

# Analytische Herausforderungen und deren Lösungen bei der quantitativen Analyse von Phospholipiden und Ceramiden

Diane Schmiederer

8. LC/MS-Diskussionstreffen

Wuppertal, 20. April 2010

# Background



Innsbrucker Nordkette



Bergisel-Schanze

## Metabolomics company in Innsbruck, Austria

Hauptfokus: Biomarker Discovery

Strategie: Targeted Metabolomics (↔ Non-Targeted/Profiling)



Goldenes Dachl



Patscherkofel

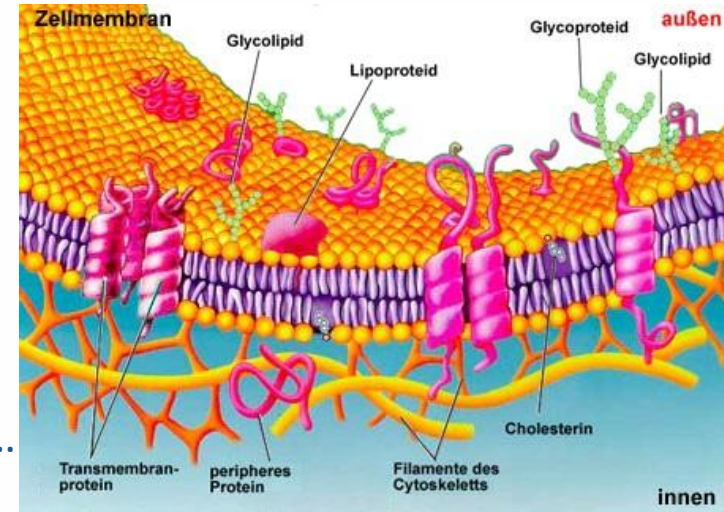
# Wieso Lipidomics?

## Interessante biologische Funktionen:

- Energiespeicherung
- Aufbau von Zellmembranen
- Signalmoleküle für Zellwachstum, Apoptose, Entzündung ...
- Hormone, Vitamine
- ...



Adipozyt (Fettzelle)



Aufbau einer Zellmembran

-> mit **Lipidstoffwechsel assoziierte Krankheitsbilder**: Diabetes, Schlaganfall, Krebs, Arthritis,

Alzheimer

-> **Lipid-Biomarker!!??**

# Methodenentwicklung Targeted Lipidomics

## **Analytische Zielvorgaben:**

- hochdurchsatzfähige Methode
- wenig Probenvolumen verwenden (ca. 20µl)
- möglichst viele Analyten gleichzeitig erfassen
- valide quantitative Ergebnisse (MRM)

## **Analytische Herausforderungen:**

- Strukturvielfalt der Lipide
- Verfügbarkeit von externen und internen Standards ist limitiert
- endogene Konzentrationen sehr unterschiedlich
- Verschleppung/FIA-Troubleshooting

# Methodenentwicklung Targeted Lipidomics

## Analytische Zielvorgaben:

- hochdurchsatzfähige Methode
- wenig Probenvolumen verwenden (ca. 20µl)
- möglichst viele Analyten gleichzeitig erfassen
- valide quantitative Ergebnisse (MRM)

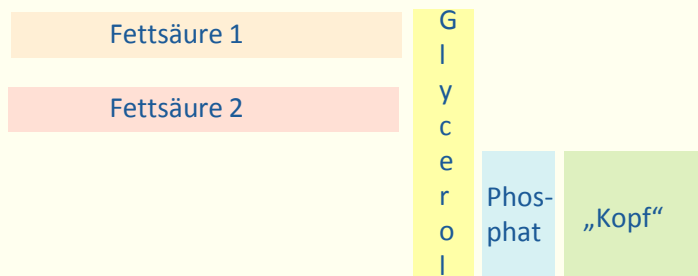
## Analytische Herausforderungen:

- **Strukturvielfalt der Lipide**
- Verfügbarkeit von externen und internen Standards ist limitiert
- endogene Konzentrationen sehr unterschiedlich
- Verschleppung/FIA-Troubleshooting

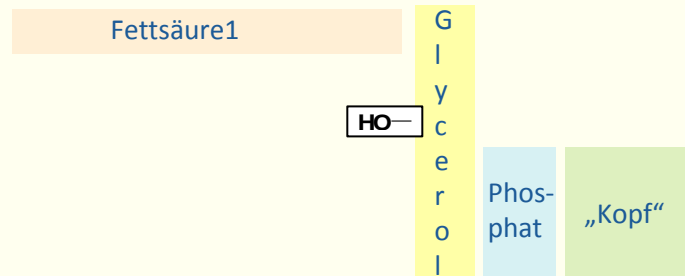
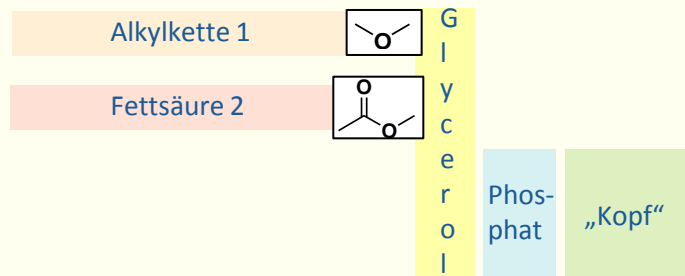
# Strukturvielfalt der Lipide

(Glycerophospholipide (PC, PE, PS, PG), Sphingomyeline und Ceramide)

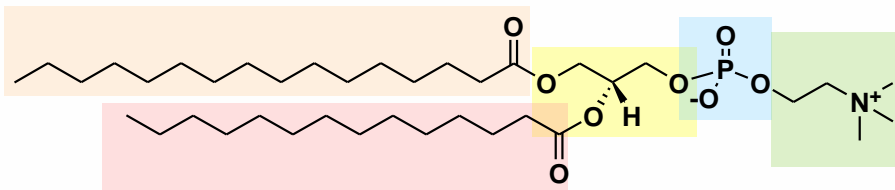
## Allg. Struktur der Glycerophospholipide („aa“):



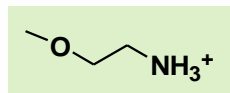
## Spez. Strukturen der Glycerophospholipide („ae“, „lyso“):



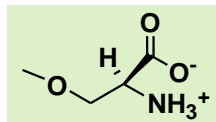
### Phosphatidylcholine (PC)



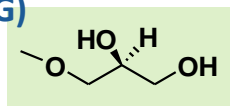
### Phosphatidylethanolamine (PE)



### Phosphatidylserine (PS)



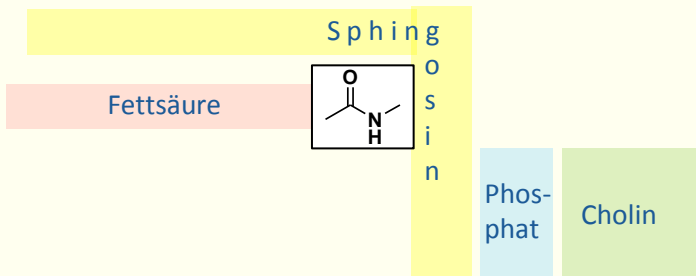
### Phosphatidylglycerole (PG)



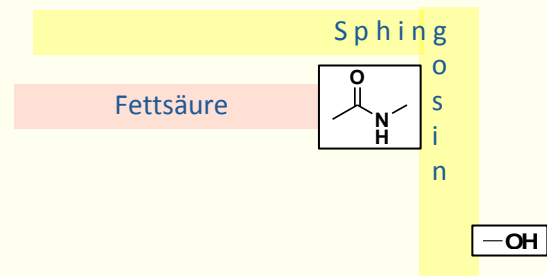
# Strukturvielfalt der Lipide

(Glycerophospholipide (PC, PE, PS, PG), **Spingomyeline und Ceramide**)

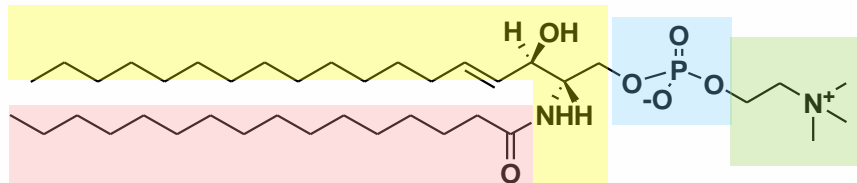
## Allg. Struktur der Spingomyeline:



## Allg. Struktur der Ceramide:

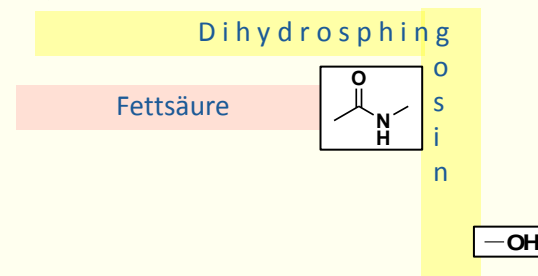


## Bsp.: SM C16:0

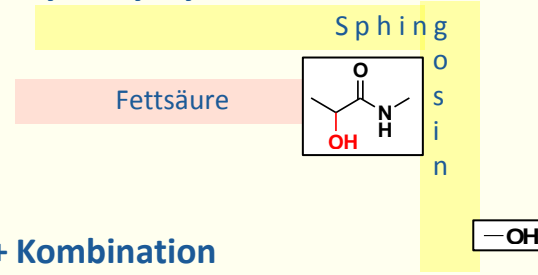


## Spezielle Strukturen der Ceramide:

### Dihydroceramide



### 2-Hydroxyacylceramide

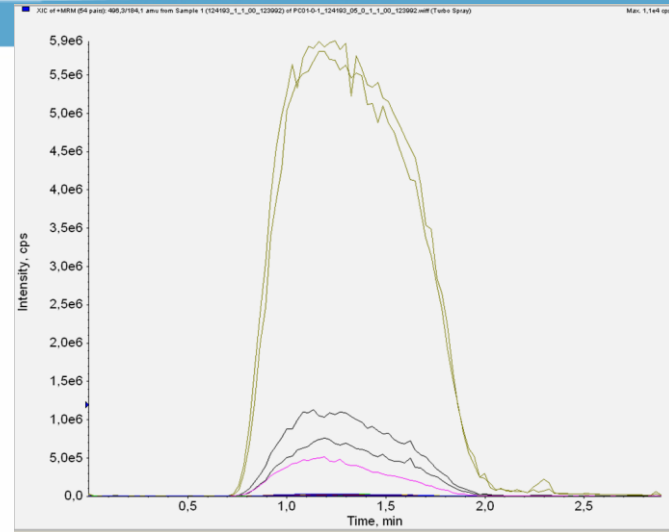


+ Kombination

# Strukturvielfalt der Lipide

- vollständige chromatographische Trennung in hochdurchsatzfähiger Zeit ist unmöglich

**=> Fließinjektionsanalyse (FIA)**



- verschiedene Lipide mit gleicher Summenformel (Isobare) oder gleicher Nominalmasse

**=> MRMs sind „nur“ Summensignale**

- Molekulargewichte der Lipide liegen nah beieinander -> falsch pos. Ergebnisse durch natürlich vorkommende Isotopen

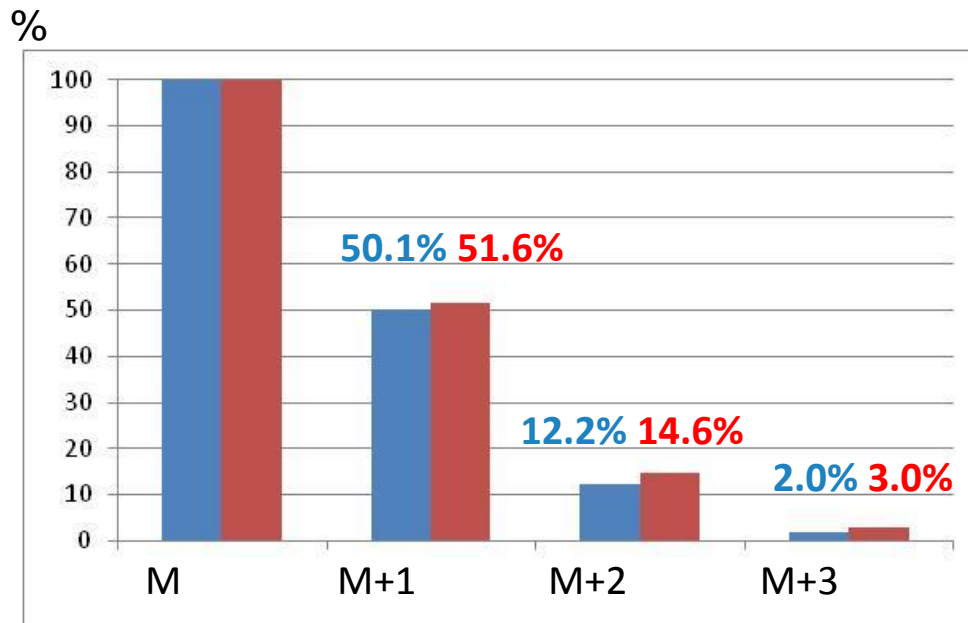
**=> Isotopenkorrektur nötig**

# Strukturvielfalt der Lipide

## Isotopenkorrektur

Isotope in Lipiden:  $^1\text{H}$  - 99.985%       $^2\text{H}$  - 0.015%  
 $^{12}\text{C}$  - 98.893%       $^{13}\text{C}$  - 1.107%  
 $^{14}\text{N}$  - 99.634%       $^{15}\text{N}$  - 0.366%  
 $^{16}\text{O}$  - 99.759%       $^{17}\text{O}$  - 0.037%       $^{18}\text{O}$  - 0.204%  
 $^{31}\text{P}$  - 100%

Bsp.:  $\text{C}_{45}\text{H}_{81}\text{NO}_8\text{P}$



Nur  $^{13}\text{C}$  berücksichtigt  
alle Isotope berücksichtigt

# Strukturvielfalt der Lipide

## Isotopenkorrektur

This table displays a large number of rows of data, representing measurements of various lipids. The data is presented in a grid format with multiple columns and rows, showing a wide range of values. The table is oriented vertically on the slide.

Realprobenmessungen

ohne Isotopenkorrektur  
mit Isotopenkorrektur



This table displays a large number of rows of data, representing measurements of various lipids. The data is presented in a grid format with multiple columns and rows, showing a wide range of values. The table is oriented vertically on the slide.

# Strukturvielfalt der Lipide

## Isotopenkorrektur

Sample T <sub>1</sub>	PC ae 38:1 neg	PC aa 38:6 neg	SM 24:4 neg	PC aa 38:5 neg	SM 24:3 neg	P
	860,7	864,6	865,7	866,6	867,7	
	786,7	790,6	791,7	792,6	793,7	
QC Level	80,9	504	246	612	339	
Sample	6,94	294	143	196	87,5	
Sample	1,81	535	261	292	125	
Sample	2,8	595	287	297	131	
Sample	2,91	569	277	270	119	
Sample	4,34	556	257	273	109	
Sample	16,2	2219	1053	987	429	
Sample	6,39	2061	1001	625	240	
Sample	10,8	2993	1415	873	320	
Sample	11,1	2189	1051	927	387	
Sample	9,02	2789	1317	784	284	
Sample	11,2	3158	1525	1416	601	
Sample	9,8	1611	773	1105	499	
Sample	7,76	362	177	234	108	
Sample	6,4	1848	870	560	223	
Sample	2,37	545	258	284	129	
Sample	10,6	3762	1770	1443	615	
QC Level	94,1	577	273	684	377	

Realprobenmessungen

← ohne Isotopenkorrektur  
mit Isotopenkorrektur

Sample T <sub>1</sub>	PC ae 38:1 neg	PC aa 38:6 neg	SM 24:4 neg	PC aa 38:5 neg	SM 24:3 neg
	860,7	864,6	865,7	866,6	867,7
	786,7	790,6	791,7	792,6	793,7
QC Level	1,92	504		537	43,2
Sample	1,14	294		152	
Sample	1,17	535		212	
Sample	2,06	595		208	4,15
Sample	2,39	569		185	4,54
Sample	3,56	556		190	
Sample	3,37	2219		655	18,6
Sample	2,73	2061		317	11,5
Sample	3,6	2993		425	5,4
Sample	2,66	2189		599	6,76
Sample	3,24	2789		367	6,46
Sample	4,76	3158		943	11,2
Sample	3,7	1611		864	
Sample	2,27	362		180	3,14
Sample	2,39	1848		284	17,6
Sample	1,91	545		203	5,94
Sample	6,38	3762		880	39,6
QC Level	4,35	577		597	47

# Methodenentwicklung Targeted Lipidomics

## Analytische Zielvorgaben:

- hochdurchsatzfähige Methode
- wenig Probenvolumen verwenden (ca. 20µl)
- möglichst viele Analyten gleichzeitig erfassen
- valide quantitative Ergebnisse (MRM)

## Analytische Herausforderungen:

- Strukturvielfalt der Lipide
- **Verfügbarkeit von externen und internen Standards ist limitiert**
- endogene Konzentrationen sehr unterschiedlich
- Verschleppung/FIA-Troubleshooting

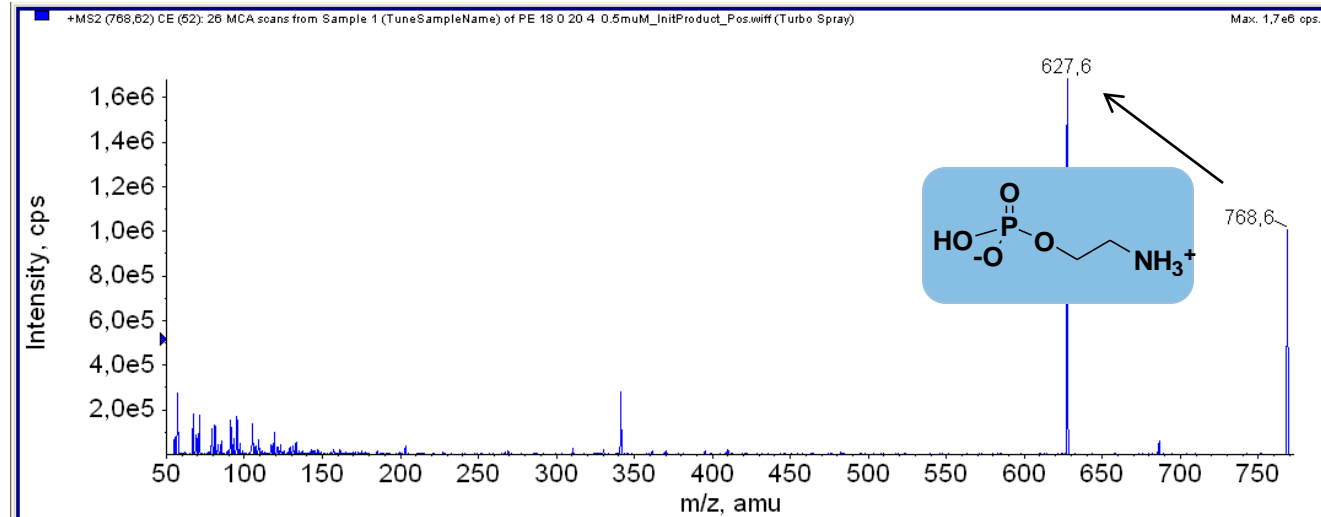
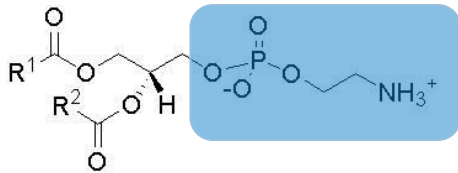
# Verfügbarkeit von ES und IS ist limitiert

## MRM Optimierung

### 1) Klassentypisches Fragmentierverhalten evaluieren

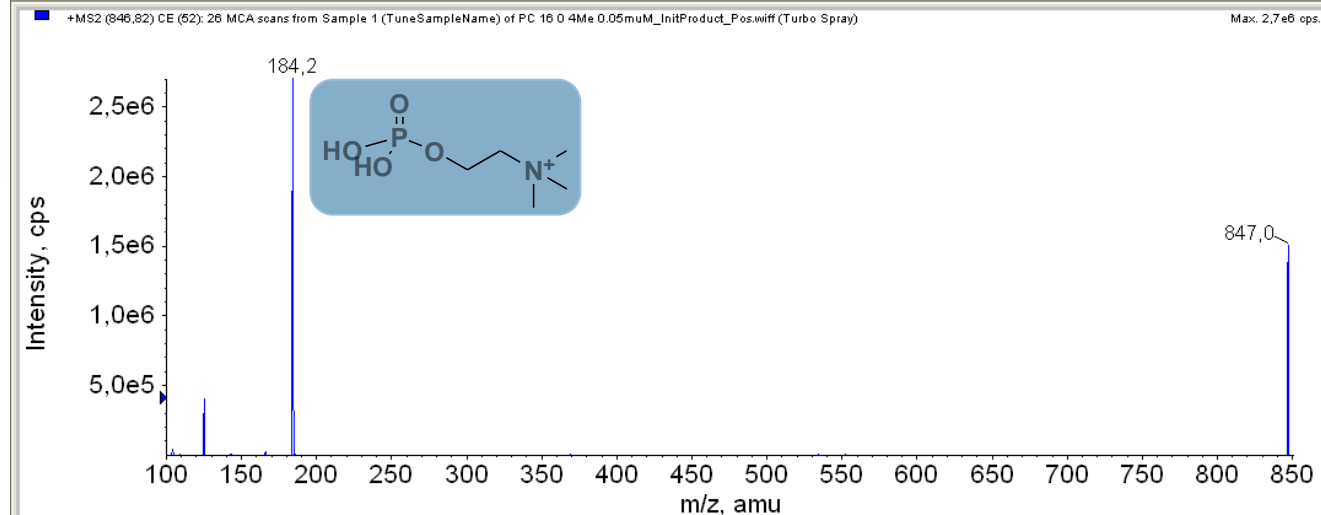
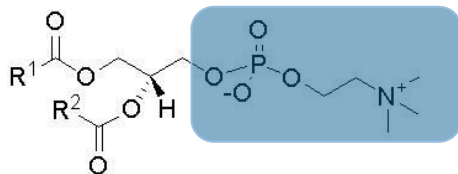
#### Phosphatidylethanolamine (PE):

+NL141



#### Phosphatidylcholine (PC):

+ Prec 184



# Verfügbarkeit von ES und IS ist limitiert

## MRM Optimierung

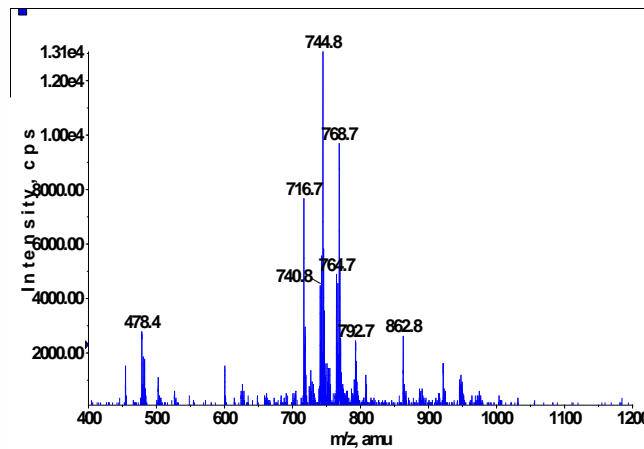
### 2) Analyse versch. Proben mit Scanmethoden -> MRMs ableiten

außerdem:  
Leber  
Niere  
Darm  
Muskelgewebe  
Fettgewebe  
Lunge

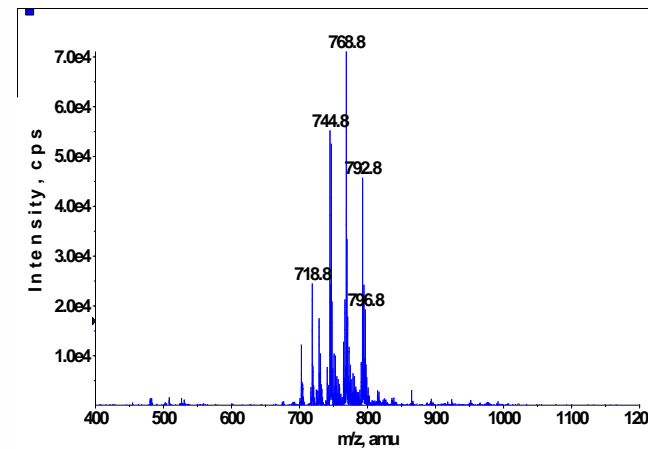
Phosphatidyl-  
ethanolamine (PE):

+NL141

Plasma

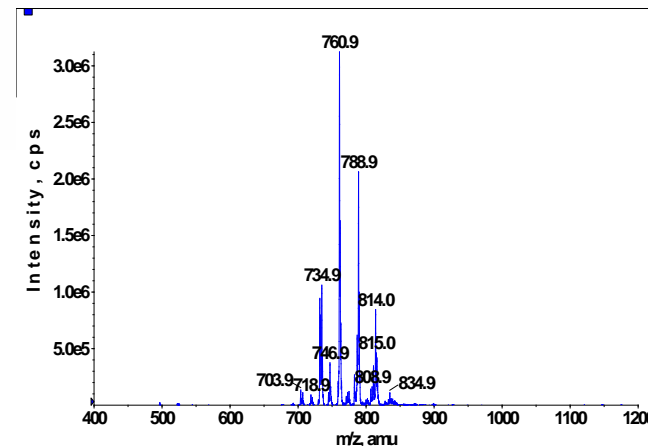
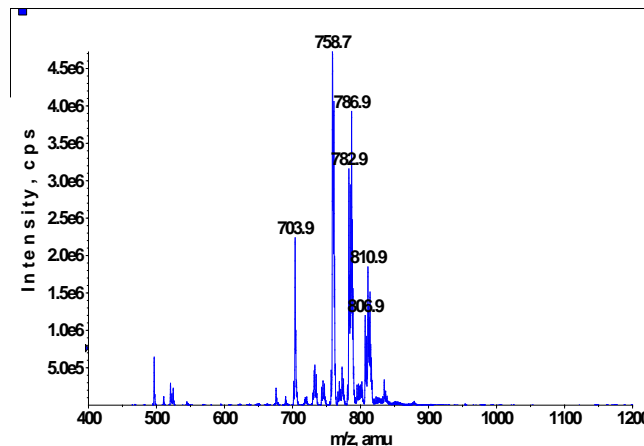


Gehirnhomogenat

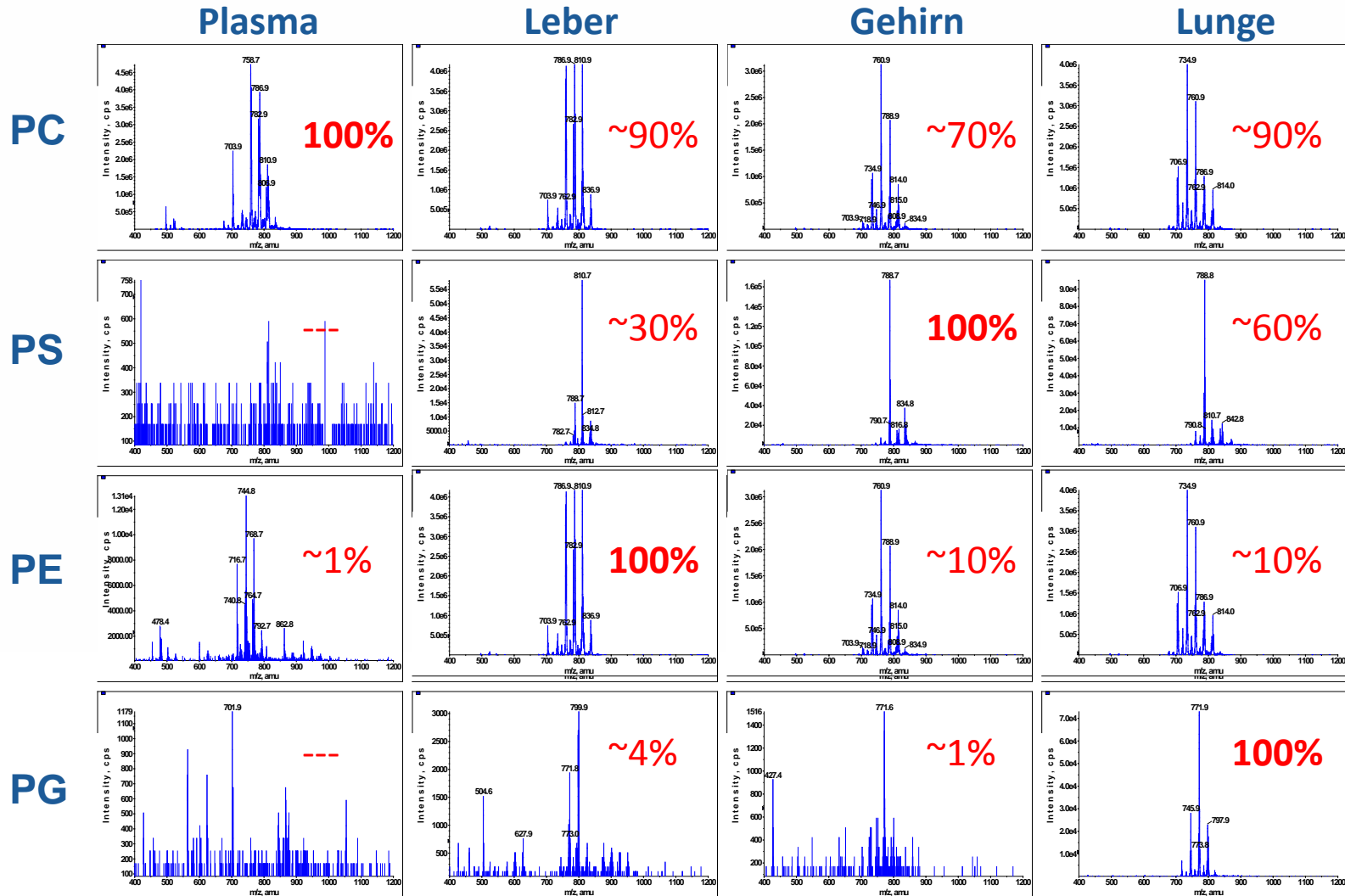


Phosphatidyl-  
choline (PC):

+ Prec 184



# Exkurs: Lipidverteilung in versch. biolog. Proben



# Verfügbarkeit von ES und IS ist limitiert

## Übersicht

Lipidklasse	Anzahl der MRMs	Anzahl der ES	Anzahl der IS
Phosphatidylserine (PS):	27	3	1
Phosphatidylglycerole (PG):	19	5	1
Phosphatidylethanolamine (PE):	63	4	
Phosphatidylcholine (PC):	53	8	1
Sphingomyeline (SM):	33	1	
Ceramide	44	13	1
Dihydroceramide	44	6	
2-Hydroxyacylceramide	22	2	1
2-Hydroxyacyl-dihydroceramide	21	1	
Summe	326	43	

# Methodenentwicklung Targeted Lipidomics

## Analytische Zielvorgaben:

- hochdurchsatzfähige Methode
- wenig Probenvolumen verwenden (ca. 20µl)
- möglichst viele Analyten gleichzeitig erfassen
- valide quantitative Ergebnisse (MRM)

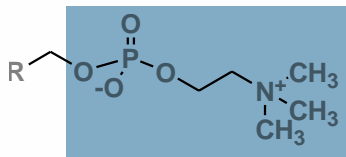
## Analytische Herausforderungen:

- Strukturvielfalt der Lipide
- Verfügbarkeit von externen und internen Standards ist limitiert
- **endogene Konzentrationen sehr unterschiedlich**
- Verschleppung/FIA-Troubleshooting

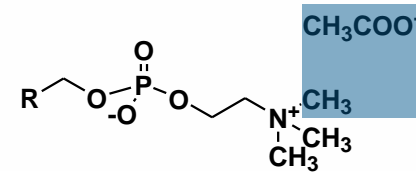
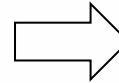
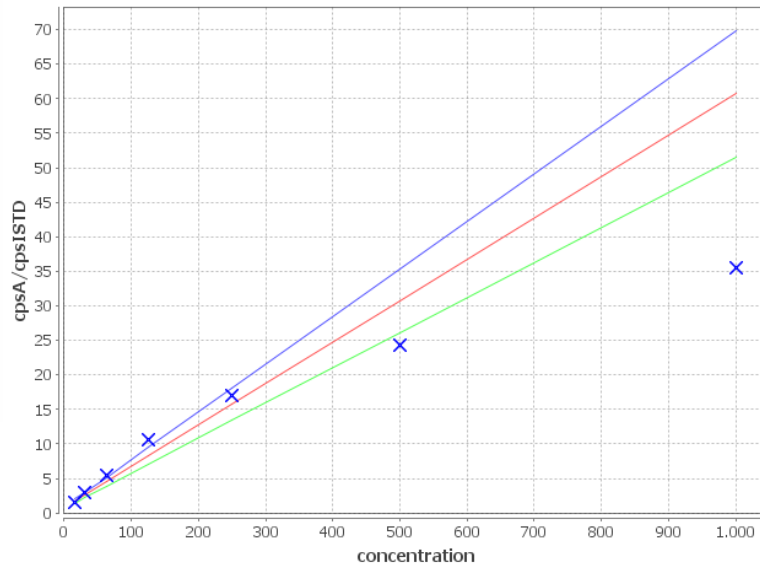
# Endogene Konz. sehr unterschiedlich

PC sind sehr viel höher konzentriert als andere Lipidklassen:

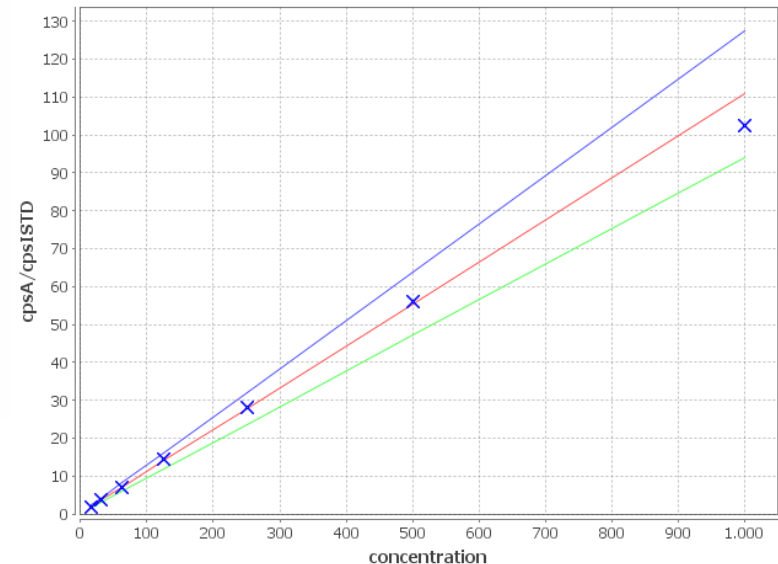
1) andere MRMs verwenden



MRMs basierend auf +Prec 184



MRMs basierend auf -NL 74



2) Methanol/CHCl<sub>3</sub>-Extrakt für PC Messung 1:10 verdünnen

# Methodenentwicklung Targeted Lipidomics

## Analytische Zielvorgaben:

- hochdurchsatzfähige Methode
- wenig Probenvolumen verwenden (ca. 20µl)
- möglichst viele Analyten gleichzeitig erfassen
- valide quantitative Ergebnisse (MRM)

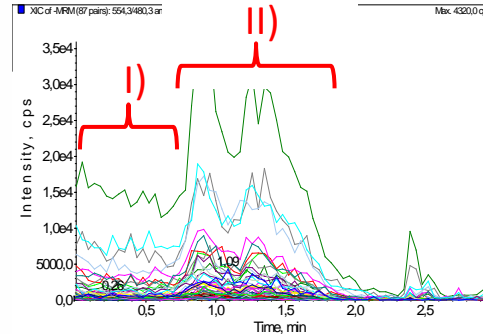
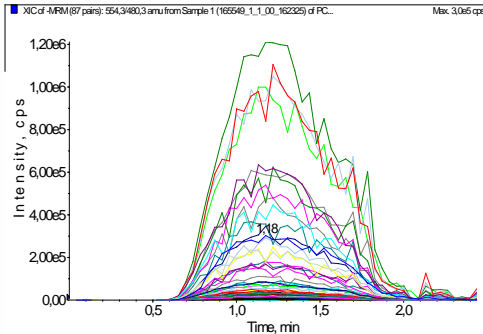
## Analytische Herausforderungen:

- Strukturvielfalt der Lipide
- Verfügbarkeit von externen und internen Standards ist limitiert
- endogene Konzentrationen sehr unterschiedlich
- **Verschleppung/FIA-Troubleshooting**

# Verschleppung/FIA-Troubleshooting

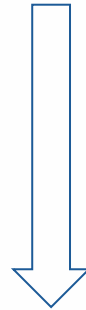
Probe

nachfolgender Blank



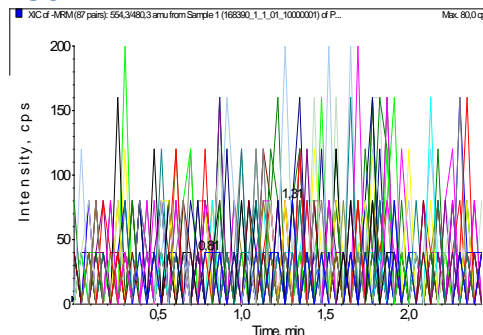
## I) (Stahl) Kapillaren spülen

min	μL/min
0.0	30
1.6	30
2.4	200
2.5	1500
4.4	1500
4.5	30



## II) Injektionseinheit optimieren

- Rotor/Stator, Nadelsitz und Spritze regelmäßig tauschen
- aktive Waschstation verwenden (CTC-Pal)
- Laufmittel als Waschlösung verwenden



## III) Totvolumina vermeiden!!!!

- sorgfältiges Verschrauben (Kapillaren usw.)
- Systemcheck vor Probenanalyse

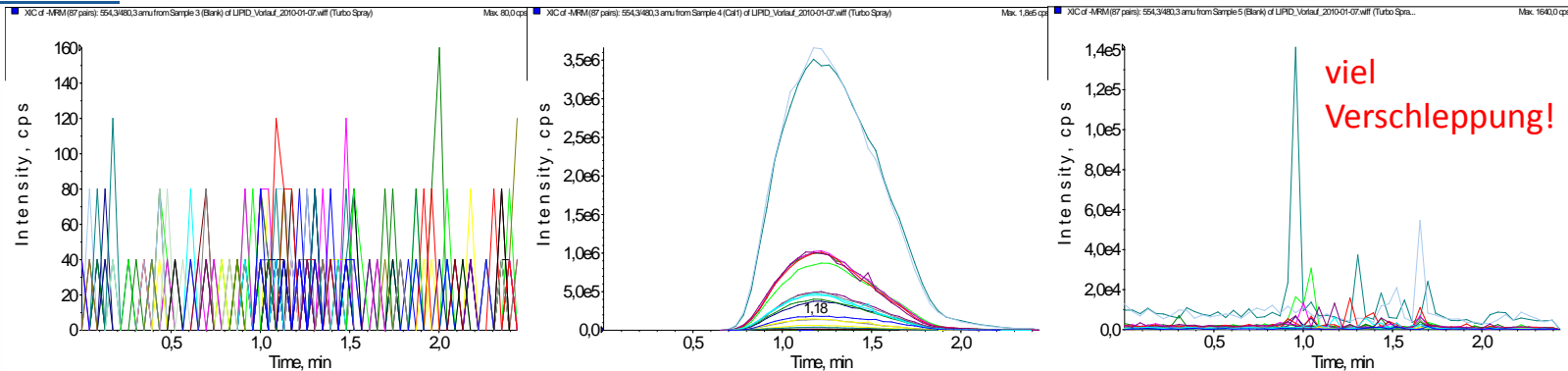
# Verschleppung/FIA-Troubleshooting

## III) Totvolumina vermeiden!!!!

- sorgfältiges Verschrauben (Kapillaren usw.)
- Systemcheck vor Probenanalyse

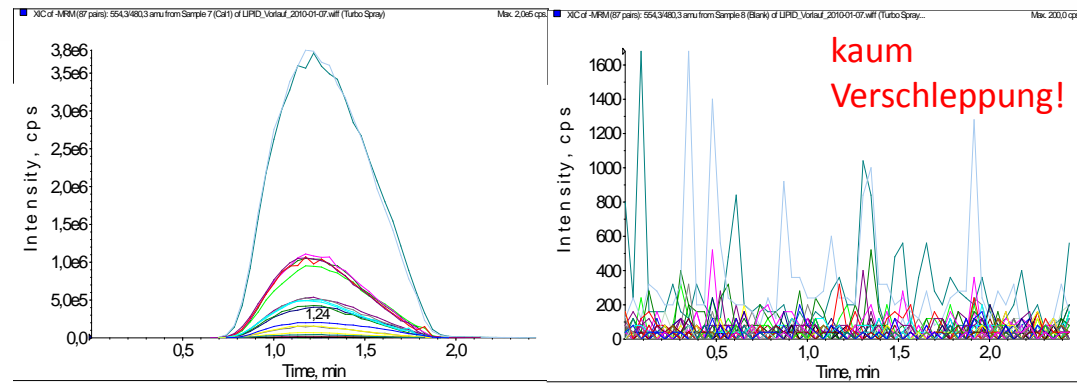
## Bsp. aus der Routine:

### 1) Systemcheck

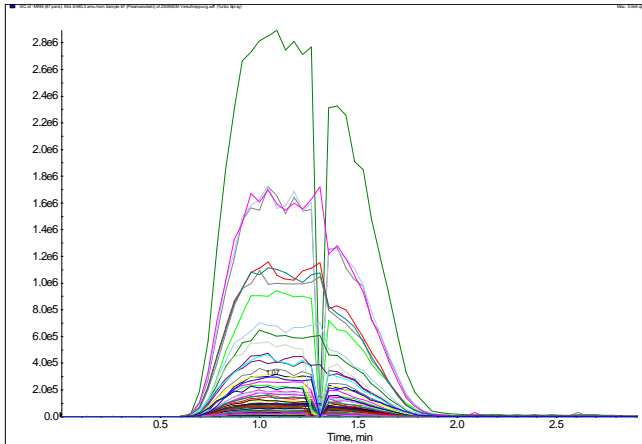


### 2) Probenschleife, Kapillaren und ESI Tube nochmal neu reinschrauben (5min)

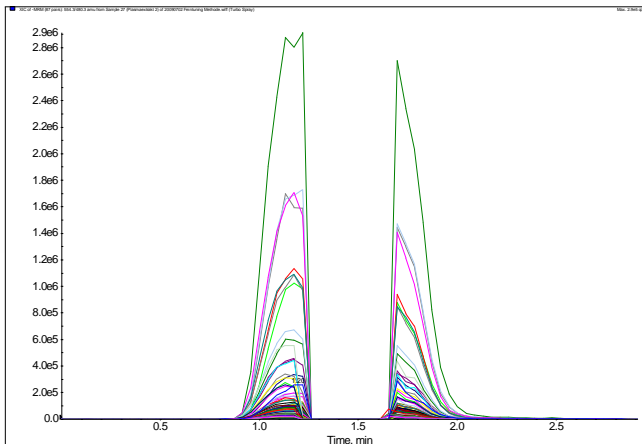
### 3) Wiederholung Systemcheck



# Verschleppung/FIA-Troubleshooting



Einbruch im FIA-Peak durch Luftblase in Injektionsschleife  
=> Lösung: ab sofort Injektionsschleife „überfüllen“ (overfill)



=> Kein ausreichendes Probenvolumen!!!!

# Zusammenfassung

Hochdurchsatzfähige FIA-ESI-MS/MS Screeningmethode für quantitative Analyse von  
7 Lipidklassen

Methodenentwicklung: 1 Jahr

Methodenvalidierung: ½ Jahr

---

Gesamtdauer: 1 ½ Jahre

## Danksagung

**Dr. Therese Koal**

**Dr. Hai Pham Tuan**

**Doreen Kirchberg**

# European Lipidomics Workshop

Darmstadt, Frankfurter Str. 129B  
16. - 17. June 2010  
Please register with Nina.Dressel@lifetech.com



## Agenda

### 16.06.2010 Seminar Session

- 10:00** Registration
- 10:30** Welcome and Introduction
- 10:45** From Discovery to Clinical Application:  
Using the AB SCIEX QTRAP® 5500 LC/MS/MS System in Lipidomics Workflows  
Axel Besa, AB Sciex, Germany
- 11:30** Software Solutions for Lipidomics Workflows  
N.N., AB Sciex, Canada
- 12:15** Lunch Break
- 13:30** 'Shotgun' Lipidomics: Direct Infusion MS and LCMS Strategies in Lipid Analyses  
Reinaldo Almeida, Advion Ltd, Germany
- 14:15** Targeted Lipidomics: The Biocrates Absolut/DQ™ Kit and New Developments  
Dr. Therese Koal, BIOCRATES Life Science AG, Austria
- 15:00** Coffee Break
- 15:30** Front End Sample Preparation: Approaches to Enhance Workflow Automation  
Dr. Roland Geyer, Tecan Trading AG, Switzerland
- 16:15** Lipidomics in Health and Disease  
Kim Ekroos, Zora, Finland
- 17:00** End of Day 1
- 18:30** Dinner

### 17.06.2010

Lab session QTRAP® 5500 LC/MS/MS systems:

This session will cover Lipid ID in a 'Shotgun' approach including LipidView™ Software and targeted Lipid analysis using the Biocrates Absolut/DQ™ Kit

- 09:00** Welcome and Introduction
- 09:15** Group will be split into 2 parts for lab session; groups rotate between 2 different sessions
- 13:00** Lunch Break
- 14:15** Discussion
- 15:00** End of Workshop