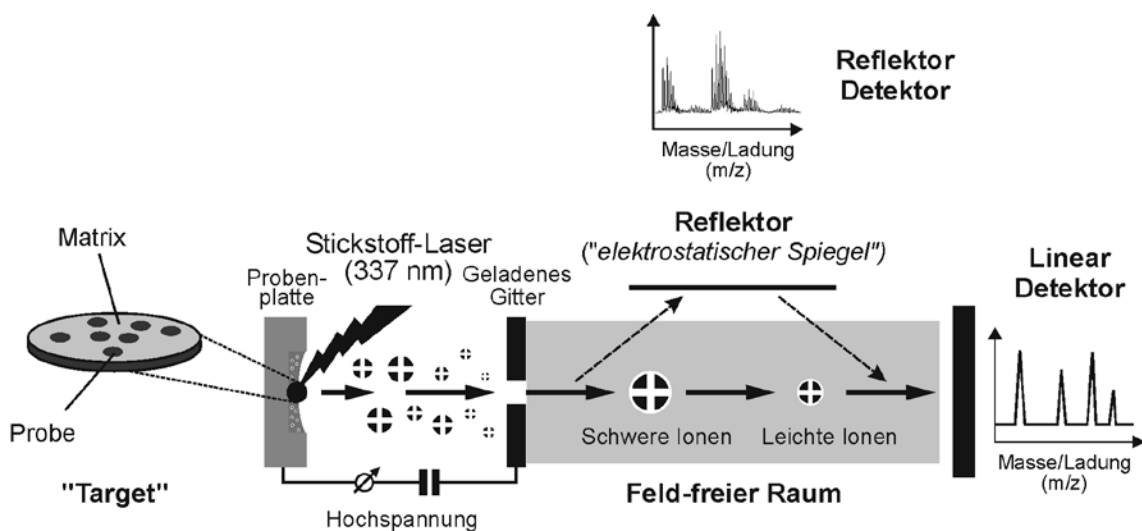


**Praktikum Biophysikalische Chemie  
für den Studiengang Biochemie**

**Versuch MS II:**

**Lipidanalytik mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie  
und Dünnschichtchromatographie  
- Effekt der Ionenunterdrückung**



**Universität Leipzig, Medizinische Fakultät  
Institut für Medizinische Physik und Biophysik  
Härtelstr. 16/18, D-04107 Leipzig**

# Lipidanalytik mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie

Jenny Leopold, Patricia Prabutzki, Kathrin Engel, und Jürgen Schiller

Medizinische Fakultät, Institut für Medizinische Physik und Biophysik,

Härtelstr. 16/18, D-04107 Leipzig

Tel.: 0341-9715722; Fax: 0341-9715709

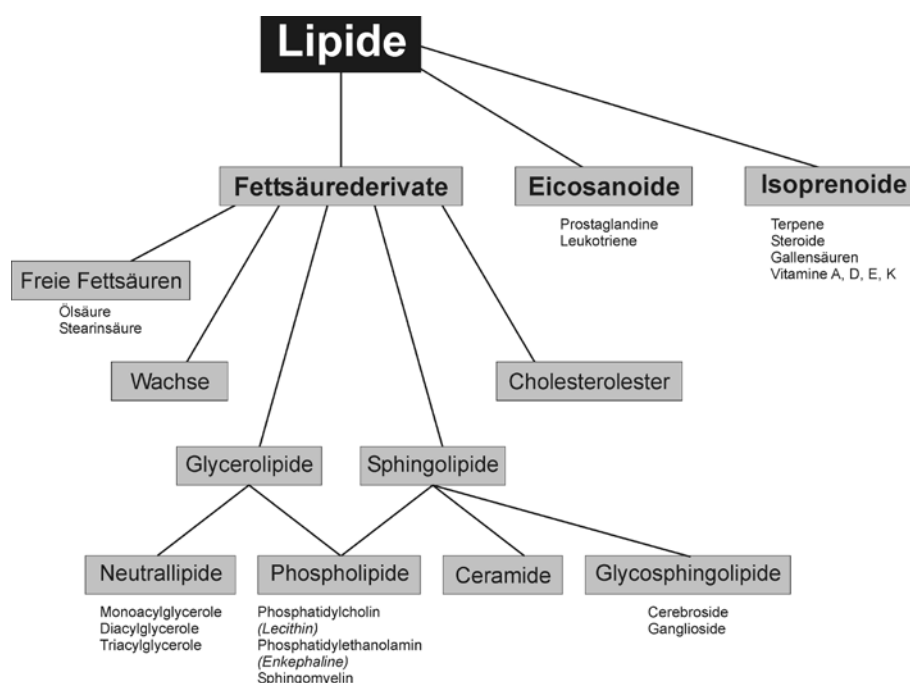
e-mail: jenny.leopold@medizin.uni-leipzig.de

## A. Allgemeine Einführung

### 1. Was sind Lipide und Phospholipide?

Lipide spielen neben Proteinen und Kohlenhydraten eine gewaltige Rolle in der gesamten Biologie [1]. Obwohl sie in der Vergangenheit häufig etwas stiefmütterlich behandelt wurden, kann man heute als gesichert annehmen, daß Lipide u.a. bei vielen Erkrankungen eine sehr wichtige Rolle spielen (z.B. bei der Arteriosklerose) [2].

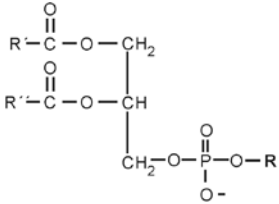
Generell werden unter Lipiden vergleichsweise unpolare Verbindungen verstanden, die z.B. durch organische Lösungsmittel (in der Regel Hexan oder Chloroform) aus biologischen Proben extrahiert werden können. Lipide unterscheiden sich also von den meisten anderen Verbindungen dadurch, daß sie hydrophob bzw. lipophil ("fettliebend") sind. Eine Übersicht der natürlich vorkommenden Lipide zeigt **Abb. 1**:



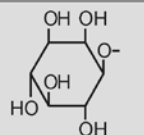
**Abb. 1:** Übersicht über die natürlich vorkommenden Lipide. Unter Lipiden werden in dem Schema ganz generell hydrophobe Verbindungen verstanden. Bitte beachten Sie die große Variationsbreite der Lipide.

Wir werden uns im folgenden ganz überwiegend für die sogenannten "Phospholipide" (PL) und hier wiederum für die Glycerophospholipide interessieren. Diese Verbindungen machen zwar im Gegensatz zu den klassischen Speicherfetten, d.h. den Triacylglycerolen (TAG) und auch dem Cholesterol nur einen mengenmäßig sehr geringen Anteil der Lipide im Organismus aus, besitzen aber dennoch überragende Bedeutung. So sind sie aufgrund ihres amphiphilen Charakters (sie besitzen einen polaren und einen apolaren Anteil) z.B. wesentlich am Aufbau von biologischen (Zell)-Membranen beteiligt. Darüber hinaus spielen Phospholipide oder davon abgeleitete Verbindungen eine große Rolle als "second messenger Moleküle" bei der Signaltransduktion.

Die Strukturen der wichtigsten Glycerophospholipide sind in **Abb. 2** dargestellt:



**R = Kopfgruppe des PL**  
**R', R'' = Verschiedene Fettsäurereste**

Rest -R	Klasse	Rest -R	Klasse
-H	Phosphatidsäure (PA)	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Phosphatidylserin (PS)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Phosphatidylethanolamin (PE)	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	Phosphatidylglycerol (PG)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholin (PC)		Phosphatidylinositol (PI)

**Abb. 2:** Übersicht über die wichtigsten Klassen von Glycerophospholipiden.

Dabei unterscheidet man in der Regel zwischen neutralen (PE und PC) und sauren Phospholipiden, d.h. Verbindungen, die bei annähernd neutralem pH-Wert (das Blut des gesunden Menschen besitzt einen pH-Wert von ca. 7.4) eine negative Ladung besitzen (PA, PS, PG, PI). Die Lipidzusammensetzung schwankt je nach Zell- oder Gewebetyp ganz beträchtlich. Jedoch kann davon ausgegangen werden, daß PC in den meisten biologischen Gewebe den größten Teil der PL ausmacht [1].

Der in den Phospholipiden enthaltene Fettsäurerest kann in weiten Grenzen variieren, wobei sowohl die Kettenlänge, d.h. die Zahl der C-Atome als auch der Gehalt an Doppelbindungen (Sättigungsgrad) stark schwanken. Da die Synthese der PL jedoch immer aus Acetyl-Coenzym A erfolgt, besitzen alle physiologisch relevanten Phospholipide immer Fettsäurereste mit einer geraden Anzahl von C-Atomen. Einen Überblick über die wichtigsten Fettsäuren gibt **Tab. 1**:

**Tab. 1:** Übersicht über die wichtigsten, physiologisch relevanten Fettsäuren, die Position der Doppelbindungen, ihr Trivialname und Molekulargewicht.

Zahl an C-Atomen	Anzahl und Position der enthaltenen Doppelbindungen	Trivialname	Molekulargewicht	Massendifferenz zu 16:0
14	0	Myristinsäure	228.209	-28
16	0	Palmitinsäure	256.240	0
18	0	Stearinsäure	284.272	+28
18	1 (cis - $\Delta^9$ )	Ölsäure	282.256	+26
18	2 (cis,cis - $\Delta^9, \Delta^{12}$ )	Linolsäure	280.240	+24
18	3 (all cis - $\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$ )	Linolensäure	278.225	+22
20	4 (all cis - $\Delta^5, \Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ )	Arachidonsäure	304.240	+48
22	6 (all cis - $\Delta^4, \Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}, \Delta^{19}$ )	Docosahexaensäure	328.240	+72

Die vollständige und eindeutige Bezeichnung eines Phospholipids lautet z.B. 1-Stearoyl-2-linoleoyl-*sn*-phosphatidylcholin. Zur Abkürzung verwendet man hier in der Regel auch Bezeichnungen wie "SLPC" oder "PC 18:0/18:2". Die verwendeten Zahlen geben hierbei die Zahl der C-Atome bzw. die Zahl der Doppelbindungen (hinter dem Doppelpunkt) an. Natürlich vorkommende Phospholipide besitzen in 1-Position in der Regel immer einen vollständig gesättigten Fettsäurerest, während sich in 2-Position normalerweise eine ungesättigte Fettsäure befindet. Von dieser Faustregel wollen wir im folgenden stets ausgehen, da mittels Massenspektrometrie (in der Regel) lediglich eine Unterscheidung hinsichtlich des Molekulargewichtes, aber nicht der entsprechenden Position eines bestimmten Fettsäurerestes möglich ist (s. unten) [3].

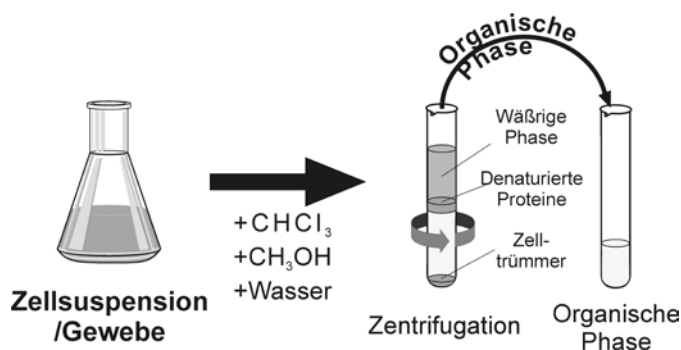
## 2. Lipidanalytik

Die bei Lipiden etablierten Prozeduren sind - im Vergleich etwa zu den Proteinen - weit weniger genau definiert bzw. standardisiert [4]. Dennoch lassen sich auch hier unterschiedliche Schritte eindeutig unterscheiden:

### 2.1. Extraktion der Lipide

In der Regel werden die Lipide zunächst aus den entsprechenden Körperflüssigkeiten (z.B. Blutplasma) oder Geweben (z.B. Leber) durch Anwendung organischer Lösungsmittel extrahiert, d.h. von den polareren Verbindungen wie z.B. Proteinen oder Kohlenhydraten abgetrennt. Dazu werden Gemische organischer Lösungsmittel wie z.B. Chloro-

form/Methanol oder Hexan/Isopropanol eingesetzt. Am weitesten verbreitet ist dabei das System  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ : Chloroform ist mit Wasser nicht mischbar, wodurch sich ein 2-Phasensystem bildet (**Abb. 3**): In der unteren, organischen Phase sammeln sich die Lipide, während in der oberen, wässrigen Phase ( $+\text{CH}_3\text{OH}$ ) die polareren Moleküle wie auch ein Großteil der Ionen verbleiben.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Extraktion von Lipiden aus biologischen Materialien. Bitte beachten Sie:  $\text{CHCl}_3$  hat eine größere Dichte als Wasser und findet sich deshalb immer "unten"! Aufgrund seiner Polarität ist das Methanol überwiegend in der  $\text{H}_2\text{O}$ -Phase.

## 2.2. Trennung der erhaltenen Lipide in die einzelnen Unterklassen

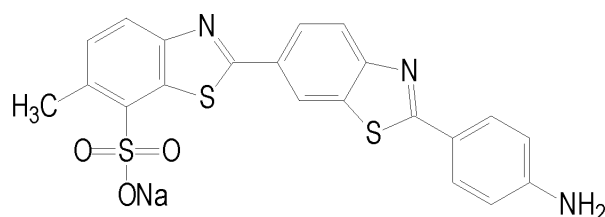
Für die meisten analytischen Anwendungen ist es notwendig die in dem erhaltenen Lipid-Rohextrakt vorhandenen Lipide in die einzelnen Klassen aufzutrennen, d.h. den Extrakt zu "fraktionieren". Dazu werden in der Regel chromatographische Verfahren wie z.B. die Dünnschichtchromatographie (TLC, "Thin-layer chromatography") [5] oder die Säulenchromatographie [3] eingesetzt. Die optimale Trennmethode zu finden setzt hier große Erfahrung voraus und hängt in entscheidendem Maße von der Art des Lipidgemisches ab. Da wir lediglich die TLC einsetzen werden, soll nur auf dieses Verfahren näher eingegangen werden:

Zur TLC werden in aller Regel mit Kieselgel beschichtete Kunststoff-, Aluminium-, oder Glasplatten als stationäre Phase verwendet. Die zu analysierenden Lipide werden in einem möglichst leicht flüchtigen, organischen Lösungsmittel wie z.B. Chloroform oder Hexan gelöst und anschließend mit einer Mikroliterspritze auf einer vorher markierten Linie auf die TLC-Platte aufgebracht. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird die so vorbereitete Platte in eine mit "Laufmittel" gesättigte Kammer gebracht.

Steht die Platte in Kontakt mit dem Laufmittel, so beginnt das Laufmittel aufgrund der Kapillarkräfte in der Kieselgelschicht zu wandern. Dabei werden die einzelnen Komponenten des zu trennenden Lipidgemisches entsprechend ihrer Affinität zur stationären Phase unterschiedlich stark vom Laufmittel "mitgenommen". Dies führt dazu, daß unpolare Lipide (z.B. Triacylglycerole) unter identischen Bedingungen wesentlich weiter wandern als die viel polareren Phosphatidylcholine.

Hat die Laufmittelfront fast den oberen Rand der Platte erreicht, wird die Chromatographie abgebrochen. Nach dem Trocknen der Platte werden die (farblosen) Lipide durch Besprühen mit einem Farbstoff sichtbar gemacht. Wir wollen dazu den Farbstoff Primulin (Strukturformel in **Abb. 4**) einsetzen. Dieser Farbstoff bindet nicht-kovalent an die unpolaren

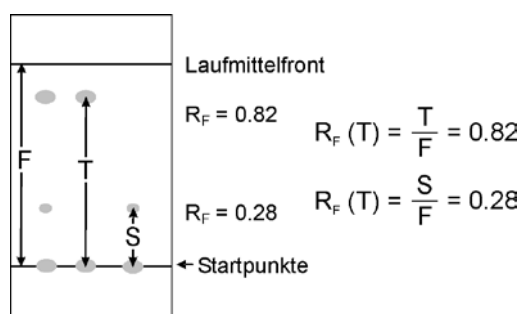
Reste von Lipiden, die anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können ( $\lambda_{\max}$  der Emission  $\sim 365$  nm) [6].



**Abb. 4:** Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes "Primulin"

Der besondere Vorteil dieses Farbstoffes liegt darin, daß er bei Verwendung eines geeigneten Lösungsmittels wieder ohne Zerstörung des Lipids abgelöst werden kann. Somit können die einzelnen Lipidklassen nach ihrer Trennung mittels TLC unmittelbar für die Massenspektrometrie verwendet werden.

Ein wichtiger Begriff bei der TLC ist der sogen. "R<sub>F</sub>-Wert" ("ratio of fronts"), der zur Charakterisierung der einzelnen Fraktionen verwendet wird. Darunter versteht man den Quotienten aus der zurückgelegten Strecke der Substanz und der Strecke des Laufmittels (vgl. **Abb. 5**):



**Abb. 5:** Illustration zur Berechnung des R<sub>F</sub>-Wertes anhand einer schematisierten TLC-Platte

### 2.3. Quantitative Bestimmung der Phospholipide

Hat man die einzelnen PL-Klassen voneinander getrennt, so erfolgt in der Regel eine Konzentrationsbestimmung der PL in den einzelnen Fraktionen. Der klassische Weg ist hier die Bestimmung des Phosphatgehaltes, der über biochemische Techniken sehr präzise und sensitiv erfolgen kann [7]. Dazu wird das entsprechende PL zunächst durch oxidierende Säuren vollständig in Phosphat überführt und dieses anschließend quantitativ bestimmt. Dann gilt: 1 Phosphat = 1 Phospholipidmolekül.

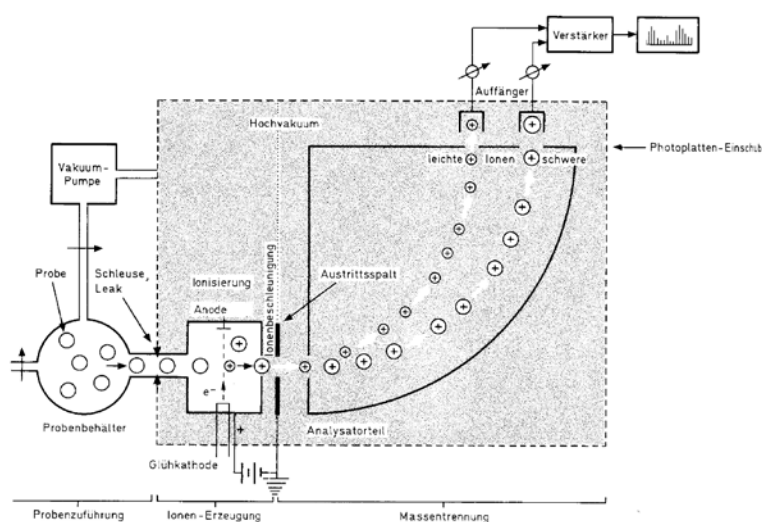
Natürlich ist auch die sogen. "densitometrische" Auswertung der TLC-Platten direkt möglich. Dabei wird die Platte "eingescant" und digitalisiert. Die Quantifizierung erfolgt dann über die Intensitäten der einzelnen "Flecke".

Mit den bislang genannten Verfahren lassen sich zwar die einzelnen PL-Klassen quantitativ bestimmen, allerdings ist eine Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung nur unter sehr großen Mühen möglich. In diesem Zusammenhang hat sich die Etablierung geeigneter massenspektrometrischer Techniken als außerordentlich hilfreich erwiesen. Die Massenspektrometrie ist außerdem eine extrem sensitive Technik und ermöglicht es mit nur sehr geringen Materialmengen auszukommen [8].

### 3. Massenspektrometrische Lipidanalytik

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein vergleichsweise altes analytisches Verfahren [8] und wurde bereits gegen Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt. Bei der MS wird die Masse von Ionen bestimmt. Dabei lassen sich generell zwei Schritte, die eigentliche Erzeugung von Ionen in der sogenannten Ionenquelle und ihre anschließende Trennung bzw. die Detektion voneinander unterscheiden. Die klassische Methode zur Generierung von Ionen ist der Beschuß der (zuvor verdampften) Probe mit Elektronen (Electron Impact, EI) in der Gasphase (Elektronenstoßionisation). Allerdings ist diese Technik durch zwei Randbedingungen erheblich limitiert, da (a) die Substanz ohne Zersetzung zu verdampfen sein muß und (b) die gebildeten Ionen eine genügende Stabilität aufweisen müssen, um den Detektor erreichen zu können.

Dabei werden - wenn die notwendige Ionisierungsenergie überschritten wird - Elektronen aus dem Analytmolekül "herausgeschlagen" und es entstehen positiv geladene Radikalkationen, die über ein ungepaartes Elektron verfügen. Da bewegte elektrische Ladungen in einem Magnetfeld abgelenkt werden, kann auf diese Weise das entsprechende Molekulargewicht bestimmt werden. Eine schematisierte Darstellung eines "klassischen" Massenspektrometers zeigt **Abb. 6**:



**Abb. 6:** Typische Anordnung bei der "klassischen" MS mit Elektronenstoß-Ionisation und Detektion der gebildeten Ionen in einem Magnetfeld.

Diese Art der MS wird auch heute noch eingesetzt (insbesondere in Kombination mit der Gaschromatographie (GC)), da hier die Ionenausbeute im wesentlichen durch die Ionisierungsenergie bestimmter funktioneller Gruppen gegeben ist: Da z.B. die Ionisierungsenergie von Fettsäuren durch die Carboxylgruppe bestimmt ist und diese in allen Fettsäuren identisch ist, können Fettsäuren mittels EI-MS quantitativ bestimmt werden. Dies ist ein wichtiger Unterschied zu Techniken wie z.B. ESI oder MALDI, da hier die Ionenausbeute mit der Azidität oder Basizität der einzelnen Verbindungen (in einem Gemisch) gewichtet ist.

Die zugrunde liegenden physikalischen Gesetzmäßigkeiten lassen sich wie folgt wiedergeben:

**a) Elektrische Energie = Kinetische Energie:**

$$z = \text{Ladungszahl} \times \text{Elementarladung}$$

$$E_{\text{elek}} = E_{\text{kin}} \Rightarrow z U = \frac{m v^2}{2} \Rightarrow v^2 = \frac{2 z U}{m}$$

**b) Kraft im Magnetfeld = Zentripetalkraft:**

$$F = B z v = \frac{m v^2}{r} \Rightarrow v = \frac{B z r}{m} \Rightarrow v^2 = \frac{B^2 z^2 r^2}{m^2}$$

Gleichsetzen :

$$\frac{B^2 z^2 r^2}{m^2} = \frac{2 z U}{m} \Rightarrow \frac{B^2 z r^2}{m} = 2 U$$

$$\Rightarrow \frac{z}{m} = \frac{2 U}{B^2 r^2} \Rightarrow \frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2 U}$$

Bestimmt wird bei der MS also immer das Masse/Ladungs-( $m/z$ )-Verhältnis. Geht man davon aus, daß das Molekül nur eine einzige Ladung besitzt, dann entspricht dieses Verhältnis genau dem Molekulargewicht. Dabei ist es jedoch wichtig mit den Atommassen und nicht etwa mit den Isotopenmassen zu rechnen:



**Tab. 2:** Atomgewichte und mittlere Atomgewichte verschiedener, physiologisch relevanter Elemente und ihrer verschiedenen Isotope

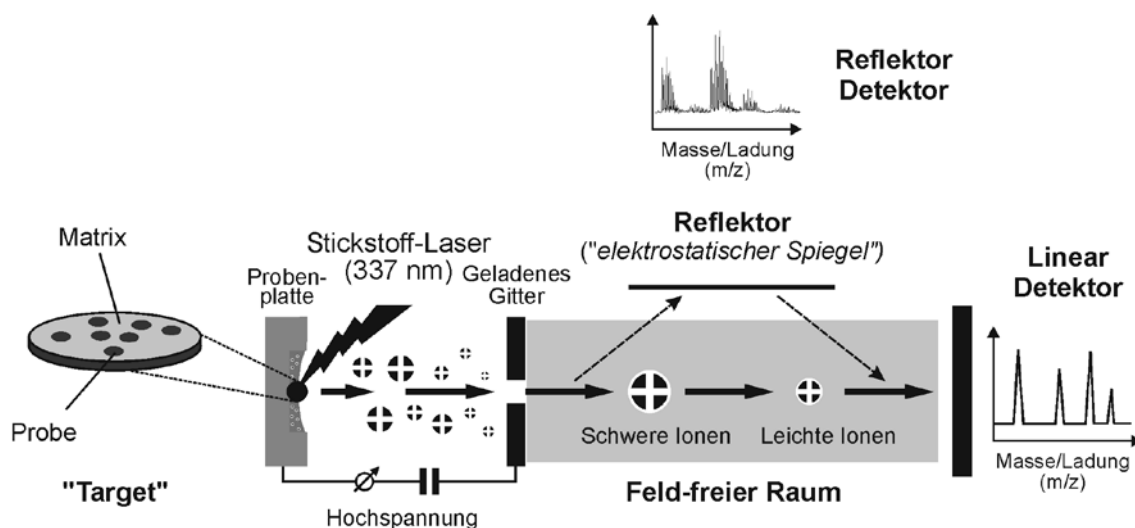
Isotop	Atomgewicht	Mittel über alle Isotope	Weitere stabile Isotope (Vorkommen in %)
<sup>1</sup> H	1.0078250	1.0078250	<sup>2</sup> H (0.015)
<sup>12</sup> C	12.000000	12.011	<sup>13</sup> C (1.110), <sup>14</sup> C (0.001)
<sup>14</sup> N	14.003074	14.007	<sup>15</sup> N (0.366)
<sup>16</sup> O	15.994915	15.999	<sup>17</sup> O (0.038), <sup>18</sup> O (0.200)
<sup>23</sup> Na	22.989769	22.989769	----
<sup>31</sup> P	30.974	30.974	----
<sup>39</sup> K	38.963711	39.089	<sup>40</sup> K (0.012), <sup>41</sup> K (6.73)

Mit dem genannten Verfahren sind jedoch nur Moleküle zu charakterisieren, die über eine ausreichende Flüchtigkeit verfügen und die ohne Zersetzung verdampft werden können. Dies machte die MS bis vor ca. 20 Jahren für die Analytik der meisten biologisch relevanten Moleküle ungeeignet. Erst Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts gelang es sogen. "Soft-Ionization"-Techniken zu etablieren, die diese Nachteile ausgleichen konnten. Von den beiden wichtigsten Verfahren, der "electrospray" (ESI) und der "MALDI"-Technik werden wir hier ausschließlich das MALDI-Verfahren zur Analytik von Lipiden einsetzen. Es soll noch darauf hingewiesen werden, daß sowohl die Erfindung von ESI wie auch von MALDI im Jahre 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt wurde.

#### 4. Was ist MALDI-TOF MS?

MALDI-TOF MS ist die Abkürzung für "matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight Massenspektrometrie" und wird heute - insbesondere für die Analytik von Proteinen - sehr häufig eingesetzt [9]. Das Verfahren nutzt einen Laser zur Verdampfung der Probe. Dabei werden vor allem Stickstoff-Laser eingesetzt, da sie relativ kostengünstig sind und im Betrieb recht reibungslos arbeiten. Diese Laser emittieren bei  $\lambda = 337$  nm. Bei weitem nicht alle Proben absorbieren jedoch auch bei dieser Wellenlänge. Deshalb hat man

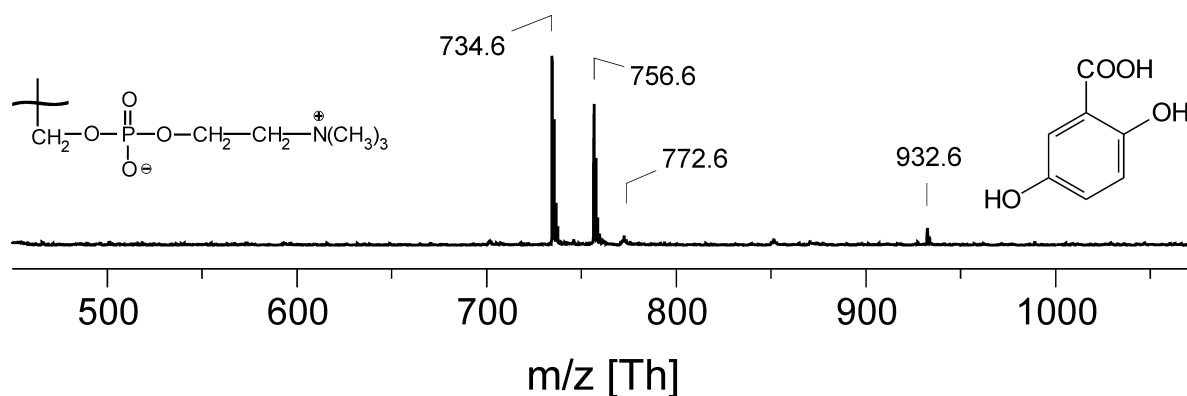
sich folgenden "Trick" einfallen lassen: Man setzt der zu untersuchenden Probe eine geeignete "Matrix" zu. Dies ist ein (in der Regel kleines, organisches) Molekül, das bei der angegebenen Wellenlänge die Energie des Lasers absorbiert. Dadurch wird die Probe "heiß" und verdampft. Analytmoleküle werden dabei "mitgerissen". Eine sehr vereinfachte Skizze des MALDI-Prozesses zeigt **Abb. 7**:



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Prozesse bei der MALDI-TOF MS (Ionen-erzeugung und Detektion)

Durch Stöße zwischen der zu untersuchenden Substanz und der Matrix bzw. einem zuge-setzten Hilfsmedium (z.B. einer organischen Säure) bzw. von vorneherein enthaltenen Ionen kommt es zur Bildung von Ionen, die zunächst in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und anschließend in einem feldfreien Raum sich selbst überlassen werden. Dabei erfolgt eine Trennung gemäß des  $m/z$ -Verhältnisses: Leichte Ionen erreichen den Detektor schneller als schwerere und können auf diese Weise getrennt werden. Da die Massentrennung sehr wesentlich von der freien Flugstrecke abhängig ist, erreicht man eine höhere Massenauflösung durch Verlängerung der Flugstrecke. Um dennoch möglichst kleine Geräte konstruieren zu können, wird ein spezieller "Umlenkspiegel" (Reflektor-Detektor) verwendet, der die Flugstrecke verlängert.

In **Abb. 8** ist das Positiv-Ionen MALDI-TOF-Massenspektrum von 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholin dargestellt, um einen Eindruck zu vermitteln wie Massenspektren von Lipiden aussehen und wie sie interpretiert werden müssen:



**Abb. 8:** Positiv-Ionen MALDI-TOF MS von DPPC (PC 2×16:0). Das Spektrum wurde mit einem  $\mu\text{g}$  Lipid und DHB als Matrix aufgenommen. Alle Peaks sind entsprechend des  $m/z$ -Verhältnisses gekennzeichnet. Die charakteristische Kopfgruppe von PC wie auch die Struktur von DHB sind ebenfalls gezeigt. "Th" ist die Abkürzung für "Thompson", die Einheit des  $m/z$ -Verhältnisses.

Das Molekulargewicht dieses Lipids im neutralen Zustand beträgt 733.6 g/mol. Man erkennt 3 deutlich voneinander getrennte Peakgruppen, wobei das intensivste Signal jeweils bei  $m/z = 734.6$ , 756.6 bzw. 772.6 liegt. Dieses intensivste Signal entspricht der Verbindung, die ausschließlich die jeweils häufigsten Isotope enthält ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{23}\text{Na}$  und  $^{31}\text{P}$ ), während der Peak im Abstand von einem Dalton ein schwereres Isotop (wahrscheinlich  $^{13}\text{C}$  aufgrund seiner höchsten natürlichen Häufigkeit), der Peak im Abstand 2 Da zwei schwerere Isotope usw., enthält.

Zur Vereinfachung sollen hier nur die jeweils intensivsten Peaks betrachtet werden. Diese Peaks entsprechen der Anlagerung unterschiedlicher Kationen, wodurch einfach geladene DPPC-Addukte mit charakteristischen Massendifferenzen im Vergleich zum neutralen DPPC entstehen. Die Anlagerung eines Protons entspricht einer Massendifferenz von 1 Da, die eines Natrium-Ions 23 Da und die Anlagerung eines Kalium-Ions schließlich 39 Da. Die Intensität der unterschiedlichen Addukte ist im wesentlichen durch den Kationen-Gehalt der verwendeten Lösungen bestimmt und somit gewissen Schwankungen unterworfen [10]. Der Peak bei  $m/z = 932.6$  entspricht schließlich einem sogen. Cluster-Ion aus einem Matrix-Molekül (bei dem zwei Protonen gegen Natrium-Ionen ausgetauscht sind, d.h. MG = 198) und dem Protonaddukt des DPPC.

Eine sehr ausführliche Arbeit zum gegenwärtigen Stand der Lipid- bzw. Phospholipidanalytik mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie findet sich in [11]. Ein vergleichbarer Review zur ESI-Problematik hingegen in [12].

## B. Experimenteller Teil

**Folgende Fragen sollen beantwortet werden:**

- 1. Werden alle Lipide mit der gleichen MS-Empfindlichkeit nachgewiesen?**
- 2. Ist die Summe der Spektren der einzelnen Fraktionen gleich dem Gemischspektrum?**

Bitte beachten Sie bei allen Arbeiten im Labor:

- Die zur Anwendung kommenden Chemikalien bzw. Lösungsmittel sind gesundheitsschädlich (dies gilt vor allem für Chloroform, das verdächtigt wird krebserregend zu sein!).
- Vermeiden Sie Berührungen mit **ALLEN** Chemikalien bzw. Lösungsmitteln. Dies gilt insbesondere für die Augen.
- Obwohl wir bei allen Experimenten nur mit sehr geringen Mengen an Chemikalien bzw. Lösungsmitteln arbeiten werden, sollten Sie darauf achten, sich den Lösungsmitteldämpfen nur kurz auszusetzen. Das heißt: Bitte schließen Sie die entsprechenden Vorratsflaschen unmittelbar nach Entnahme wieder sorgfältig.
- Chloroform ist ein "aggressives" Lösungsmittel und darf **NICHT** in Kunststoffgefäße gefüllt werden! Aus dem gleichen Grund verbietet sich das Pipetieren mit Kunststoff-Pipetten ("Eppendorf-Pipetten"). Verwenden Sie ausschließlich Spritzen aus Glas (sogen. "Hamilton"-Spritzen).

### 1. Lipidextraktion

Untersucht werden sollen (a) eine Avocado, (b) ein Stück Rinderleber und c) ein Eigelb. Zur Entfernung polarer Bestandteile sowie zur Anreicherung der apolaren Bestandteile (Lipide bzw. Phospholipide) ist dazu zunächst eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln erforderlich:

- Schneiden Sie die Avocado bzw. die Leber in möglichst kleine Stücke, das Eigelb wird homogenisiert.
- Wägen Sie jeweils ungefähr 0.5 g in ein Reagenzglas mit Schliff ein.
- Geben Sie 1 ml destilliertes Wasser, 1 ml Chloroform und 1 ml Methanol zu (Extraktion gemäß "Bligh & Dyer") [13].
- Vortexen Sie die Proben gründlich (ca. 1 min) lang.

- Füllen Sie die Probe in ein Zentrifugenröhrchen um und zentrifugieren Sie die Probe (20°C, 2500 U/min, 8 min) um die Phasentrennung zu beschleunigen.
- Entnehmen Sie mit einer Hamilton-Spritze (vorsichtig!) die untere (CHCl<sub>3</sub>) Phase und überführen Sie diese in ein anderes Gefäß.

## 2. Trennung der Lipidextrakte mittels TLC

Die Trennung der drei Lipid-Gesamtextrakte in die einzelnen Lipidklassen erfolgt an 10×10 cm HPTLC-("high performance thin-layer chromatography")-Kieselgel 60 Platten.

Als "Laufmittel" verwenden Sie ein Gemisch aus Chloroform, Ethanol, Wasser und Triethylamin (30:35:7:35 v/v/v/v).

- Tragen Sie jeweils ca. 5 µl der drei Lipidextrakte im Abstand von ca. 1 cm vom unteren Rand und im Abstand von ca. 1,2 cm voneinander auf die TLC-Platte auf (Bitte achten Sie darauf, daß Sie die Beschichtung der Platte mit der Spritze nicht beschädigen).
- Neben den drei Lipidextrakten tragen Sie je 1 µl Stammlösung (10 mg/ml) der folgenden Lipidstandards auf: PC 16:0/18:1 (a), PE 16:0/18:1 (b), und Triacylglycerol (TAG) 3×18:1 (Triolein) (c).
- Legen Sie die präparierte Platte in die mit dem Laufmittel gefüllte Entwicklungskammer. Die Trennung der Proben ist nach ca. 45 Minuten beendet.
- Nehmen Sie die Platte aus der Entwicklungskammer und trocknen Sie die Platte mit dem Fön.
- Besprühen Sie die Platte mit Primulin-Lösung (Direct Yellow 59) in Aceton/H<sub>2</sub>O (80:20 (v/v), 50 mg/l). Trocknen Sie die Platte.
- Unter dem UV-Betrachter (366 nm) erkennen Sie an den Stellen, wo der Farbstoff gebunden hat, violette Flecke. Markieren Sie diese Stellen indem Sie die Flecke mit Bleistift umkreisen. Durch Vergleich mit den Standards identifizieren Sie die jeweiligen Fraktionen in den Gewebeproben.
- Kratzen Sie die Spots von PC und PE des Leber- und Eigelbextraktes mit einem Spatel vorsichtig von der Platte ab und überführen Sie das Kieselgel in ein kleines Glasgefäß.
- Eluieren Sie die Lipide vom Kieselgel mit einem Gemisch aus 65 µl CHCl<sub>3</sub>, 65 µl Methanol und 65 µl 0.9%-iger wässriger NaCl-Lösung.
- Zentrifugieren Sie die Proben kurz um die Phasentrennung zu beschleunigen (5 Minuten bei 3500 U/min).
- Alle erhaltenen Proben werden in der Vakuumzentrifuge "Speed-Vak" zur Trockne eingedampft und mit 5 µl CHCl<sub>3</sub> wieder aufgenommen.

### 3. MALDI Präparation

- Als Matrix für die MALDI-TOF MS wird 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet. Stellen Sie sich bitte eine 0.5 M (77.06 mg/ml) Lösung von DHB in Methanol (CH<sub>3</sub>OH) her.
- Mischen Sie in einem kleinen Glasröhrchen 5 µl der auch bei der TLC als Standard verwendeten Lipidlösungen (1 mg/ml) mit 10 µl der Matrix-Lösung und mischen Sie sorgfältig (Vortexer).
- Tragen Sie auch die drei Lipid-Gesamtextrakte sowie die nach der Trennung erhaltenen Fraktionen auf.

Probe	Position auf Target
Standard PC (POPC)	
Standard PE (POPE)	
Standard Triolein	
Gesamtextrakt Leber	
Gesamtextrakt Avocado	
Gesamtextrakt Eigelb	
PE-Fraktion Leber	
PC-Fraktion Leber	
PE-Fraktion Eigelb	
PC-Fraktion Eigelb	

### 4. Durchführung der MALDI-TOF MS

- Nehmen Sie zunächst die Spektren der Standardlipide (Detektionsmodus: Positiv Ionen) auf. Vergleich Sie die Anzahl der erhaltenen Peaks der einzelnen Verbindungen. Was fällt Ihnen beim Vergleich von PE/PC bzw. TAG/PC auf?
- Messen Sie nun die Gesamtlipidextrakte der Avocado, der Leber sowie des Eigelbs. Können Sie einzelne Peaks zuordnen? **Detektieren Sie PE und PC (in der Leber und im Eigelb) mit vergleichbarer Empfindlichkeit?**
- Betrachten Sie schließlich die Spektren der isolierten Fraktionen des Leber- und des Eigelbextraktes. Geben Sie die Fettsäurezusammensetzung von PC und PE durch Vergleich mit den bereitgestellten Massentabellen an.

**Peakzuordnung für die PE-Fraktion:**

Verbindung	m/z (M + H <sup>+</sup> )	m/z (M + Na <sup>+</sup> )	m/z (M - H <sup>+</sup> + 2 Na <sup>+</sup> )
PE 16:0;18:1	718.5	740.5	762.5
PE 18:0;18:1	746.5	768.5	790.5
PE 16:0;20:4	740.5	762.5	784.5
PE 18:0;20:4	768.5	790.5	812.5
PE 16:0;22:6	764.5	786.5	808.5
PE 18:0;22:6	792.5	814.5	836.5

**Peakzuordnung für die PC-Fraktion:**

Verbindung	m/z (M + H <sup>+</sup> )	m/z (M + Na <sup>+</sup> )
PC16:0;16:0	734.6	736.6
PC 16:0;18:2	758.6	780.6
PC 16:0;18:1	760.6	782.6
PC 16:0;18:0	762.6	784.6
PC 16:0;20:4	782.6	804.6
PC 18:0;18:2	786.6	808.6
PC 18:0;18:1	788.6	810.6
PC 18:0;18:0	790.6	812.6
PC16:0;22:6	806.6	828.6
PC 18:0;20:4	810.6	832.6
PC 18:0;22:6	834.6	856.6

**Peakzuordnung für die TAG-Fraktion:**

Verbindung	m/z (M + Na <sup>+</sup> )
TAG 48:0	829.7
TAG 50:2	853.7
TAG 50:1	855.7
TAG 50:0	857.7
TAG 52:2	881.8
TAG 52:1	883.8
TAG 52:0	885.8
TAG 54:4	905.8
TAG 54:3	907.8
TAG 54:2	909.8

## Literatur:

- [1] Stryer, L.: Biochemie, Vieweg, Braunschweig, 1987.
- [2] Libby, P.: Atherosklerose als Entzündung. Spektrum der Wissenschaft. **2002**, Heft 7, 48-59.
- [3] Lottspeich, F., Zorbas, H.: Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
- [4] [www.cyberlipid.org](http://www.cyberlipid.org)
- [5] Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., Schiller, J.: Lipid analysis by thin-layer chromatography - a review of the current state. *J Chromatogr A* 2011, **1218**: 2754-274.
- [6] White, T., Bursten, S., Frederighi, D., Lewis, R.A., Nudelman, E.: High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipid species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* 1998, **10**: 109–117.
- [7] Chen, P. S., Toribara, T. Y., Warner, H.: Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1956, **11**: 1756–1758.
- [8] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie, Thieme, Stuttgart, 2005.
- [9] Schiller, J., Arnold, K.: Mass spectrometry in structural biology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry (ed. by Meyers, R.A.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, 559-585.
- [10] Schiller, J., Arnhold, J., Benard, S., Müller, M., Reichl, S., Arnold, K.: Lipid analysis by matrix-assisted-laser desorption and ionization mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) - A methodological approach. *Anal. Biochem.* 1999, **267**: 46-56.
- [11] Engel, K.M., Prabutzki, P., Leopold, J., Nimptsch, A., Lemmnitzer, K., Vos, D.R.N., Hopf, C., Schiller J.: A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog. Lipid Res.* 2022; **86**: 101145.
- [12] Pulfer, M., Murphy, R.C.: Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom. Rev.* 2003, **22**: 332-364.
- [13] Bligh, E.G., Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, **3**: 911–917.