

Probenvorbereitung mit der GERSTEL-MPS-DualHead-WorkStation

Automatisierte Flüssigfraktionierung mittels Festphasenextraktion (SPE) im Rahmen von Lipidomics-Studien

Metabolomische Studien zielen häufig auf die Analyse großer Probensätze, um eine statistische Differenzierung der Probenarten zu ermöglichen. Wichtig ist die Wiederholbarkeit des Arbeitsablaufs. Die Automatisierung der Probenvorbereitungsschritte hilft, analytische Schwankungen zu reduzieren. Teil 2 unserer Serie zur Metabolomics-Forschung wirft einen dezidierten Blick auf die Fraktionierung mittels SPE im Rahmen von Lipidomics-Studien.

Von Koen Sandra, Frank David, Christophe Devos, Bart Tienpont, Pat Sandra, Research Institute for Chromatography (RIC), 8500 Kortrijk, Belgien

Ein typischer metabolomischer Arbeitsablauf umfasst klassischerweise diverse Arbeitsschritte wie Extraktion, Fraktionierung oder Aufreinigung, Derivatisierung und Aufkonzentrierung der Analyten, insbesondere von Molekülen ($MG < 2000$) aus biologischen Matrices wie Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen, gefolgt von einer gas- oder flüssigchromatographischen (GC/LC) Trennung und massenspektrometrischen Detektion (MS) der Analyten.

Stichwort „Lipidomics“

Die Lipidomics beschäftigt sich mit der Erforschung aller in einer Zelle oder einem Organismus vorkommenden ganz oder zumindest größtenteils wasserunlöslichen (hydrophoben) Naturstoffe, namentlich den Lipiden; sie sind wesentlicher Bestandteil der Zellmembran. Vergleichbar der Proteomics-Forschung, die den Fokus auf die Gesamtheit aller Proteine eines Organismus richtet, nutzt die Lipidomics instrumentalanalytische Verfahren, um die Gesamtheit der Lipide in einem Organismus zu erfassen und ihre Funktionen zu bestimmen. Als besonders geeignet erweisen sich in diesem Kontext massenspektrometrische Verfahren. Ziel der Lipidomics-Forschung ist es, u. a. zu verstehen, welche Rolle Lipide im Zusammenhang mit Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas, Arteriosklerose, Schlaganfall, Hypertonie oder Diabetes spielen [5, 6].

Relativ große Probensätze sind zu verarbeiten, um Probenarten differenzieren zu können; von größter Wichtigkeit ist es, die analytische Schwankungsbreite geringer zu halten, als es die biologische Variabilität von Natur aus ist. Die Automatisierung der Probenvorbereitung kann helfen, die Wiederholbarkeit des analytischen Verfahrens zu verbessern.

In unserem ersten Beitrag [1] diskutierten wir die automatisierte ultraschallgestützte Flüssigextraktion und Filtration unter Verwendung der GERSTEL-

In der von uns betrachteten Studie ging es um die Charakterisierung von Pflanzenmaterial beziehungsweise um die Bestimmung der darin enthaltenen Lipidklassen einschließlich neutraler Lipide (NL) [Triglyzeride, Sterole], freier Fettsäuren (FF) und polarer Lipide (PL). Ebenso von Interesse war das zugrunde liegende Mengenverhältnis. Genannte Verbindungsklassen liegen im Pflanzenmaterial in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor. Wie sich in vorangegangenen Untersuchungen zeigte, wirkt sich eine Fraktionierung und selektive Anreicherung der verschiedenen Lipide im Vorfeld der LC/MS-Analyse positiv auf die Bestimmung aus [2].

Zunächst wurde auf Basis der sogenannten Folch-Methode [3] mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) eine konzentrierte Lipidfraktion gewonnen. Diesem Schritt schloss sich eine Festphasenextraktion (SPE) unter Einsatz einer Aminopropyl-Kartusche (NH_2) an, in deren Zuge wir drei Fraktionen unterschiedlich polarer Lipide erhielten. Die gesammelten Extrakte wurden automatisch eingengt, aufkonzentriert und mittels LC-QTOF analysiert.

Ein Blick auf die technischen Details

Sämtliche der oben in Kürze beschriebenen Probenvorbereitungsschritte wurden auf der GERSTEL-MPS-WorkStation computergestützt und vollständig automatisiert ausgeführt. Um zeitliche Verzögerungen durch einen eventuell notwendigen Austausch von Werkzeugen zu vermeiden und die Arbeit auch vom Laborpersonal unbeobachtet erledigen zu können, verfügt die MPS-WorkStation über zwei in alle drei Raumrichtungen bewegliche Arme, die mit im vor-

MPS-WorkStation. In dem hier vorliegenden zweiten Beitrag werfen wir einen Blick auf ein automatisiertes SPE-basiertes Fraktionierungsverfahren, das im Rahmen einer Lipidomics-Studie (siehe Infokasten) zur Anwendung kam.

Die GERSTEL-MPS-DualHead-WorkStation, konfiguriert für die automatisierte Festphasenextraktion (SPE) und Aufkonzentrierung von Probenextrakten. Der linke Arm war mit einer 500- μ L-Spritze ausgestattet, der rechte Arm mit einer 2,5-mL-Spritze. Die Probenhalter erlaubten die Aufnahme sowohl von 10-mL-Vials als auch von SPE-Kartuschen; für jede Probe wurde eine neue Kartusche verwendet. Eine Waschstation diente der Reinigung der Spritzen, die SPE-Einheit der automatisierten Festphasenextraktion, die m VAP-Station der Reduzierung der Extrakte unter Vakuum, einschließlich Wiederaufnahme der bis zur Trockene eingedampften Rückstände. Die Solvent-Filling-Station diente der Bevorratung mit den für die Fraktionierung der einzelnen Lipidklassen und Waschschriffe verwendeten Lösemitteln.



© RIC

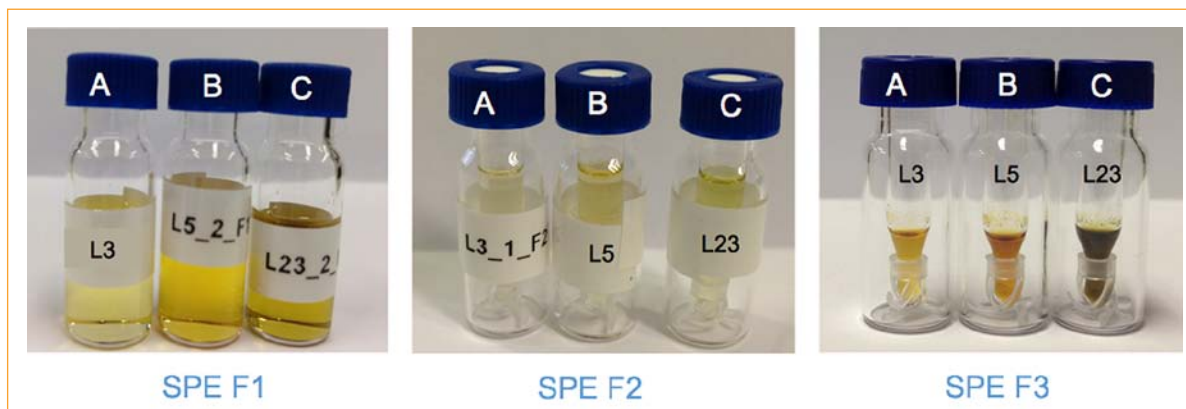
liegenden Fall unterschiedlich dimensionierten Spritzen zwecks Handhabung divergenter Flüssigkeiten und Volumina ausgestattet waren. Diese Ausstattung, sprich zwei Türme/Arme, die einen zwischenzeitlichen Werkzeugwechsel erübrigen, verbunden mit einigen technisch relevanten Features, erweist sich als nützlich für eine zeitlich effiziente, produktive Analytik. Die MPS-WorkStation verfügt unter anderem über die GERSTEL-MultiPosition-Evaporation-Station (m VAP), um Extrakte automatisiert unter Vakuum bis zur Trockene einengen und somit nach Wiederaufnahme in einem kleineren, der Chromatographie angepassten Lösemittelvolumen aufkonzentrieren zu können.

Bei der Extraktion der Lipide gingen wir wie folgt vor: Ein Gramm Pflanzenmaterial wurde mit 6 mL einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1 [v/v]) versetzt und extrahiert. Zur Lösung wurden 4 mL Wasser dosiert. 1,5 mL der Chloroform-Phase wurden entnommen, gefiltert und in ein Vial überführt. Anschließend erfolgte die Verdampfung des Lösemittels in der m VAP-

Essigsäure in Diethylether, verwendet; die Extraktion der polaren Lipide (PL) erfolgte mit 3 mL Methanol. Allein die SPE-Schritte zur Fraktionierung der verschiedenen Lipidfraktionen würden, manuell ausgeführt, sehr viel Zeit in Anspruch nehmen. Die Automatisierung erweist sich hier als Schlüssel zur Steigerung der Produktivität, erlaubt sie doch die Abwicklung unbeobachtet vom Labpersonal auch in der Nacht oder am Wochenende.

Die drei Fraktionen wurden in 10-mL-Vials gesammelt und in der m VAP-Station bis zur Trockene eingedampft. Die Aufnahme des Rückstands und die anschließende LC/MS-Analyse erfolgten in einer Lösung aus Chloroform und Isopropanol. Die Lösemittelmengen wurden gemäß der Konzentration der Lipide in den Extrakten optimiert [2].

Für die Analyse der Extrakte verwendet wurde ein Agilent-1290-UHPLC-System, das mit einem 6540-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (QTOF) verbunden war. Die LC-Trennung der Analyten erfolgte auf einer C18-Reversed-Phase-Säule mit 20 mM



© RIC

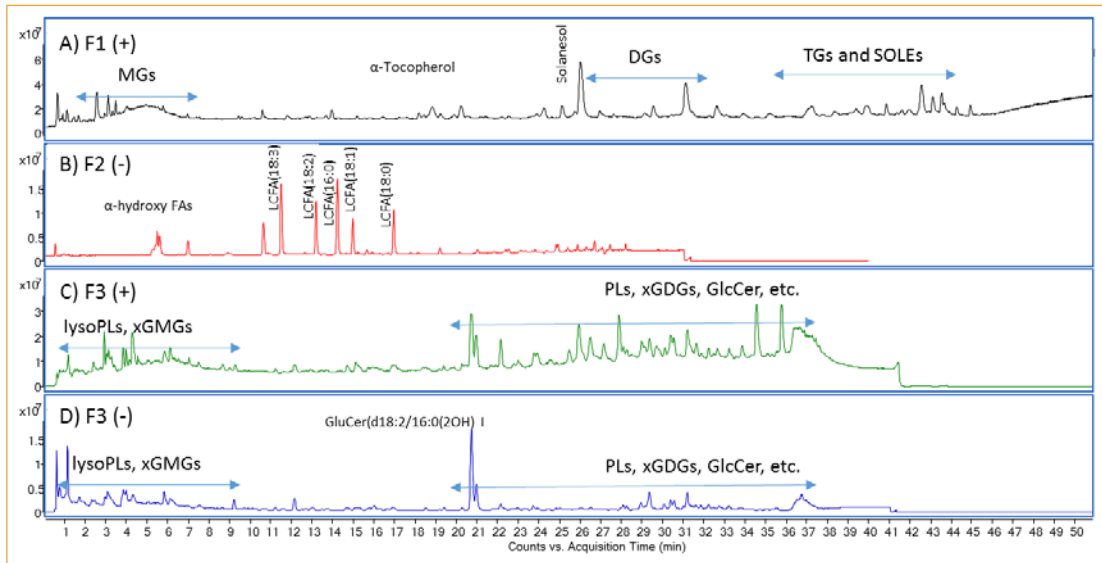
Rekonstituierte Pflanzenextrakte nach SPE-Fraktionierung und m VAP-Konzentrierung (A, B und C entsprechen den drei Arten von Pflanzen). (F1: neutrale Lipide, F2: freie Fettsäuren, F3: polare Lipide.)

Station. Die Extrakte wurden in 300 μ L Chloroform aufgenommen und einer SPE über eine NH_2 -Phase unterzogen, um die darin enthaltenen Lipidklassen vor ihrer LC/MS-Bestimmung zu fraktionieren.

Wir verwendeten 3 mL einer Lösung aus Chloroform und Isopropanol (2:1 [v/v]), um die neutralen Lipide (NL) von der NH_2 -Phase zu eluieren. Für die Fraktionierung der freien Fettsäuren (FF) wurden jeweils 4 mL einer Lösung, bestehend aus einer zweiprozentigen

Ammoniumformiat in Wasser und Methanol als mobiler Phase [4]. Insgesamt wurde mit vier verschiedenen LC/MS-Methoden gearbeitet, die sich im Wesentlichen in leicht divergenten Lösemittelgradienten und MS-Bedingungen unterschieden: Die Analyten aus Fraktion 1 (F1) wurden mittels positiver Elektrospray-Ionisierung (ESI POS) bestimmt, Fraktion 2 (F2) wurde analysiert im negativen ESI-Modus (ESI NEG) und Fraktion 3 (F3) in beiden Modi (ESI POS und ESI NEG).

Total-Ionenchromatogramme der LC-QTOF-Bestimmung der verschiedenen SPE-Fractionen. Gemessen wurde Fraktion 1 (F1; neutrale Lipide) im ESI-POS-Modus (A), Fraktion 2 (F2; freie Fettsäuren) im ESI-NEG-Modus (B), Fraktion 3 (F3; polare Lipide) im ESI-POS-Modus (C) und im ESI-NEG-Modus (D).



Erfolgreicher Einsatz der Automatisierung

Für eine Lipidomics-Studie an Pflanzen wurden insgesamt 84 Proben mit der oben beschriebenen automatisierten Methode analysiert. Der Probenbestand setzte sich zusammen aus 22 individuellen Pflanzenproben, die sich drei Hauptarten zuordnen ließen und die jeweils dreifach aufbereitet und analysiert wurden. Zusätzlich wurden 18 Qualitätskontrollproben (QC) analysiert, um die Wiederholbarkeit der Probenvorbereitung sowie das LC/MS-Protokoll zu bewerten. Detektiert wurden, wie in der Abbildung oben zu sehen ist, in Spur A Monoglyceride (MGs), Diglyceride (DGs), Triglyceride (TGs) und Pflanzensterole. Spur B zeigt die Analyse der in Fraktion 2 vorhandenen langkettigen freien Fettsäuren (LCFAs) im ESI-NEG-Modus. Die Spuren C und D spiegeln die Detektion von Phospholipiden (PLs), Sphingolipiden und anderen polaren Lipiden im ESI-POS- beziehungsweise ESI-NEG-Modus wider.

Zur AppNote „Automated Sample Preparation for Metabolomics Studies Using the Gerstel MPS Dual Head WorkStation, Part 2: Automated Lipid Fractionation Using Solid Phase Extraction“ (App-Note-2015-01)



Präzision der Lipidomics-Methode einschließlich der Schritte der automatisierten Probenvorbereitung.

Fraktion	Lipid	Masse [Da]	t _r [min]	RSD-Fläche [%]
F1 (+)	MG (18:3)	369,2879	6,389	9,6
	Solanesol	647,6005	29,097	8,6
	LANE (18:3)	703,6267	38,749	5,5
	SOLE (18:3)	907,8145	44,918	7,7
F2 (-)	LCFA-OH (18:3)	294,2210	7,540	11,7
	LCFA (18:3)	278,2259	14,497	5,4
	LCFA (16:0)	256,2414	17,245	6,2
F3 (+)	MGMG (18:3)	531,3407	8,137	22,1
	LysoPC (18:1)	521,3481	9,783	21,6
	GlcCer (d18:2/16:0)	697,5493	25,470	23,4
	PC (36:2)	785,5935	30,794	18,7
	MGDG (36:0)	803,6486	34,540	8,2
F3 (-)	MGMG(18:3)	560,3197	8,186	10,1
	LysoPC(18:1)	567,3550	9,868	19,4
	GlcCer(d18:2/16:0)	713,5471	24,494	15,2
	PC(36:2)	831,5980	30,745	10,3
	MGDG(36:0)	832,6212	32,410	5,8

Um die Genauigkeit der Messung bewerten zu können, wurden an einer Auswahl identifizierter Verbindungen die Standardabweichungen der Flächen in Prozent (RSD [%]) berechnet. Für Lipidomics-Studien liegt der Testwert (Cut-off-Wert) für die Flächen-RSD-Werte in der Regel bei 30 Prozent [5]. Bemerkenswert ist, dass bei den von uns untersuchten 18 QC-Proben die relative Standardabweichung für alle Analyten kleiner als 25 Prozent und für die Hälfte der Analyten sogar kleiner als zwölf Prozent war.

Eine Bemerkung zum Schluss

Wie unsere Untersuchung ergab, erweist sich die GERSTEL-MPS-WorkStation mit zwei Armen (DualHead-Version) als besonders gut geeignet für die Automatisierung der Probenbereitung im Rahmen von Metabolomics-Studien wie der hier beschriebenen Bestimmung von Lipidklassen in Pflanzenmaterial. Eine Methode für die Fraktionierung von Lipiden auf SPE-Basis wurde mit einer zweckbestimmten Konfiguration vollständig automatisiert, einschließlich der Aufkonzentrierung von SPE-Fractionen mittels Lösemittelverdampfung. Die LC/QTOF-Analysen der Fractionen ergaben eine ausgezeichnete Wiederholbarkeit der Bestimmungen.

In der dritten und letzten Folge zur Metabolomics-Analytik in der kommenden Ausgabe 51 der „GERSTEL Aktuell“ berichten K. Sandra *et al.* über die Automatisierung eines Derivatisierungsprotokolls im Rahmen von Metabolomics-Studien unter Einsatz des MPS-WorkStation-GC-QTOF-Systems.

Quellen

- [1] K. Sandra, M. Dunkle, C. Devos, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, GERSTEL Aktuell 49 (2015) 18-19
- [2] M. N. Dunkle, Y. Yoshimura, R. Kindt, A. Ortiz, E. Masugi, K. Mitsui, F. David, P. Sandra, and K. Sandra, in preparation
- [3] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem. 226 (1957) 497-509
- [4] K. Sandra, A. D. S. Pereira, G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, J. Chromatography A, 1217 (2010) 4087-4099
- [5] Wikipedia [https://de.wikipedia.org/wiki/Lipide#Lipidomik] (16.11.2015)
- [6] Max-Planck-Institut [www.mpg.de/6959315/ncbs_bangalore] (16.11.2015)