolarität eines Analyten neben dem Protonierungszustand der Kopfgruppe auch von der Anzahl der Kohlenstoffatome und Doppelbindungen der Fettsäurereste abhängt, ist es wahrscheinlich, dass Lysophosphatidsäure dennoch eine andere Extraktionseffizienz zeigt wie Phosphatidsäure.

1.5.2 Chromatographische Trennung

Im Unterschied zu anderen Phospholipiden besitzen sowohl Phosphatidsäure als auch Lysophosphatidsäure einen Phosphatrest am Glycerolgerüst, der mit keiner weiteren Kopfgruppe verbunden ist. Verbindungen mit einer endständigen Phosphatgruppe (dazu gehören neben Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure beispielsweise auch Nukleosidphosphate) tendieren dazu, mit Edelstahloberflächen zu interagieren und ungewünschte Peakverbreiterung hervorzurufen (Wakamatsu et al. 2005; Myint et al. 2009). HPLC-Systeme besitzen Edelstahlbauteile im Injektionssystem (Injektionsnadel, Sample Loop), an denen sich u.a. phosphorylierte Verbindungen anhaften können (Thermo Fisher Scientific Inc. 2007a). Weiters sind die Hochdruckleitungen in einer HPLC-Anlage (Verbindungen zwischen Pumpe und Säule) aus Edelstahl, um dem hohen Druck standhalten zu können (Thermo Electron Corporation 2006). Auch der Einlass in die Ionenquelle des Massenspektrometers (ESI-Nadel) ist aus Edelstahl (Thermo Fisher Scientific Inc. 2008). Vermutlich besteht auch die Innenseite der Trennsäule aus Edelstahl. Mit all diesen Bauteilen können Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure interagieren, was zu einer unerwünschten Peakverbreiterung (Tailing) führt.

1.5.3 Detektion

Die massenspektrometrische Detektion von Phosphatidsäure erfolgt meist im negativen Modus ($[M-H]^-$ -Ionen), obwohl auch positiv geladene $[M+H]^+$ -Ionen beobachtet werden können (Pulfer & Murphy 2003; Scherer et al. 2010). Während andere Phospholipide durch die Abspaltung ihrer Kopfgruppe als Neutralteilchen oder Produktion selektiv detektiert werden können, besitzen Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure keine charakteristischen Kopfgruppe oder Fragmente. Im negativen Modus können, wie bei anderen Phospholipiden, die Fettsäurereste als Carboxylat-Anionen detektiert werden und so Rückschlüsse auf die Fettsäurezusammensetzung getroffen werden. Weiters kann PA und LPA auch durch einen Precursor Ion Scan von m/z 153 detektiert werden. Dieses Ion entspricht zyklischem Glycerolphosphat nach einer Wasserabspaltung; kann jedoch auch von allen anderen Phospholipiden gebildet werden und ist daher nicht spezifisch für Phosphatidsäure (Pulfer &

Murphy 2003; Ejsing et al. 2006; Shan, S. Li, et al. 2008). Der Einsatz hochauflösender Massenspektrometer ermöglicht eine eindeutige Identifizierung aufgrund der elementaren Zusammensetzung, welche durch Analyse des Fragmentspektrums noch zusätzlich abgesichert werden kann (H. C. Köfeler et al. 2012).

1.5.4 Isotopenkorrektur

Bei der Verwendung von NP-HPLC bzw. HILIC, bei der Lipidklassen nach ihrer polaren Kopfgruppe aufgetrennt werden und innerhalb der Klasse keine oder nur geringe chromatographische Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Kettenlängen bzw. Anzahl der Doppelbindungen erfolgt, muss beachtet werden, dass es zu Isotopenüberlappungen kommen kann. Phospholipide bestehen aufgrund ihrer Fettsäureketten überwiegend aus Kohlenstoff und Wasserstoff. Während die relative Häufigkeit von Deuterium (^2H) vernachlässigbar gering ist (0,0115 %), kommt ^{13}C zu 1,07 % in der Umwelt vor (De Laeter et al. 2003). Mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, die sich aus der Anzahl der Kohlenstoffatome ergibt, wird in ein Phospholipid ein ^{13}C -Atom statt einem ^{12}C -Atom eingebaut und die Atommasse erhöht sich um eine Einheit. Diese natürliche Isotopenverteilung ist in einem Massenspektrum am Auftreten sogenannter „Isotopenpeaks“ sichtbar. Abbildung 13 zeigt das Massenspektrum von PA 24:0. Der Basispeak ist das $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ion bei m/z 535,34; die Peaks bei m/z 536,34 und m/z 537,35 sind die Isotopenpeaks, die ein bzw. zwei ^{13}C -Atome beinhalten.

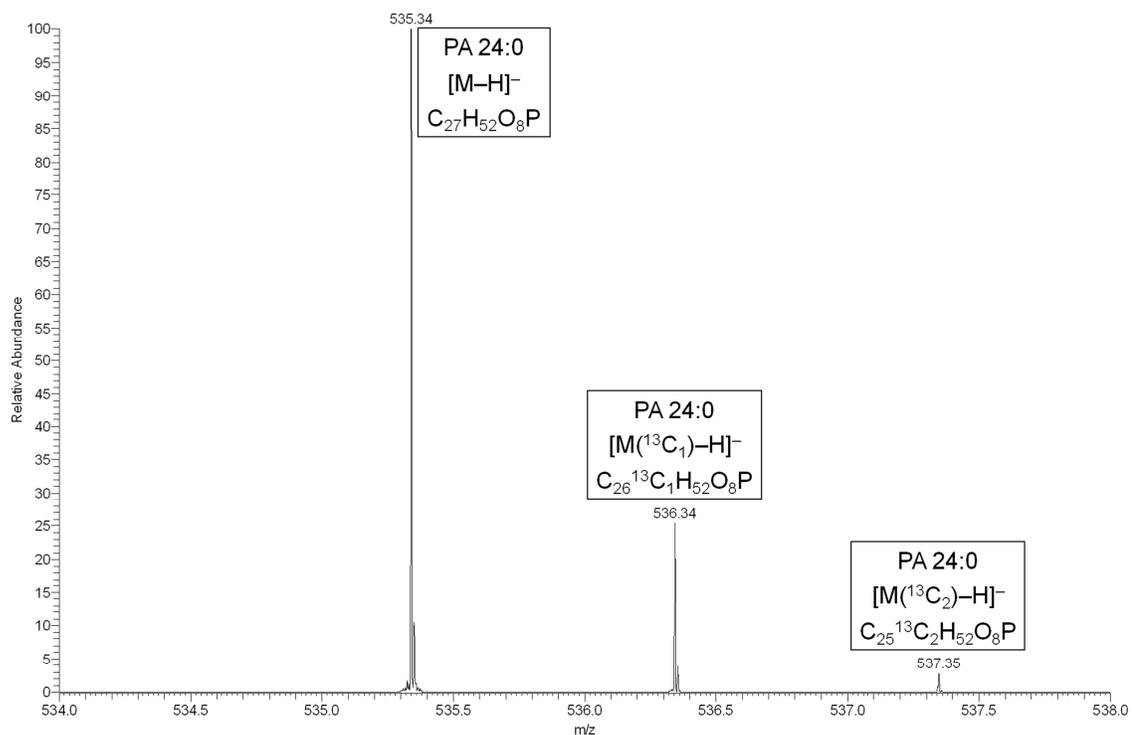


Abbildung 13: Isotopenverteilung von PA 24:0

Zu Isotopenüberlappung kommt es, wenn Verbindungen, die sich durch eine Doppelbindung unterscheiden, gleichzeitig eluieren. Beispielsweise beträgt die monoisotopische Masse von PA 34:1 (Phosphatidsäure mit 34 Kohlenstoffatomen und einer Doppelbindung im Fettsäurerest) 674,47 Da. Die monoisotopische Masse von PA 34:2, welches eine Doppelbindung mehr besitzt, beträgt 672,46 Da. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül PA 34:2 zwei ^{13}C -Atome beinhaltet, also zwei Da schwerer und somit die gleiche nominale Masse wie PA 34:1 besitzt, beträgt 9,9 %. In einem Massenspektrum dieser beiden Phospholipide sind neben den beiden Molekülonen ($[\text{M}-\text{H}]^-$) bei m/z 673,48 und m/z 671,48 auch die $[\text{M}(^{13}\text{C}_1)-\text{H}]^-$ -Isotopenpeaks bei m/z 674,49 und m/z 672,47 sichtbar (Abbildung 14). Der $[\text{M}(^{13}\text{C}_2)-\text{H}]^-$ -Isotopenpeak von PA 34:2 bei m/z 673,48 ist zwar nicht mehr als solcher erkennbar, da er vom Molekülonenpeak von PA 34:1 überlagert wird; er trägt jedoch zur Intensität des Peaks bei m/z 673,48 bei. Im Falle einer Quantifizierung muss der Beitrag von PA 34:2 zur Intensität des Peaks von PA 34:1 abgezogen werden, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

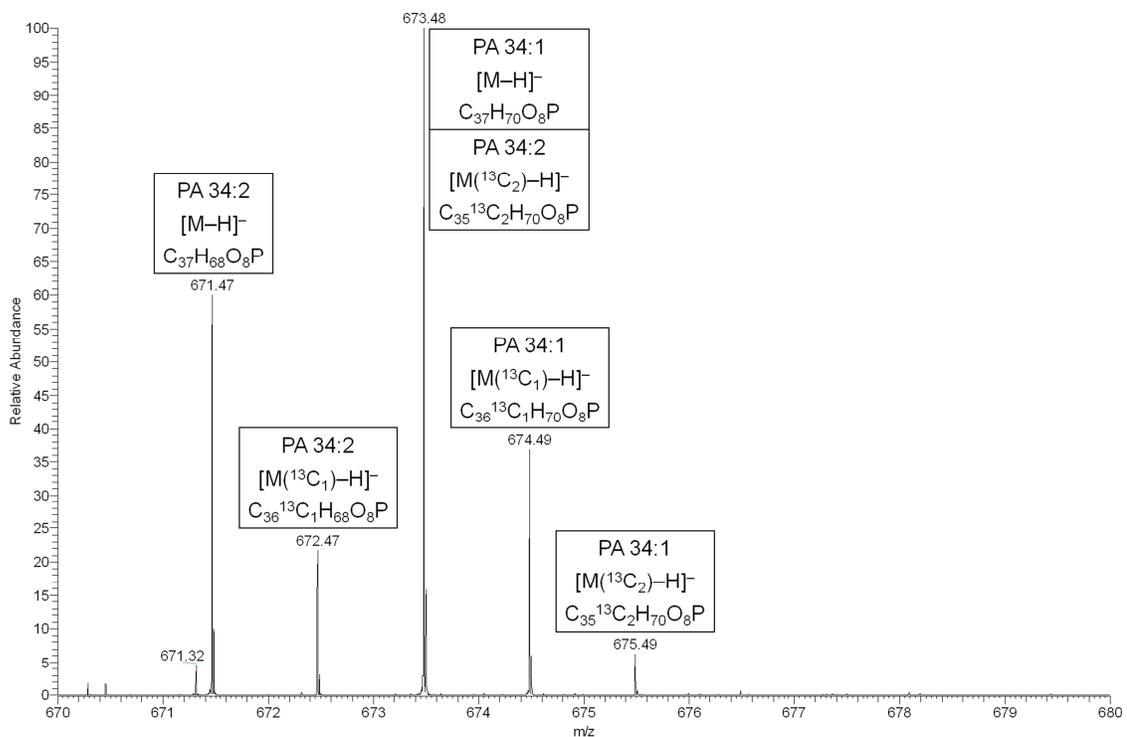


Abbildung 14: Massenspektrum von PA 34:1 und PA 34:2 mit Isotopenpeaks

Ab einer bestimmten Auflösung, die für ausgewählte Lipidspezies in Tabelle 2 dargestellt ist, können die $[\text{M}(^{13}\text{C}_2)-\text{H}]^-$ -Isotopenpeaks von der Verbindung mit einer Doppelbindung weniger unterschieden werden.

Tabelle 2: Nötige Auflösung, um Isosopenpeaks zu unterscheiden

	Formel	[M-H]⁻	[M(¹³C₂)-H]⁻	Auflösung, um ¹³C₂- Isotop zu unterscheiden
LPA 18:0	C ₂₁ H ₄₃ O ₇ P	437,26733		
LPA 18:1	C ₂₁ H ₄₁ O ₇ P		437,25839	48911
PA 34:1	C ₃₇ H ₇₁ O ₈ P	673,48134		
PA 34:2	C ₃₇ H ₆₉ O ₈ P		673,4724	75333
PC 34:1	C ₄₂ H ₇₉ O ₈ PN	804,575409		
PC 34:2	C ₄₂ H ₈₀ O ₈ PN		804,566469	89997
CL 72:8	C ₈₁ H ₁₄₂ O ₁₇ P ₂	1447,96487		
CL 72:9	C ₈₁ H ₁₄₀ O ₁₇ P ₂		1447,95593	161965

Bei RP-Chromatographie ist eine Isotopenkorrektur üblicherweise nicht notwendig, da Verbindungen, die sich in einer Doppelbindung unterscheiden, meist chromatographisch getrennt werden können (Fauland et al. 2011).

1.6 Literaturbekannte HPLC-Methoden zur Bestimmung von PA und LPA

In der wissenschaftlichen Fachliteratur sind mehrere Methoden zur Bestimmung von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure beschrieben, die verschiedene Lösungswege für die soeben erläuterten Probleme (S. 18ff) bieten.

Die schlechte Extraktionseffizienz für LPA unter neutralen pH-Bedingungen kann durch Zugabe von Säure verbessert werden (Xiao et al. 2000; Shan, Jaffe, et al. 2008; Zhao & Yan Xu 2009; Ishida et al. 2005). Eine andere Möglichkeit ist eine Extraktion mit Butanol (Scherer et al. 2009; Saulnier-Blache et al. 2000; Baker et al. 2001; Christie 1993) oder mit Methanol als einzigem Lösungsmittel (Zhao & Yan Xu 2010). Weiters kann die Ausbeute an LPA durch eine zweistufige Extraktion verbessert werden (Bollinger et al. 2010).

Die Ausbeute von PA unter neutralen Extraktionsbedingungen beträgt ca. 50-60 % (Holland et al. 2003).

Die Analyse von LPA kann mittels RP-HPLC durchgeführt werden, wobei die Auftrennung nach der Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen erfolgt (Zhao & Yan Xu 2009; Meleh et al. 2007; Aaltonen et al. 2010; Fang et al. 2003; Bathena et al. 2011; Shan, Jaffe, et al. 2008). Weiters kann die chromatographische Trennung auch mittels NP-HPLC bzw. HILIC erfolgen, wobei keine weitere Auftrennung der einzelnen LPA-Spezies stattfindet (Liebisch & Scherer 2012; Bollinger et al. 2010; Baker et al. 2001).

Das Peaktailing, das bei der Chromatographie von Phosphatidsäure auftritt, kann durch Zugabe von Phosphorsäure oder Carbonat zum Laufmittel (Ogiso et al. 2008; Wakamatsu et al. 2005; Y. Asakawa et al. 2008), durch Verwendung von quartären Ammoniumphosphaten (Abidi & Mounts 1995), durch Ionenpaarchromatographie (Dodbiba et al. 2011), oder durch Vorspülen der Säule mit EDTA (Ogiso et al. 2008) verringert werden. Wiederum kann die Analyse entweder mittels RP- oder NP-HPLC/HILIC erfolgen (Holland et al. 2003; Scherer et al. 2010; Rezanka et al. 2011).

Zur massenspektrometrischen Detektion von PA und LPA kann der SRM-Modus oder ein Precursor Ion Scan auf m/z 153 oder m/z 79 verwendet werden (Mehle et al. 2007; Aaltonen et al. 2010; Fang et al. 2003; Ishida et al. 2005). Hochauflösende Massenspektrometrie ermöglicht ebenfalls eine sehr selektive Analyse von PA und LPA im Fullscan-Modus unter Verwendung von DDA (Ejsing et al. 2009; Myers et al. 2011). Eine Isotopenkorrektur kann auch bei der Analyse mittels SRM durch Excel-Berechnungen vorgenommen werden (Scherer et al. 2010).

2 ZIELSETZUNG

Es soll eine HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure aus einer biologischen Matrix entwickelt werden. Vor Beginn der Methodenentwicklung wurden folgende Kriterien festgelegt, denen die fertige Methode entsprechen soll:

- Phosphatidylinositol (PI) soll mit der entwickelten Methode auch bestimmbar sein. Da PI vorwiegend im negativen Modus ionisiert, während die meisten anderen Phospholipide im positiven Modus gut quantifizierbar sind (Pulfer & Murphy 2003), soll die Analytik von PA, LPA und PI möglichst gemeinsam erfolgen können.
- Verwendung einer Extraktionsmethode, die eine möglichst quantitative Extraktion von PA und LPA ermöglicht, ohne störende Artefakte zu produzieren: PA und LPA können durch Hydrolyse der Kopfgruppe oder der Fettsäurereste aus vielen anderen Phospholipiden, bzw. Plasmalogen-Phospholipiden entstehen (Mawatari et al. 2007; Zhao & Yan Xu 2009; Aoki et al. 2002), was das Ergebnis nachhaltig verfälschen würde.
- Möglichst keine Verwendung von Phosphorsäure/Phosphatsalzen im Laufmittel: Phosphate können mit Analyten ungewünschte Addukte bilden, was die Analyse erschweren würde. Phosphate zersetzen sich bei den verwendeten Temperaturen nicht und würden zu Verschmutzung der Ionenquelle führen. Weiters können sie zu dauerhaften Verunreinigungen des HPLC-Systems führen.
- Chromatographische Abtrennung von PA/LPA von anderen Phospholipidklassen, die zu Ionensuppression führen könnten: Selbst im äquimolaren Verhältnis ionisieren andere Phospholipidklassen deutlich besser als PA/LPA (im positiven Modus PC und PE, im negativen Modus PG und PI (Koivusalo et al. 2001)). Dieser Umstand führt zu Ionensuppression. Um diesen unerwünschten Effekt möglichst zu vermeiden, soll PA und LPA chromatographisch von anderen Phospholipiden getrennt werden.
- Chromatographische Trennung von LPA und LPC: LPA kann in der Ionenquelle aus LPC entstehen (Zhao & Yan Xu 2009); daher sollen auch diese beiden Lipidklassen chromatographisch getrennt werden.
- Möglichst sensitive Detektion: Da PA und LPA im Verhältnis zu anderen Phospholipiden nur einen sehr geringen Teil des Lipidoms ausmachen, soll die Methode in der Lage sein, auch geringste Konzentrationen (niedriger μM -, bzw. nM-Bereich) messen zu können.

3 MATERIALIEN

3.1 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Substanz	Firma	Lot. No.
Methanol Chromasolv	Sigma Aldrich	SZBC167SV
Acetonitril Chromasolv	Sigma Aldrich	SZBC120SV
2-Propanol LCMS Chromasolv	Fluka Analytical	SZBC208CV
Chloroform for analysis	Merck	1.02445.2500
1-Butanol for mol. biol.	Sigma Aldrich	046K3661
Ameisensäure	Merck	1.00264.1000
Eisessig 100 %	Merck	1.00063.1011
Ammonium formate	Fluka	BCBF9137V
Ammoniumacetat	Merck	A712216603
Ammonium bicarbonate	Fluka Analytical	1228883 42306047
EDTA (ethylendiamin tetra acetic acid)	Sigma Aldrich	1434776
tert-Butyl methyl ether, Chromasolv Plus	Sigma Aldrich	SHBB5075V
Salzsäure rauchend 37 %	Merck	1.00317.1000
o-Phosphorsäure 85 %	Merck	1.00573.1000
Citric acid monohydrate	Fluka Analytical	4332:9

3.2 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Typ	Firma
Ultraschallbad	Elmasonic S 30	Elma
Abzug	S/TA/120/1297	Prutscher
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Gradient A10	Millipore
Waage	AG 285	Mettler Toledo
Analysenwaage	Cubis	Sartorius
Vortex	Test Tube Shaker	Yellowline
Mixer	DIAX 100	Heidolph
Überkopfschüttler	REAX 2	Heidolph
Zentrifuge	Multifuge 3 L-R	Heraeus
N ₂ -Abdampfvorrichtung	Sample Concentrator	Techne
	DB 3 DriBlock	Techne
	Savant SC250 Express	Thermo
Vakuumentrifuge	SpeedVac Concentrator	Thermo
	RVT 4104 Refrigerated	Thermo
	Vacuum Trap	Thermo
pH-Meter	OFP Oil-Free Vacuum Pump	Thermo
	pH 213 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments

3.3 HPLC-MS

Tabelle 5: Komponenten der verwendeten HPLC-MS-Systeme

Gerät	Typ	Firma
HPLC-Pumpe	Accela Pump	Thermo
HPLC-Pumpe	Accela 1250 Pump	Thermo
Autosampler	Accela Autosampler	Thermo
Ionenquelle	ESI-Probe	Thermo
Ionenquelle	HESI-Probe	Thermo
Ionenquelle	HESI-II Probe	Thermo
Triple-Quadrupol-MS	TSQ Quantum Ultra	Thermo
Orbitrap-MS	Orbitrap Velos Pro	Thermo
FT-ICR-MS	LTQ FT Ultra	Thermo
HPLC-Säule	Hypersil Gold 100x1, 1,9 µm	Thermo
HPLC-Säule	Hypersil Gold aQ 100x1 1,9 µm	Thermo
HPLC-Säule	Acquity UPLC BEH C8 1,7 µm	Waters
HPLC-Säule	Acquity UPLC HSS C18 1,6 µm	Waters
HPLC-Säule	Kinetex HILIC, 2,1x100 2,6 µm	Phenomenex
HPLC-Säule	Hypersil CN 100x1 1,9 µm	Thermo
HPLC-Säule	Triart Diol-HILIC 200x2 1,9 µm	YMC

3.4 Labormaterialien

Tabelle 6: Labormaterialien

	Firma	Typ
Glasgefäße	Schott	Duran
Pipetten	Eppendorf	Research
Autosampler-Vials	Agilent	Screw cap vials, clear TPX Kurzgewindeflasche
Autosampler-Vials	La-Pha-Pack	32x11,6mm mit integriertem 0,2mL Glas-Mikroeingang
Reagenzgläser	Pyrex	10 mL Epruvetten mit Schraubverschluss und Teflondichtung

3.5 Lipidstandards

Tabelle 7: Lipidstandards

Name	Firma
1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (sodium salt)	Avanti Polar Lipids, Inc.
1-oleoyl-2-hydroxy- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (sodium salt)	Larodan Fine Chemicals
L- α -phosphatidic acid (Egg PC)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Phosphatidylinositol (bovine heart) (ammonium salt)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Phosphatidylcholine (bovine liver)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Lysophosphatidylcholine (bovine liver)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Phosphatidylethanolamine (corn germ)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Lysophosphatidylethanolamine (egg yolk)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Phosphatidylglycerol (egg PC)	Larodan Fine Chemicals
L- α -Phosphatidylserine (porcine brain)	Larodan Fine Chemicals
Cardiolipin (ammonium salt) (heart, bovine)	Larodan Fine Chemicals
1-dodecanoyl-2-tridecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (ammonium salt)	Avanti Polar Lipids, Inc.
1-heptadecanoyl-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (ammonium salt)	Avanti Polar Lipids, Inc.
1-heneicosanoyl-2-(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (ammonium salt)	Avanti Polar Lipids, Inc.
1-heptadecanoyl-2-(9Z-tetradecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (ammonium salt)	Avanti Polar Lipids, Inc.
1-(10Z-heptadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate (ammonium salt)	Avanti Polar Lipids, Inc.

4 EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG

4.1 Herstellung der Laufmittel

Die Zusammensetzung der Laufmittel ist wie folgt zu verstehen: Ein 5+2-Gemisch beispielsweise besteht aus 5 Teilen X und 2 Teilen Y. Die angegebenen Salzkonzentrationen wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge einer 1 M wässrigen Lösung erreicht. Angegebene pH-Werte wurden durch Zugabe von Ameisensäure mittels pH-Meter eingestellt.

4.2 Herstellung der Lipid-Standardlösungen

Es wurden die entsprechenden Volumina an Lipidstandards pipettiert, das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft und im Endvolumen $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ 1/1 (v/v) aufgenommen.

Die Lösungen für die Methodenentwicklung wurden folgendermaßen hergestellt:

Tabelle 8: Zusammensetzung des PL-Mastermix für die Methodenentwicklung

		Ausgangskonzentration		Zielkonzentration	eingesetztes Volumen
		[g/L]	[mM]	[μM]	[μL]
PL-Mastermix	nat. PA		1	10	10
	PA 24:0		1	5	5
	LPA 18:1		1	10	10
	nat. PC	1	1.43	100	70
	nat. LPC	1	2	100	50
	nat. PE	1	1.37	50	37
	nat. LPE	0.5	1.09	50	46
	nat. CL	1	0.71	50	70
	nat. PS	1	1.28	50	39
	nat. PI		1	50	50
	nat. PG	1	1.33	50	38

abdampfen, in 1 mL $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ aufnehmen

Die Lösungen für die Extraktionsversuche wurden wie folgt hergestellt:

Tabelle 9: Zusammensetzung der Standardlösungen für die Extraktionsversuche

		Ausgangskonzentration		Zielkonzentration	eingesetztes Volumen
		[g/L]	[mM]	[μM]	[μL]
PA-Mix	nat. PA		1	200	200
	PA 24:0		1	100	100
	LPA 18:1		1	200	200

abdampfen, in 1 mL $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ aufnehmen

PL-Mix	nat. PC	1	1.43	500	350
	nat. LPC	1	2	500	250
	nat. PE	1	1.37	500	365
	nat. LPE	0.5	1.09	500	460

	nat. CL	1	0.71	500	700
	nat. PS	1	1.28	500	390
	nat. PI		1	500	500
	nat. PG		1	500	500
	TG 54:0		2.6	50	19
	TG 54:1		1.12	50	44
	TG 54:2		1.13	50	44
	DG 24:0		1	100	100
	DG 32:0		1	100	100
	DG 36:0		1	100	100

abdampfen, in 1 mL CHCl₃/MetOH aufnehmen

4.3 Extraktionen

Für die Extraktionsversuche wurden je 20 µL Lipid-Standardmix in Pyrex vorgelegt und in Fünffachansätzen extrahiert, wobei Leerwerte als Negativkontrollen mitgeführt wurden.

Die Gewebeprobe (murines Hirn) wurde in drei Aliquots zu ca. 25 mg aufgeteilt, homogenisiert und nach der Bligh and Dyer HCl-Methode (4.3.3) weiter verarbeitet.

4.3.1 MTBE

- +1,5 mL Methanol
- Vortexen
- +5 mL MTBE
- 1 h Überkopfschüttler
- +1,25 mL A. dest
- 10 min Überkopfschüttler
- zentrifugieren (3 min, 2000 G, RT)
- Oberphase gewinnen

4.3.2 Bligh and Dyer

- +2,5 mL Methanol
- Vortexen
- +2,5 mL Chloroform
- 1 h Überkopfschüttler
- +2,25 mL A. dest
- 10 min Überkopfschüttler
- zentrifugieren (3 min, 2000 G, RT)
- Unterphase gewinnen

4.3.3 Bligh and Dyer HCl

- +400 µL 0,1 N HCl
- +400 µL Methanol
- 1 min vortexen
- +400 µL Chloroform
- 1 min vortexen
- zentrifugieren (3 min, 2000 G, RT)
- Unterphase gewinnen

4.3.4 Butanol

- +500 µL Citrat-Phosphat-Puffer (200 mM Zitronensäure, 280 mM Na₂HPO₄)
- +1 mL Butanol
- Vortexen
- +500 µL der oberen Phase einer Wasser-Butanol-Mischung
- 10 min Überkopfschüttler
- zentrifugieren (3 min, 2000 G, RT)
- Oberphase gewinnen

Die gewonnenen organischen Phasen wurden in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trocknung eingengt, in 1 mL CHCl₃/MetOH aufgenommen und bis zur Messung bei -20 °C (Hirnextrakte bei -80 °C) gelagert.

Um herauszufinden, ob während der Extraktion aus anderen Phospholipidklassen durch Hydrolyse PA oder LPA entsteht, wurden PC-, LPC-, PE-, LPE-, CL-, PS-, PI- und PG-Einzelstandards nach der Bligh and Dyer HCl und der Butanol-Methode extrahiert und durch Vergleich mit einer unextrahierten Standardlösung auf eine Erhöhung von PA oder LPA untersucht.

4.4 HPLC

4.4.1 Methodenentwicklung

Die Säulenmaterialien, Elutionsmittelzusammensetzungen und Gradienten wurden so lange variiert, bis zufriedenstellende chromatographische Ergebnisse erzielt wurden.

4.4.2 RP-Methode

Laufmittel A: H₂O; 10 mM NH₄COOH; 1 % HCOOH

Laufmittel B: ACN/IPA (5+2, v/v); 10 mM NH₄COOH; 1 % HCOOH

Tabelle 10: Gradient für RP-Trennung

t [min]	LM A [%]	LM B [%]	Flussrate [μL/min]
0	45	55	250
4	30	70	250
22	0	100	250
30	0	100	250
30,01	45	55	250
35	45	55	250

Säulentemperatur 50 °C; Injektionsvolumen 3 μ L

4.4.3 HILIC-Methode

Laufmittel A: H₂O; 10 mM NH₄COOH; 0,5 % HCOOH

Laufmittel B: ACN/IPA (5+2, v/v); 10 mM NH₄COOH; 0,5 % HCOOH

Tabelle 11: Gradient für HILIC-Trennung

t [min]	LM A [%]	LM B [%]	Flussrate [μL/min]
0	5	95	250
12	50	50	250
15	50	50	250
15,01	5	95	250
30	5	95	250

Säulentemperatur 50 °C; Injektionsvolumen 5 μ L

4.4.3.1 Retentionszeitstabilität

Zur Evaluierung der Retentionszeitstabilität wurde die gleiche Probe bei unterschiedlich langer Reäquilibrationszeit aus dem gleichen Vial jeweils 5x injiziert (5.3.2).

4.5 Massenspektrometrie

Die Quellen-Parameter wurden im Laufe der Methodenentwicklung regelmäßig optimiert, um ein möglichst hohes Meßsignal zu erzielen. Beim LTQ-FT und bei der Orbitrap wurde eine Massenkalkulation der Hochauflösung ca. 1x/Woche durchgeführt. Eine Optimierung der Linsenspannungen auf die entsprechenden Laufmittelzusammensetzungen wurde ebenfalls durchgeführt.

Die Detektion erfolgte im negativen ESI-Modus; LPA, PA, PG, PI, PE, LPE und PS wurden dabei als [M-H]⁻-Ionen, PC und LPC als Formiataddukte ([M+HCOO]⁻) detektiert.

Die Detektion von PA und PI am TSQ Quantum erfolgte im Precursor Ion Mode (pr153@35 eV; pr241@45 eV), die Detektion mit dem LTQ-FT (R=200 000) und der Orbitrap (R=100 000) erfolgte im Fullscan unter Verwendung von Data Dependent Scans

(Einstellungen - Nth Order Double Play: MS/MS most intense Ion, Top 10, Normalized Collision Energy=35, Exclusion Duration 20 s).

4.6 Auswertung

Für die Extraktionsversuche wurden die Peakflächen mittels Xcalibur Quan Browser integriert und in Microsoft Excel exportiert. Die Extraktionseffizienz wurde für jede Lipidspezies wie folgt berechnet:

$$\text{Extraktionseffizienz[\%]} = \frac{\text{Peakfläche in der extrahierten Probe}}{\text{Peakfläche in der unextrahierten Probe}} * 100$$

Bei der Berechnung der Extraktionseffizienz wurde keine Isotopenkorrektur durchgeführt, da der dadurch auftretende Fehler in der obigen Formel sowohl den Zähler als auch den Nenner im selben Ausmaß verändern würde.

4.7 Realproben

Für die quantitative Analyse der Hirnprobe mittels HILIC wurden interne Standards verwendet. Vor der Extraktion wurden 20 pmol PA 24:0 zugegeben, vor der Messung wurden PA 25:0, PA 31:1, PA 37:4, PA 43:6, und LPA 17:1 mit einer Endkonzentration von 2 µM zugegeben.

Die Analyse wurde sowohl mittels HILIC-, als auch mittels RP-HPLC durchgeführt.

Die qualitative Analyse wurde mittels Xcalibur durchgeführt. Da Xcalibur keine eingebaute Isotopenkorrektur zur Quantifizierung besitzt, wurde in das Programm Lipid Data Analyzer eine Isotopenkorrektur implementiert, die eine qualitative Auswertung im HILIC-Modus ermöglicht.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Extraktion

Tabelle 12 und Tabelle 13 zeigen die Resultate der Extraktionsversuche. Die Prozentwerte geben den Anteil der Peakfläche eines Analyten im Extrakt zur Peakfläche im unextrahierten Mix an. Ein Wert von 100 wäre der Idealfall und würde vollständige Extraktion bedeuten.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind die Ergebnisse aus Tabelle 12 als Balkendiagramme dargestellt.

Bei Verwendung der Bligh and Dyer HCl-Methode oder der Butanol-Methode entstand aus keiner der einzeln extrahierten Phospholipidklassen in nennenswertem Ausmaß PA oder LPA (nicht abgebildet).

Tabelle 12: Extraktionseffizienz für PA und LPA (n=5)

PA-Mix		PA							LPA					
		24:0	34:1	34:2	36:1	36:2	38:4	38:6	16:0	16:1	18:1	18:2	20:4	22:6
MTBE	MW	31	8	14	4	8	8	15	14	14	19	21	18	20
	StAbw	3	1	1	1	1	1	1	2	3	4	4	4	5
B & D	MW	38	76	76	75	74	75	77	6	5	2	3	5	5
	StAbw	1	6	5	7	6	4	6	3	2	1	1	2	1
B&D HCl	MW	90	94	93	94	95	94	91	95	102	89	106	110	111
	StAbw	8	8	9	9	9	9	8	12	14	11	13	15	14
Butanol	MW	82	84	81	85	80	75	75	89	81	84	95	80	81
	StAbw	5	3	4	3	2	2	2	4	4	4	3	4	5

Tabelle 13: Extraktionseffizienz für die restlichen untersuchten Phospholipide (n=5)

PL-Mix	PC		LPC		PE		LPE		PG		PI		PS		CL			
	34:1	38:4	16:0	18:1	34:2	36:4	16:0	18:0	34:1	36:2	36:2	38:4	36:1	36:2	38:4	74:11	72:8	
MTBE	MW	87	85	75	85	90	92	78	83	85	86	67	72	77	70	75	70	49
	StAbw	4	4	1	2	2	2	2	2	3	3	2	2	4	2	3	10	9
B & D	MW	104	104	93	102	104	105	89	99	89	99	44	55	84	75	81	81	74
	StAbw	5	7	7	7	6	7	7	7	6	7	8	8	8	4	8	6	9
B&D HCl	MW	97	95	80	97	97	96	81	91	96	95	94	96	101	101	102	82	91
	StAbw	3	3	3	3	3	2	4	3	4	3	3	5	3	4	5	6	5
Butanol	MW	83	83	76	76	77	83	71	73	93	93	65	69	71	65	71	72	56
	StAbw	6	8	2	3	2	1	1	2	1	1	3	3	2	2	2	2	1

Die Ergebnisse aus Tabelle 13 sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 als Balkendiagramme dargestellt.

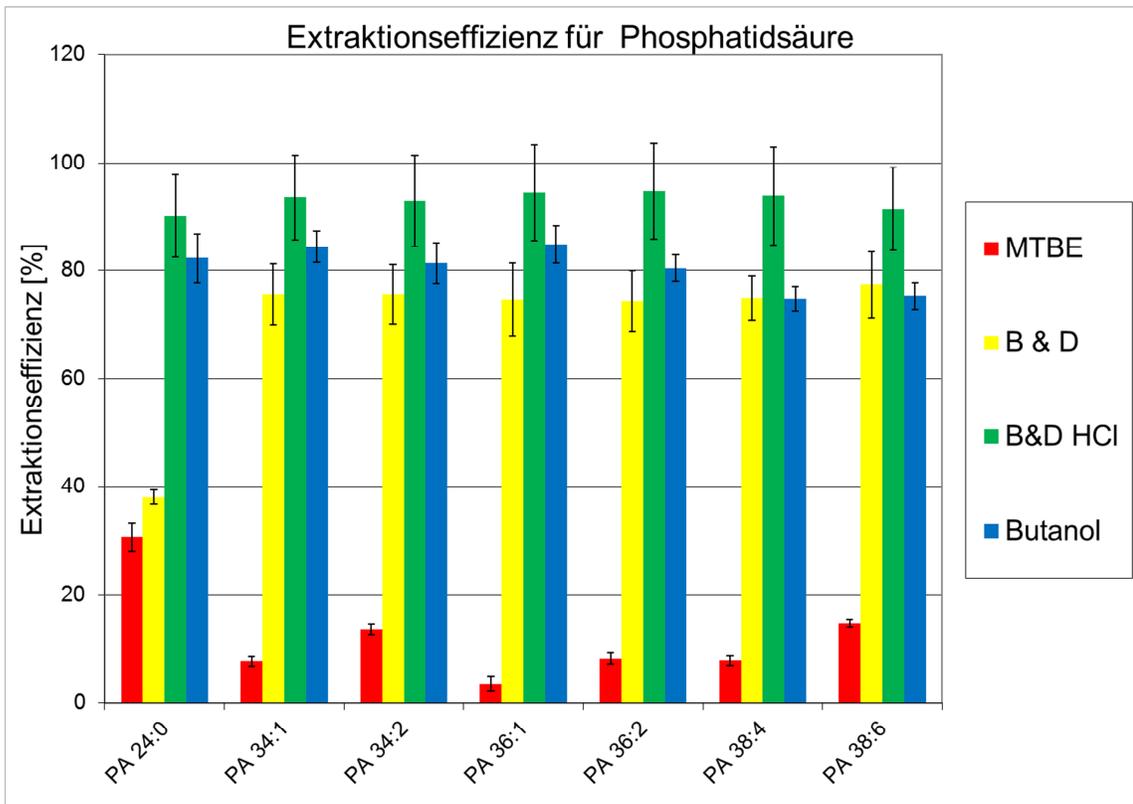


Abbildung 15: Extraktionseffizienz für Phosphatidsäure (n=5, MW +/- StdAbw)

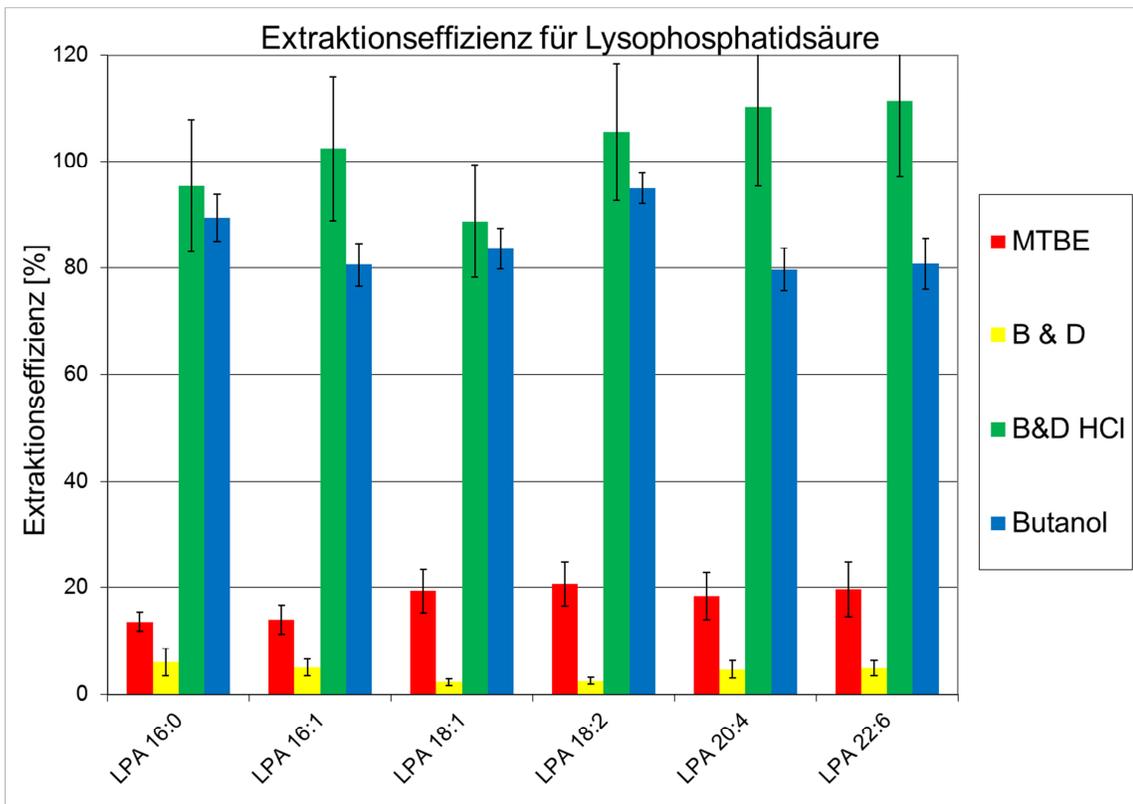


Abbildung 16: Extraktionseffizienz für Lysophosphatidsäure (n=5, MW +/- StdAbw)

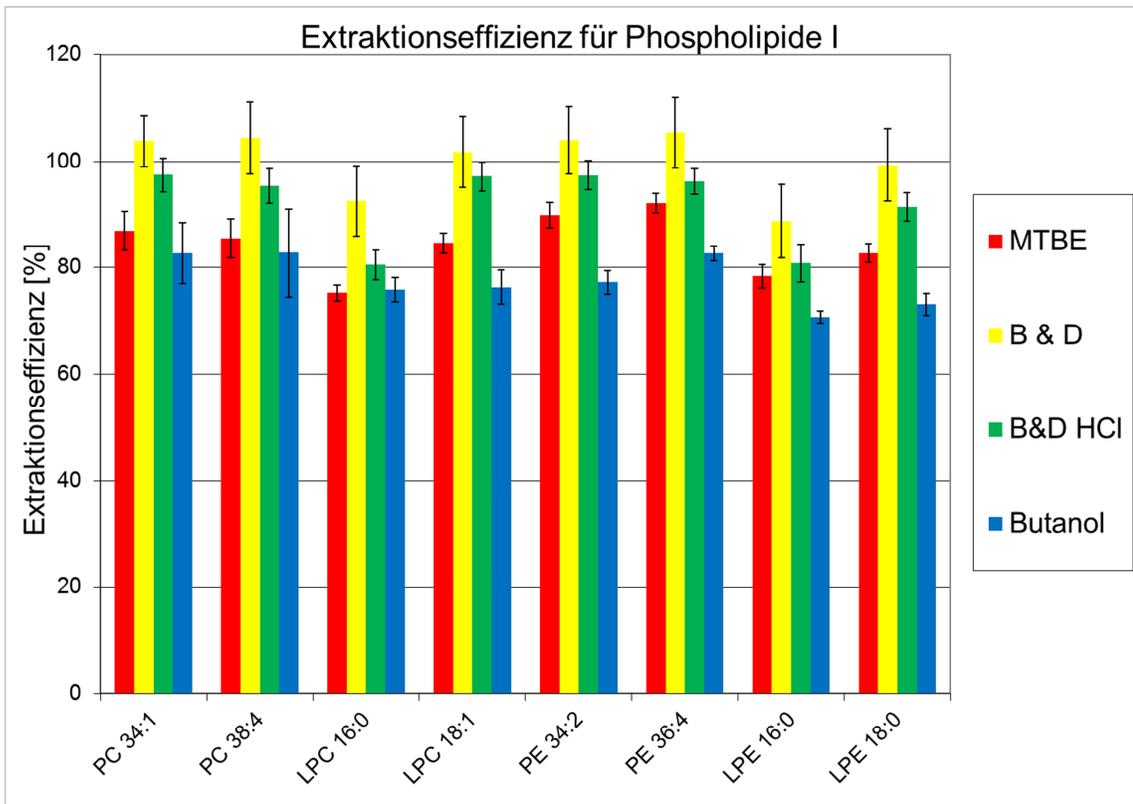


Abbildung 17: Extraktionseffizienz für Phospholipide I (n=5, MW +/- StdAbw)

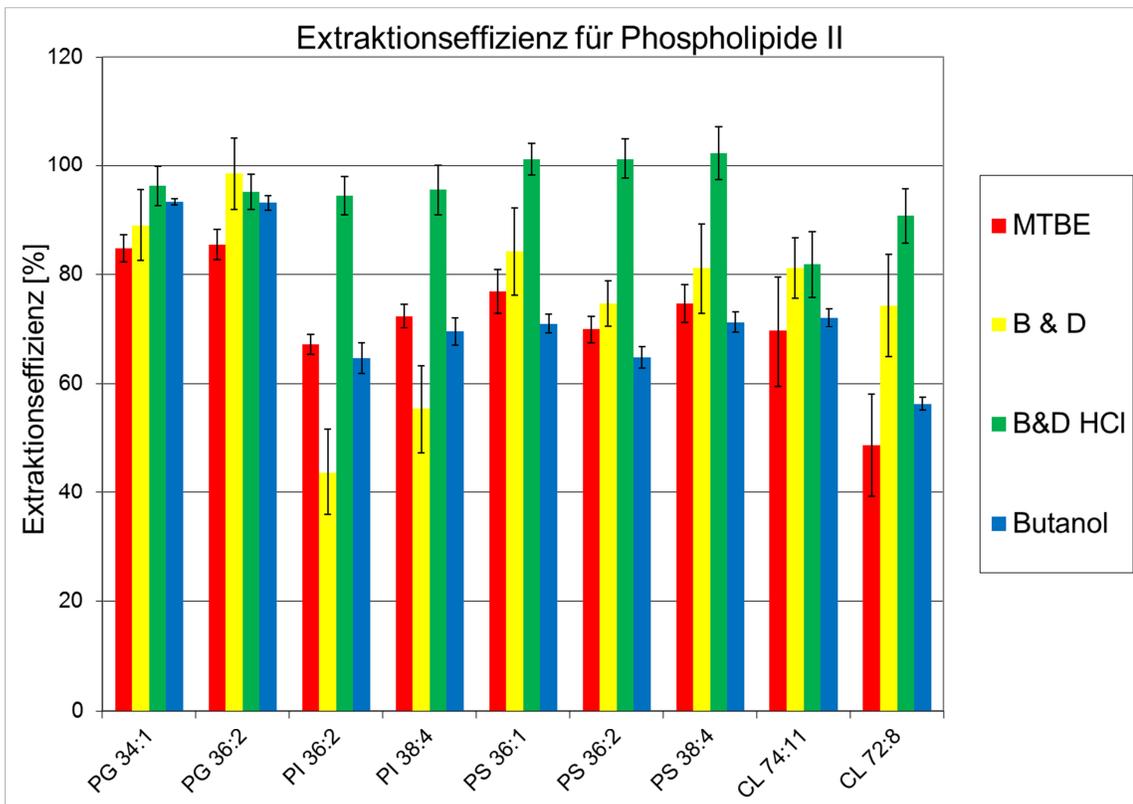


Abbildung 18: Extraktionseffizienz für Phospholipide II (n=5, MW +/- StdAbw)

Während eine Standard-Extraktionsmethode nach Bligh and Dyer für PA akzeptable Ergebnisse liefert (Abbildung 15, ca. 70 %), ist die Ausbeute an LPA sehr gering (Abbildung 16). Da sowohl PA als auch LPA nur einen sehr geringen Teil des Lipidoms ausmachen, sollte eine möglichst vollständige Extraktion angestrebt werden. Die Extraktion unter Anwesenheit einer starken Säure (z.B. HCl) führt zwar zu höheren Extraktionseffizienzen, jedoch wurden für manche Spezies Extraktionseffizienzen von weit über 100 % erzielt (nicht abgebildet), was in diesem Fall weniger für eine Verbesserung der Ionisation durch Veränderung des Lösungsmittels spricht als für die künstliche Erhöhung von LPA aufgrund säurekatalysierter Hydrolyse anderer Phospholipide. Würde LPA während der Extraktion entstehen, würde dies zu einer starken Verfälschung des Ergebnisses führen. Daher wurde eine Extraktionsmethode gesucht, die einerseits PA und LPA möglichst vollständig extrahiert, andererseits aber nicht zu einer künstlichen Erhöhung der Analyten führt. Sowohl die Extraktion mit Butanol als auch die Modifikation der Extraktion nach Bligh and Dyer, bei der statt Wasser 0,1 M HCl verwendet wird, erfüllen diese beiden Kriterien. Wie bereits erwähnt kam es bei keiner der untersuchten Phospholipid-Klassen zu einem signifikanten Anstieg der korrespondierenden LPA- bzw. PA-Spezies. Jedoch ist die Extraktion mit Butanol zeitaufwändig, da das Abdampfen von Butanol aufgrund seines hohen Siedepunktes von 118 °C sehr lange dauert. Daher wurde die Bligh and Dyer-Methode mit HCl als Methode der Wahl für die Extraktion von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure gewählt. Diese Methode ist auch für die Extraktion anderer Phospholipidklassen sehr gut geeignet (Abbildung 17, Abbildung 18).

5.2 RP-Methodenentwicklung

5.2.1 Chromatographie von PA und PI zu Beginn der Methodenentwicklung

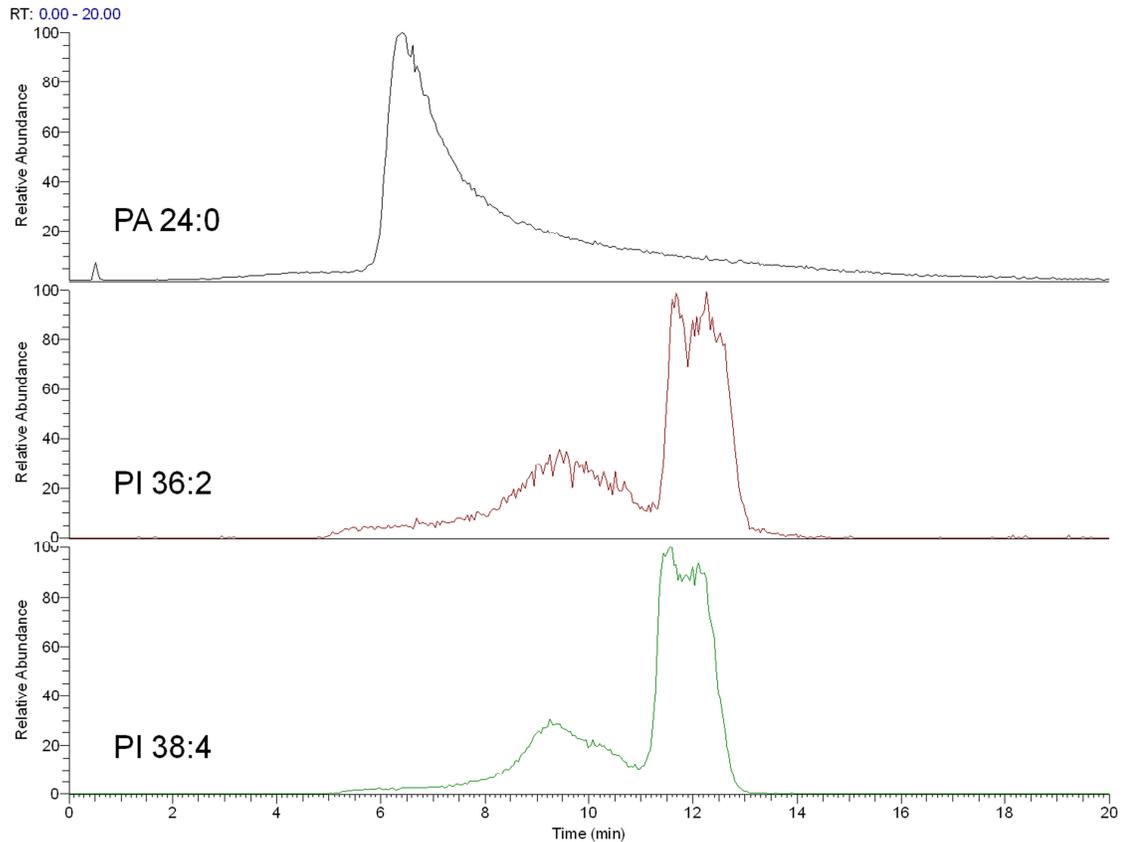


Abbildung 19: Chromatographie zu Beginn der Methodenentwicklung am Beispiel von PA 24:0, PI 36:2 und PI 38:4

Abbildung 19 zeigt den Ausgangspunkt der Methodenentwicklung. Der Peak von PA 24:0 zeigt sehr starkes Tailing und die PI-Peaks zeigen Peaksplitting. Viele chromatographische Trennungen, die in der Literatur beschrieben sind, konnten trotz möglichst gleicher Analyseparameter nicht reproduziert werden. Beispielsweise konnte weder durch ein Vorspülen der HPLC-Säule mit EDTA oder Phosphorsäure, oder durch die Verwendung von Carbonat im Laufmittel eine zufriedenstellende Peakform erreicht werden. Auffallend bei der Methodenentwicklung war, dass der verwendete PA 24:0-Standard, der rein synthetischer Natur ist, immer weniger Tailing aufwies als die natürlich vorkommenden PA-Spezies. Gründe dafür könnten sein, dass PA 24:0 zwei relativ kurze, gesättigte Fettsäuren beinhaltet und dass die Retention bei RP-HPLC größtenteils von den Fettsäureresten und erst sekundär von der Art bzw. Polarität der Kopfgruppen bestimmt wird. Die Tatsache, dass auch LPA in RP-Trennungen vergleichsweise geringes Tailing zeigte, weist darauf hin, dass für die beobachtete Peakverbreiterung nicht allein die Phosphatgruppe verantwortlich sein kann,

sondern auch die Fettsäureketten (Länge und Anzahl der Doppelbindungen) einen wesentlichen Einfluss haben.

5.2.2 Evaluierung verschiedener RP-Säulen

Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen chromatographische Trennungen auf verschiedenen Säulenmaterialien, wobei die anderen chromatographischen Parameter (Laufmittel, Gradient siehe S. 30, Autosampler- und Detektoreinstellungen) konstant gehalten wurden. Es konnte auf keiner der verwendeten Säulen eine zufriedenstellende Trennung erreicht werden.

5.2.2.1 Hypersil Gold

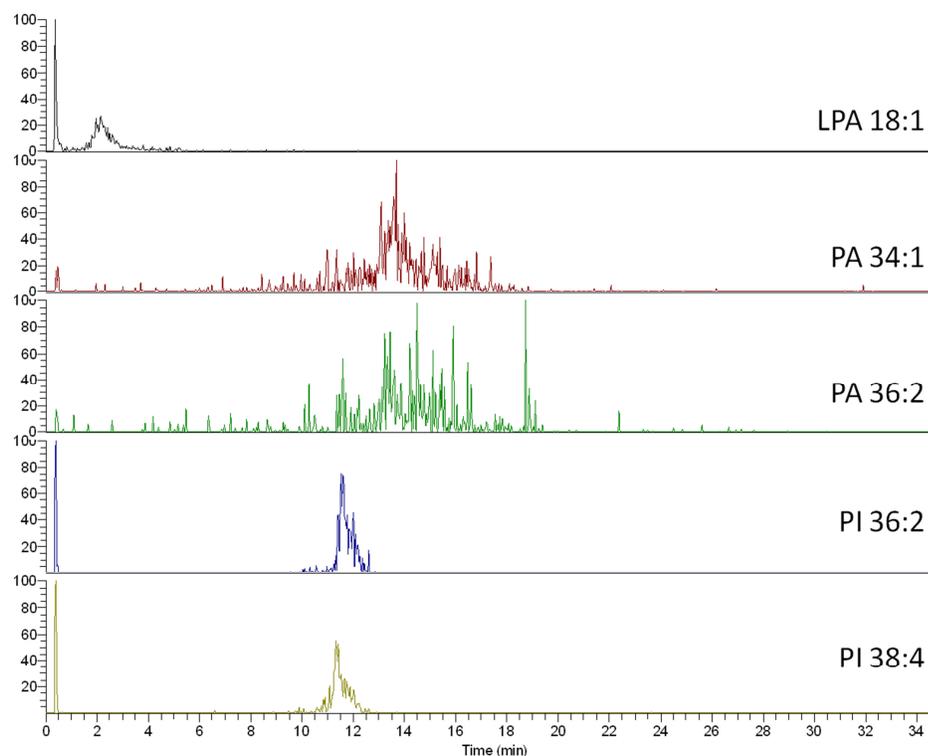


Abbildung 20: Chromatographie von LPA, PA und PI auf Hypersil Gold 100x1 mm, 1,9 μm

5.2.2.2 Hypersil Gold aQ

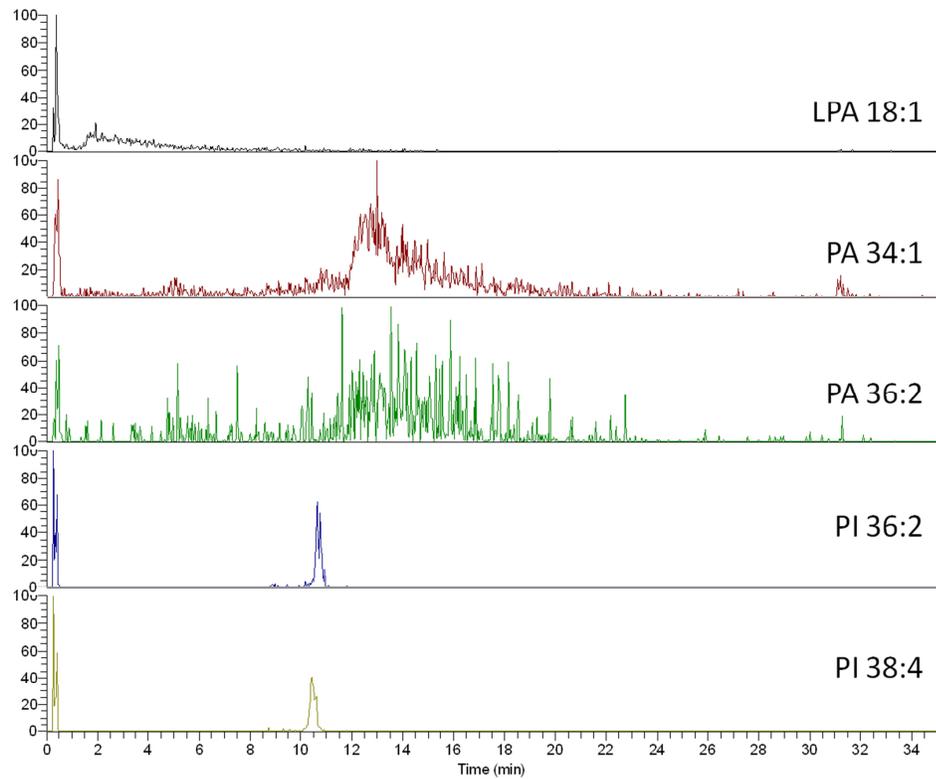


Abbildung 21: Chromatographie von LPA, PA und PI auf Hypersil Gold aQ 100x1 mm, 1,9 μm

5.2.2.3 BEH C8

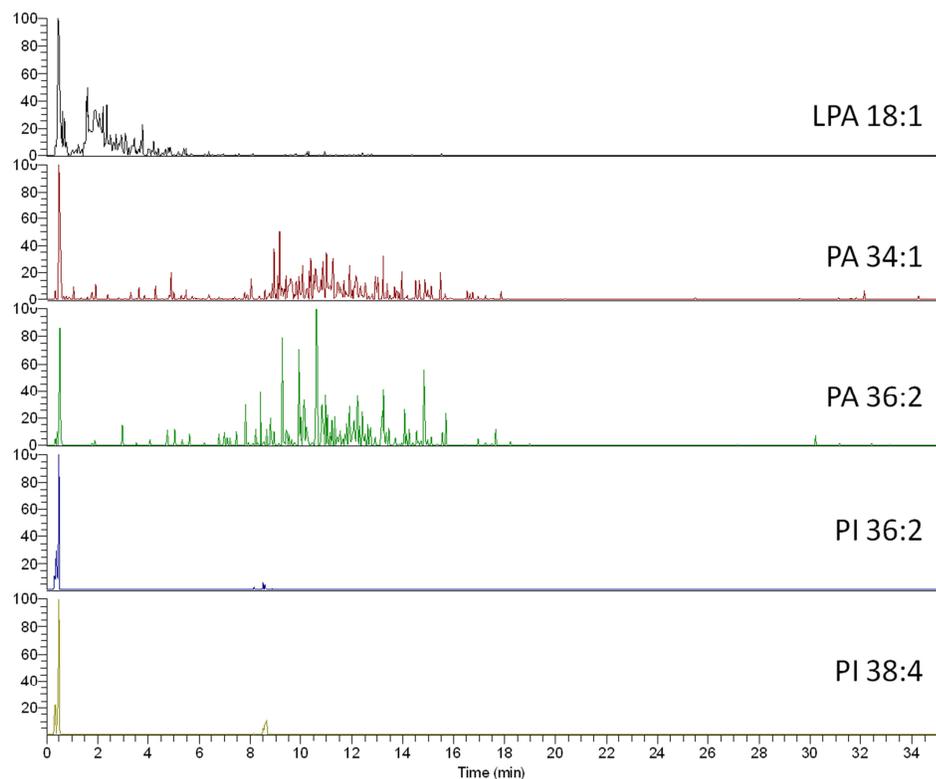


Abbildung 22: Chromatographie von LPA, PA und PI auf BEH C8 100x1 mm, 1,7 μm

5.2.2.4 HSS C18

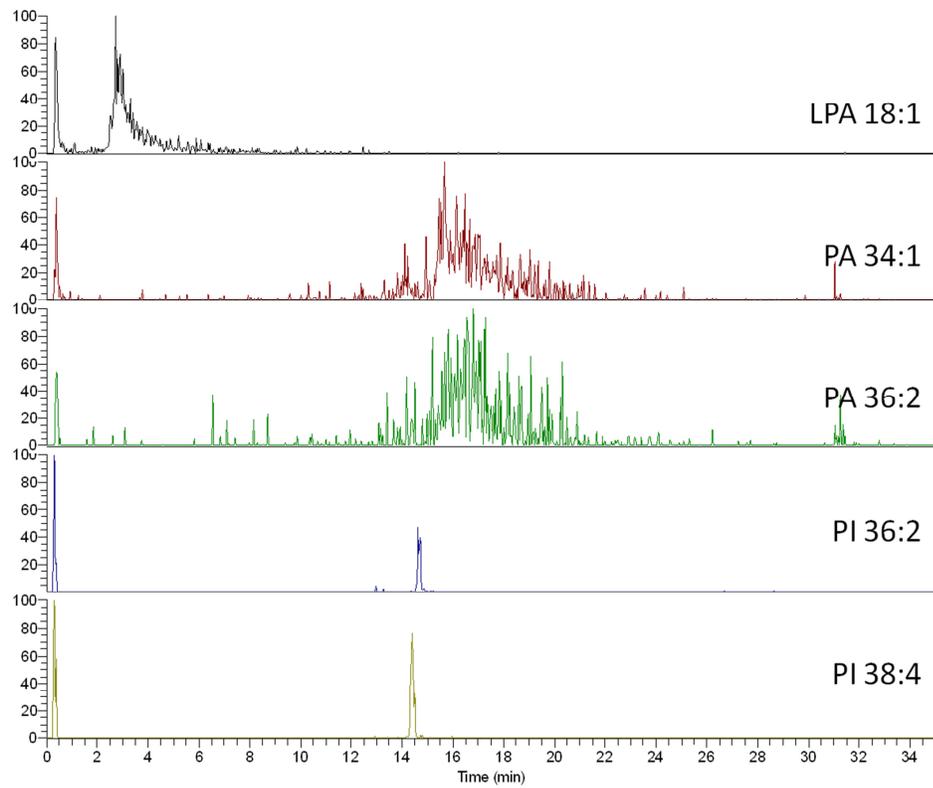


Abbildung 23: Chromatographie von LPA, PA und PI auf HSS C18 100x1 mm, 1,6 µm

5.2.3 Einfluss des Injektionslösungsmittels auf die Chromatographie

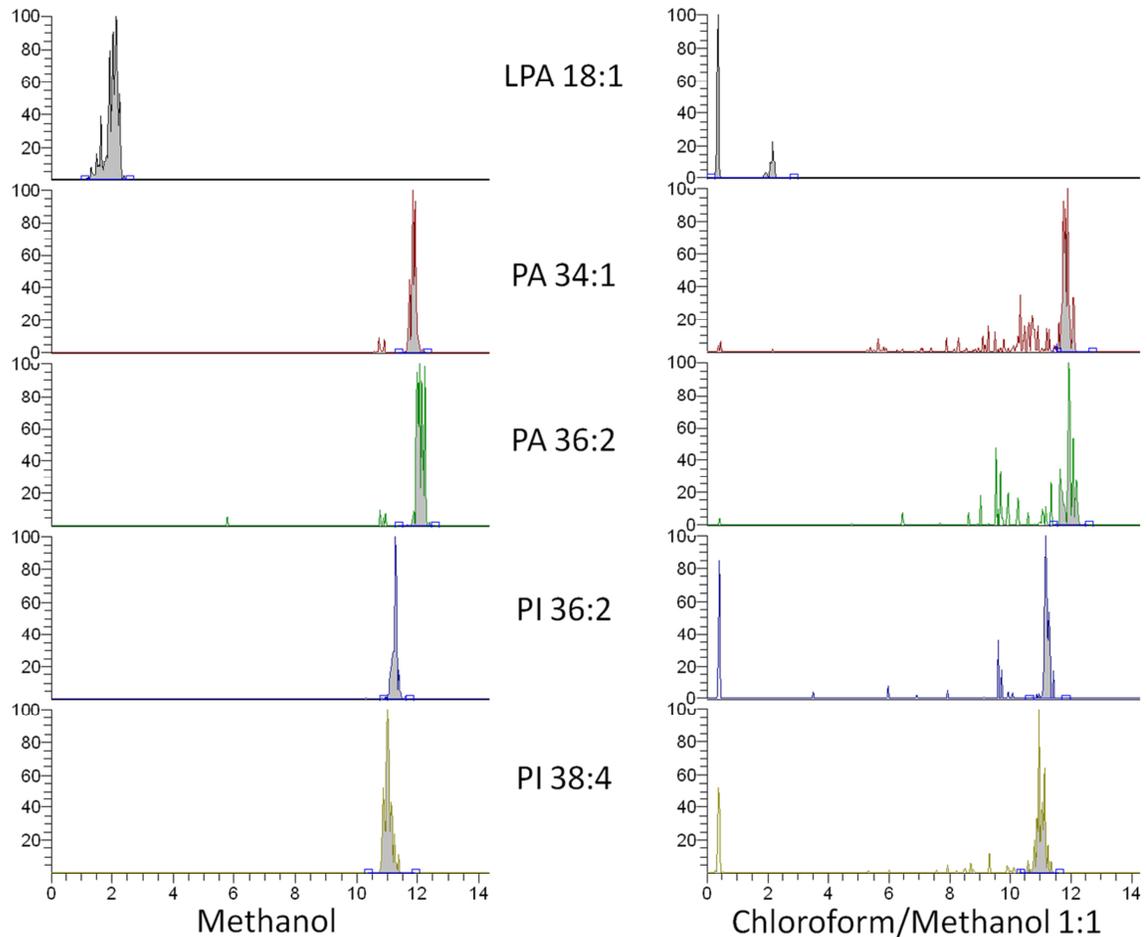


Abbildung 24: Einfluss des Injektionslösungsmittels auf die Chromatographie

Abbildung 24 zeigt den Einfluss des Injektionslösungsmittels auf die Peakform. Mit Methanol als Lösungsmittel sind die Peaks schärfer und das Chromatogramm wirkt im Allgemeinen „sauberer“, während mit Chloroform/Methanol als Injektionslösungsmittel ein unerwünschter Peaksplitting-Effekt auftritt. Die positiven Auswirkungen von Methanol als Injektionslösungsmittel sind bei allen vier evaluierten Säulen sichtbar.

5.2.4 Einfluss von pH-Wert und Salzkonzentration auf die Chromatographie

Abbildung 25 zeigt Chromatogramme eines Lipidgemisches bei verschiedenen pH-Werten. Während die Peakformen von LPA 18:1, PA 24:0 und PI kaum Veränderungen zeigen, sind die Peaks von PA 34:1 und PA 36:2 bei niedrigem pH-Wert weniger breit als bei pH 4 oder pH 5.

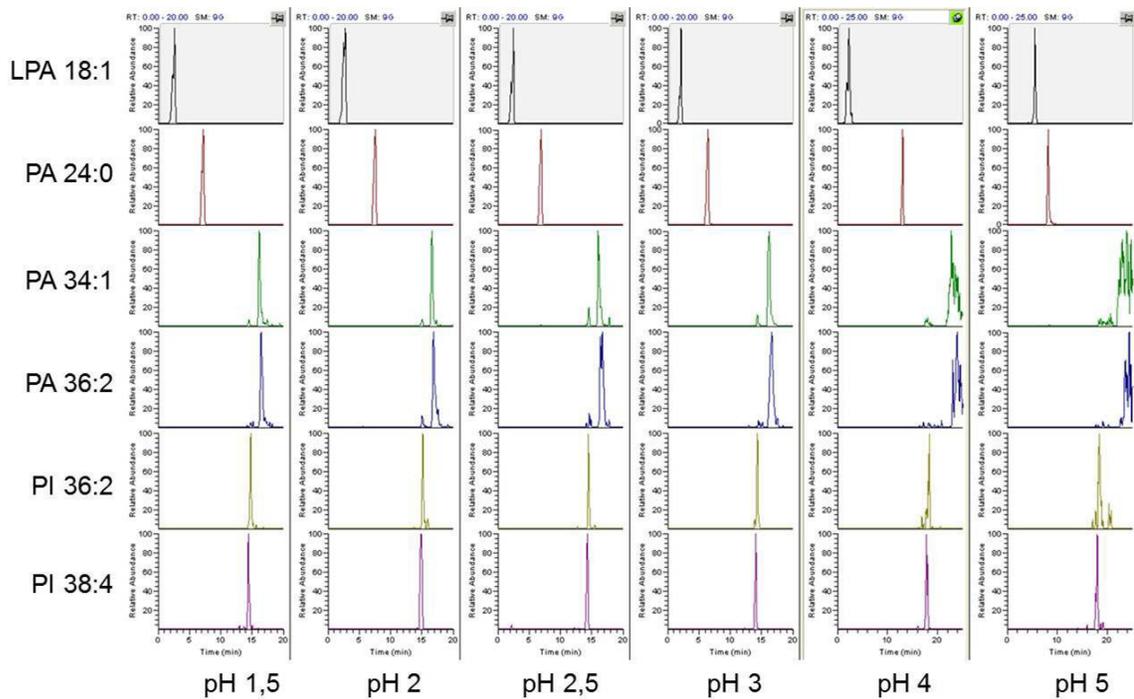


Abbildung 25: Einfluss des pH-Wertes auf die Chromatographie (Salzkonzentration 500 mM)

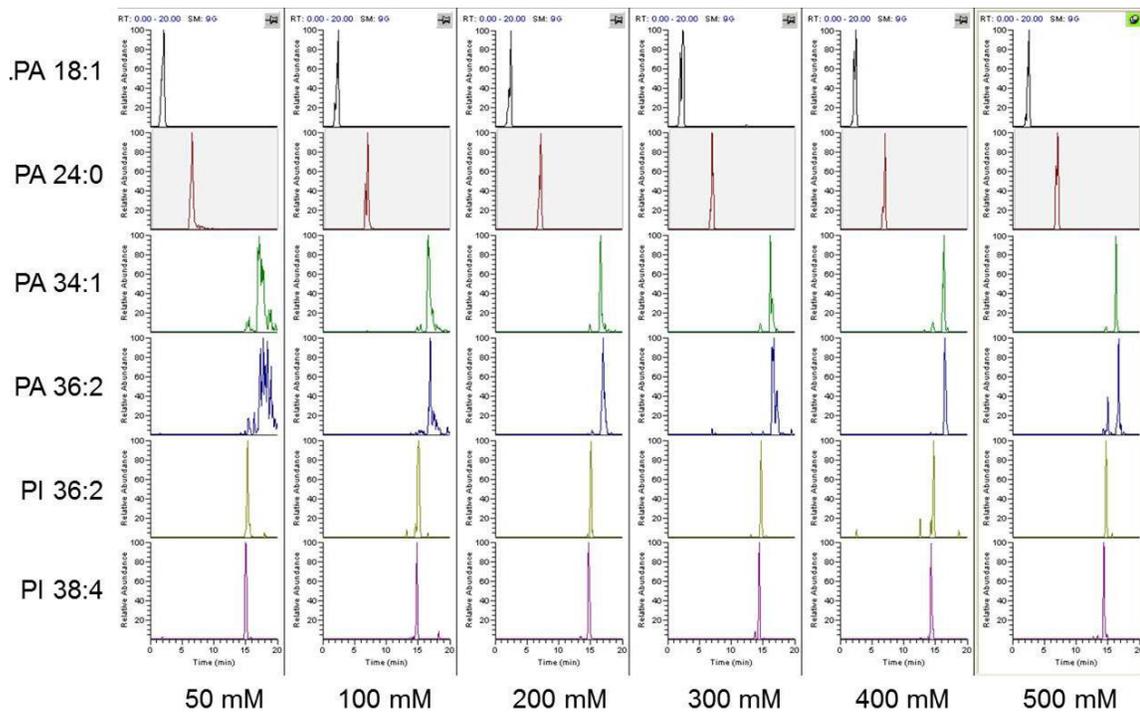


Abbildung 26: Einfluss der Salzkonzentration auf die Chromatographie (pH-Wert 2,5)

In Abbildung 26 ist erkennbar, dass die Peakform von PA 34:1 und PA 36:2 sich bei gleichbleibendem pH-Wert mit zunehmender Salzkonzentration im Laufmittel verbessert.

Durch eine sehr hohe Salzkonzentration (500 mM Ammoniumformiat) und einen niedrigen pH-Wert (2,5) konnte das Tailing von PA zufriedenstellend verringert werden

(Abbildung 26). Durch die hohe Salzkonzentration ist der Retentionsmechanismus möglicherweise nicht mehr der einer klassischen Umkehrphasenchromatographie, sondern ähnelt dem von Ionenchromatographie bzw. Ionenpaarchromatographie. Allerdings ist diese Methode wegen der Gefahr der Salzablagerung im HPLC-System und der hohen Kosten von Ammoniumformiat als Routinemethode nicht anwendbar.

5.2.5 Finale Methode

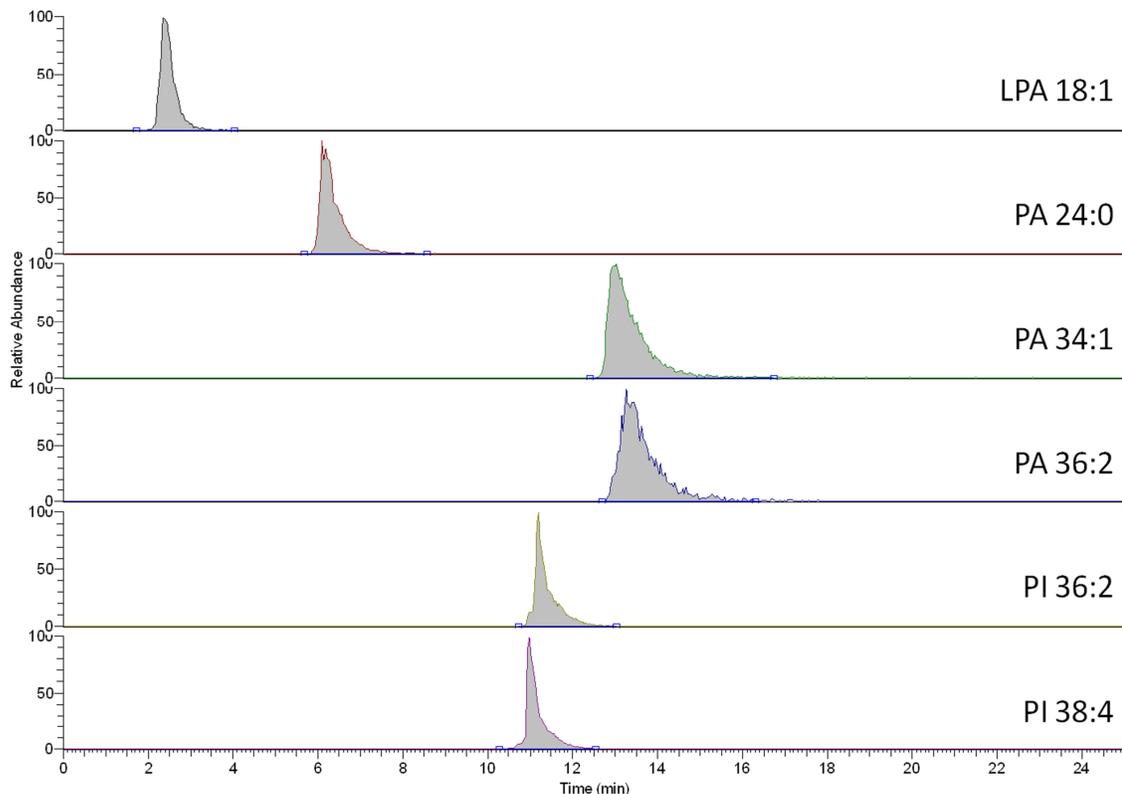


Abbildung 27: Finale RP-Methode

Der Zusatz von 1 % HCOOH zu beiden Laufmitteln führte zu einer starken Verbesserung der Peakform von PA. Das Tailing ist stark reduziert, der jeweilige Peak eluiert in ca. zwei Minuten (Abbildung 27). Hier war auch zwischen 0,5 % HCOOH und 1 % HCOOH ein sehr großer Unterschied bemerkbar. Hierin liegt möglicherweise zumindest teilweise die Erklärung für eine der oben aufgeworfenen Fragen, nämlich warum das Tailing bei PA 24:0 immer in viel geringerem Ausmaß auftritt als beispielsweise bei PA 34:1. Ist Säure nur im Laufmittel A vorhanden, verringert sich die Säurekonzentration während des Gradienten, da der Anteil an Laufmittel A sinkt. Da LPA und PA 24:0 deutlich früher eluieren als PA 34:1, ist bei deren Elution die Säurekonzentration höher als bei der Elution von PA 34:1. Hat nun die Säurekonzentration den erwarteten Einfluss auf die Protonierung der Kopfgruppe und im weiteren Sinn auf die Peakverbreiterung, würde dies erklären, warum früher eluierende PA

und LPA-Spezies weniger Peakverbreiterung zeigen. Allerdings zeigt der Peak von PA 24:0 selbst bei der Verwendung von Laufmitteln ohne Säure viel weniger Tailing als andere PA-Spezies. Wenn die Säurekonzentration auch nicht der einzige Einflussfaktor sein kann, so ist der positive Effekt auf die Peakform dennoch nicht von der Hand zu weisen.

Ausgehend von dieser verbesserten Methode wurde ein Säulenvergleich zwischen Hypersil Gold und Hypersil Gold aQ durchgeführt. Hypersil Gold aQ enthält polare Gruppen und soll für polare Analyten bessere Retention und Peakform liefern. Obwohl PI-Spezies auf der aQ-Säule deutlich geringeres Tailing zeigten, wurde für PA oder LPA keine Verbesserung der Peakform beobachtet (Abbildung 28).

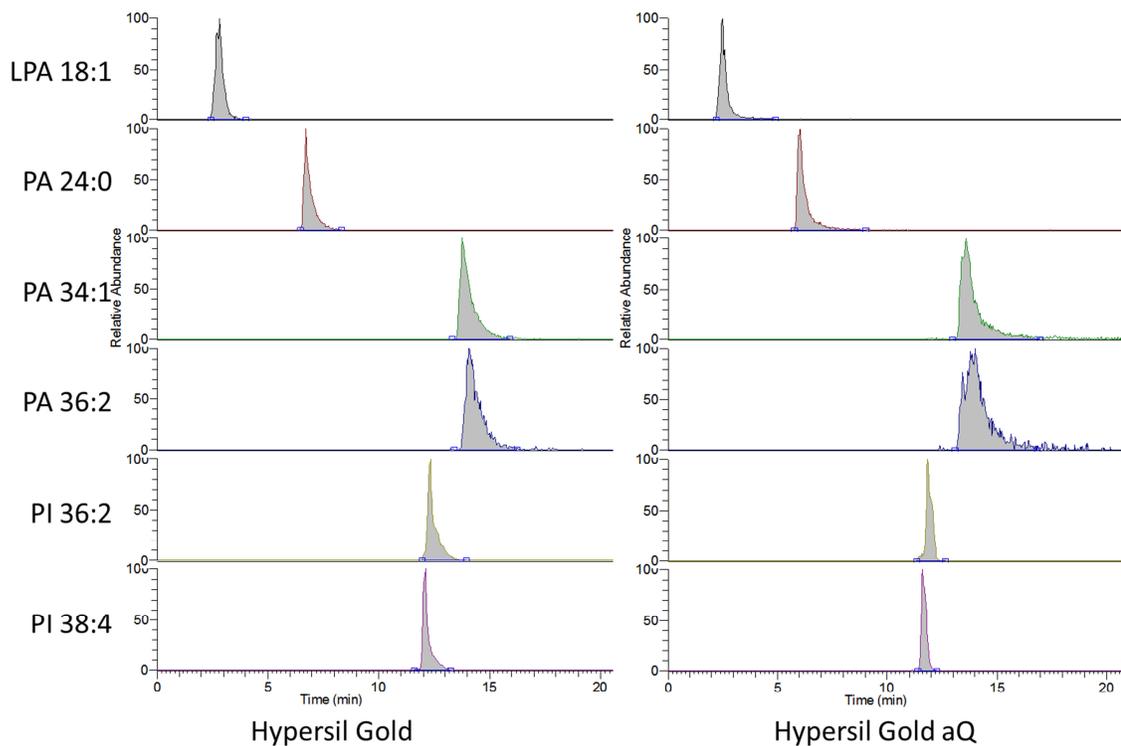


Abbildung 28: Vergleich Hypersil Gold – Hypersil Gold aQ

5.2.6 Vergleich verschiedener Injektionsvolumina

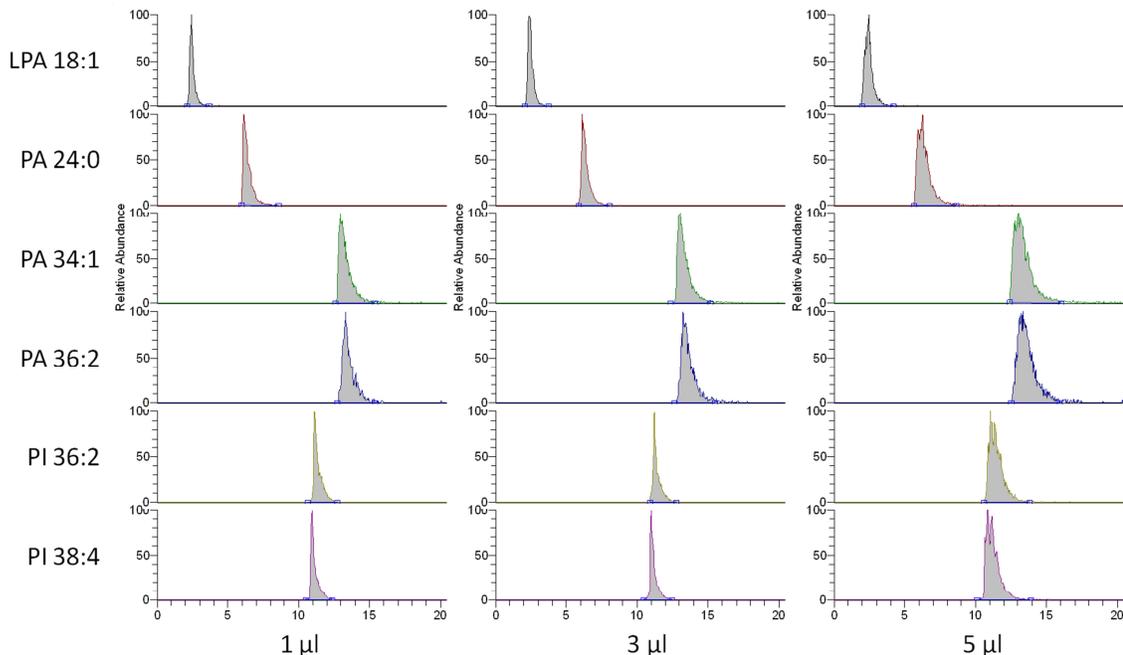


Abbildung 29: Einfluss des Injektionsvolumens auf die Peakform

Der Einfluss des Injektionsvolumens auf die Peakform wurde ebenfalls evaluiert (Abbildung 29). Die Peakform ist bei einem Injektionsvolumen von 1 bzw. 3 μL deutlich besser als bei 5 μL . Der Grund dafür ist das Injektionslösungsmittel, in dem die Probe auf die Säule aufgebracht wird. Werden 5 μL Probe auf die verwendete RP-Säule aufgebracht, entspricht dies 6,4 % des Gesamtsäulenvolumens (berechnet ohne Berücksichtigung des Volumens der porösen Partikel). Dadurch, dass das Injektionslösungsmittel ($\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$) eine deutlich höhere Elutionskraft besitzt als die Laufmittelzusammensetzung zu Beginn des Gradienten, kommt es bereits während der Injektion zu einer Verteilung der Probe entlang der Säule, ohne dass nennenswerte Interaktion zwischen Probe und Säule stattfindet. Für dieses Problem gibt es mehrere Lösungsmöglichkeiten: Eine Möglichkeit wäre es, die Probe in einem Lösungsmittel aufzunehmen, das in seiner Zusammensetzung den Anfangsbedingungen des Gradienten entspricht (ca. 50 % wässrige, 50 % organische Phase). Im Fall von Gesamtlipidextrakten ist das problematisch, da bestimmte Lipide (z.B. Triacylglycerole) nicht löslich wären und daher nicht analysiert werden könnten. Sollen jedoch in einem Lauf nur bestimmte Lipidklassen (z.B. PA und LPA) analysiert werden, wäre dies durchführbar. Eine andere Möglichkeit, das Problem zu umgehen, ist die Verwendung eines geringeren Injektionsvolumens, wodurch das Probenvolumen einen kleineren Anteil des Säulenvolumens belegt. Im Fall von PA und LPA führte bereits eine Reduktion des

Injektionsvolumens von 5 auf 3 μL zu einer deutlichen Verbesserung der Peakform, während eine weitere Reduktion auf 2 bzw. auf 1 μL keine zusätzliche Verbesserung hervorrief.

5.3 HILIC-Methodenentwicklung

Mit der CN-Säule konnte keine zufriedenstellende Retention erreicht werden, die Analyten eluierten nahe dem Lösungsmittelpeak (nicht abgebildet). Auch mit der Triart Diol HILIC-Säule konnten die Lipidklassen nicht zufriedenstellend aufgetrennt werden (nicht abgebildet). Möglicherweise besitzen diese Säulen nicht die notwendige Selektivität für die untersuchten Analyten.

Im Unterschied zu RP-Chromatographie, wo die Auftrennung von Lipiden aufgrund der Länge und Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäurereste erfolgt, beruht die Trennung bei HILIC hauptsächlich auf den unterschiedlichen Polaritäten der Kopfgruppen, was eine Auftrennung nach Lipidklassen ermöglicht. Innerhalb der Klassen kann zwar eine geringe Auftrennung nach Länge und Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäureresten beobachtet werden, diese ist jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als bei RP-HPLC.

Interessanterweise hat bei HILIC – im Unterschied zu RP – eine Änderung der Salzkonzentration kaum Auswirkungen auf die Peakform bzw. die Retentionszeit (nicht abgebildet). Eine Veränderung der Säurekonzentration, bzw. des pH-Werts, hat hingegen einen großen Einfluss, sowohl auf die Peakform, als auch auf die Retentionszeit von PA und LPA. Während sowohl die Peakform als auch die Retentionszeit anderer Phospholipide unverändert bleibt, verringert sich mit zunehmender Säurekonzentration (untersucht in Schritten von 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 und 1,3 %) die Retentionszeit von PA und LPA (Tabelle 14). Dieser Effekt ist dadurch leicht erklärbar, dass es sich hierbei um pH-Werte zwischen 2 und 3 handelt, die in etwa dem pKa-Wert der Phosphatgruppe von PA und LPA entsprechen. Eine Zunahme der Säurekonzentration führt zur zunehmenden Protonierung der Phosphatgruppen. Da die Phosphatgruppe in protoniertem Zustand ungeladen vorliegt und damit weniger polar ist, verringert sich dadurch die Retentionszeit bei HILIC.

Tabelle 14: Einfluss der Säurekonzentration auf die Peakform von PA und LPA; Peakbreite bei 10 % max. Intensität;
 +: zufriedenstellende Peakform, -: knapp getrennt, — : deutlich voneinander getrennt

HCOOH		PA			LPA			Dauer der Trennung
LM A	LM B	Peakform	Peakbreite	koeluiert mit	Peakform	Peakbreite	koeluiert mit	
0,5 %	0,0 %	+	0,5 min	LPE	+	0,8 min	PS	6,3 min
0,2 %	0,2 %	+	0,7 min	LPE, PE	+	0,8 min	PS	6,0 min
0,5 %	0,5 %	+	0,8 min	CL	+	1,0 min	PS, LPE	6,0 min
1,0 %	1,0 %	+	0,5 min	PI	+	1,0 min	PS, LPE	5,8 min
1,3 %	1,3 %	+	0,5 min	PG, PI	+	0,8 min	PS, PE, CL	6,0 min

5.3.1 Finale Methode

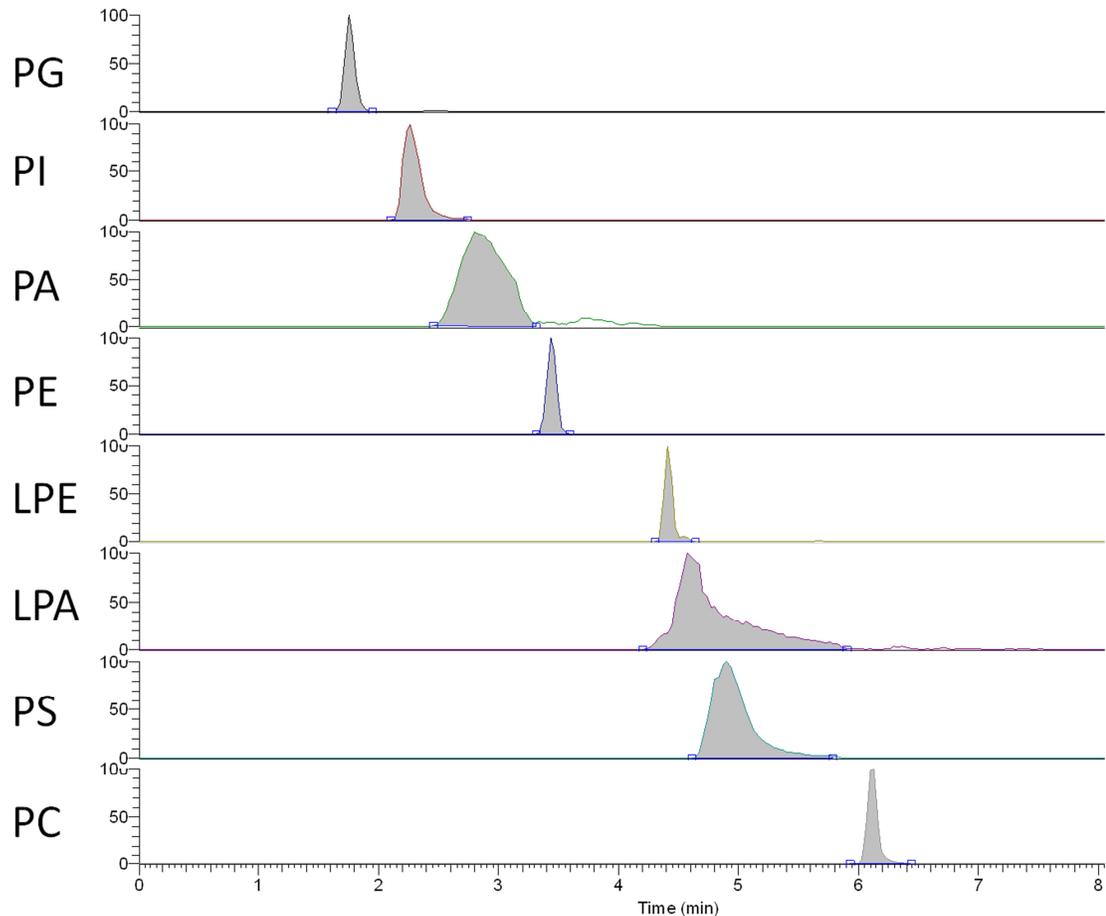


Abbildung 30: Finale HILIC-Methode

Es konnte mit der Kinetex-Säule eine Trennung mehrerer Phospholipidklassen erreicht werden, wobei PA nach PI und vor PE eluiert und LPA zwar gemeinsam mit PS und LPE, aber vor PC oder LPC (Abbildung 30). Dies führt, verglichen mit RP, zu einer Steigerung der Sensitivität, da es zu keiner Interferenz durch andere Lipidklassen und damit zu Ionensuppression kommt. Die Koelution von LPA mit PS und LPE führt zu keinen Problemen, da diese Lipidklassen in biologischen Systemen meist in wesentlich geringerem Ausmaß vorhanden sind als beispielsweise PC oder PE.

Das zuvor beschriebene Problem der Peakverbreiterung durch das Injektionslösungsmittel tritt bei HILIC nicht auf. Einerseits deswegen, weil eine HILIC-Gradiententrennung mit einem hohen Anteil an organischem Lösungsmittel beginnt, was dem Injektionslösungsmittel sehr ähnlich ist, andererseits deswegen, weil die verwendete HILIC-Säule einen größeren Innendurchmesser besitzt als die verwendete RP-Säule. Dadurch macht das Injektionsvolumen einen deutlich geringeren Anteil am Säulenvolumen aus (ca. 1,5 %).

5.3.2 Retentionszeitstabilität der HILIC-Methode

Abbildung 31 und Tabelle 15 zeigen die Ergebnisse der Versuche zur Retentionszeitstabilität. Unabhängig von der Dauer der Reäquilibration zeigen die Retentionszeiten nur sehr geringe Schwankungen.

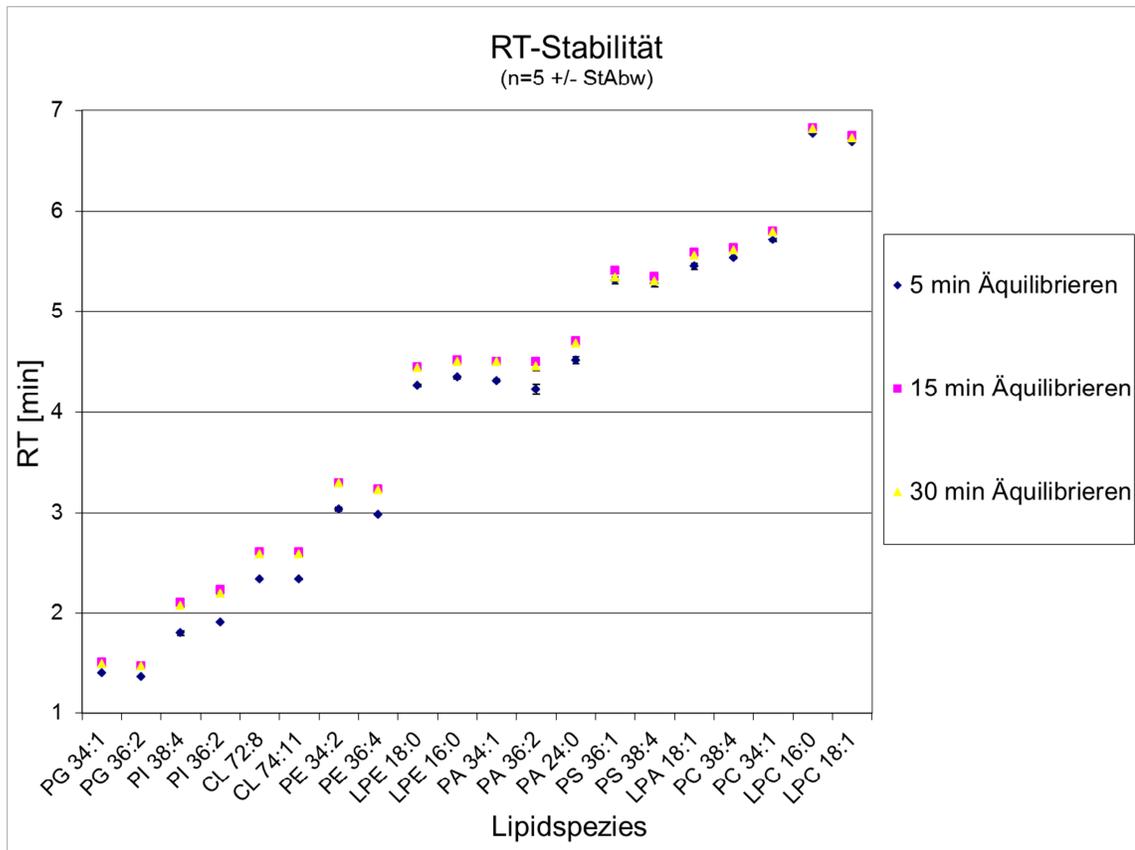


Abbildung 31: Retentionszeitstabilität

Bei Gradiententrennungen muss die Säule äquilibriert werden, das heißt, vor der Injektion einer neuen Probe muss die Säule eine bestimmte Zeit lang mit den Startbedingungen gespült werden, um reproduzierbare Trennungen zu erhalten. Die Äquilibrationsdauer, die bei der HILIC-Methode für eine stabile Retentionszeit notwendig ist, wurde evaluiert (Abbildung 31). Die Retentionszeit ist unabhängig von der Äquilibrationsdauer stabil und zeigt nur geringste Schwankungen zwischen Mehrfachinjektionen; bei manchen Analyten jedoch erhöht sich die Retentionszeit um bis zu 15 s, wenn länger äquilibriert wird. In der finalen Methode wurde eine Äquilibrationsdauer von 15 min gewählt, was zu einer Gesamtdauer von 30 min führt. Bei Bedarf könnte die Methode jedoch ohne Verlust der Reproduzierbarkeit um 30 % verkürzt werden (Äquilibrationsdauer 5 min).

Tabelle 15: Retentionszeiten bei unterschiedlicher Äquilibrationszeit (RT in Minuten)

Äquilibrationszeit	PG		PI		CL		PE		LPE		PA		PS		LPA		PC		LPC		
	34:1	36:2	38:4	36:2	72:8	74:11	34:2	36:4	18:0	16:0	34:1	36:2	24:0	36:1	38:4	18:1	38:4	34:1	16:0	18:1	
5 min	1	1,41	1,37	1,79	1,91	2,34	2,34	3,04	2,99	4,27	4,35	4,31	4,19	4,52	5,27	5,23	5,40	5,53	5,70	6,77	6,69
	2	1,41	1,37	1,79	1,91	2,34	2,34	3,01	2,97	4,28	4,36	4,32	4,20	4,49	5,32	5,28	5,49	5,53	5,74	6,77	6,69
	3	1,41	1,37	1,79	1,91	2,34	2,34	3,06	2,98	4,26	4,34	4,34	4,22	4,51	5,29	5,33	5,46	5,54	5,71	6,78	6,70
	4	1,41	1,37	1,83	1,91	2,34	2,34	3,03	2,99	4,25	4,33	4,29	4,21	4,50	5,33	5,29	5,46	5,54	5,71	6,78	6,70
	5	1,40	1,36	1,82	1,90	2,33	2,33	3,02	2,98	4,28	4,36	4,32	4,32	4,57	5,36	5,27	5,44	5,53	5,74	6,77	6,69
MW	1,41	1,37	1,80	1,91	2,34	2,34	3,03	2,98	4,27	4,35	4,32	4,23	4,52	5,31	5,28	5,45	5,53	5,72	6,77	6,69	
StAbw	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,03	0,03	0,04	0,03	0,01	0,02	0,01	0,01	
15 min	1	1,50	1,46	2,10	2,22	2,61	2,61	3,26	3,22	4,43	4,51	4,51	4,47	4,68	5,41	5,33	5,59	5,63	5,80	6,82	6,74
	2	1,52	1,48	2,12	2,24	2,63	2,63	3,30	3,23	4,47	4,50	4,50	4,50	4,71	5,43	5,38	5,60	5,64	5,81	6,84	6,76
	3	1,51	1,47	2,10	2,23	2,61	2,61	3,29	3,22	4,44	4,52	4,52	4,56	4,69	5,42	5,34	5,59	5,63	5,80	6,82	6,74
	4	1,51	1,47	2,11	2,23	2,62	2,62	3,29	3,22	4,44	4,52	4,48	4,48	4,73	5,38	5,34	5,60	5,64	5,81	6,84	6,76
	5	1,50	1,46	2,10	2,22	2,60	2,60	3,29	3,25	4,45	4,53	4,49	4,49	4,70	5,38	5,34	5,55	5,64	5,80	6,83	6,75
MW	1,51	1,47	2,11	2,23	2,62	2,62	3,29	3,23	4,45	4,52	4,50	4,50	4,70	5,40	5,35	5,58	5,64	5,80	6,83	6,75	
StAbw	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01	
30 min	1	1,49	1,49	2,08	2,20	2,58	2,58	3,30	3,22	4,45	4,49	4,53	4,45	4,70	5,32	5,28	5,58	5,62	5,79	6,81	6,74
	2	1,50	1,46	2,09	2,21	2,60	2,60	3,30	3,22	4,43	4,51	4,47	4,47	4,68	5,34	5,29	5,55	5,60	5,81	6,83	6,75
	3	1,48	1,48	2,07	2,19	2,57	2,57	3,30	3,22	4,43	4,51	4,51	4,39	4,68	5,37	5,29	5,55	5,63	5,80	6,83	6,71
	4	1,51	1,47	2,06	2,19	2,62	2,62	3,29	3,21	4,45	4,49	4,49	4,49	4,66	5,38	5,34	5,55	5,60	5,81	6,79	6,72
	5	1,50	1,47	2,06	2,18	2,57	2,57	3,26	3,23	4,42	4,50	4,50	4,46	4,67	5,31	5,31	5,57	5,61	5,78	6,81	6,73
MW	1,49	1,47	2,07	2,19	2,59	2,59	3,29	3,22	4,44	4,50	4,50	4,45	4,68	5,34	5,30	5,56	5,61	5,80	6,82	6,73	
StAbw	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,04	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	

Ein Nachteil der entwickelten HILIC-Methode ist, dass die Trennung der Phospholipidklassen innerhalb von 7 Minuten stattfindet (obwohl die Gesamtdauer der Methode 30 min beträgt). Der Grund dafür liegt vermutlich in der Polarität der mobilen Phasen: Laufmittel B ist eine 5+2-Mischung von Acetonitril und Isopropanol, der Säure und Salz zugesetzt werden. Isopropanol ist deutlich polarer als Acetonitril, beschleunigt also die Elution. Würde reines Acetonitril verwendet werden, würde dies die Elution verzögern. Die Zugabe von Isopropanol ist jedoch notwendig, da das verwendete Salz in reinem Acetonitril nicht löslich ist und ausfallen würde.

Während in manchen Fällen eine derartig schnelle Trennung gewünscht ist, führt sie hier zu kleineren Schwierigkeiten: Die Zykluszeit der Orbitrap bei der verwendeten Methode (R=100 000, DDA) beträgt ca. 2 s, was einer Scanrate von 0,5 Hz entspricht. Während für einen PA- oder LPA-Peak, die ca. 1 min breit sind, genug Meßpunkte für eine Quantifizierung vorhanden sind, eluieren PI-Spezies innerhalb 15-30 s, wodurch für eine sichere Quantifizierung mit ausreichender Anzahl an Messpunkten eine geringere Zykluszeit wünschenswert wäre, welche jedoch beim verwendeten Gerät mit einer geringeren Auflösung verbunden wäre.

5.4 Vergleich der entwickelten Methoden

Tabelle 16: Vergleich der entwickelten Methoden

	RP	HILIC
Gesamtzeit	35 min	30 min
Isotopenkorrektur	Nein	Ja
Auftrennung nach	Fettsäureresten	Kopfgruppen
Ionensuppression	Tritt auf	Tritt in geringerem Ausmaß auf ¹
Verschleppung	Ja (<3 %)	Nein

Wie in Tabelle 16 ersichtlich, besitzen die beiden entwickelten Methoden sowohl Vor- als auch Nachteile. Mit RP-HPLC erfolgt die Auftrennung der Lipide nach der Polarität ihrer Fettsäurereste, was zu Überlappung unterschiedlicher Lipidklassen und somit zu Ionensuppression führen kann. Mit HILIC hingegen ist eine Auftrennung nach Lipidklassen möglich, was einerseits Ionensuppression weitgehend minimiert, aber eine Isotopenkorrektur notwendig macht. Für eine qualitative Analyse ist die HILIC-Methode deswegen gut geeignet, weil die einzelnen Lipidklassen nur innerhalb eines bestimmten

¹ Ionensuppression durch andere PA-Spezies möglich, jedoch deutlich geringer als bei RP

Retentionszeitbereichs eluieren. Wird eine Isotopenkorrektur vorgenommen, können mit dieser Methode auch quantitative Aussagen getroffen werden. Mit RP ist eine quantitative Auswertung mittels bereits etablierter Methoden (Lipid Data Analyzer) möglich.

5.5 Detektion

Die Tatsache, dass bei der Fragmentierung von Lysophosphatidsäure und Phosphatidsäure im Gegensatz zu anderen Phospholipiden keine klassenspezifischen Produktionen oder Neutralverluste auftreten, erschwert deren Analyse. Eine Möglichkeit ist die Verwendung eines Precursor Ion Scans von m/z 153, das dem 1,2-zyklischen Phosphodiester von Glycerol entspricht (Abbildung 32). Dieses Ion ist jedoch nicht spezifisch für PA oder LPA; es kann von allen Phospholipiden durch Abspaltung beider Fettsäuren und anschließendem Ringschluss gebildet werden.

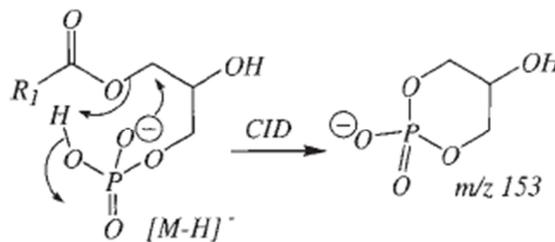


Abbildung 32: Fragmentierung von LPA zum 1,2-zyklischen Phosphodiester von Glycerol (Pulfer & Murphy 2003)

Eine weitere Möglichkeit einer sehr selektiven Detektion ist die Verwendung von SRM-Scans. Diese Herangehensweise wäre für Lysophosphatidsäure relativ einfach durchzuführen, da LPA nur einen Fettsäurerest enthält. Phosphatidsäure enthält jedoch zwei Fettsäuren, die abgespalten werden können, was die Anzahl der möglichen SRMs stark erhöht. Beispielsweise könnte PA 36:2 zwei 18:1-Fettsäuren oder eine 18:0- und eine 18:2-Fettsäure beinhalten.

Hochauflösende Massenspektrometrie hingegen ermöglicht die Ermittlung der elementaren Zusammensetzung aus dem gemessenen m/z -Verhältnis (unter der Annahme, dass bei Phospholipiden nur gewisse Elemente – Kohlenstoff, Wasserstoff, Phosphor, Sauerstoff und Stickstoff – vorkommen). Verbunden mit Kenntnis über das theoretische m/z -Verhältnis kann die Summenformel mit hoher Sicherheit bestimmt werden und zur Identifikation herangezogen werden.

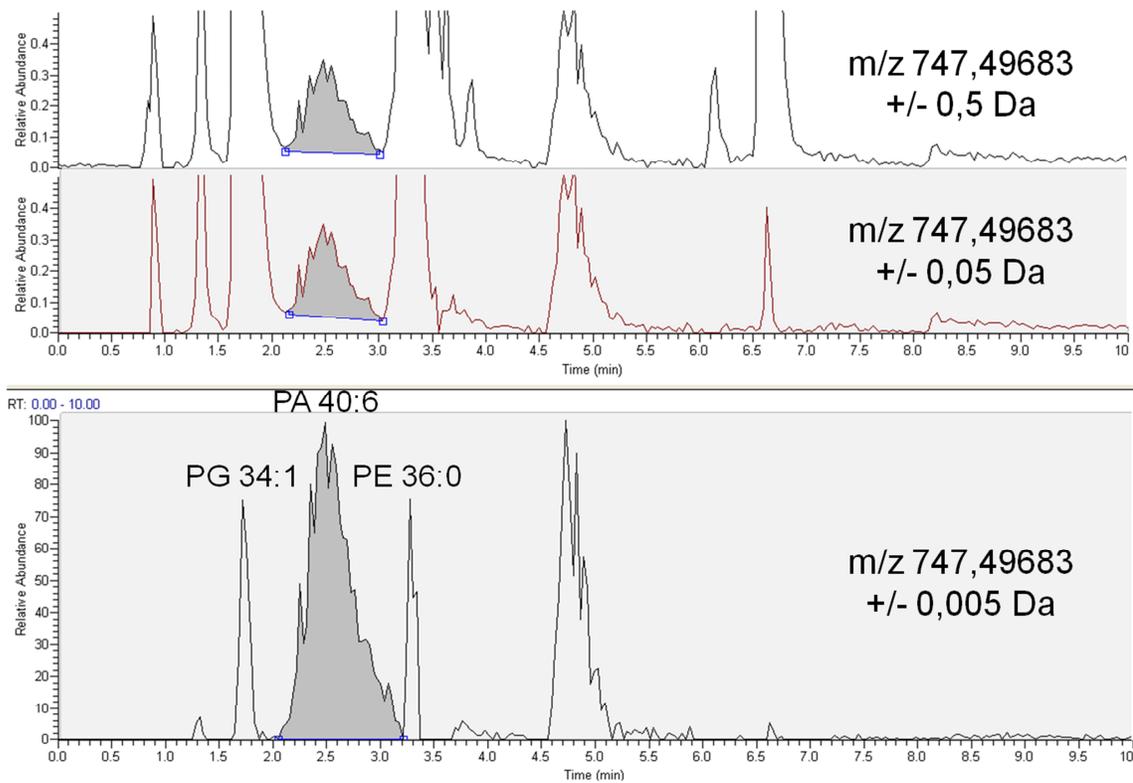


Abbildung 33: Chromatogramm von PA 40:6 bei verschiedenen m/z-Isolations-Fenstern

Abbildung 33 verdeutlicht den Vorteil hochauflösender Massenspektrometrie. Es handelt sich bei der gezeigten Substanz mit hoher Sicherheit um PA 40:6 (Abweichung vom theoretischen m/z-Verhältnis 0,84 ppm). Wird der Massenbereich mit einer Einschränkung von +/- 0,5 um den Zielwert (gemessenes m/z-Verhältnis 747,49683) gesetzt, besitzt der gesuchte Peak nur eine sehr geringe Intensität im Verhältnis zu den benachbarten Peaks von PG 34:1 ($[M-H]^- = 747,51811$) und PE 36:0 ($[M-H]^- = 747,57776$), die sich in der Masse nur um einen sehr geringen Wert voneinander unterscheiden, jedoch eine andere Retentionszeit besitzen. Wird jedoch das m/z-Fenster entsprechend eingeschränkt (z.B. auf +/- 0,005 Da um den Zielwert), kann ein Großteil der anderen Peaks ausgeblendet werden. Die verbleibenden Signale könnten durch in-Source-Fragmentierung (ungewünschte Zerfallsreaktionen während des Ionisationsprozesses) aus anderen Phospholipidklassen entstanden sein. Bei einer HILIC-Trennung führt ein größeres m/z-Isolations-Fenster zu weniger Problemen als bei RP-HPLC, da Lipide, die die gleiche nominale Masse besitzen, aber zu einer anderen Klasse gehören, oft andere Retentionszeiten besitzen. Eine Detektion in RP-HPLC hingegen wäre schwierig, da es dabei höchstwahrscheinlich zu einer Überlappung verschiedener Lipidklassen kommen würde.

Ein weiteres Selektivitätskriterium für die Identifikation kann durch das Fragmentspektrum einer Verbindung gewonnen werden. In der entwickelten Methode wurden Data Dependent Scans verwendet, bei denen die 10 höchsten Peaks in einem Spektrum einzeln isoliert und

fragmentiert werden („Top 10-Methode“). Das LTQ-Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometer ermöglicht in dieser Methode die Bestimmung der genauen Masse aller Analyten (Fullscan) mit einer Auflösung von 100 000 in der Orbitrap, während beinahe zeitgleich in der LTQ-Ionenfalle Fragmentspektren der 10 Ionen mit der höchsten Intensität im Spektrum aufgenommen werden. Die gewählte Auflösung im Fullscan ist ausreichend für eine Identifikation von Lipidspezies mit einer Abweichung von weniger als 5 ppm, während das Fragmentspektrum eine weitere Ebene der Selektivität in der Identifikation bietet und zusätzlich Aussagen über die Fettsäurezusammensetzung ermöglicht.

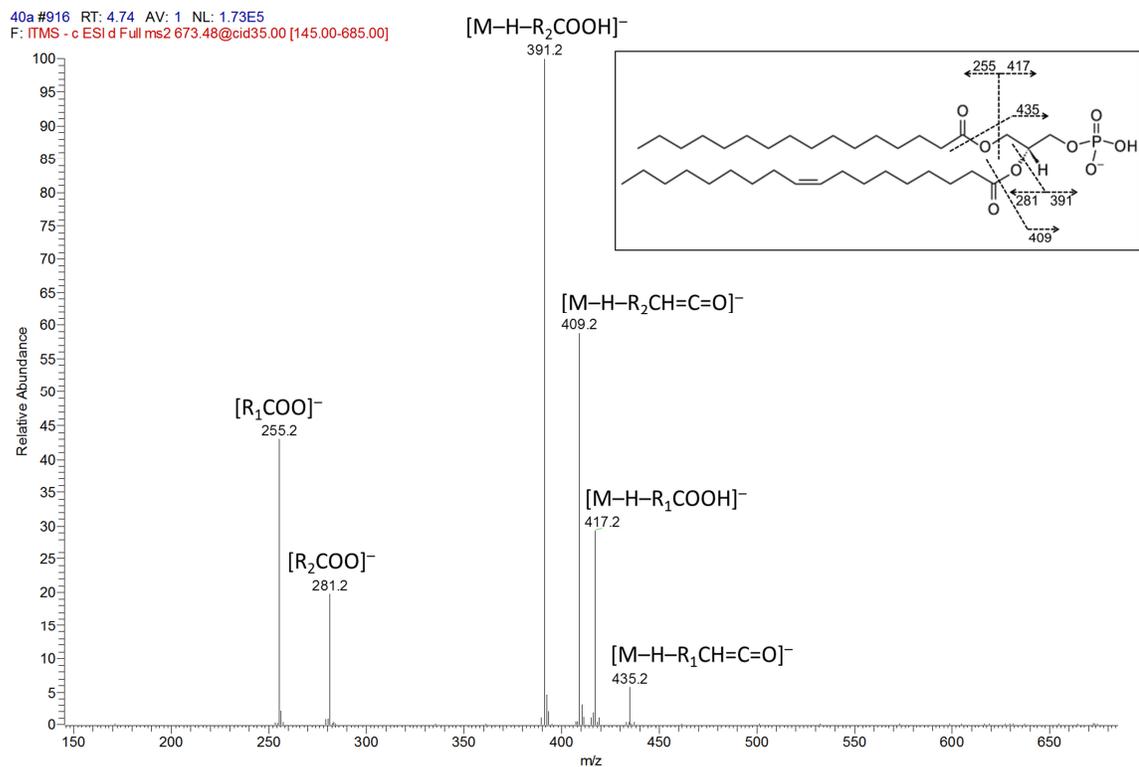


Abbildung 34: Fragmentspektrum und Fragmentierungsschema von PA 34:1

Abbildung 34 zeigt das Fragmentspektrum einer Verbindung, das während der HILIC-Trennung eines Phospholipidgemisches aufgenommen wurde. Das m/z -Verhältnis des Precursor-Ions entspricht mit einer Abweichung von 1,532 ppm dem von PA 34:1, die Retentionszeit entspricht ebenfalls der von PA. Könnten die Peaks im Fragmentspektrum durch die Struktur von PA 34:1 erklärt werden, wäre die Verbindung eindeutig identifiziert. In diesem Fall können alle Peaks im Spektrum als Abspaltungen der Fettsäuren als Carboxylat-Anionen (m/z 255, m/z 281), als neutrale Fettsäuren (m/z 417, m/z 391) und als Ketene (m/z 435, m/z 409) interpretiert werden. Die Verbindung ist somit durch Retentionszeit, exakte Masse und Fragmentspektrum als PA 34:1, genauer als PA 16:0-18:1

identifiziert. Eine Fettsäurezusammensetzung von 16:1-18:0 wäre zwar theoretisch ebenso möglich, kann aber aufgrund der fehlenden Fragmente ausgeschlossen werden.

Der Nachteil bei dieser Vorgehensweise ist, dass jedes Fragmentspektrum manuell ausgewertet werden muss, was einen hohen Zeitaufwand erfordert.

5.6 Notwendigkeit einer Isotopenkorrektur

Bei der in der Methode verwendeten Auflösung von 100 000 sollten die ^{13}C -Isotopenpeaks voneinander getrennt sein (S. 22). Diese rein theoretische Angabe gilt jedoch nur für Peaks gleicher Höhe. Abbildung 35 zeigt die simulierte Isotopenüberlappung von PA 34:1 (blau) und PA 34:2 (rot) bei einem Verhältnis von 1:1 und einer Auflösung von 100 000. Der Peak bei m/z 673,5 besteht aus dem $[\text{M}(^{13}\text{C}_2)\text{-H}]^-$ -Isotopenpeak von PA 34:2 und dem $[\text{M-H}]^-$ -Peak von PA 34:1, die nicht voneinander getrennt sind. Eine Basislinientrennung würde erst bei einer Auflösung von $>250\,000$ erreicht werden.

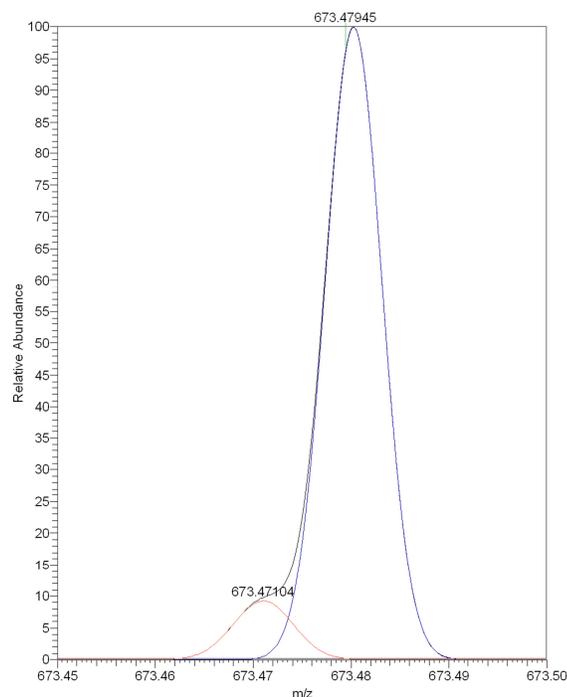


Abbildung 35: Isotopenüberlappung von PA 34:2 (rot) und PA 34:1 (blau) bei $R=100\,000$

Während das LTQ-FT zwar eine derart hohe Auflösung erreichen kann, würde es dabei für einen Scanzzyklus mehrere Sekunden benötigen und eine Quantifizierung während einer HPLC-Trennung wäre nicht qualitativ ausreichend, da nicht genügend Meßpunkte für einen Peak vorhanden wären. Bei Auflösungen unter 250 000 ist somit eine Isotopenkorrektur während der Auswertung notwendig.

5.7 Anwendung der entwickelten Methoden auf Realproben

Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen Chromatogramme ausgewählter PA-Spezies der gemessenen murinen Hirnprobe im HILIC- (links) und im RP-Modus (rechts).

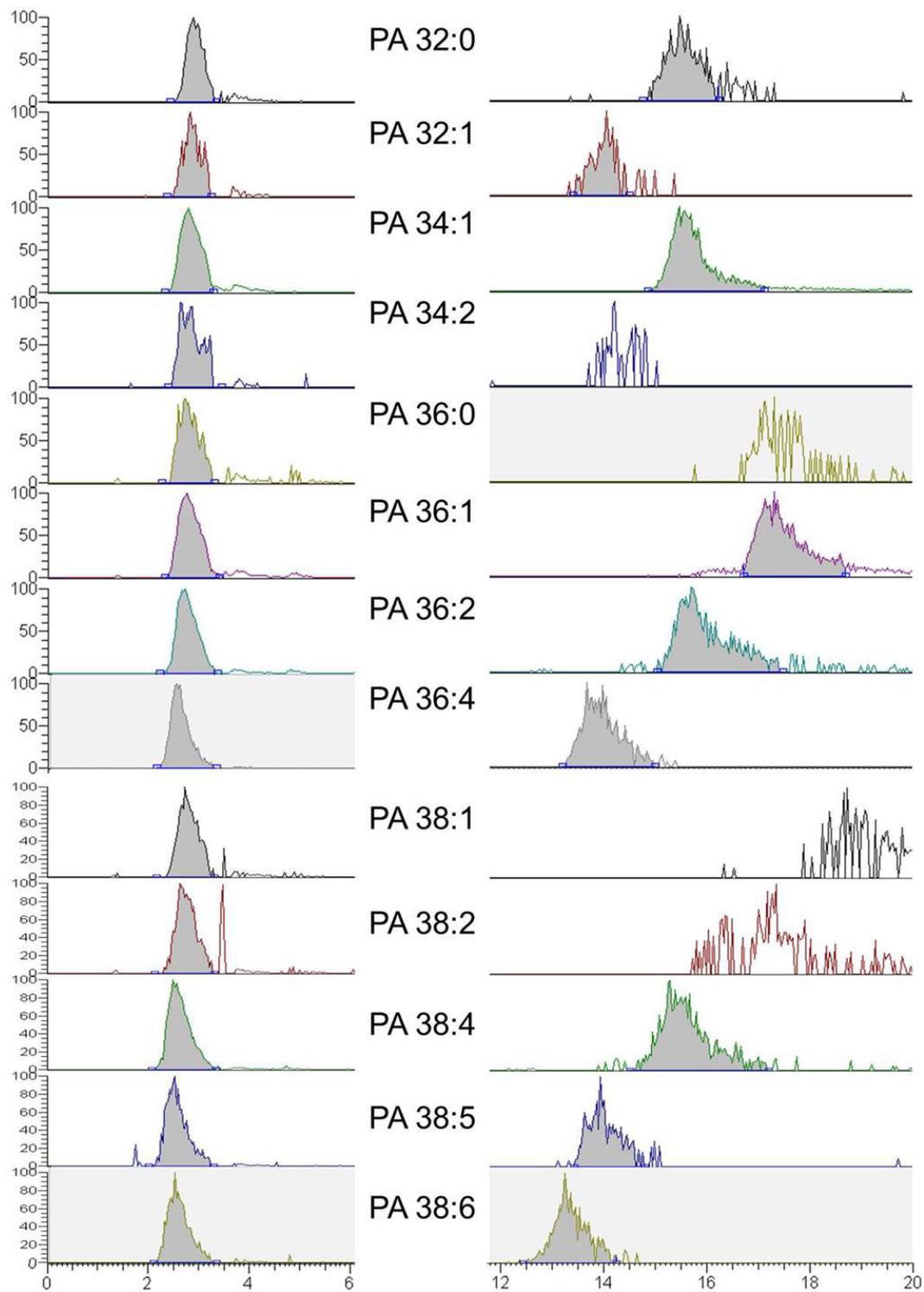


Abbildung 36: Ausgewählte PA-Spezies in murinem Hirn I (links HILIC, rechts RP)

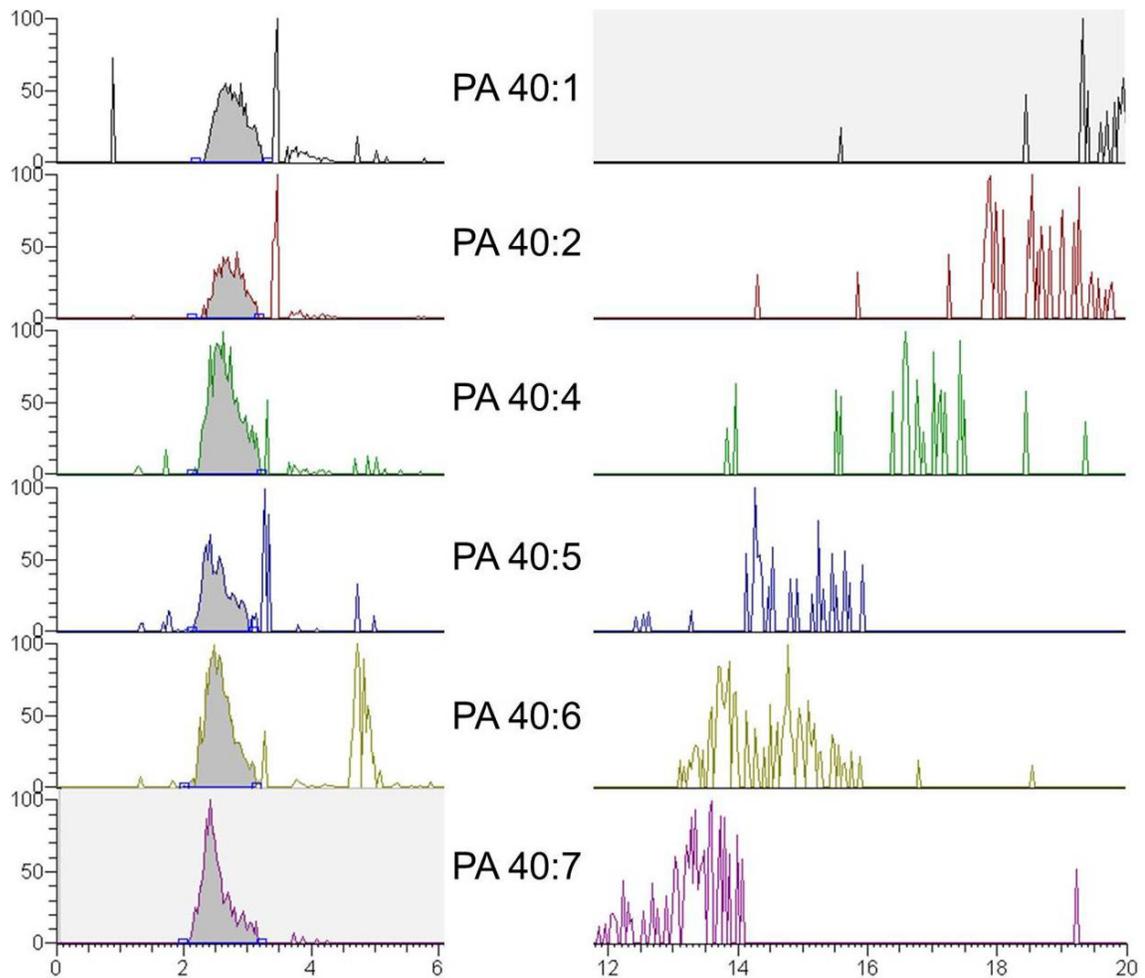


Abbildung 37: Ausgewählte PA-Spezies in murinem Hirn II (links HILIC, rechts RP)

In Abbildung 36 und Abbildung 37 ist der Vorteil der HILIC-Methode gegenüber der RP-Methode deutlich sichtbar: Einerseits führt bei RP-Chromatographie die Ionensuppression zu schlechteren Peakformen und geringeren Intensitäten für PA, andererseits konnten mit der HILIC-Methode PA-Spezies gefunden werden, die mit RP schwer bis gar nicht quantifizierbar waren (Abbildung 37). Dies ist möglich, weil bei HILIC der Großteil der Phospholipide, der eine Ionisierung von PA supprimieren kann (vor allem PC), zu einer anderen Zeit eluiert.

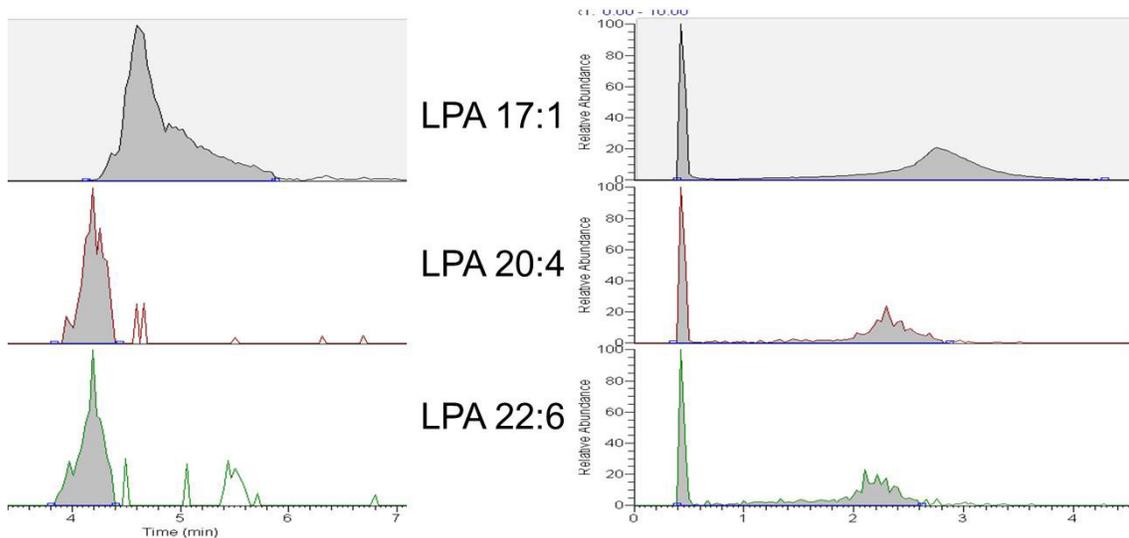


Abbildung 38: Ausgewählte LPA-Spezies in murinem Hirn (links HILIC, rechts RP)

In Abbildung 38 sind Chromatogramme dreier gefundener LPA-Spezies in murinem Hirn abgebildet. Bei RP-HPLC führte das Injektionslösungsmittel ($\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$) zum unerwünschten Effekt eines Doppelpeaks, wobei ein Teil des LPA bereits mit dem Lösungsmittelpeak eluierte. Dieser Effekt kann, wie bereits beschrieben, dann auftreten, wenn das Injektionslösungsmittel höhere Elutionskraft besitzt als das Laufmittel zu den Anfangsbedingungen des Gradienten, wodurch ein Teil der Probe ohne wesentliche Interaktion mit der stationären Phase den Detektor erreicht. Die Auswertung im HILIC-Modus war ohne Schwierigkeiten möglich.

5.7.1 quantitative Auswertung

Tabelle 17, Abbildung 39 und Abbildung 40 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Auswertung von PA und LPA in murinem Hirn.

Tabelle 17: PA- und LPA-Konzentrationen in murinem Hirn

rel. weight [nmol/g]	PA													
	30:0	32:0	32:1	34:1	34:2	36:1	36:2	36:3	36:4	38:1	38:2	38:4	38:5	
H1	0,1	6,7	1,3	99,5	0,9	73,8	17,7	0,3	10,2	7,0	4,8	25,7	3,5	
H2	0,1	7,0	1,1	97,5	0,8	64,6	16,1	0,4	7,8	5,9	4,2	21,5	2,8	
H3	0,0	9,4	1,1	102,0	0,7	66,8	16,4	0,1	8,6	5,7	4,8	22,4	3,3	
MW	0,1	7,7	1,2	99,6	0,8	68,4	16,7	0,3	8,9	6,2	4,6	23,2	3,2	
StAbw	0,04	1,49	0,10	2,25	0,10	4,83	0,86	0,14	1,21	0,69	0,38	2,21	0,39	

rel. weight [nmol/g]	PA													
	38:6	38:7	40:1	40:2	40:4	40:5	40:6	40:7	42:2	44:7	46:7	48:10		
H1	4,1	0,1	1,4	1,5	2,3	0,7	3,8	0,9	0,8	2,3	1,8	0,3		
H2	4,2	0,1	1,3	1,0	1,5	0,4	3,9	0,8	0,5	2,2	1,6	0,2		
H3	5,1	0,1	1,4	0,6	1,6	0,2	4,1	0,8	0,4	2,6	1,8	0,2		
MW	4,5	0,1	1,4	1,0	1,8	0,5	3,9	0,9	0,6	2,4	1,7	0,2		
StAbw	0,52	0,02	0,07	0,48	0,48	0,25	0,13	0,06	0,22	0,22	0,10	0,08		

rel. weight [pmol/g]	LPA					
	14:1	18:0	18:1	20:4	22:6	
H1	327,7	312,8	207,5	371,6	420,1	
H2	318,9	307,8	201,5	323,0	332,8	
H3	334,9	341,4	232,7	393,7	340,1	
MW	327,2	320,7	213,9	362,8	364,4	
StAbw	7,99	18,11	16,53	36,16	48,43	

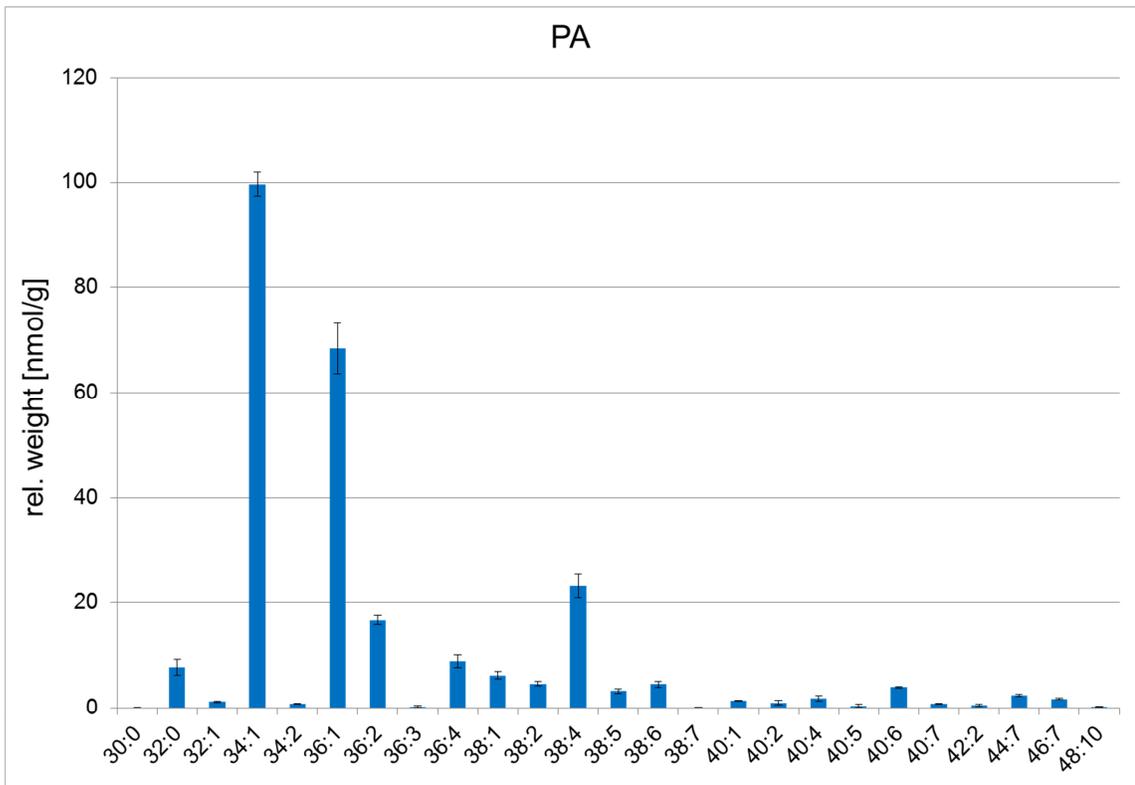


Abbildung 39: PA-Konzentrationen in murinem Hirn (n=5, MW +/- StdAbw)

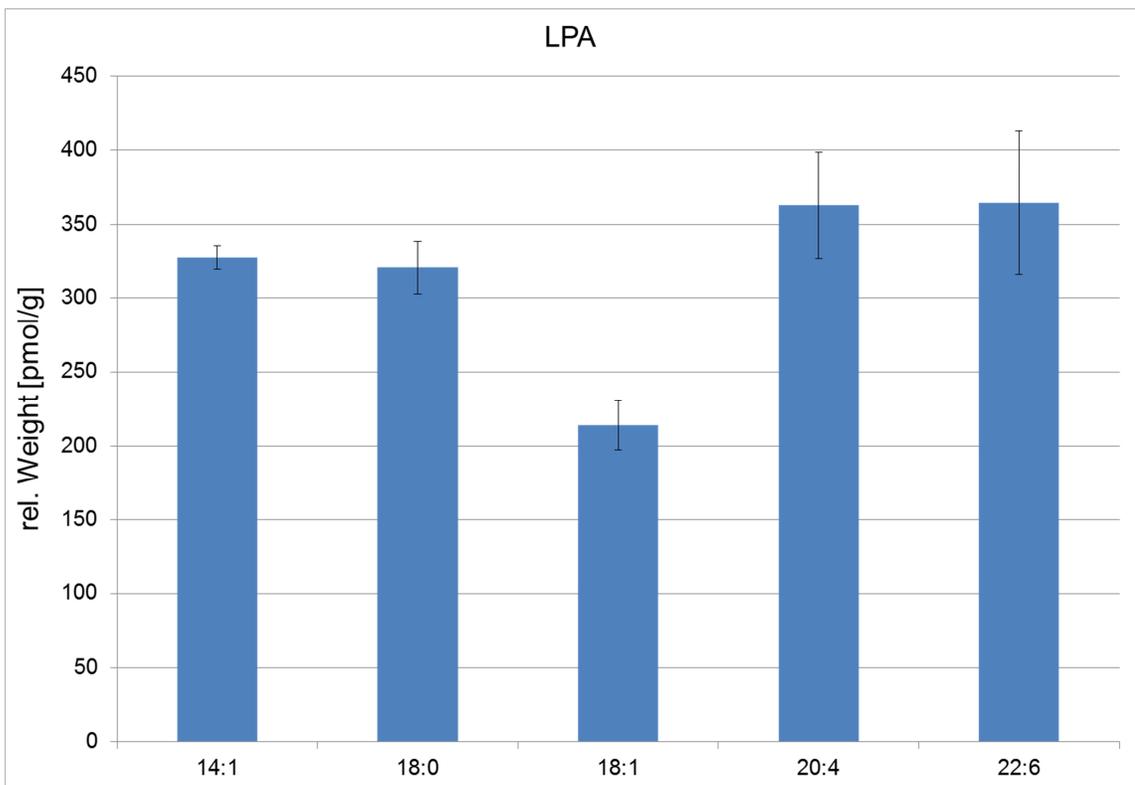


Abbildung 40: LPA-Konzentrationen in murinem Hirn (n=5, MW +/- StdAbw)

Im Hirnextrakt wurden PA-Konzentrationen von ca. 250 nmol/g gefunden (Tabelle 17, Abbildung 39). PA 42:2, PA 44:7, PA 46:7 und PA 48:10 wurden zwar durch den Auswertalgorithmus des Lipid Data Analyzer (Retentionszeit, Abweichung vom theoretischen m/z-Verhältnis unter 5 ppm) in der Probe gefunden; es könnte sich bei diesen Spezies jedoch um eine Fehlinterpretation handeln, da sich ihre Fettsäurezusammensetzung durch keine der in biologischen Systemen häufig vorkommenden Fettsäuren erklären lässt. Aufgrund der niedrigen Intensität ist kein Fragmentspektrum vorhanden, das zur Identifikation herangezogen werden könnte.

LPA wurde in einer Konzentration von ca. 1,5 nmol/g gemessen (Tabelle 17, Abbildung 40). Ähnlich wie bei PA wurde auch eine biologisch schwer zu erklärende LPA-Spezies gefunden. LPA 14:1 ist zwar durch die Retentionszeit und das exakte m/z-Verhältnis identifiziert (Abweichung 1,203 ppm), ist jedoch biologisch (auch aufgrund des Fehlens von LPA 14:0 und LPA 16:0) schwer erklärbar. Es könnte sich auch hierbei um ein falsch positives Ergebnis handeln, was aufgrund des fehlenden Fragmentspektrums weder ausgeschlossen noch bestätigt werden kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

HPLC-Methodenentwicklung ist eine je nach Aufgabenstellung manchmal leichte, manchmal schwere, oftmals frustrierende, jedoch immer mit vielen „Aha-Erlebnissen“ verbundene Aufgabe, bei der sich unzählige kleine Einflussfaktoren auf das Gesamtergebnis auswirken.

Es wurden sowohl eine RP-HPLC als auch eine HILIC-Methode entwickelt, um die Identifizierung und Quantifizierung von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure zu ermöglichen. Weiters wurde eine Extraktionsmethode untersucht, mit der die Ziel-Analyten (PA, LPA) extrahiert werden können, ohne irreführende Artefakte aus anderen Lipidklassen zu generieren. Zusammen mit der Detektion durch hochauflösende Massenspektrometrie ermöglicht dies die quantitative Bestimmung von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure aus einer biologischen Matrix.

Eine vollständige Methodenvalidierung (Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen) wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt, ist jedoch geplant. Die Anwendbarkeit der Methode auf Gewebeproben ist gegeben und wurde bereits durchgeführt.

Die Bestimmung von PA kann streng genommen nur auf hochauflösenden Massenspektrometern selektiv durchgeführt werden. Um größere Sicherheit in der Identifikation der Analyten zu gewinnen, könnten die DDA-Einstellungen verändert werden. Bei der Analyse der Hirnprobe zeigte sich ein Nachteil der verwendeten Top 10-Methode; von vielen als PA-Spezies identifizierten Verbindungen wurde kein Fragmentspektrum aufgenommen, da sie im Massenspektrum vom Untergrundsignal („Rauschen“) überlagert wurden. Anstatt der Top 10-Methode könnte eine Liste aller biologisch möglichen PA dazu herangezogen werden, dass nur von potentiellen PA-Spezies Fragmentspektren aufgenommen werden. Dadurch könnten falsch positive Resultate minimiert werden; der Nachteil dieser Herangehensweise ist, dass im Vorhinein angegeben werden muss, von welchen Verbindungen Fragmentspektren aufgenommen werden sollen.

LPA könnte mit der bestehenden HPLC-Methode auch unter Verwendung von SRM-Scans auf einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer analysiert werden. Der Vorteil bei Verwendung eines Triple-Quadrupol-Geräts bestünde in der höheren Sensitivität und der damit verbundenen niedrigeren Nachweisgrenzen für LPA. Andererseits könnte eine gewünschte Sensitivitätssteigerung in gewissem Ausmaß auch durch eine Kopplung von Orbitrap und Nano-Elektrospray (z.B. NanoMate) erreicht werden, wodurch die gemeinsame Analyse von PA und LPA möglich wäre.

Weiters könnte die Extraktion von LPA optimiert werden. Möglicherweise kann durch eine Extraktion mit nur einem relativ polaren Lösungsmittel, z.B. mit Methanol, die Extraktionseffizienz erhöht und Verluste während der Probenvorbereitung minimiert werden. Weiters könnte SPE (solid phase extraction, Festphasenextraktion) zur Probenvorbereitung verwendet werden. Im Optimalfall könnten so mehrere Fraktionen gewonnen werden, von denen eine nur PA enthält und die andere nur LPA, bzw. möglichst frei von supprimierenden Lipidklassen. Dies würde andere analytische Ansätze ermöglichen, beispielsweise Direct Infusion, bei dem die Probe (in diesem Fall das SPE-Eluat) ohne HPLC-Vortrennung mittels Massenspektrometer analysiert wird. Die Entwicklung derartiger Methoden (SPE, Direct Infusion) ist jedoch mit hohem Zeitaufwand verbunden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aaltonen, N; Laitinen, JT and Lehtonen, M: *Quantification of lysophosphatidic acids in rat brain tissue by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 878(15-16), pp.1145–52. 2010.
- Abidi, SL and Mounts, TL: *Separations of molecular species of phosphatidic acid by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 694(2), pp.365–373. 1995.
- Aoki, J; Taira, A; Takanezawa, Y; Kishi, Y; Hama, K; Kishimoto, T; Mizuno, K; Saku, K; Taguchi, R and Arai, H: *Serum Lysophosphatidic Acid Is Produced through Diverse Phospholipase Pathways*. The Journal of Biological Chemistry, 277(50), pp.48737–44. 2002.
- Asakawa, Y; Tokida, N; Ozawa, C; Ishiba, M; Tagaya, O and Asakawa, N: *Suppression effects of carbonate on the interaction between stainless steel and phosphate groups of phosphate compounds in high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1198-1199, pp.80–6. 2008.
- Ashcroft, AE: *An Introduction to Mass Spectrometry*. Available at: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm> [Accessed February 3, 2013].
- Athenstaedt, K and Daum, G: *Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism*. European Journal of Biochemistry, 266(1), pp.1–16. 1999.
- Baker, DL; Desiderio, DM; Miller, DD; Tolley, B and Tigyi, GJ: *Direct Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid Molecular Species by Stable Isotope Dilution Electrospray Ionization Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Analytical Biochemistry, 292(2), pp.287–95. 2001.
- Bathena, SP; Huang, J; Nunn, ME; Miyamoto, T; Parrish, LC; Lang, MS; McVaney, TP; Toews, ML; Cerutis, DR and Alnouti, Y: *Quantitative determination of lysophosphatidic acids (LPAs) in human saliva and gingival crevicular fluid (GCF) by LC-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56(2), pp.402–7. 2011.
- Bligh, E and Dyer, W: *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian Journal of Biochemical Physiology, 37(8), pp.911–7. 1959.
- Bollinger, JG; Ii, H; Sadilek, M and Gelb, MH: *Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Lipid Research, 51(2), pp.440–7. 2010.
- Buszewski, B and Noga, S: *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 402(1), pp.231–47. 2012.
- Christie, WW: *Preparation of lipid extracts from tissues*. Advances in Lipid Methodology, 2, pp.195–213. 1993.
- Dodbiba, E; Xu, C; Payagala, T; Wanigasekara, E; Moon, MH and Armstrong, DW: *Use of ion pairing reagents for sensitive detection and separation of phospholipids in the positive ion mode LC-ESI-MS*. The Analyst, 136(8), pp.1586–93. 2011.
- Ejsing, CS; Duchoslav, E; Sampaio, J; Simons, K; Bonner, R; Thiele, C; Ekroos, K and Shevchenko, A: *Automated Identification and Quantification of Glycerophospholipid Molecular Species by Multiple Precursor Ion Scanning*. Analytical Chemistry, 78(17), pp.6202–14. 2006.

- Ejsing, CS; Sampaio, JL; Surendranath, V; Duchoslav, E; Ekroos, K; Klemm, RW; Simons, K and Shevchenko, A: *Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(7), pp.2136–41. 2009.
- Fahy, E; Subramaniam, S; Brown, HA; Glass, CK; Merrill, AH; Murphy, RC; Raetz, CRH; Russell, DW; Seyama, Y; Shaw, W; Shimizu, T; Spener, F; Van Meer, G; VanNieuwenhze, MS; White, SH; Witztum, JL and Dennis, E a: *A comprehensive classification system for lipids*. Journal of Lipid Research, 46(5), pp.839–61. 2005.
- Falbe, J and Regitz, M: *Römpp Lexikon Chemie. Bd. 4*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1998.
- Fang, N; Yu, S and Badger, TM: *LC-MS/MS analysis of Lysophospholipids Associated with Soy Protein Isolate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(23), pp.6676–82. 2003.
- Fauland, A; Köfeler, H; Trötz Müller, M; Knopf, A; Hartler, J; Eberl, A; Chitraju, C; Lankmayr, E and Spener, F: *A comprehensive method for lipid profiling by liquid chromatography-ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Journal of Lipid Research, 52(12), pp.2314–22. 2011.
- Fenn, JB; Mann, M; Meng, CK; Wong, SF and Whitehouse, CM: *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*. Science, 246(6), pp.64–71. 1989.
- Folch, J; Lees, M and Sloane Stanley, GH: *A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues*. The Journal of Biological Chemistry, 226(1), pp.497–509. 1957.
- Goldsmith, ZG; Ha, JH; Jayaraman, M and Dhanasekaran, DN: *Lysophosphatidic Acid Stimulates the Proliferation of Ovarian Cancer Cells via the gep Proto-Oncogene Ga(12)*. Genes & Cancer, 2(5), pp.563–75. 2011.
- Herbert, CG and Johnstone, RAW: *Mass Spectrometry Basics*. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press LLC. 2003.
- Holčápek, M; Jirásko, R and Lísá, M: *Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques*. Journal of Chromatography A, 1259, pp.3–15. 2012.
- Holland, WL; Stauter, EC and Stith, BJ: *Quantification of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid by HPLC with evaporative light-scattering detection*. Journal of Lipid Research, 44(4), pp.854–8. 2003.
- Hu, Q; Noll, RJ; Li, H; Makarov, A; Hardman, M and Graham Cooks, R: *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry, 40(4), pp.430–43. 2005.
- Ishida, M; Imagawa, M; Shimizu, T and Taguchi, R: *Effective Extraction and Analysis for Lysophosphatidic Acids and Their Precursors in Human Plasma Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 53(4), pp.217–226. 2005.
- Knochenmuss, R: *Ion Formation Mechanisms in UV-MALDI*. The Analyst, 131, pp.966–986. 2006.
- Köfeler, HC; Fauland, A; Rechberger, GN and Trötz Müller, M: *Mass Spectrometry Based Lipidomics: An Overview of Technological Platforms*. Metabolites, 2(1), pp.19–38. 2012.
- Koivusalo, M; Haimi, P; Heikinheimo, L; Kostianen, R and Somerharju, P: *Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response*. Journal of Lipid Research, 42(4), pp.663–72. 2001.

- Kooijman, EE; Carter, KM; Van Laar, EG; Chupin, V; Burger, KNJ and De Kruijff, B: *What Makes the Bioactive Lipids Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid So Special?* *Biochemistry*, 44(51), pp.17007–15. 2005.
- De Laeter, JR; Böhlke, JK; De Bièvre, P; Hidaka, H; Peiser, HS; Rosman, KJR and Taylor, PDP: *Atomic Weight of the Elements: Review 2000*. *Pure and Applied Chemistry*, 75(6), pp.683–800. 2003.
- Liebisch, G and Scherer, M: *Quantification of bioactive sphingo- and glycerophospholipid species by electrospray ionization tandem mass spectrometry in blood*. *Journal of Chromatography B*, 883-884, pp.141–6. 2012.
- Lindsay, S: *Einführung in die HPLC*. Braunschweig/Wiesbaden: Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH. 1996.
- Loewen, CJR: *Lipids as conductors in the orchestra of life*. *F1000 Biology Reports*, 4(4). 2012.
- Löffler, G: *Basiswissen Biochemie* 6. Auflage. Springer Medizin Verlag. 2004.
- Lottspeich, F: *Bioanalytik* H. Zorbas, ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 1998.
- Makarov, A: *Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis*. *Analytical Chemistry*, 72(6), pp.1156–62. 2000.
- March, RE: *An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 32, pp.351–369. 1997.
- Marshall, AG and Hendrickson, CL: *Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 215(1-3), pp.59–75. 2002.
- Mawatari, S; Okuma, Y and Fujino, T: *Separation of intact plasmalogens and all other phospholipids by a single run of high-performance liquid chromatography*. *Analytical Biochemistry*, 370(1), pp.54–9. 2007.
- Meleh, M; Pozlep, B; Mlakar, A; Meden-Vrtovec, H and Zupancic-Kralj, L: *Determination of serum lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian cancer*. *Journal of Chromatography B*, 858(1-2), pp.287–91. 2007.
- Meyer, VR: *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern* 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006.
- Meyer, VR: *Practical high-performance liquid chromatography* 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd. 2010.
- Mills, GB and Moolenaar, WH: *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 3(8), pp.582–91. 2003.
- Myers, DS; Ivanova, PT; Milne, SB and Brown, HA: *Quantitative analysis of glycerophospholipids by LC-MS: Acquisition, data handling, and interpretation*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811(11), pp.748–57. 2011.
- Myint, KT; Uehara, T; Aoshima, K and Oda, Y: *Polar Anionic Metabolome Analysis by Nano-LC/MS with a Metal Chelating Agent*. *Analytical Chemistry*, 81(18), pp.7766–72. 2009.
- Nelson, D and Cox, MM: *Lehninger Biochemie* 4. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2009.
- Ogiso, H; Suzuki, T and Taguchi, R: *Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of*

- phosphatidic acid and phosphatidylserine*. *Analytical Biochemistry*, 375(1), pp.124–31. 2008.
- Perlman, DH; Huang, H; Dauly, C; Costello, CE and McComb, ME: *Coupling of protein HPLC to MALDI-TOF MS using an on-target device for fraction collection, concentration, digestion, desalting, and matrix/analyte cocrystallization*. *Analytical Chemistry*, 79(5), pp.2058–66. 2007.
- Prakash, C; Shaffer, CL and Nedderman, A: *Analytical Strategies for identifying drug metabolites*. *Mass Spectrometry Reviews*, 26, pp.340–369. 2007. Available at: <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>.
- Pulfer, M and Murphy, RC: *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(5), pp.332–64. 2003.
- Rezanka, T; Siristova, L; Matoulková, D and Sigler, K: *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography: ESI-MS/MS of Plasmalogen Phospholipids from Pectinatus Bacterium*. *Lipids*, 46(8), pp.765–80. 2011.
- Saulnier-Blache, JS; Girard, A; Simon, MF; Lafontan, M and Valet, P: *A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification*. *Journal of Lipid Research*, 41(12), pp.1947–51. 2000.
- Scherer, M; Schmitz, G and Liebisch, G: *High-Throughput Analysis of Sphingosine 1-Phosphate, Sphinganine 1-Phosphate, and Lysophosphatidic Acid in Plasma Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. *Clinical Chemistry*, 55(6), pp.1218–1222. 2009.
- Scherer, M; Schmitz, G and Liebisch, G: *Simultaneous Quantification of Cardiolipin, Bis(monoacylglycero)phosphate and their Precursors by Hydrophilic Interaction LC-MS/MS Including Correction of Isotopic Overlap*. *Analytical Chemistry*, 82(21), pp.8794–8799. 2010.
- Scigelova, M; Hornshaw, M; Giannakopoulos, A and Makarov, A: *Fourier Transform Mass Spectrometry*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(7). 2011.
- Shan, L; Jaffe, K; Li, S and Davis, L: *Quantitative determination of lysophosphatidic acid by LC/ESI/MS/MS employing a reversed phase HPLC column*. *Journal of Chromatography B*, 864(1-2), pp.22–8. 2008.
- Shan, L; Li, S; Jaffe, K and Davis, L: *Quantitative determination of cyclic phosphatidic acid in human serum by LC/ESI/MS/MS*. *Journal of Chromatography B*, 862(1-2), pp.161–7. 2008.
- Shin, JJH and Loewen, CJR: *Putting the pH into phosphatidic acid signaling*. *BMC Biology*, 85(December). 2011.
- Thermo Electron Corporation: *Accela Pump Hardware Manual*. 2006.
- Thermo Electron Corporation: *Finnigan TSQ Quantum Hardware Manual*. 2003.
- Thermo Fisher Scientific Inc.: *Accela Autosampler Hardware Manual*. 2007a.
- Thermo Fisher Scientific Inc.: *HESI II Probe User Guide*. 2008.
- Thermo Fisher Scientific Inc.: *Thermo Scientific LTQ FT Ultra Product Specifications*. 2007b.
- Thermo Fisher Scientific Inc.: *Thermo Scientific LTQ XL Ion Trap LC/MS Product Specifications*. 2010a.
- Thermo Fisher Scientific Inc.: *Thermo Scientific Orbitrap Elite Products Specifications*. 2011.

- Thermo Fisher Scientific Inc.: *TSQ Series Hardware Manual*. 2010b.
- Umezu-Goto, M; Kishi, Y; Taira, A; Hama, K; Dohmae, N; Takio, K; Yamori, T; Mills, GB; Inoue, K; Aoki, J and Arai, H: *Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production*. *The Journal of Cell Biology*, 158(2), pp.227–33. 2002.
- Voet, D; Voet, JG and Pratt, C: *Lehrbuch der Biochemie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2002.
- Wakamatsu, A; Morimoto, K; Shimizu, M and Kudoh, S: *A severe peak tailing of phosphate compounds caused by interaction with stainless steel used for liquid chromatography and electrospray mass spectrometry*. *Journal of Separation Science*, 28(14), pp.1823–30. 2005.
- Wang, X; Devaiah, SP; Zhang, W and Welti, R: *Signaling functions of phosphatidic acid*. *Progress in Lipid Research*, 45(3), pp.250–78. 2006.
- Wilm, M: *Principles of Electrospray Ionization*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(7), p.M111.009407. 2011.
- Xiao, Y; Chen, Y; Kennedy, AW; Belinson, J and Xu, Y: *Evaluation of Plasma Lysophospholipids for Diagnostic Significance Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) Analyses*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 905, pp.242–59. 2000.
- Zhao, Z and Xu, Yan: *An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples*. *Journal of Lipid Research*, 51(3), pp.652–659. 2010.
- Zhao, Z and Xu, Yan: *Measurement of endogenous lysophosphatidic acid by ESI-MS/MS in plasma samples requires pre-separation of lysophosphatidylcholine*. *Journal of Chromatography B*, 877(29), pp.3739–42. 2009.

8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Entwicklung einer HPLC-MS-Methode zur Bestimmung von Phosphatidsäure und Lysophosphatidsäure

Lipide haben in biologischen Systemen mehrere wichtige Aufgaben; sie dienen als Energiespeicher, sind Lipidvitamine und Botenstoffe und bilden Zellmembranen. Phosphatidsäure spielt dabei eine zentrale Rolle als Intermediat zwischen Membran- und Energiestoffwechsel, während Lysophosphatidsäure ein wichtiges Signalmolekül ist.

Sowohl Phosphatidsäure als auch Lysophosphatidsäure sind nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Ihre Analyse wird zusätzlich durch die endständige Phosphatgruppe erschwert, die zu Schwierigkeiten bei Extraktion, Chromatographie und selektiver massenspektrometrischer Detektion führt.

Für die Analyse dieser beiden Phospholipidklassen wurde eine Extraktionsmethode evaluiert, die eine Extraktion beider Klassen in ausreichendem Maße ermöglicht, ohne störende Artefakte zu generieren. Für die Analyse mittels HPLC-MS wurde sowohl eine HILIC-Methode als auch eine Reversed Phase Methode entwickelt. Mit der HILIC-Methode ist eine Auftrennung nach Lipidklassen möglich, was Ionensuppression durch dominierende Lipidklassen minimiert, während die Reversed Phase Methode eine quantitative Analyse mit bereits etablierten Auswertemethoden (Lipid Data Analyzer) ermöglicht.

Beide HPLC-MS-Methoden wurden auf Realproben angewandt. In murinem Hirn wurde dabei Phosphatidsäure in einem Konzentrationsbereich von 250 nmol/g und Lysophosphatidsäure in einem Konzentrationsbereich von 1,5 nmol/g gemessen.

Development of an HPLC-MS method for the analysis of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid

Lipids play several important roles in biological systems. They serve in energy storage, as signaling molecules and vitamins and they constitute cellular membranes. Phosphatidic acid plays a central role in membrane and energy metabolism while lysophosphatidic acid functions as a signaling molecule.

Both phosphatidic acid and lysophosphatidic acid are present only in low concentrations; their analysis is further impeded by the presence of a terminal phosphate group which leads to difficulties in extraction, chromatography and selective detection by mass spectrometry.

We evaluated an extraction method which allows for quantitative extraction of these phospholipid classes without artificially generating artefacts. We further developed two HPLC-MS analysis methods: A HILIC method allows for separation of lipid classes, thereby minimizing ion suppression effects of dominating lipid classes, while a reversed phase method enables us to quantitatively analyze samples using data processing methods already in existence (Lipid Data Analyzer).

Both HPLC-MS methods were applied to murine brain samples, in which phosphatidic acid was detected at levels of 250 nmol/g and lysophosphatidic acid at levels of 1.5 nmol/g.