

LIPIDEK AZONOSÍTÁSA LC-MS/MS MÉRÉSI MÓDSZERREL

DR. LOVRITY ZITA¹, DR. EMMER JÁNOS¹,
JUHÁSZNÉ SZALAI ADRIENN¹, DR. FODOR BERTALAN¹

Összefoglalás: A lipidek az élő szervezet fontos alkotórészei, melyek számos feladatot látnak el. Lipidekből épülnek fel a liposzómák, a nanobiotechnológia fejlődésének köszönhetően alkalmazási területük széles körű (pl. élelmiszeripar, szépségápolás, gyógyszeripar). Munkánk elsődleges célja liposzómális gyógyszerhordozók előállítására. Ehhez a liposzóma gyártásához felhasznált lipidek előzetes vizsgálata elengedhetetlen. Különböző összetételű mesterséges lipideket vizsgáltunk tömegspektrometriás mérési módszerrel. A lipidek azonosításához LCMS-IT-TOF készüléket használtunk. Mérési módszert dolgoztunk ki a vizsgált lipidek fragmentációjának meghatározására, ami egyben alkalmazható a sejtben lévő foszfolipidek azonosítására is.

Kulcsszavak: lipid, tömegspektrometria, fragmentáció

Bevezetés

A lipidek az emberi szervezetben trigliceridek, foszfolipidek, glikolipidek, koleszterin, szteroidhormonok, eikozanoidok és vitaminok (A, D, K, E) formájában fordulnak elő. Ezek az élő szervezetben számos feladatot látnak el, melyek közül a legfontosabb a metabolizmusban való részvétel, továbbá meghatározó szerepük van a sejtmembrán felépítésében is [1].

A liposzómák gömb alakú, belső üreggel rendelkező részecskék, melyek fő alkotórészei a lipidek. Munkánk során különböző összetételű liposzómákat állítottunk elő, melyeket a későbbiekben gyógyszerhordozóként szeretnénk alkalmazni. A liposzómák felépítéséhez foszfolipideket, pegilált (polietilén glikol oldallánccal rendelkező) foszfolipidet és koleszterint használtunk. A foszfolipidek amfipatikus sajátságúak, azaz egy molekulán belül tartalmaznak hidrofób és hidrofil részeket. Az élő szervezetben a sejtmembrán felépítésében vesznek részt. Amfipatikus sajátságai miatt a foszfolipidek liposzómák fontos alkotóelemei, mert a külső hidrofil burok által vízdoldhatóvá tehetők a liposzómák. Léteznek olyan felépítésű liposzómák, melyek belső felülete hidrofób jellegű, emiatt apoláris molekulák (pl. gyógyszerek) bezárására, azaz gyógyszerhordozóként történő használatra alkalmasak. A pegilált foszfolipid a liposzóma stabilitását és a biokompatibilitást növeli. A koleszterin szintén a sejtmembrán alkotóeleme, feladata a membrán fluiditásának szabályozása, ezáltal fontos alkotóeleme a liposzómáknak is.

¹ Miskolci Egyetem Egészségügyi Kar, Nanobiotechnológiai és Regeneratív Medicina Tanszék, Miskolc

A liposzómáknak számos alkalmazási területe ismert [2], ezek előállítására különböző technológiák léteznek a gyakorlatban [3]. A liposzómák és lipidek analitikai vizsgálatára többféle mérési módszert alkalmaznak a gyakorlatban [4]. A liposzómákat felépítő lipidek analízisére elsősorban folyadékkromatográfiás elválasztást kapcsolnak össze különböző detektálási módszerekkel (pl. fényszórás-mérés, UV, MS detektorok) [5].

Jelen munkában a liposzóma gyártásban alkalmazott lipidek tömegspektrometriás azonosítását mutatjuk be. Ezek az elővizsgálatok az általunk előállított lehetséges gyógyszerhordozók pontos összetételének meghatározásához nélkülözhetetlenek.

Liposzóma gyártásakor alkalmazott lipidek

A liposzóma gyártásához felhasznált lipidek fragmentációs vizsgálatát végeztük el, melyek az alábbiak:

- 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfokolin (DMPC), (NOF Corp., Japan);
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-foszfokolin (DPPC), (NOF Corp., Japan);
- 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfokolin (DSPC), (NOF Corp., Japan);
- 1,2-dióleil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin (DOPE), (NOF Corp., Japan);
- 1,2-dióleil-3-trimetilammónium-propán (klorid sója) (DOTAP), (NOF Corp., Japan);
- koleszterin, (SIGMA-ALDRICH, Germany)
- 1,2-dimirisztoil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin-N-(metoxi(polietilén-glikol))-2000 (nátrium sója) (14:0 PEG2000 PE), (NOF Corp., Japan);

A lipideket metanolban (Merck, HPLC grade) oldottuk fel, a törzsoldatok koncentrációja 500–700 ppm közötti tartományban volt.

Tömegspektrometriás mérések

A tömegspektrometriás vizsgálatokhoz a törzsoldatok hígítását acetonitril (Chromasolv for LC-MS, Fluka) : metanol (LiChrosolv hypergrade for LC-MS, Merck): 0,1% ammónium-formiát (HPLC grade, Fluka) = 6:7:2 eluens eleggyel végeztük [6], melyhez deionizált vizet (Zeneer Up 900, Human Corporation) használtunk. A méréseket LCMS-IT-TOF (Shimadzu Corp.) készülékkel végeztük el, ami elektroszpré (ESI) ionforrással van felszerelve. Mivel az azonosításhoz standard anyagokat használtunk fel, ezért közvetlenül a tömegspektrométerbe került a minta folyadékkromatográfiás elválasztás nélkül (FIA: flow injection analysis). A DMPC, DPPC, DSPC és DOPE azonosítását pozitív és negatív ionizációs módszerrel, míg a PEG2000PE, koleszterin és DOTAP azonosítását pozitív ionizációs módszerrel hajtottuk végre.

A törzsoldatok tízszeres hígítása után minden lipidből 0,5–2 µl-t injektáltunk, 0,2 ml/min eluens áramlási sebesség mellett.

A lipidek azonosításához szükséges fragmentációs vizsgálatok során MS^2 és MS^3 mérési beállításokat használtunk, ami a molekulaion fragmentációját (MS^2), illetve a molekulaion bomlásából származó ion további fragmentációs vizsgálatát (MS^3) foglalja magában.

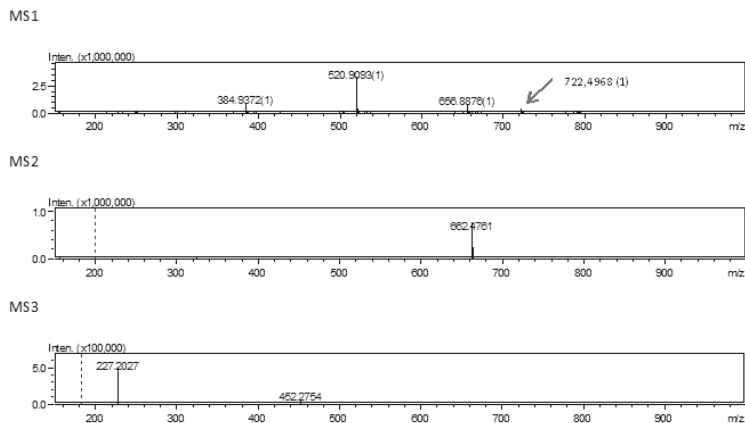
A foszfokolinok (DMPC, DPPC, DSPC) azonosítására negatív ionmódban alkalmazható az NLS (neutral loss scan) mérési mód, melynek során a készülék az ionok fragmentációja során a molekulaionhoz képest egy megadott tömegvesztést figyel, és csak az adott tömegvesztés megjelenésekor végzi el a molekulaionból keletkezett töredék (fragmens) ion további ütköztetését. Ennek a mérési beállításnak a nagy előnye, hogy ismeretlen foszfokolinok azonosíthatók, mivel a második ütközés a zsírsav oldallánc szerkezetére ad felvilágosítást (lásd alább).

Lipidek azonosítása

Az azonosításhoz a fragmentációs vizsgálatok nélkülözhetetlenek, mert a molekulaionból nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy az adott tömegű ion milyen szerkezetű. A molekula darabolásával, majd a keletkezett fragmens ionok vizsgálatával az eredeti molekulaszervezetre lehet következtetni. A pontos szerkezet meghatározása (pl. izomerek elkülönítése) további vizsgálatokat (IR, NMR) igényel. Jelen esetben erre nincs szükség, mivel ismert összetételű lipidekből indulunk ki a liposzóma gyártása során.

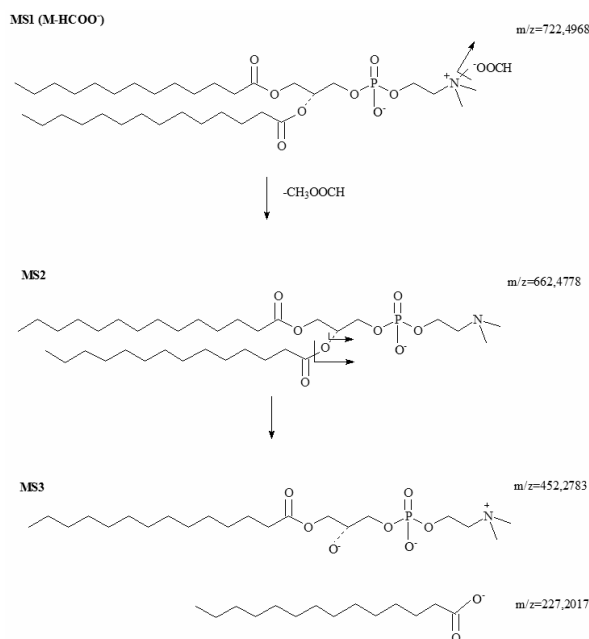
A szerkezetvizsgálat során a kapott fragmens ionok szerkezetét Formula Predictor képlet-meghatározó szoftver segítségével erősítettük meg.

Az MS^1 mérések során negatív ionmódban a molekulaion eluenssel alkotott adduktját mérjük ($[M-HCOO]^-$), pozitív ionmódban pedig a pozitív töltésű molekulaiont ($[M-H]^+$). Az ábrákon feltüntetett m/z értékeket a tömegspektrumból olvashatók le (1. ábra). Az MS^2 mérések során a precursor ion (azaz a fragmentációra kijelölt ion) a molekulaion, MS^3 mérések során pedig a kapott töredék ion van tovább bontva.



1. ábra. DMPC tömegspektrumok. ESI-, injektált térfogat:
1 μ l 67 ppm-s oldatból

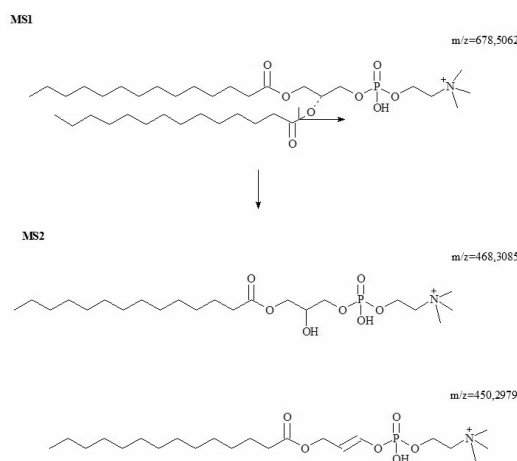
A DMPC fragmentációs vizsgálata során az m/z (tömeg/töltés) értékek alapján meghatározott feltételezett szerkezetek az alábbi ábrákon láthatók (2., 3. ábra).



2. ábra. DMPC fragmentációja. ESI-, injektált térfogat:
1 μ l 67 ppm koncentrációjú oldatból

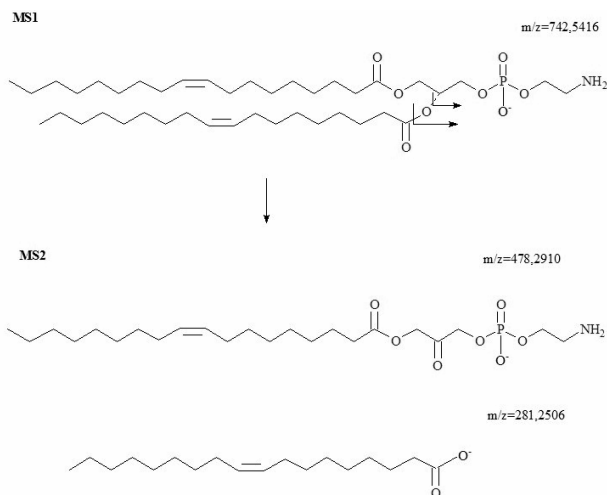
A liposzóma gyártása során felhasznált foszfokolinok csak a zsírsav oldalláncban különböztek egymástól, ezért fragmentációs mechanizmusuk hasonló mind pozitív, mind negatív ionizációs módban. Negatív ionmódban a fragmentáció első lépése a semleges vesztes (NL: neutral loss), melynek során 60 Da tömegű semleges molekula szakad le a molekulaionból (MS^2). Ez a NL a foszfokolinokra jellemző fragmentációs lépés, ami a tömegspektrometriás azonosításukat nagymértékben elősegíti. A második ütközés során zsírsav oldalláncok bomlanak fel, az így kapott m/z érték a zsírsavlánc összetételére ad felvilágosítást.

Pozitív ionmódban történt vizsgálatok során nem történik semleges vesztes, a molekula az észetkötéseknél hasad (3. ábra).



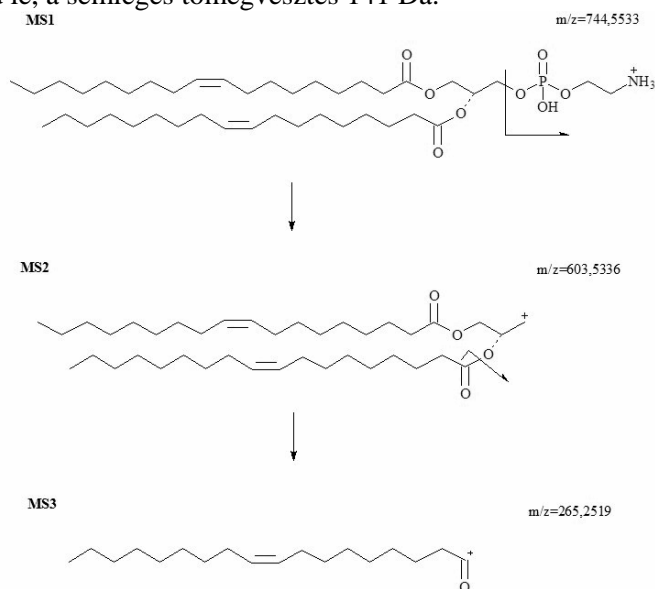
3. ábra. DMPC fragmentációja. ESI+, injektált térfogat: 1 μ l 67 ppm koncentrációjú oldatból

A DOPE és a DOTAP fragmentációja molekulaszervezetükből adódóan eltér a foszfokolinokétól. A semleges vesztes negatív ionmódban már nem jellemző ezekre a lipidekre. A kapott m/z értékek alapján a DOPE fragmentációja és a feltételezett molekulaszervezetek az alábbi ábrákon láthatók (4., 5. ábra):



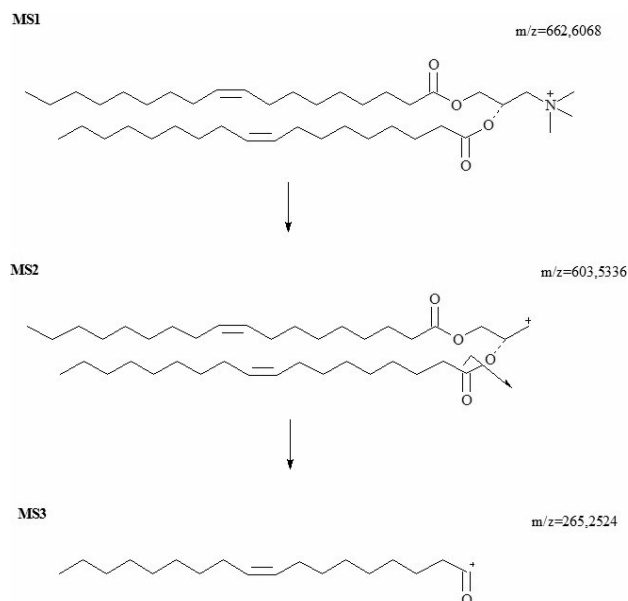
4. ábra. DOPE fragmentációja. ESI-, injektált térfogat 0,5 μ l 60 ppm koncentrációjú oldatból

A foszfoetanolaminokra is jellemző a semleges vesztés, de eltérően a foszfokolinoktól, nem negatív, hanem pozitív ionmódban. Ebben az esetben a lipid fejrésze szakad le, a semleges tömegvesztés 141 Da.



5. ábra. DOPE fragmentációja. ESI+, injektált térfogat 0,5 μ l 60 ppm koncentrációjú oldatból

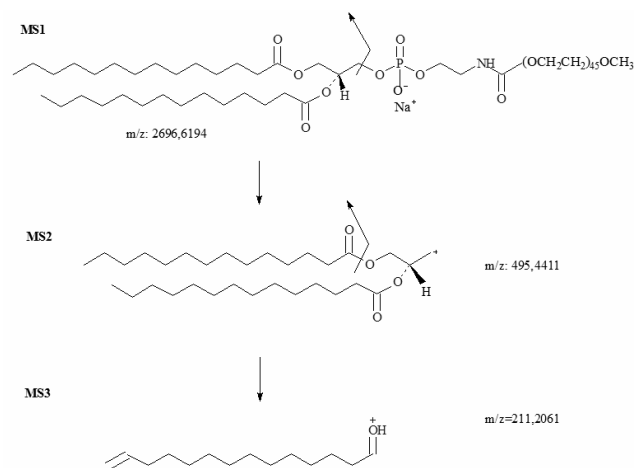
A DOTAP fragmentációját pozitív ionmódban vizsgáltuk, negatív ionizációs módszerrel nem kaptunk jellemző értékeket. A mért tömegek alapján az alábbi fragmentációs szerkezetek valószínűsíthetők (6. ábra):



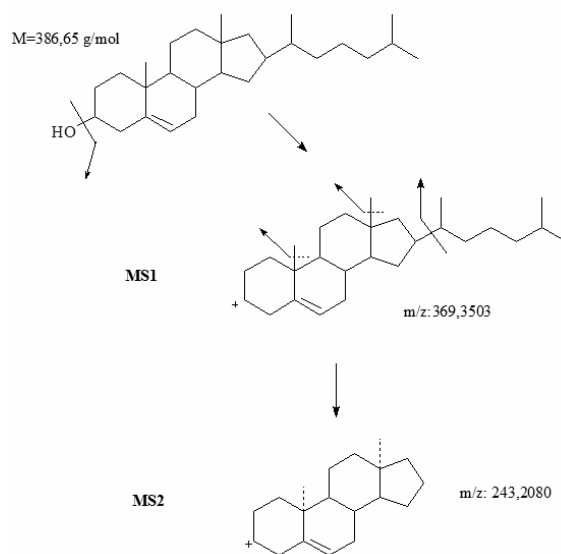
6. ábra. DOTAP fragmentációja. ESI+, injektált térfogat 0,5 μ l 65 ppm koncentrációjú oldatból

A pegilált foszfolipid vizsgálatokor a fragmentáció első lépésében a molekula poláris fejrésze szakad le a poliglikol oldallánccal együtt (7. ábra). Az azonosításhoz a zsírsav oldallánccok fragmentációját vizsgáltuk.

A koleszterinvizsgálatát pozitív ionizációs módban hajtottuk végre. Ebben az esetben a tömegspektrometriás mérés érzékenysége kisebb, mint a fent említett lipideké a molekulának szénhidrogénekhez hasonló szerkezete miatt. Ezáltal a fragmentációs vizsgálatokhoz az injektálás térfogatát növelni kellett. Az azonosításhoz az alábbi m/z értékeket mértük (8. ábra):



7. ábra. PEG2000 PE fragmentációja. ESI+, injektált térfogat 1 μ l 62,8 ppm koncentrációjú oldatból



8. ábra. Koleszterin fragmentációja. ESI+, injektált térfogat 1 μ l 62,8 ppm koncentrációjú oldatból

A tömegspektrometriás mérési eredmények nem adnak egyértelmű felvilágosítást az izomerek szerkezetéről. Az MS² mérés során kapott m/z értékből nem lehet következtetni arra, hogy melyik metil-csoport hasadt le a molekuláról. Az ábrán a két szaggatott vonal azt jelzi, hogy a kettő közül az egyik metil-csoport leszakadt, a másik a molekulán maradt. A mérési eredmények azonban elegendőek a koleszterin azonosításához, mivel az eredeti molekulaszervezet visszakövethető a fragmentációs lépésekből.

Összefoglalás

MS/MS méréseket végeztünk el lipidek azonosítása céljából. Az MSⁿ mérések felvilágosítást adnak a lipidek szerkezetéről, így egyszerűen azonosíthatók a mind a liposzómákat felépítő mesterséges lipidek és a sejtek felépítésében fontos szerepet játszó természetes lipidek.

Az ismertett tömegspektrometriás mérési módszer segítségével kromatográfiás elválasztás nélkül is azonosíthatók a lipidek, ami lényegesen lerövidíti a vizsgálati időt.

A továbbiakban kromatográfiás elválasztás során az előállított liposzómákban található lipidek mennyiségi meghatározását tervezzük elvégezni.

Köszönetnyilvánítás

Jelen munka a TÁMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0001 jelű projekt részeként – az Új Magyarország Fejlesztési Terv keretében – az Európai Unió rész támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Irodalomjegyzék

- [1] Ádám, V. és mtsai.: *Orvosi biokémia*. Medicina Kiadó, 2006.
- [2] Bergstrand, N.: *Liposomes fro drug delivery*. Acta Universitatis Upsaliensis, 2003.
- [3] Gregoriadis, G.: *Liposome technology*. Informa Healthcare, 2007.
- [4] Edwards, K. A., Baeumner, A. J.: *Analysis of liposomes*. Talanta, 2006, 1342–1441.
- [5] Gómez-Hens, A., Fernández-Romero J. M.: *Analytical methods for the control of liposomal delivery system*. Trend in Analytical Chemistry, 2006, 167–178.
- [6] Ishida, M., Houjou, T., Nakanishi, H. és mtsai.: *Identification of molecular sepcies of phospholipids by combination of neutral loss survey and MS³*. Shimadzu Application News

