

HILIC/MS ANALÝZA GANGLIOSIDŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

Roman Hájek, Robert Jirásko, Miroslav Lísa, Eva Cífková a Michal Holčapek

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

Abstract

Gangliosides represent a lipid class containing a backbone of sphingoid bases and polar saccharide chains with at least one sialic acid. These lipids are abundant in the central nervous system and play important roles in numerous physiological processes in cells, such as memory control, cell signaling, neuronal recovery, neuronal protection or apoptosis. Gangliosides are extracted using chloroform, methanol and water, where aqueous phase containing gangliosides is further purified on C18 solid-phase extraction column to remove undesired salts. The purpose of this study is the development of a reliable analytical method for the ganglioside analysis based on the hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to negative-ion electrospray ionization mass spectrometry (HILIC/ESI-MS). The developed method is applied for the lipidomic analysis of human kidney, lungs, plasma, urine, erythrocytes and porcine brain.

Souhrn

Gangliosidy jsou třídou lipidů obsahující ceramid, na kterém jsou navázány cukerné jednotky a alespoň jedna kyselina sialová. Tyto lipidy jsou hojně zastoupeny v centrální nervové soustavě a hrají v buňkách důležitou roli v mnoha fyziologických procesech, jako je kontrola paměti, buněčná signalizace, ochrana neuronů nebo apoptóza. Gangliosidy jsou extrahovány pomocí směsi chloroform, methanol a voda. Vodná fáze obsahující gangliosidy je následně přečištěna na C18 kolonkách. Přečištění se provádí pro odstranění solí. Hlavním cílem této práce je vyvinutí spolehlivé metody pro analýzu gangliosidů. Vyvinutá metoda, založená na HILIC separaci ve spojení s ESI-MS (HILIC/ESI-MS), je aplikována na analýzu lidských ledvin, plic, plasmy, erythrocytů a prasečího mozku

1. Úvod

Sfingolipidy jsou jednou z osmi hlavních tříd (mastné kyseliny, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy) dle LIPID MAPS [1]. Sfingolipidy obsahující ceramid, na který je navázán oligosacharidový řetězec a jedna nebo více kyselin sialových se nazývají gangliosidy. Na ceramid mohou být navázány různé typy cukrů jako nenabitě cukry – glukóza, galaktóza, fukóza atd.; anebo ionizovaná funkční skupina jako je sulfát připojený k nenabitému cukru a residua kyseliny sialové. Kyselina sialová je triviální název pro všechny deriváty neuraminové kyseliny [2], kde nejdůležitější je N-acetylneuraminová kyselina (NeuAc, SA) a méně běžná je N-glycolylneuraminová kyselina

(NeuGc). NeuAc a NeuGc si jsou velmi podobné, ale významně se liší v jejich přirozeném výskytu. NeuAc je přítomen u člověka na rozdíl od NeuGc, který je získán z potravy v omezeném množství [2-4]. Gangliosidy mají významné funkce v buňkách savců [2,5]. Jsou přítomny téměř ve všech lidských tkáních, zejména v neurálních tkáních a extraneurálních orgánech jako jsou plíce, slezina střevo, stejně jako v biologických tekutinách jako je mléko[6-10]. Gangliosidy jsou hojně zastoupeny v centrálním nervovém systému a hrají důležitou roli v mnoha buněčných fyziologických procesech, jako je: buněčná signalizace, ochrana neuronů, apoptóza, adheze a diferenciací [2,11-15].

Gangliosidy jsou komplexní lipidy a jejich analýza je velmi důležitá pro porozumění jejich funkcí v organismu. Vzhledem k nízkým koncentracím představuje příprava vzorků kritický a rozhodující krok. V současné době se v lipidomické analýze používají extrakční postupy vyvinuté Folchem [16] a jejich další modifikace [17]. Při extrakci dle Folche se nejprve homogenizuje vzorek biologického materiálu se směsí chloroform/methanol a přidavku vody. Vzniklá směs je rozdělena do dvou fází, přičemž v dolní organické fázi (chloroform) je směs zejména nepolárních lipidů a horní vodná fáze obsahuje polární lipidy (gangliosidy atd.) a látky nelipidového charakteru. Vodnou fází obsahující gangliosidy a další nelipidové látky je třeba přecistit od nečistot. Pro čištění se používají SPE založené na módu reverzních fází nebo iontově výměnné [9,18,19]. Extrakt lipidů může být separován pomocí RP, HILIC nebo TLC módu [5,6,9,19,20]. Identifikace gangliosidů v biologických tkáních a tekutinách je náročná úloha, která vyžaduje použití tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) spojené s chromatografickými technikami [21,22]. Kombinace zobrazování pomocí hmotnostní spektrometrie a imunohistochemie byla aplikována pro multimodální detekci GM2 a GM3 u myši [23]. Další aplikace zobrazování pomocí hmotnostní spektrometrie pro prostorovou charakterizaci gangliosidů v myším mozku je založena na kombinaci zobrazení a separace iontové mobility [24].

V této studii je popsán vývoj systematické optimalizace HILIC/ESI-MS/MS metody pro analýzu širokého spektra gangliosidů. Hlavním parametrem chromatografické optimalizace je složení mobilní fáze s důrazem na kontrolu pH, testování typů a koncentrací pufrů pro dosažení optimální separace a citlivosti. Fragmentační chování jednotlivých tříd gangliosidů v režimu MS/MS je studováno s cílem objasnit strukturu gangliosidů.

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie a standardy

Pro měření byla použita rozpouštědla acetonitril, methanol o HPLC/MS čistotě ($\geq 99,9\%$) dodané firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dále byla používána voda získaná z demineralizačního přístroje Milli-Q® Reference system (Molsheim, Francie). K extrakci lipidů byl použit chloroform o HPLC čistotě ($\geq 99,9\%$) stabilizovaný 0,5-1% ním ethanolem (Sigma-Aldrich). Do mobilní fáze byl přidáván octan amonný o čistotě $\geq 99,995\%$ a mravenčan amonný o čistotě $\geq 99,0\%$ od firmy Sigma-Aldrich. Pro úpravu pH byla použita kyselina octová o čistotě $\geq 99,99\%$ a kyselina mravenčí o čistotě $\sim 98\%$ od firmy Sigma-Aldrich. Standard celkového extraktu gangliosidů z prasečího mozku byl zakoupen od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

2.2 Příprava vzorků a standardů

Vzorek 2 mg celkového extraktu gangliosidů z prasečího mozku byl rozpuštěn ve směsi 1100 μ l chloroform/methanol/voda (600:425:75, v/v/v). Vzorky lidských ledvin a plic byly získány během operace a okamžitě zmrazeny a uloženy při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dokud nebyly zpracovány. Lidské ledviny, plíce, plasma, erythrocyty a prasečí mozek extrahovány pomocí směsi chloroform/methanol/voda dle Folche [16] s malou modifikací [17,25]. 25 mg tkáně bylo homegenizováno s 6 ml chloroform/methanol (2:1, v/v); 200 μ l plasmy a erythrocytů bylo homogenizováno s 3 ml chloroform/methanol (2:1, v/v) v ultrazvuku po dobu 10 minut a za teploty $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla přidána deionizovaná voda (1200 μ l pro tkáně a 600 μ l pro plasmu a erythrocyty) a centrifugováno po dobu 3 minut při 3000 ot./min. Horní vodná fáze obsahující gangliosidy byla oddělena a odpařena pod proudem dusíku. Po odpaření byl vzorek rozpuštěn v 1 ml vody a přečištěn pomocí SPE. 200 mg tC18 kolonky (Sep-Pak Vac, 37-55 μ m velikost částic) (Waters, Milford, MA, USA) byly kondicionovány pomocí 3 ml methanolu a následně promyty 3 ml vody. Poté byl nanesen rozpuštěný vzorek v 1 ml vody a přečištěn pomocí 3 ml vody. Posledním krokem byla eluce pomocí 3 ml methanolu. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku a rozpuštěn v 500 μ l směsi methanol/voda/chloroform (300:150:50, v/v/v).

2.3 Optimalizace LC/MS podmínek

Experimenty byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). Finální podmínky pro analýzu lipidů jsou následující: kolona Ascentis Si (150 \times 2.1, 3 μ m, Sigma-Aldrich), průtok 0,3 ml/min, teplota

kolony 40 °C, gradient: 0 min - 87.7% A + 12.3% B, 15 min - 77.9% A + 22.1% B, kde A je acetonitril s kyselinou octovou a B je 10 mM vodný octan amonný, upravený kyselinou octovou na pH 6,1.

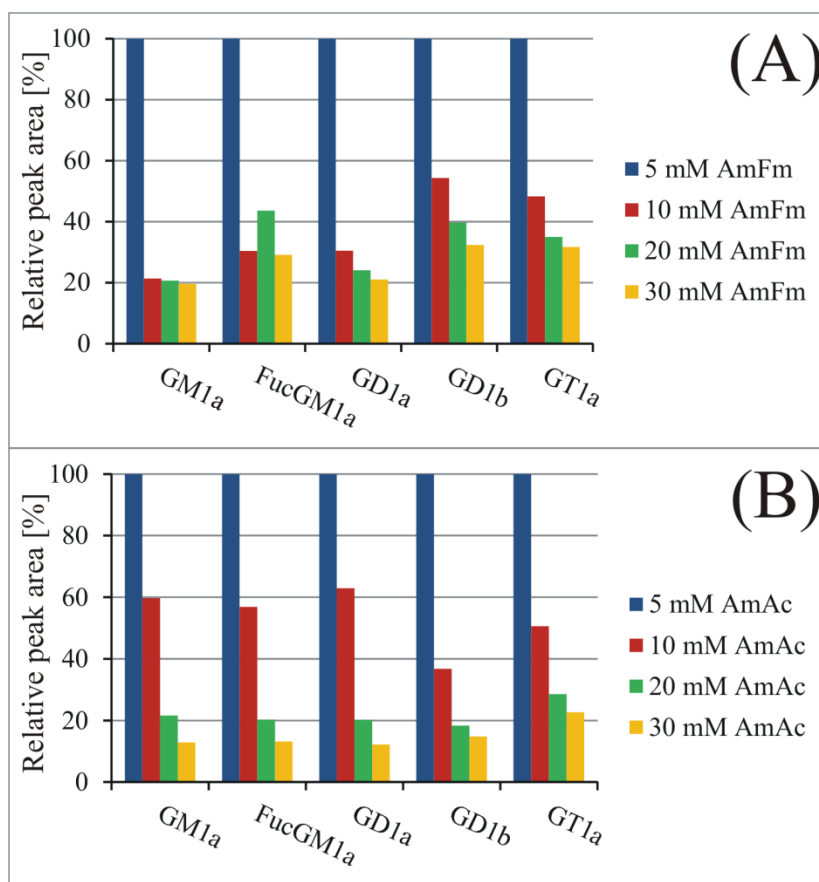
Finální podmínky HPLC/MS metody byly následující: hydridová kolona Cogent Diamond Hydride (250 x 4,6 mm, 4µm), průtok mobilní fáze 1 ml/min, dávkovaný objem 3 µl rozpuštěného extraktu lipidů, teplota kolony 40°C. Byla použita mobilní fáze se složkami A (acetonitril s kyselinou mravenčí) a B (40 mM vodný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

Optimalizace metody byla prováděna na kapalinovém chromatogramu ve spojení s hmotnostním spektrometrem micrOTOF-Q (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Byly použity tyto parametry: napětí na kapiláře 2,5 kV, průtok sušícího plynu 9,3 l/min, teplota sušícího plynu 210 °C, ESI záznam negativních iontů v rozsahu 50-300 m/z , tlak zmlžujícího plynu 1,2 bar.

Pro identifikaci byl použit hmotnostní spektrometr Synapt G2-Si (Waters) v rozlišujícím módu za použití těchto podmínek: ESI záznam negativních iontů v rozsahu 50-200 m/z , napětí na kapiláře 2,2 kV, teplota zdroje 150 °C, sušící teplota 500 °C, průtok sušícího plynu 17 l/min, tlak zmlžujícího plynu 4 bar.

3. Výsledky a diskuze

Na základě předchozí HILIC/ESI-MS metody pro analýzu kyselých lipidů [26], byla použita pro analýzu gangliosidů kolona Ascentis Si. Při vývoji metody byly sledovány tyto hlavní třídy gangliosidů: GM1a, Fuc-GM1a, GD1a, GD1b a GT1b. Byla testována koncentrace od 0 do 30 mM mravenčanu a octanu amonného (obrázek 1). Nejlepší signál pro mravenčan a octan amonný byl pro koncentraci 5 mM, ale nejlepší kompromis mezi sensitivitou a tvarem píku bylo dosaženo pro 10 mM octan amonný. Mobilní fáze bez aditiv není možné použít z důvodů chvostování píků a také nebylo dosaženo separace izomerů GD1a a GD1b. Z obrázku 1 je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací aditiv se snižuje sensitivity.



Obrázek 1. Porovnání relativní plochy píků versus koncentrace (A) mravenčanu amonného a (B) octanu amonného pro tyto gangliosidy: GM1a 36:1 (RIC of $[M-H]^-$ at m/z 1544.9), Fuc-GM1a 36:1 (RIC of $[M-H]^-$ at m/z 1690.9), GD1a 36:1 (RIC of $[M-H]^{2-}$ at m/z 917.5), GD1b 36:1 (RIC of $[M-H]^{2-}$ at m/z 917.5), and GT1b 38:1 (RIC of $[M-H]^{2-}$ at m/z 1077.0).

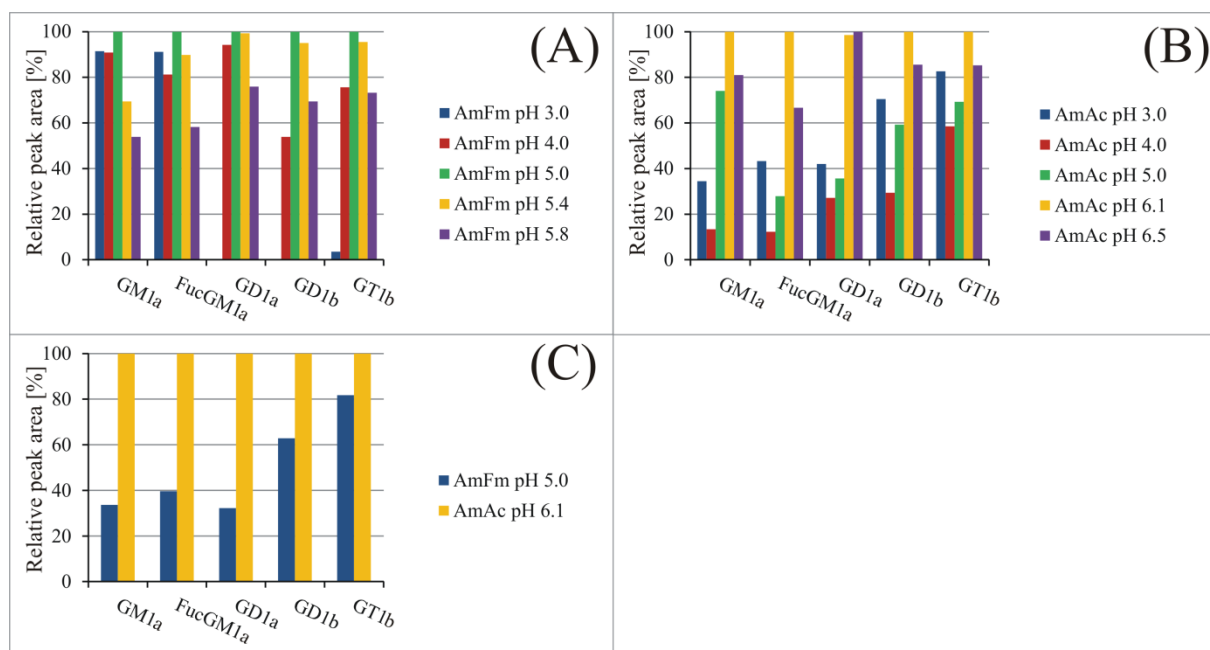
Dále byl testován vliv pH mobilní fáze na tvar píků (tabulka 1). Byla testována hodnota pH, v rozmezí od 3,0 do 6,5 upravovaná 10 mM octanem amonným a kyselinou octovou, v rozmezí od 3,0 do 5,8 10 mM mravenčanem amonným a kyselinou mravenčí. Za použití mobilní fáze mravenčanu amonného při pH 3 nebylo dosaženo separace izomerů GD1a a GD1b. Při testování octanu amonného došlo k separaci již zmíněných izomerů i při pH 3. Bylo testováno pH mravenčanu amonného a octanu amonného a jeho vliv na sensitivitu (obrázek 2.). Největší změny sensitivity lze pozorovat v octanovém prostředí, kdy se snižující se hodnotou pH docházelo k jejímu snižování. Citlivost byla nejnižší při pH 4,0 a nejvyšší při pH 6,1. Dále byly porovnány nejlepší výsledky v prostředí mravenčanovém (pH 5,1) a octanovém (pH 6,1) (obrázek 2C). Je ukázáno, že v octanovém prostředí tlumeném na pH 6,1

dosáhneme nejlepší citlivosti. Nejlepšího kompromisu mezi sensitivitou a kvalitou separace bylo dosaženo za pomoci 10 mM octanu amonného při pH 6,1.

Tabulka 1. Vliv hodnoty pH na chvostování píků (parametr symetrie píků).

pH	10 mmol/L ammonium formate buffer					10 mmol/L ammonium acetate buffer				
	3.0	4.0	5.0	5.4	5.8	3.0	4.0	5.0	6.1	6.5
GM1	1.07	1.06	1.17	1.24	1.21	1.36	1.19	1.27	1.27	1.21
FucGM1	0.95	1.02	1.25	1.43	1.69	1.22	0.97	1.31	1.21	1.38
GD1a	2.64*	1.28	1.17	1.15	1.14	1.21	1.39	1.17	1.34	1.36
GD1b	2.64*	1.57	1.57	1.24	1.02	1.65	1.43	1.35	1.28	1.05
GT1	0.88	1.25	1.11	1.23	1.02	2.92	1.27	1.21	1.08	1.05

*Nebyly rozseparovány třídy GD1a a GD1b



Obrázek 2. Vliv pH mravenčanu amonného (A) a octanu amonného (B) na sensitivitu.

Tabulka 2. Přehled lipidů identifikovaných v prasečím mozku, lidských ledvinách, plicích, plasmě a erythrocytech.

Lipid class	Retention time window [min]	Sample type					Total
		Porcine brain	Human kidney	Human lungs	Human plasma	Human erythrocytes	
SulfoHexCer	0.6 - 1.7	38	25	3	2	4	43
SulfoHex ₂ Cer	0.6 - 1.7	-	25	-	-	4	25
PG	1.0 - 1.5	7	4	5	-	-	9
PI	1.0 - 1.5	10	20	13	8	9	20
LPI	1.7 - 2.4	8	8	4	5	-	10
PS	2.0 - 2.9	17	7	8	-	10	20
GM3	1.9 - 2.5	2	16	15	15	4	22
GD3-Ac	2.8 - 3.8	13	-	2	-	-	14
GM2	3.3 - 4.1	3	3	2	-	-	6
GD3	4.5 - 5.7	9	9	13	-	-	17
GD1a-Ac	4.8 - 5.5	3	-	-	-	-	3
GM1a	4.9 - 5.8	10	-	-	-	5	11
Fuc-GM1a	6.2 - 7.2	7	-	-	-	-	7
GD1a	6.3 - 7.1	7	4	2	-	-	10
GT3-Ac	6.3 - 7.3	6	-	-	-	-	6
GD0a	7.3 - 8.3	7	-	-	-	-	7
GD2	7.5 - 8.4	2	-	-	-	-	2
Fuc-GD1b-Ac	8.3 - 9.0	3	-	-	-	-	3
GD1b	8.8 - 9.6	8	-	-	-	-	8
GT1b-Ac	9.2 - 9.9	4	-	-	-	-	4
GQ1-Ac	9.2 - 9.9	2	-	-	-	-	2
GT1a	9.3 - 9.9	4	-	-	-	-	4
Fuc-GD1b	10.3 - 11.3	5	-	-	-	-	5
GT1b	10.8 - 12.0	12	-	-	-	-	12
GQ1b	12.4 - 13.5	2	-	-	-	-	2
Total		189	122	67	30	36	272

4. Závěr

Byla zoptimalizována HILIC/MS metoda, kdy byly testovány různé koncentrace a pH mravenčanu a octanu amonného a byl popsán jejich vliv na separaci a sensitivitu gangliosidů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 10 mM octanu amonného při pH 6,1. Metoda byla použita pro analýzu lipidů v prasečím mozku, lidských ledvinách, plicích, plasmě a erythrocytech (Tabulka 2). Bylo identifikováno 145 gangliosidů, 71 sulfatidů a 59 polárních fosfolipidů.

Poděkování

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

Literatura

- [1] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw: A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **46** (2005) 839-862.
- [2] M. Aureli, L. Mauri, M.G. Ciampa, A. Prinetti, G. Toffano, C. Secchieri, S. Sonnino: GM1 ganglioside: past studies and future potential. *Molecular neurobiology* **53** (2016) 1824-1842.
- [3] R. Schauer: Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* **107** (2004) 49-64.
- [4] Y.N. Malykh, R. Schauer, L. Shaw: N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* **83** (2001) 623-634.
- [5] K. Ikeda, R. Taguchi: Highly sensitive localization analysis of gangliosides and sulfatides including structural isomers in mouse cerebellum sections by combination of laser microdissection and hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24** (2010) 2957-2965.
- [6] R. Lacomba, J. Salcedo, A. Alegría, M.J. Lagarda, R. Barberá, E. Matencio: Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51** (2010) 346-357.
- [7] F. Giuffrida, I.M. Elmelegy, S.K. Thakkar, C. Marmet, F. Destailats: Longitudinal evolution of the concentration of gangliosides GM3 and GD3 in human milk. *Lipids* **49** (2014) 997-1004.
- [8] L. Ma, A.K. MacGibbon, H.J.B.J. Mohamed, S. Loy, A. Rowan, P. McJarrow, B.Y. Fong: Determination of ganglioside concentrations in breast milk and serum from Malaysian mothers using a high performance liquid chromatography-mass spectrometry-multiple reaction monitoring method. *International Dairy Journal* **49** (2015) 62-71.
- [9] M. Fuller, S. Duplock, L.K. Hein, B.A. Rigat, D.J. Mahuran: Liquid chromatography/electrospray ionisation-tandem mass spectrometry quantification of G M2 gangliosides in human peripheral cells and plasma. *Analytical Biochemistry* **458** (2014) 20-26.
- [10] T. Valdes-Gonzalez, N. Goto-Inoue, W. Hirano, H. Ishiyama, T. Hayasaka, M. Setou, T. Taki: New approach for glyco-and lipidomics-Molecular scanning of human brain gangliosides by TLC-Blot and MALDI-QIT-TOF MS *Journal of Neurochemistry* **116** (2011) 678-683.
- [11] S. Sonnino, L. Mauri, M.G. Ciampa, A. Prinetti: Gangliosides as regulators of cell signaling: ganglioside-protein interactions or ganglioside-driven membrane organization? *Journal of Neurochemistry* **124** (2013) 432-435.
- [12] S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, A. Prinetti: Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* **17** (2007) 1R-13R.

- [13] P.H. Lopez, R.L. Schnaar: Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Current Opinion in Structural Biology* **19** (2009) 549-557.
- [14] S.-I. Hakomori: Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *Journal of Biological Chemistry* **265** (1990) 18713-18716.
- [15] S.-I. Hakomori, K. Handa: GM3 and cancer. *Glycoconjugate Journal* **32** (2015) 1-8.
- [16] J. Folch, M. Lees, G. Sloane-Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226** (1957) 497-509.
- [17] E. Cífková, M. Holčápek, M. Lísa, M. Ovčáčíková, A. Lyčka, F. Lynen, P. Sandra: Nontargeted quantitation of lipid classes using hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry with single internal standard and response factor approach. *Analytical Chemistry* **84** (2012) 10064-10070.
- [18] A.D. Garcia, J.L. Chavez, Y. Mechref: Rapid and sensitive LC-ESI-MS of gangliosides. *Journal of Chromatography B* **947** (2014) 1-7.
- [19] K. Ikeda, T. Shimizu, R. Taguchi: Targeted analysis of ganglioside and sulfatide molecular species by LC/ESI-MS/MS with theoretically expanded multiple reaction monitoring. *Journal of Lipid Research* **49** (2008) 2678-2689.
- [20] A. Prinetti, F. Rocchetta, E. Costantino, A. Frattini, E. Caldana, F. Rucci, A. Bettiga, P.L. Poliani, V. Chigorno, S. Sonnino: Brain lipid composition in grey-lethal mutant mouse characterized by severe malignant osteopetrosis. *Glycoconjugate Journal* **26** (2009) 623-633.
- [21] Z.-C. Tsui, Q.-R. Chen, M.J. Thomas, M. Samuel, Z. Cui: A method for profiling gangliosides in animal tissues using electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **341** (2005) 251-258.
- [22] T. Hu, Z. Jia, J. Zhang, A Novel Strategy for Comprehensive Profiling and Identification of Acidic Glycosphingolipids Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **89** (2017) 7808-7816.
- [23] M. Dufresne, D. Guneysu, N.H. Patterson, M.M. Marcinkiewicz, A. Regina, M. Demeule, P. Chaurand: Multimodal detection of GM2 and GM3 lipid species in the brain of mucopolysaccharidosis type II mouse by serial imaging mass spectrometry and immunohistochemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409** (2017) 1425-1433.
- [24] K. Škrášková, E. Claude, E.A. Jones, M. Towers, S.R. Ellis, R.M. Heeren: Enhanced capabilities for imaging gangliosides in murine brain with matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption electrospray ionization mass spectrometry coupled to ion mobility separation. *Methods* **104** (2016) 69-78.
- [25] M. Ovčáčíková, M. Lísa, E. Cífková, M. Holčápek: Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1450** (2016) 76-85.

- [26] E. Cífková, R. Hájek, M. Lída, M. Holčápek: Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry of (lyso) phosphatidic acids, (lyso) phosphatidylserines and other lipid classes. *Journal of Chromatography A* **1439** (2016) 65-73.