

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kryštof Pelcl

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Izomery lipidů a analytické možnosti pro jejich rozlišení

Kryštof Pelcl

Bakalářská práce  
2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kryštof Peld**  
Osobní číslo: **C20435**  
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**  
Téma práce: **Izomery lipidů a analytické možnosti pro jejich rozlišení**  
Téma práce anglicky: **Lipid isomers and analytical options for their distinguishing**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. V první části popište jednotlivé typy izomerií u lipidů a diskutujte rovněž jejich biologickou důležitost.
2. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analytické přístupy (ve většině případech založených na hmotnostní spektrometrii), které se využívají pro rozlišení izomerů lipidů.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- 'W. Zhang, R. Jian, J. Zhao, Y. Liu and Y. Xia, Deep-lipidotyping by mass spectrometry: recent technical advances and applications. *Journal of Lipid Research* 2022, 63, 100219.
- 'R. A. Harris, K. L. Leaptrot, J. C. May and J. A. McLean, New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2019, 116, 316-323.
- 'F. Xia and J.-B. Wan, Chemical derivatization strategy for mass spectrometry-based lipidomics. *Mass Spectrometry Reviews* 2023, 42, e21729.
- 'H. Lu, H. Zhang, S. Xu and L. Li, Review of Recent Advances in Lipid Analysis of Biological Samples via Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Metabolites* 2021, 11, 781.
- 'Další odborné články týkající se dané problematiky dostupné na WOS databázi.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Robert Jirásko, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

LS.

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem “Izomery lipidů a analytické možnosti pro jejich rozlišení“ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2023

Kryštof Pelel

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady, jeho trpělivost a věnovaný čas při zpracování této práce. Zvláštní poděkování patří mé rodině a mé přítelkyni za podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá izomerií lipidů, jejich rolí v různých onemocněních a metodami pro jejich detekci v biologických vzorcích. V první kapitole jsou shrnuty základní informace o lipidech a jednotlivých izomeriích. Druhá kapitola je zaměřena na popis jejich důležitosti v souvislosti s konkrétními onemocněními. Analytické možnosti pro rozlišení jednotlivých typů izomerů lipidů jsou finálně shrnuty v třetí části, v které jsou diskutovány principy založené na chromatografické separaci, na iontové mobilní spektrometrii a tandemové hmotnostní spektrometrii včetně využití derivatizačních reakcí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hmotnostní spektrometrie, izomery, lipidomika, lipidy, iontová mobilita, chromatografie

## **TITLE**

Lipid isomers and analytical options for their distinguishing

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with lipid isomers, their role in various diseases and methods for their detection in biological samples. The first chapter summarizes basic information about lipids and individual lipid isomers. The second chapter is focused on the description of their importance in connection with specific diseases. Analytical options for the distinguishing individual types of lipid isomers are finally summarized in the third chapter, in which principles based on chromatographic separation, ion mobility spectrometry, tandem mass spectrometry, and derivatization approaches are discussed.

## **KEYWORDS**

mass spectrometry, isomers, lipidomics, lipids, ion mobility, derivatization, chromatography

# Obsah

PODĚKOVÁNÍ.....	6
ANOTACE.....	7
KLÍČOVÁ SLOVA .....	7
TITLE 7	
ANNOTATION .....	7
KEYWORDS .....	7
SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK .....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	11
ÚVOD.....	13
<b>1 LIPIDY A JEJICH IZOMERIE .....</b>	<b>14</b>
1.1 KONSTITUČNÍ IZOMERY .....	16
1.1.1 Řetězové izomery.....	16
1.1.2 Polohové izomery .....	16
1.1.3 Tautomerie.....	17
1.1.4 Skupinová izomerie.....	17
1.2 KONFIGURAČNÍ IZOMERY .....	18
1.2.1 Konformační izomery.....	18
1.2.2 Geometrické izomery.....	18
1.2.3 Optická izomerie.....	19
<b>2 BIOLOGICKÁ DŮLEŽITOST LIPIDOVÝCH IZOMERÍ.....</b>	<b>20</b>
2.1 DIABETES MELLITUS.....	20
2.1.1 Antioxidační a protizánětlivý účinek konjugovaných izomerů kyseliny linolenové proti streptozotocinem indukovanému diabetu.....	20
2.2 KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	21
2.2.1 Efekt izomerů kyseliny olejové a linolové na výskyt ischemické srdeční choroby.....	22
2.3 RAKOVINA.....	23
2.3.1 Hmotnostně spektrometrické zobrazování izomerů lipidů v tkáni karcinomu prostaty.....	23
<b>3 ANALYTICKÉ MOŽNOSTI PRO ROZLIŠENÍ LIPIDOVÝCH IZOMERÍ.....</b>	<b>25</b>
3.1 ROZLIŠENÍ IZOMERŮ LIPIDŮ S VYUŽITÍM SEPARAČNÍCH TECHNIK .....	25
3.1.1 Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi.....	26
3.1.2 Argentační chromatografie .....	27
3.1.3 Chirální separace .....	28
3.2 PRINCIPY ZALOŽENÉ NA IONTOVÉ MOBILITĚ .....	30
3.3 PRINCIPY ZALOŽENÉ NA TANDEMOVÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII.....	32



3.4	PRINCIPY ZALOŽENÉ NA DERIVATIZAČNÍCH REAKCÍCH A NÁSLEDNÉ MS/MS.....	33
3.4.1	<i>Stanovení dvojně vazby v lipidech pomocí ozonolýzy ve spojení s MS/MS.....</i>	33
3.4.2	<i>Derivatizace dvojných vazeb pomocí Paternò–Büchi reakce.....</i>	34
	ZÁVĚR .....	36
	POUŽITÁ LITERATURA.....	38

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Příklady struktur lipidů reprezentující jednotlivé kategorie lipidů .....	15
Obrázek 2 – Příklad řetězové izomerie dvou větvených mastných kyselin.....	16
Obrázek 3 – Ukázka možných polohových izomerů pro molekuly tryacylglycerolů	17
Obrázek 4 – Ukázka tautomerie .....	17
Obrázek 5 – Ukázka konformační izomerie.....	18
Obrázek 6 – Ukázka cis/trans izomerie.....	19
Obrázek 7 – Ukázka chirálních izomerů pro molekuly tryacylglycerolů .....	19
Obrázek 8 - Struktury kyselin punicické a alfa-eleostearové.....	21
Obrázek 9 - Struktury kyselin olejové a linolové.....	22
Obrázek 10 - 14-HpODE .....	27
Obrázek 11 - 8-HpODE .....	27
Obrázek 12 - Snímek z NAPA-LDI-IMS ledviny potkana.....	31
Obrázek 13 - Schéma mikroreaktoru ozonolýzy.....	34
Obrázek 14 - Schéma pracovního postupu RP-LC-PB-MS/MS .....	35

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CCS	Srážkový průřez
CID	Kolizně indukovaná disociace (Collision induced dissociation)
cIM	Cyklická iontová mobilita (Cyclic ion mobility mass spectrometry)
CLnA	konjugovaná kyselina linolenová (Conjugated linolenic acid)
DTIMS	Iontová mobilitní spektrometrie s driftovou trubicí (Drift tube ion mobility)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
HpOD	hydroperoxid kyseliny oktadekadienové
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IM	Iontová mobilita (Ion mobility)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid chromatography)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
PC	Fosfatidylcholin (Phosphatidylcholine)
RP-LC	Kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (Reverse phase liquid chromatography)
SFC	Superkritická fluidní chromatografie (Supercritical fluid chromatography)
STZ	Streptozotocin
TG	Triacylglycerol
TIMS	Iontová mobilitní spektrometrie záchytu iontů (Trapped ion mobility spectrometry)
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-high-performance liquid chromatography)
UHPSFC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie se superkritickou kapalinou (Ultra-high

UVPD

performance supercritical fluid  
chromatography)

Fotodisociace ultrafialovým zářením (Ultra-  
violet-photo dissociation)

## ÚVOD

Lipidomika je rychle se rozvíjející obor zabývající se studiem lipidů a jejich reakcemi v biologickém systému. Samotné lipidy se hojně vyskytují téměř ve všech organismech, jelikož jsou součástí buněčných membrán, různých tkání, tělních tekutin atd. S vývojem nových technologií, zejména v oblasti tandemové hmotnostní spektrometrie a iontové mobility, se objevují nové možnosti pro analýzu lipidů a jejich složitých struktur včetně rozlišení jejich izomerie. Komplexní lipidomická analýza a detekce konkrétních izomerů by mohla pomoci pochopit biochemické mechanismy probíhající v souvislosti s výskytem některých závažných onemocnění jako jsou například diabetes mellitus, kardiovaskulární choroby, rakovina atd. Nové poznatky mohou přispět k preventivním opatřením v dietě, vývoji nových léčiv a objevu vhodných biomarkerů, které by mohly pomoci detekovat choroby spojené s pozměněným metabolismem lipidů ve včasném stádiu, což by umožnilo zahájení léčby dříve než se nemoc rozvine do těžko léčitelné formy.

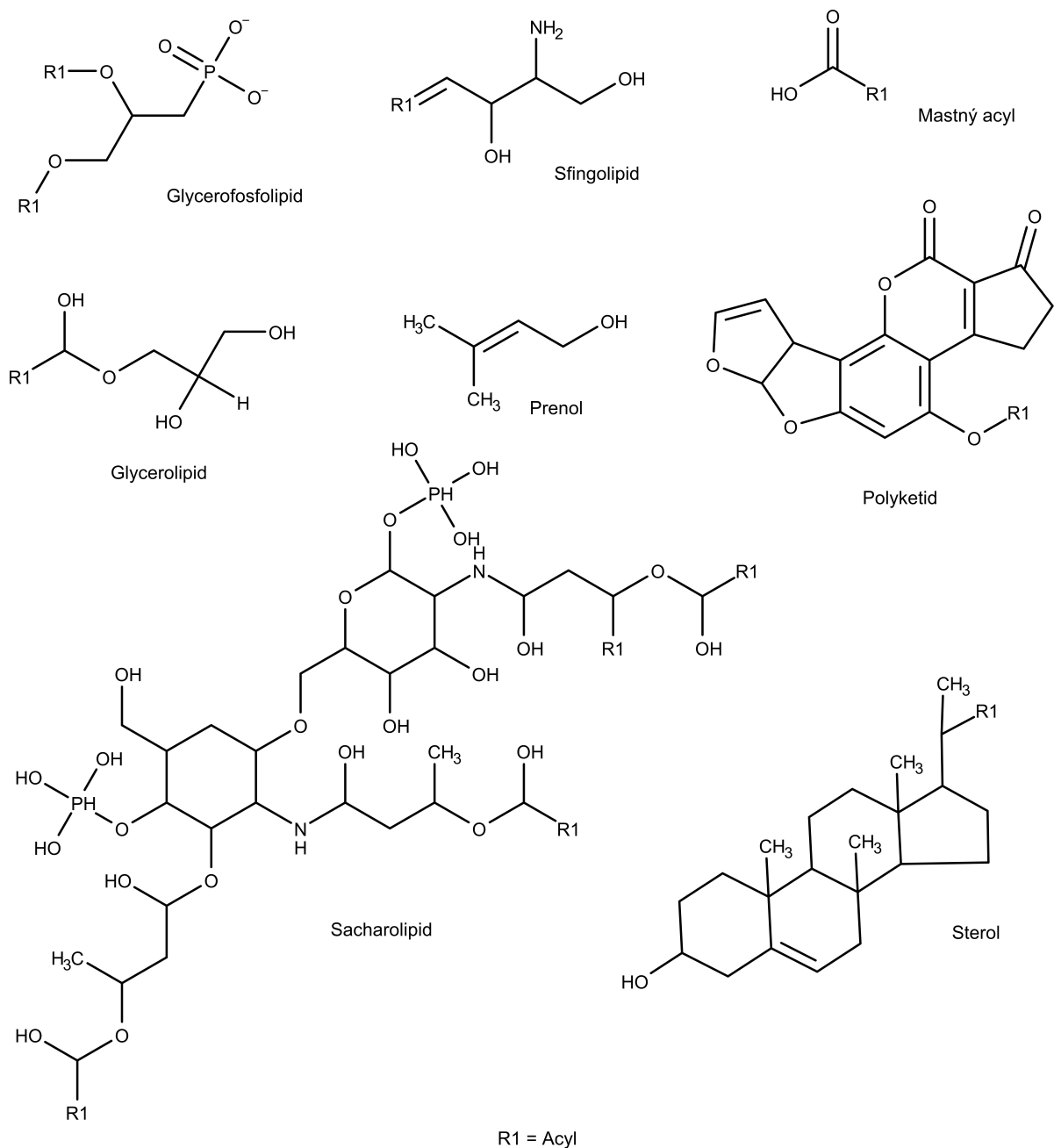
# 1 Lipidy a jejich izomerie

Lipidy jsou chemické látky, které se podílí na řadě biologických funkcí. Je možné je nalézt například v buněčných membránách, kde tvoří fosfolipidovou dvojvrstvu. Amfifilní fosfolipidy jsou v ní uspořádány tak, že polární část (hydrofilní) v obou vrstvách je orientována směrem ven a nepolární (hydrofobní) řetězce acylů jsou uvnitř membrány. Kromě fosfolipidů lze v buňkách najít i další kategorie lipidů (sfingolipidy, glykosfingolipidy, cholesterol), které plní další funkce, např. buněčnou signalizaci, regulační funkce (snižování či zvyšování propustnosti membrány), atd. Lipidy také slouží jako zásobní zdroj energie pro organismus. Tuto funkci plní zejména triacylglyceroly (TG), při jejichž metabolismu (odbourávání) dochází k uvolnění značného množství energie.

Lipidy jako takové jsou velmi strukturně rozmanité sloučeniny, obecně je rozdělujeme na “jednoduché” a “složené”. Označením jednoduché lipidy se rozumí, že při hydrolytické reakci poskytují maximálně dva typy produktů, naopak složené lipidy poskytují při hydrolytické reakci tři a více produktů.

Vědní obor zabývající se studiem lipidů a jejich biochemických drah v biologických systémech se nazývá lipidomika a poskytuje poznatky o mnoha fyziologických činnostech lipidů v organismech a onemocněních spojených s dysregulovaným metabolismem lipidů, např. diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, rakovina, neurodegenerativní onemocnění, atd. Jedná se poměrně o mladou vědní disciplínu, která se bleskově rozvíjí v souvislosti s dnešním neustálým vývojem v lékařství, analytické chemii a informačních technologiích. Ve výzkumu se pracuje s obrovskými kvanty dat, které poskytují informace o změnách jak obsahu lipidů, tak o složení jednotlivých tříd. V praxi to vypadá tak, že při lipidomické analýze dochází k identifikaci jednotlivých lipidů v rámci různých lipidových tříd, jejich kvantifikaci a případně i studiu jejich interakcí s ostatními sloučeninami.

Lipidy rozdělujeme do základních osmi kategorií podle jejich základních stavebních kamenů, a to na glycerolfosfolipidy, glycerolipidy, mastné acyly, steroly, sfingolipidy, prenoly, polyketidy a sacharolipidy. Ty se dále dělí na lipidové třídy a podtřídy, pro které byl navržen společný způsob rozdělení dle chemické struktury jednotlivých lipidů a byl stanoven dvanáctimístný identifikátor. Celková klasifikace je k nalezení on-line na stránkách LIPID MAPS, kde je zaznamenáno okolo 44 tisíc jednotlivých lipidů (<https://www.lipidmaps.org>). Podle některých zdrojů toto číslo nemusí být zdaleka konečné a spekuluje se o množství přes 100 tisíc sloučenin. <sup>[1,2,3,4]</sup>



Obrázek 1 – Příklady struktur lipidů reprezentující jednotlivé kategorie lipidů

Na obrázku jsou znázorněny reprezentativní struktury pro jednotlivé kategorie lipidů, kde označení „R1“ symbolizuje připojený mastný acyl, který je dlouhý zhruba 14-26 uhlíků (typická délka pro lipidy v lidském organismu) a obsahuje většinou 0 až 6 dvojných vazeb (v závislosti na jeho délce). Jednotlivé lipidy se často vyskytují ve více izomerních formách, tzn. mají stejné sumární vzorce (součet protonů a neutronů je tedy pro tyto sloučeniny stejný), ale jejich strukturní uspořádání je odlišné.

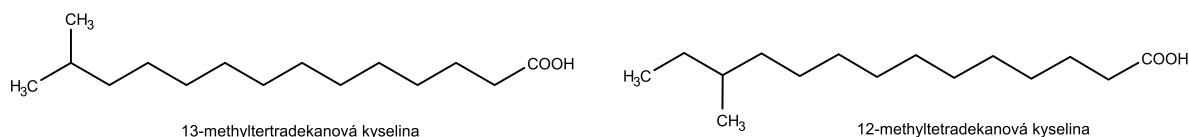
Jednotlivé orientace neboli izomery dělíme na konstituční a konformační (viz níže). Dále se v lipidomice setkáváme s pojmy izobarický lipid a izotop lipidu. Izobary lipidů mají stejnou nominální hmotnost, ale liší se přesnou hmotností, tzn. součet protonů a neutronů se pro ně liší. Vzhledem k tomu, že se lipidy skládají převážně z prvků, které obsahují více než jeden izotop, např. uhlík má izotopy  $^{12}\text{C}$  (98,9 %) a  $^{13}\text{C}$  (1,1 %), kyslík má izotopy  $^{16}\text{O}$  (99,8) a  $^{18}\text{O}$  (0,2 %), atd.), tak má i každý lipid určitý počet izotopů. Každý lipid má tedy monoizotopickou hmotnost ( $M_{\text{mono}}$ ), která je doprovázena hmotnostmi dalších izotopů ( $M_{\text{mono}+1}$ ,  $M_{\text{mono}+2}$ ,  $M_{\text{mono}+3}$ , atd.), jejichž počet a intenzita se mění v závislosti na daném elementárním složení.

## 1.1 Konstituční izomery

Konstituční izomery se liší pořadím atomů ve sloučenině a umístěním násobných vazeb. Rozlišujeme je na izomery řetězcové, polohové, skupinové (funkční) a tautomery.

### 1.1.1 Řetězové izomery

Řetězové izomery jsou látky, které mají odlišné délky řetězce. Tím pádem mohou obsahovat různé větvení jako u příkladu 13-methyltertridekanové kyseliny a 12-methyltetradekanové kyseliny (viz obrázek 2).

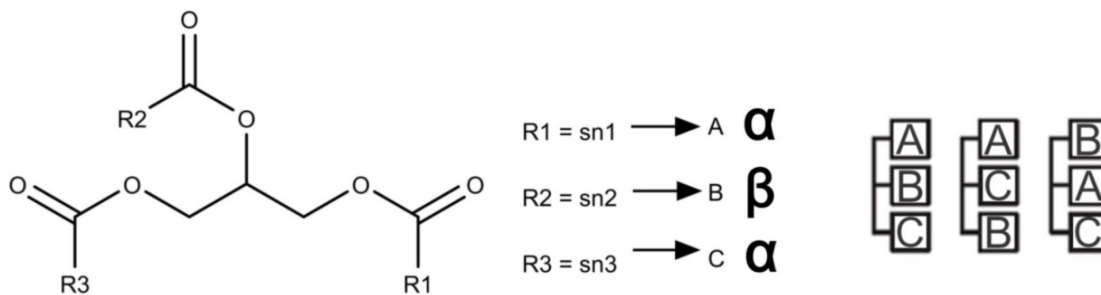


Obrázek 2 – Příklad řetězové izomerie dvou větvených mastných kyselin

### 1.1.2 Polohové izomery

Pro polohové izomery je charakteristické rozdílné umístění dvojných vazeb. U nenasycených uhlovodíků obsahující dvojnou vazbu dochází k časté migraci dvojných vazeb. U triacylglycerolů se kromě polohy dvojných vazeb v jednotlivých mastných acylech mohou vyskytovat i další izomerie související s polohou na glycerolu, přičemž názvosloví je určováno podle stereo-specifického umístění pozic (viz. obrázek 3).

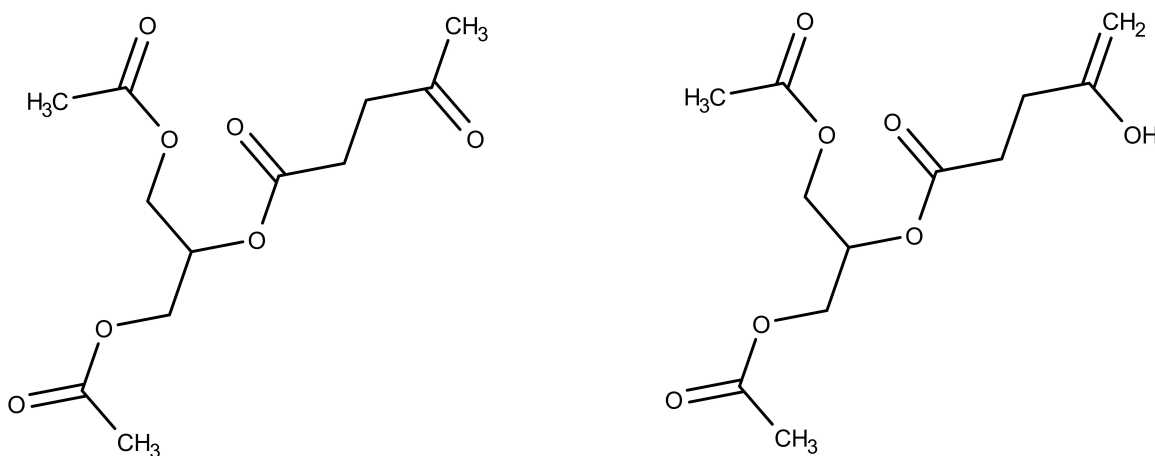




Obrázek 3 – Ukázka možných polohových izomerů pro molekuly tryacylglycerolů

### 1.1.3 Tautomerie

Tautomery jsou izomery, které vznikají změnou umístění dvojné vazby a atomu vodíku H, popřípadě protonu. Jednotlivé tautomery mezi sebou velmi rychle a ochotně přechází. Jedním z typů tautomerie je například keto/enol tautomerie. U ní je charakteristické, že enolová forma je mnohem nestabilnější než keto forma, nicméně jednotlivé zastoupení záleží na pH. Čím je pH vyšší, tím je více upřednostněna keto forma.



Obrázek 4 – Ukázka tautomerie

### 1.1.4 Skupinová izomerie

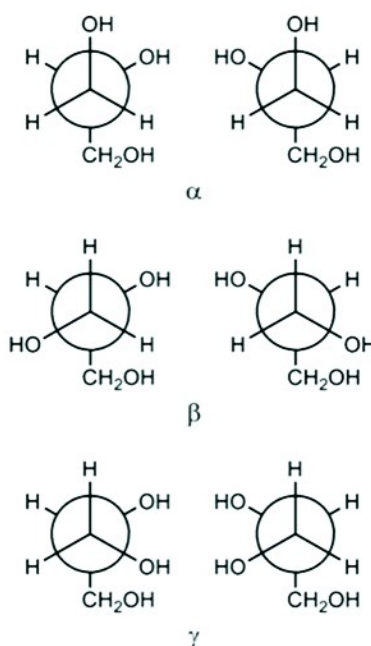
Skupinová neboli funkční izomerie se vyznačuje opět stejným sumárním vzorcem, ale její složení, konkrétně funkční skupina, je ovšem rozdílné viz obrázek 4 – Tautomerie.

## 1.2 Konfigurační izomery

Prostorové izomery neboli konfigurační či stereoizomery, mají stejné konstituční složení, ale liší se prostorovým uspořádáním. Prostorové izomery dále dělíme na konformační, geometrické a optické.

### 1.2.1 Konformační izomery

Konformační izomerie rozlišujeme na zákrytovou a nezákrytovou konformaci. Vzniká pomocí rotace kolem jednoduché vazby. Je to prostorové uspořádání různých verzí molekul stejné sloučeniny. [5]

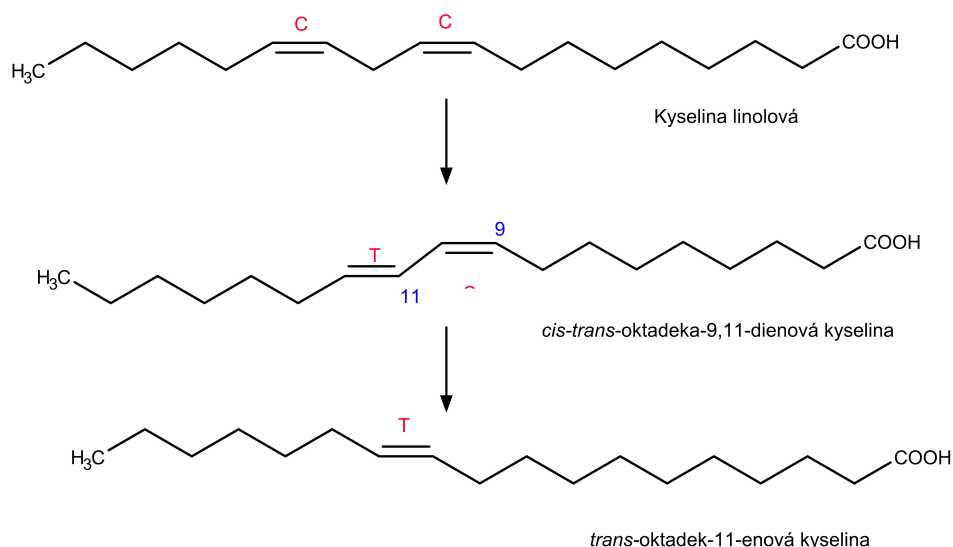


Obrázek 5 – Ukázka konformační izomerie (Převzato z [6])

### 1.2.2 Geometrické izomery

Geometrické izomery rozlišujeme cis a trans neboli po staru „židlička“ a „vanička“. Na rozdíl od konformačních izomerů, zde není možnost rotace kolem vazby, jelikož zde už není vazba jednoduchá, ale dvojná. Na obrázku 6 je možné vidět kyselinu linolovou se dvěma vazbami v cis uspořádání na 9 a 12 uhlíku. Poté je na obrázku znázorněna kyselina cis-trans-oktadeka-9,11-dienová, z jejíž názvu je možné vyčíst uspořádání cis dvojných vazeb na 9 uhlíku a trans uspořádání vazby na 11 uhlíku.

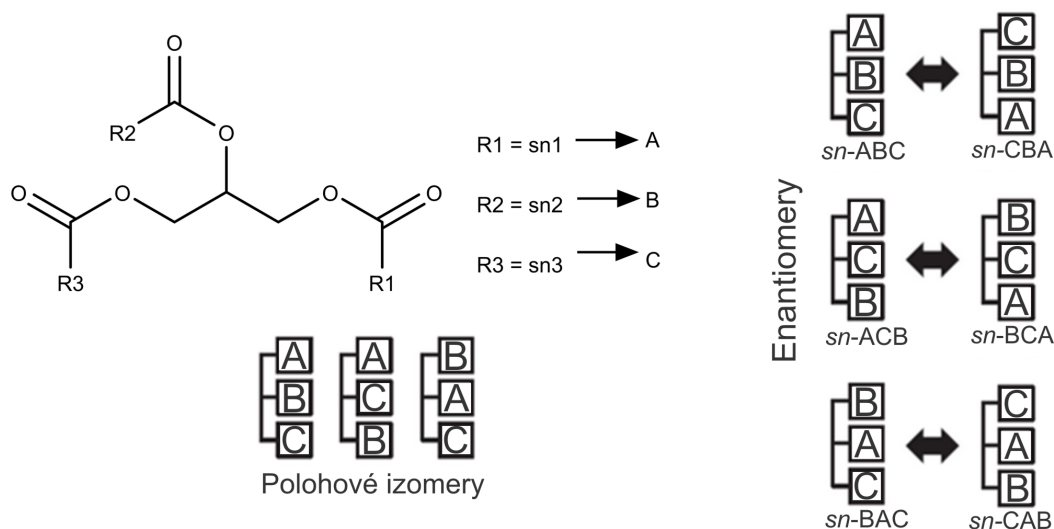
Na poslední struktuře je vidět kyselina trans-oktadek-11-enová, která obsahuje jednu dvojnou vazbu v uspořádání trans.



Obrázek 6 – Ukázka cis/trans izomerie

### 1.2.3 Optická izomerie

Optické izomery se rozlišují na R- a S-, případně D- a L- izomery. Což znamená, že daná skupina izomerů se liší v umístění dané funkční skupiny na chirálním atomu, která je buď vpravo, anebo vlevo. Na obrázku 7 je pro příklad zvolen obecný triacylglycerol, který může na sobě mít navázané celkem tři různé acylové skupiny. Pro tento příklad bude zvoleno A, B a C. Celkem při této situaci mohou vzniknout tři páry enantiomerů, a kromě toho ještě tři polohové izomery. Samotné enantiomery mají úplně stejná hmotnostní spektra, a proto je od sebe nelze jednoznačně rozlišit. Pro jejich rozlišení existuje několik možností, které budou diskutovány v kapitole 3.



Obrázek 7 – Ukázka chirálních izomerů pro molekuly tryacylglycerolů

## 2 Biologická důležitost lipidových izomerií

Lipidy se vyskytují ve všech buněčných organismech a mají mnoho funkcí. Změna určitého patologického stavu (např. zdraví organismus / nemocný organismus) má za následek kaskádu biochemických reakcí, které vedou ke změnám lipidového profilu v tkáních i tělních tekutinách.

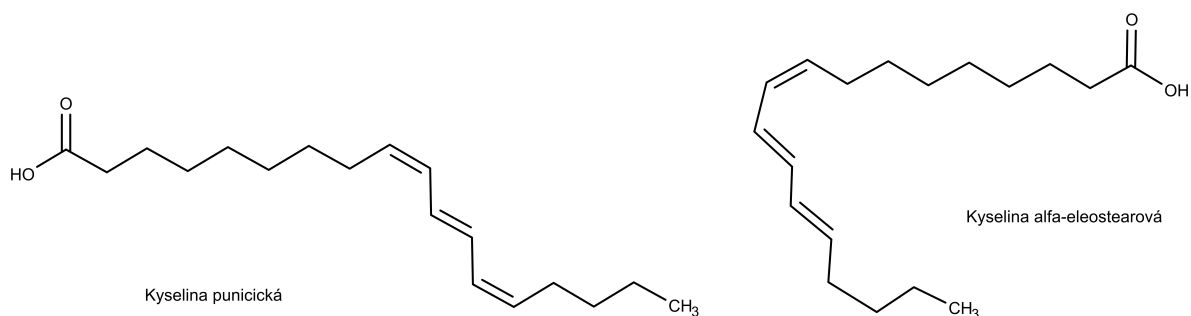
Mezi pozorovanými změnami mohou být i koncentrační změny konkrétních izomerů lipidů. V této kapitole jsou uvedeny vybrané příklady z literatury, kde autoři popisují vliv lipidových izomerů ve výživě na rozvoj vybraných onemocnění a případně popisují jejich koncentrační změny v lidském nebo zvířecím organismu v souvislosti s těmito konkrétními onemocněními.

### 2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus neboli cukrovka je chronické, metabolické, autoimunitní onemocnění, které se projevuje hyperglykemií, která vzniká částečnou nebo úplnou poruchou sekrece inzulínu ze slinivky. Konkrétně postihuje  $\beta$ -buňky Langerhanzových ostrůvků, které jsou zodpovědné za produkci inzulínu. Což je hormon, který pomáhá štěpit cukry a snižovat tak množství glukózy v krvi (3,5 - 5,5 mmol/l). Toto onemocnění má dva základní typy: diabetes I. typu a II. typu. První typ onemocnění je vrozený, projevuje se obvykle od dětství či dospívání a spočívá v autoimunitní reakci těla, kdy T-lymfocyty napadají  $\beta$ -buňky v pankreatu a v důsledku zániku Langerhanzových ostrůvků dochází k úplnému nedostatku inzulínu. Druhý typ diabetu je mnohem častější, rozvíjí se pozvolna a vyskytuje se u 90 % případů. Vznik tohoto onemocnění je zejména spojen s dlouhodobým nadměrným energetickým přísunem, obezitou a narůstajícím věkem.

#### 2.1.1 Antioxidační a protizánětlivý účinek konjugovaných izomerů kyseliny linolenové proti streptozotocinem indukovanému diabetu

Cílem této studie<sup>[4]</sup> bylo zhodnocení účinku kyselin  $\alpha$ -eleostearové a punicické. Jedná se o izomery konjugované kyseliny linolenové (CLnA), které působí proti oxidativnímu stresu, zánětům a aberacím na erytrocytech způsobených právě diabetem.



Obrázek 8 - Struktury kyselin punicické a alfa-eleostearové

Experiment spočíval v tom, že se sledovaly celkem čtyři skupiny po osmi samcích albínů potkana z kmene Charles Foster, kteří vážili v rozmezí 120-130 gramů. První skupina byla tzv. kontrolní neboli bez vnějšího vlivu. U druhé, třetí a čtvrté skupiny byl vyvolán diabetes pomocí třídní série injekcí, které obsahovaly streptozotocin (STZ). Jedna tato dávka obsahovala 60 mg/kg STZ rozpuštěných v citrátu sodném. U třetí skupiny bylo kromě injekcí STZ přidáváno množství 0,5% kyseliny  $\alpha$ -eleostearové jednou denně. Čtvrté skupině bylo per orálně (ústně) podáváno stejné množství kyseliny punicické ve stejném časovém intervalu jako u třetí skupiny. Po třídní sérii injekcí STZ měli potkani 2., 3. a 4. skupiny glykémii okolo 3000 mg/l v důsledku úplné destrukce  $\beta$ -buněk v pankreatu. U třetí a čtvrté skupiny bylo zjištěno významné snížení oxidativního stresu a obnovily se protizánětlivé a antioxidační enzymy jako například superoxid bismutáza, kataláza a glutationperoxidáza díky dávčím izomerům CLnA. Bylo pozorováno i snížení koncentrace glutationu a lýza erytrocytů v krvi. Z analytického testu antioxidační síly redukce železitého iontu krevní plazmy bylo zjištěno, že léčba pomocí CLnA způsobila zlepšení oproti 2. skupině s diabetem. Nicméně po přerušení podávání CLnA došlo u daných jedinců ke zhoršení jejich stavu.

Závěrem je, že CLnA vykazovaly po dobu léčby silné antioxidační a protizánětlivé účinky. Konkrétně kyselina punicická měla protizánětlivé účinky díky vyššímu obsahu *cis*-vazeb, a naopak kyselina  $\alpha$ -eleostearová měla vyšší antioxidační účinky právě kvůli vyššímu obsahu *trans*-vazeb.<sup>[7]</sup>

## 2.2 Kardiovaskulární onemocnění

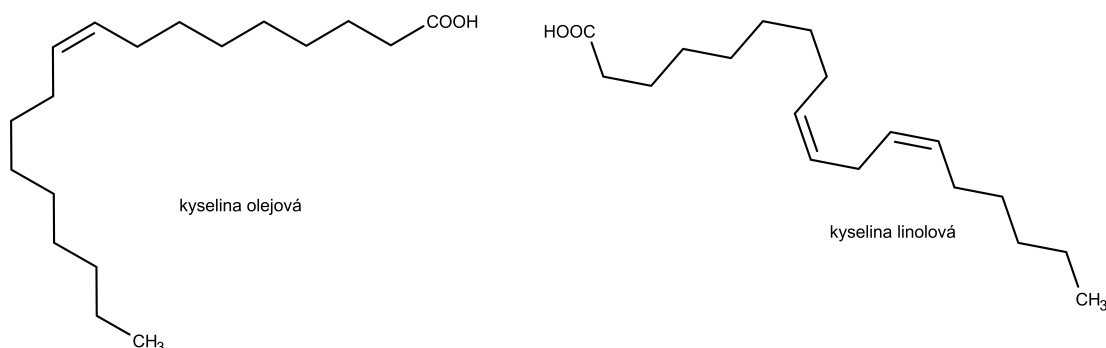
Mezi nejčastější kardiovaskulární onemocnění se řadí ischemická choroba srdeční (ICHS), která se vyznačuje nedostatečným okysličením srdce. ICHS patří mezi nejčastější příčiny smrti v „civilizovaných“ zemích a může být chronického nebo akutního charakteru.

První možností je tzv. Angina pectoris neboli námahová srdeční bolest, která se projevuje svíravou bolestí na hrudi, která polevuje buď v klidovém stavu nebo po dávce nitroglycerinu. Akutní varianta ICHS je infarkt myokardu, což je nevratné, ložiskové, nekrotické poškození způsobené neodkrvením srdečního svalu. Projevuje se dlouhotrvající silnou bolestí na hrudi, na paži i krku. Může se projevit při námaze, rozčilení, ale nejčastěji v klidu.

Podíl na ICHS má mimo jiné i výživa. Součástí potravy, kterou přijímáme jsou mastné kyseliny. Ty se rozdělují na nasycené a nenasycené. Nasycené znamená, že neobsahují žádné dvojné vazby. Mezi ně se například řadí kyselina máselná, palmitová, stearová, arachidová, atd. Pro tuto bakalářskou práci jsou důležitější větvené mastné kyseliny nebo nenasycené mastné kyseliny, které právě obsahují minimálně jednu dvojnou vazbu. To zapříčiňuje existenci jednotlivých izomerů. Mezi nenasycené mastné kyseliny se řadí například kyselina olejová, linolová, linoleová, arachidonová atd. Tyto izomerie jsou spojeny s diabetem a kardiovaskulárními nemocemi.

### 2.2.1 Efekt izomerů kyseliny olejové a linolové na výskyt ischemické srdeční choroby

Tato studie se zaměřila na hypotézu, že *trans*-izomery kyseliny olejové a linolové zvyšují riziko náhlé srdeční smrti v důsledku ischemické choroby srdeční.



Obrázek 9 - Struktury kyselin olejové a linolové

Celkový podíl jednotlivých *trans*-izomerů kyselin olejové a linolové byl v tukové tkáni subjektů stanoven pomocí plynové a kapalinové chromatografie. Průměrný podíl celkových *trans*-mastných kyselin (C18:1 a C18:2) byl významně nižší [2,68 % (0,08)] než u zdravých jedinců [2,86 % (0,04);  $p < 0,05$ ]. Výskyt *trans*-izomerů C18:1 byl celkem u 2,1 % (0,7) případů ve srovnání se zdravými jedinci [2,27 % (0,04);  $p < 0,05$ ]. Podíl všech *trans*-izomerů kyseliny linolové byl 0,58 % (0,02) ve srovnání se zdravými jedinci, kteří měli 0,59 % (0,01;  $p = 0,98$ ). Odhadované riziko náhlé srdeční smrti ve spojení s *trans*-izomery mastných kyselin C18:1 a C18:2 se dohromady významně nelišilo od 1,0 ve vztahu k rozložení u zdravé populace.

Výsledkem byl závěr, že nebyl celkově prokázán vztah mezi kombinací *trans*-izomerů kyselin olejové a linolové a náhlou srdeční smrtí. Jediný faktor, který zůstal spojen s náhlou srdeční smrtí bylo kouření. Nicméně samostatné *trans*-izomery kyseliny olejové byly negativně spojeny s náhlou srdeční smrtí, naopak u *trans*-izomerů kyseliny linolové nebyly žádné prokazatelné souvislosti. [8]

## 2.3 Rakovina

Rakovina je systémové onemocnění, při kterém v postiženém orgánu nebo orgánech dochází k nekontrolovatelnému množení buněk a vzniku nádorů. Samotné nádory si lze představit jako výrůstek, ztvrdlinu, popřípadě barevně odlišnou část daného orgánu. Dělí se na benigní neboli nezhoubné (zůstávají v místě vzniku) a maligní neboli zhoubné, které jsou pro organismus nebezpečné, protože se dokážou šířit do těla pomocí krve nebo lymfatického systému. Diagnóza ve většině případů závisí na biopsii a následném histopatologickém vyšetření. [9,10] Pozornost se směřuje i na vývoj metod, které by pomohly k diagnóze rakoviny na základě analýzy krevních vzorků pomocí koncentračních změn pro určité sloučeniny, např. specifických lipidů. [11]

Lipidy tvoří u eukaryotických buněk zhruba 50 % buněčné hmoty [12] a koncentrační změny lipidů v krvi byly popsány v souvislosti s různými typy rakoviny, např. ductální adenokarcinom pankreatu [13], světlobuněčný renální karcinom [14], rakovina prsu a prostaty. [15] Uvedená práce popisuje koncentrační změny lipidů nejvýše na úrovni lipidů rozlišení mastných acylů, avšak nezaměřují se na rozlišení dvojných vazeb, *cis/trans* izomerii apod. Tyto další strukturní informace by však mohly zlepšit pohled na danou problematiku a zpřesnit tak biologické hypotézy spojenými s těmito dysregulacemi.

### 2.3.1 Hmotnostně spektrometrické zobrazování izomerů lipidů v tkáni karcinomu prostaty

Jako příklad toho, že rozlišení izomerů lipidů poskytuje důležité informace, lze uvést práci australských vědců, kteří zkoumali lipidové složení v tkáních pacientů s karcinomem prostaty [16], celosvětově čtvrtým nejčastějším nádorovým onemocněním. [17] V této práci se autoři zaměřují právě na rozlišení polohy dvojných vazeb u konkrétních lipidů a popisují jejich koncentrační změny napříč nádorovou a okolní nenapadenou tkání s využitím hmotnostně spektrometrického zobrazování a ozonolýzy, která bude blíže diskutována v kapitole 3. [18]

Při sledování membránového lipidu fosfatidylcholinu 34:1 (PC) byla zjištěna vysoká pozitivní korelace mezi izomerem PC n-9 a epiteliárními buňkami z potenciálních přednádorových lézí, zatím co hojnost izomeru PC n-7 korelovala s infiltrací imunitních buněk a zánětem.

Závěrem bylo zjištění, že do budoucna by mohly metody obsahující hmotnostní spektrometrii pomoci s rozlišováním izomerů a tím pádem i pomoci patologům s diagnostikou rakoviny prostaty a stratifikací pacientů. <sup>[19]</sup>



### 3 Analytické možnosti pro rozlišení lipidových izomerií

Lipidomika v posledním desetiletí zaznamenala rostoucí zájem, protože lipidy jsou považovány za biologicky aktivní sloučeniny, které mají v lidském těle (organismu) mnoho funkcí. Jsou hlavní formou zásobní energie u savců, zdrojem nebo uložištěm vitamínů rozpustných v tucích a esenciálních mastných kyselin, biologických membrán nebo působí jako buněčná signalizace. <sup>[20-22]</sup> Extrémní strukturní rozmanitost lipidů v reálných biologických vzorcích představuje výzvu pro analytické techniky používané při lipidomické analýze vzhledem k velkým rozdílům ve fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých druhů. V současné době se v lipidomice využívají různé strategie, které jsou založené buď čistě na hmotnostní spektrometrii nebo její kombinaci s chromatografickými technikami. <sup>[23-25]</sup>

#### 3.1 Rozlišení izomerů lipidů s využitím separačních technik

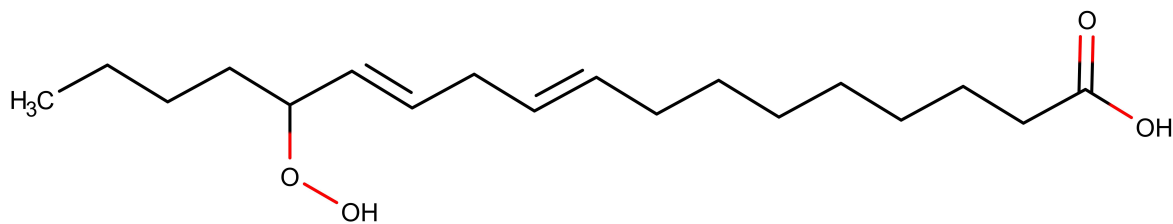
V minulosti se často používala k analýze lipidů tenkovrstvá chromatografie, ale v současnosti se hlavně používá pro preparativní izolaci vybraných lipidů nebo tříd lipidů. Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) je technika zavedená pro analýzu metylesterů mastných kyselin po trans esterifikaci lipidů, která poskytuje informace o složení mastných kyselin všech zmýdelnitelných lipidů, ale další strukturní informace neposkytuje. <sup>[26]</sup> Klíčovou analytickou konfigurací v lipidomice je spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou (LC/MS) nebo superkritickou fluidní chromatografií (SFC/MS). <sup>[25,27,28]</sup> Hlavní výhodou LC-MS pro lipidomickou analýzu je její široká škála separačních režimů, které za konkrétních podmínek dokážou rozlišit různé izomerie lipidů. Nejrozšířenějším režimem je LC s obrácenými (reverzními) fázemi (RP-LC), která je schopna poskytovat komplexní separaci na základě délky acylového řetězce, počtu dvojných vazeb a je schopná rozlišit i geometrické izomery, např. cis/trans izomerii. <sup>[29,30]</sup> V RP-LC je možné využít i bezvodé mobilní fáze (NARP) podobně jako v chromatografii s normálními fázemi, což se využívá pro účinnou separaci nepolárních lipidů jako jsou acylglyceroly. Další speciální separační mód, který se v lipidomice využívá, a to pro rozlišení polohy a počtu dvojných vazeb, je argentační chromatografie, která využívá stříbrných iontů zakotvených v polární stacionární fázi. <sup>[31]</sup> Naopak pro separaci tříd lipidů na základě polárních funkčních skupin je vhodná kombinace MS s hydrofilní kapalinovou chromatografií (HILIC), která dokáže rozdělit izomerie právě v této polární části (např. lactosylceramidy od digalactosylceramidů apod.), ale nedokáže rozdělit izomerie přítomné v nepolárních řetězcích. <sup>[32]</sup>

Současným trendem v LC je používání částic o velikosti pod 2  $\mu\text{m}$  a ultra-vysokých pracovních tlaků převyšujících 1000 bar (ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie; UHPLC), což vede ke zvýšení rychlosti separace a účinnosti separace. Dalším populárním nástrojem je použití dvourozměrné (2D) LC, kdy lze spojit dvě chromatografické metody s ortogonální selektivitou a zajistit tak vyšší kapacitu píků v online <sup>[33]</sup> nebo off-line <sup>[32]</sup> režimu. Velký potenciál ukazuje ultra vysokoúčinná chromatografie se superkritickou kapalinou (UHPSFC). Ta se používá pro separaci a kvalifikaci lipidových tříd jak u nepolárních, tak polárních směsí v extrémně krátkých časových intervalech analýzy. <sup>[25,34]</sup>

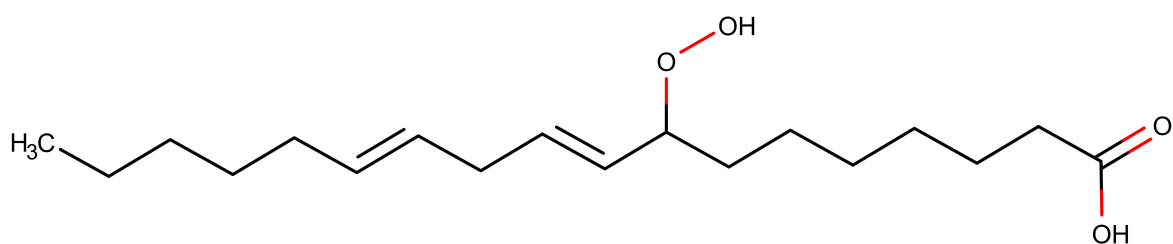
### 3.1.1 Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

V případě RP-LC je mobilní fáze polární. Velmi často je to směs rozpouštědel založená na vodné složce s polárními organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou. Stacionární fáze je nejčastěji nepolární oktadecylsilikagel nebo jiná nepolární modifikace silikagelu. Metody LC/MS obvykle poskytují komplexnější informace o složení lipidů, ale jsou obvykle časově náročné, ačkoliv v dnešní době lze s využitím UHPLC tyto analýzy výrazně zkrátit, nicméně se i tak analýza, která dokáže pokrýt stovky lipidů z různých lipidových tříd, pohybuje v desítkách minut v případě speciálních metod pro separaci izomerů. <sup>[24,35]</sup>

Studie, která popisuje tuto metodu, se zabývala vznikem těkavých látek, které se podílejí na chuti potravin, z hydroperoxidu lipidů při oxidaci lipidů. V této studii byly navrženy cesty, které mohou souvisle vysvětlit rozklad hydroperoxidu lipidů se zaměřením na izomery hydroperoxidů kyseliny oktadekadienové (HpODE) (9-EZ-HpODE, 9-EE-HpODE, 10-HpODE, 12-HpODE, 13-ZE-HpODE a 13-EE-HpODE), které jsou hlavními hydroperoxidy v jedlých olejích. Každý standard byl nejprve připraven a tepelně rozložen. Vzniklé těkavé a netěkavé sloučeniny byly analyzovány pomocí plynové chromatografie spojenou s MS (GC-MS) a LC-MS/MS. Výsledkem bylo, že všechny rozkladné produkty HpODE byly založeny na faktorech jako je příznivé štěpení, delokalizace radikálů a cyklizace. Zajímavé bylo, že při rozkladu HpODE byla prokázána tvorba 8-HpODE a 14-HpODE. Poznatky získané touto studií by mohly vysvětlit cesty vzniku chuti podílející se na kvalitě potravin. <sup>[36]</sup>



Obrázek 10 - 14-HpODE



Obrázek 11 - 8-HpODE

### 3.1.2 Argentační chromatografie

Argentační chromatografie je technika, která se používá k separaci a následné detekci analytu pomocí stříbrného iontu ( $\text{Ag}^+$ ), jejichž vlastností je vytvářet slabé reverzibilně polární komplexy s nenasycenými centry v organických molekulách. Umožňuje separaci podle počtu, geometrické konfigurace (*cis/trans*) a do jisté míry i polohy těchto dvojných vazeb. Technika byla přizpůsobena chromatografii na tenké vrstvě (TLC) <sup>[36]</sup>, sloupcové chromatografii, <sup>[37]</sup> vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) <sup>[38]</sup> a superkritické fluidní chromatografii (SFC). <sup>[25,34]</sup>

Separační účinnost a reprodukovatelnost argentační sloupcové chromatografie je velmi nízká. Proto má reálný význam zejména využití argentační HPLC s normální fází, což je výkonná technika pro selektivní separaci nenasycených sloučenin. Nejdůležitějším faktorem pro separaci je obsah stříbrného iontu naneseného na stacionární fázi. <sup>[27,28]</sup>

Jako příklad využití této metody se nabízí studie zabývající se charakterizací regioizomerů triacylglycerolů za pomoci HPLC s normální fází stříbra ve spojení s hmotnostní spektrometrií s chemickou ionizací pracující za atmosférického tlaku. Tato metoda poskytuje za optimalizovaných podmínek vynikající selektivitu pro separaci lipidů, které se liší počtem a polohou dvojných vazeb v řetězci mastné kyseliny včetně rozlišení regioizomerů TG. U této konkrétní metody byly pro dostačenou separaci spojeny tři kolony ChromSpher Lipids (v sériovém zapojení) o celkové délce 75 cm. Jako mobilní fáze byla použita

směs hexan/acetonitril/2-propanol, která poskytla lepší rozlišení a také reprodukovatelnost oproti dříve používaným mobilním fázím. Pro tvorbu řady TG regioizomerů byla použita chemická randomizace několika standardů TG vždy s jednou konkrétní kyselinou, což mělo za důsledek náhodné rozložení mastných kyselin v TG při dobře definovaných koncentračních poměrech. V této práci byla poprvé prezentována separace regioizomerních dvojic TG obsahující až tři dvojně vazby a částečná separace regioizomerů TG se čtyřmi až sedmi dvojnými vazbami. Tato metoda byla použita pro charakterizaci regioizomerů u komplexních vzorků rostlinných olejů a živočišných tuků. Výsledky ukázaly rozdílnou preferenci obsazování pozic sn-2 u rostlinných olejů (tj. nenasycené mastné kyseliny) oproti tukům živočišným (tj. opak rostlinných). Závěrem bylo, že tato metoda prokázala dostatečnou účinnost pro analýzu regioizomerů TG rostlinných olejů a živočišných tuků. Celkem tato metoda umožnila identifikaci 196 TG obsahujících 0-11 dvojných vazeb a délku řetězce mastných kyselin o délce 14-24 atomů uhlíku. [39]

### 3.1.3 Chirální separace

Tato metoda je založena na separaci molekul se stejným sumárním a konstitučním vzorcem, které se liší v prostorovém uspořádání na jednom nebo více chirálních atomech, což jsou jinými slovy stereoizomery. Pro tento typ separace je potřeba speciálního selektoru a je možné ji provést dvěma způsoby. První způsob je tzv. přímá separace, což spočívá ve vzniku transitního izomeru, který vznikne mezi chirální stacionární fází nebo chirálním selektorem v mobilní fázi a enantiomerem během samotné chromatografické separace. Druhý způsob je opakem prvního neboli nepřímá separace. Ta je založena na vzniku diastereoizomerů díky chemické reakci mezi chirálním činidlem a enantiomerním párem, což lze jinak nazvat jako chirální derivatizace. [25,40]

Jako příklad chirální separace lze uvést práci, která se věnovala systematické charakterizaci enantiomerů TG v reálných vzorcích pomocí chirální vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI-MS). Chirální metoda HPLC/APCI-MS byla založena na použitých dvou celulosatriis-(3,5-dimethylfenylkarbamátových) kolonách zapojených sériově s použitím gradientu mobilní fáze hexan-2-propanol. Všechny enantiomery TG, které obsahovaly 1-8 dvojných vazeb a různě délky mastného acylového řetězce byly separovány právě pomocí zmíněné chirální HPLC metody s výjimkou TG, které měly kombinaci nasycených a di- nebo trinenasycených mastných acylů v polohách sn-1 a sn-3. Dále byla použita pro přípravu všech

enantiomerů a regioizomerů TG ve směsi randomizační reakce standardů monoacyl TG, zatímco pro syntézu enantiomerů TG byla použita stereospecifická esterifikace 1,2- nebo 2,3-isopropyliden-sn-glycerolů vybranými mastnými kyselinami. Bylo stanoveno složení regioizomerů a enantiomerů TG ve vzorcích lískooříškového oleje a lidské plazmy. Nenasycené mastné kyseliny byly v oleji z lískových oříšků přednostně esterifikovány v poloze sn-2, naopak u lidské plazmy nebyla pozorována výrazná preference nasycených ani nenasycených mastných acylů. Mastné kyseliny s vyšším počtem dvojných vazeb byly preferovány v poloze sn-1 enantiomerů TG v oleji z lískových oříšků na rozdíl od mírné preference sn-3 v lidské plazmě. [41]

Chirálních separací lze dosáhnout i s využitím UHPSFC. V roce 2015 byla konfigurace UHSPFC/MS představena jako významný nástroj pro analýzu nepolárních i některých polárních lipidů. V této práci byla použita kolona vhodná pro separaci lipidových tříd, která dokázala sice do jisté míry rozlišit izomerie v polární části lipidů, ale není vhodná pro analýzu dalších lipidových izomerií. [25] V novějším článku z roku 2023 je však superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií využita pro analýzu chirálních izomerů monoacylglycerolu a diacylglycerolu. Pro vývoj této metody bylo celkem syntetizováno 28 enantiomerních standardů monoacylglycerolů a diacylglycerolů za použití nejčastěji se vyskytujících přírodních mastných kyselin jako jsou například kyselina palmitová, olejová, stearová, linolenová, arachidonová a dokosaheptaenová. Výsledky získané během optimalizace experimentů ukázaly, že nevýraznější vliv na separaci chirálních izomerů má typ stacionární fáze a modifikátoru mobilní fáze. Optimalizované podmínky SFC využívaly tris(3,5-dimethylfenylkarbamátu) derivátu amylosy jako chirálního selektoru a čistého methanolu jako modifikátoru mobilní fáze. Základní separace všech enantiomerů monoacylglycerolů a diacylglycerolů trvaly za daných optimalizovaných podmínek 5 minut. Vyvinutá metoda byla použita k analýze produktů hydrolýzy devíti různých triacylglycerolů obsahující identické mastné acyly a tří izomerů diacylglycerolů katalyzovaných lipázou. Pro lipázy z prasečí slinivky břišní (PPL) a *Pseudomonas fluorescens* (PFL) byly pozorovány rozdílné stereoselektivity, které silně závisely na typu prochirálního substrátu. PFL vykazoval preferenci k hydrolýze mastného acylu z sn-1 poloze triacylglycerolů, která byla výraznější u substrátů s dlouhými polynenasycenými mastnými acyly, zatímco PPL vůči TG stereoselektivitu nevykazovala. Naopak PPL preferovala, na rozdíl od PFL, hydrolýzu z pozice sn-1 prochirálního sn-1, 3-DG regioizomeru. Obě lipázy vykazovaly selektivitu pro hydrolýzu vnějších pozic DG enantiomerů. Tato zjištění ukazují složitý reakční mechanismus lipázou

katalyzované hydrolýzy, která silně závisí na lipáze a povaze substrátu. Použití této metody by mohlo být rozšířeno na hodnocení stereoselektivity jiných lipáz nebo na analýzu izomerů diacylglycerolů a monoacylglycerolů v biologických vzorcích, a to i pro další enantiomerní páry, které v článku nebyly zahrnuty. <sup>[40]</sup>

### 3.2 Principy založené na iontové mobilitě

Iontová mobilitní spektrometrie (IMS) je metoda separace v plynné fázi, která umožňuje separaci iontů prostřednictvím vícenásobných srážek s inertním plynem v prostředí elektrického pole na základě rozdílné hmotnosti, velikosti a tvaru molekul. K separaci dochází v horizontu několika milisekund, takže je vhodná pro spojení s MS bez nebo s předřazenou chromatografickou separací (tj. IMS-MS nebo LC-IMS-MS). <sup>[42,43]</sup>

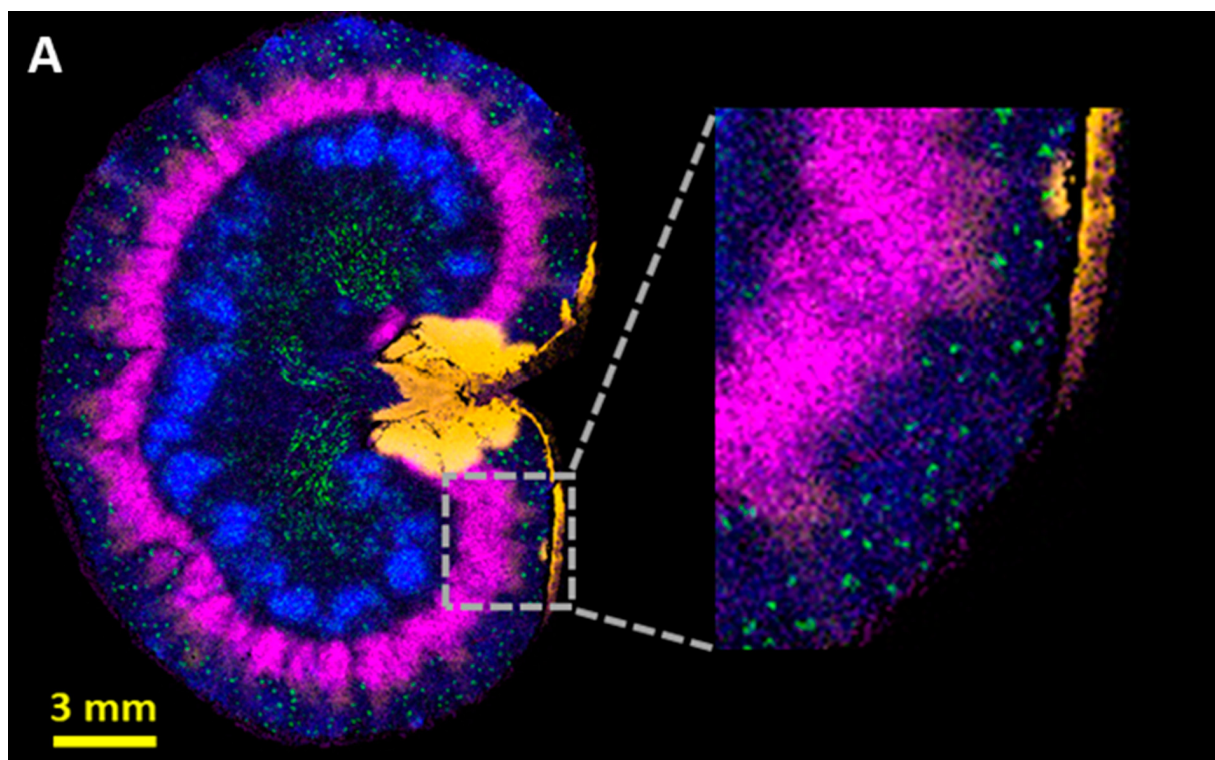
V současné době se dají komerčně dostupné přístroje IMS-MS, vhodné pro separaci izomerů, rozdělit na tři typy. <sup>[44]</sup> Za zmínku stojí iontová mobilitní spektrometrie s využitím driftové trubice (drift tube IM-MS, DTIMS), iontová mobilitní spektrometrie na principu záchytu iontů (TIMS) a iontová mobilitní spektrometrie s putující vlnou (TWIMS) včetně cyklické iontové mobility (cIM). Zařazení iontové mobility do MS konfigurace má zejména dvě výhody. První je ortogonální separace pro zlepšení poměru signálu k šumu a kapacity píků a druhá je poskytnutí charakteristického parametru srážkového (kolizního) průřezu (CCS), který odráží právě velikost, tvar a hmotnost sloučenin a podobně jako chromatografie poskytuje podpůrnou informaci pro identifikaci sloučenin, včetně různých izomerií. <sup>[5,45-48]</sup> Detailní popis principů jednotlivých technik je nad rámec této bakalářské práce, ale lze je dohledat v literatuře. <sup>[49]</sup>

Přidání IMS k tradičnímu lipidomickému pracovnímu postupu zlepšuje rozlišení izomerů a separaci lipidů v komplexních biologických matricích. Technický vývoj hardwaru i softwaru v oblasti IMS-MS umožnil přecistit hmotnostní spektra od interferujících signálů izobarických sloučenin jak v základním, tak i v MS/MS režimu. <sup>[50]</sup> Pro tento účel stačí i nižší rozlišení mobilitní separace, avšak pro rozlišení polohy dvojně vazby či cis/trans izomerie je zapotřebí vyšší rozlišovací schopnost pro získání konkrétních CCS hodnot, které účinně zvyšují jistotu při identifikaci lipidů. Avšak validace hodnot CCS je omezena na omezený počet komerčně dostupných standardů lipidů. Proto je potřeba CCS hodnoty pro zlepšení účinnosti identifikace vhodně predikovat. Pro predikci lze využít faktu, že v řadě případů jsou lipidy homologické řady podobných sloučenin, které se liší délkou acylových řetězců a počtem dvojných vazeb. Díky tomu jsou například v RP-LC, kde je separace ovlivněna zejména přítomnými acylovými

řetězci, v separaci vidět různé retenční závislosti, jak dokládá publikace z týmu prof. Holčapka. <sup>[51]</sup> Podobně v záznamech separací pořízených iontovou mobilitou jsou vidět homologické řady různých lipidů, jak dokládá řada publikací. <sup>[46,48,52,53]</sup>

Využití iontové mobility pro separaci izomerů lipidů bylo publikováno v mnoho pracích a je shrnuto v několika shrnujících článcích. <sup>[46,48,52,54,55]</sup> Níže je uvedeno několik z mého pohledu zajímavých aplikací, které ukazují, že iontová mobilita je v této problematice velmi výkonným nástrojem.

Jedním příkladem je využití TIMS v hmotnostně spektrometrickém zobrazování. Tato práce se zabývá mapováním neutrálních lipidových tříd v biologických tkáních. Ionizace neutrálních druhů lipidů jako jsou například triacylglyceroly (TG), cholestylové estery (CE) a hexosylceramidy (HexCers) z biologických tkání, zůstává nadále zobrazovací výzvou. Pro účinnou ionizaci těchto sloučenin s využitím laserové desorpce/ionizace autoři využili křemíkové nanomateriály NAPAs (silicon nanopost array), které poskytnuly pro analýzu zmíněných lipidů vysokou specifčnost a také, vzhledem k jejich velikosti, umožnily měření s vysokým prostorovým rozlišením. Zlepšení specifčnosti analýzy neutrálních lipidů pomocí TIMS bylo prokázáno u vzorku ledvin potkana, kdy došlo k separaci TG, CE, HexCer a fosfolipidů na základě odlišných trendů pohyblivosti v plynné fázi. Dále tato technologie umožnila separaci polohových izomerů lipidů včetně těch s odlišnou prostorovou lokalizací v řezu ledvin potkanů (viz obrázek 12). <sup>[54]</sup>



Obrázek 12 - Snímek z NAPA-LDI-IMS ledviny potkana [54]

### 3.3 Principy založené na tandemové hmotnostní spektrometrii

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) umožňuje fragmentaci vybraných prekurzorových iontů, které jsou s využitím jednoho analyzátoru izolovány, následně jsou podrobeny vhodné energetické aktivaci a vzniklé produktové ionty jsou pak rozděleny v dalším hmotnostním analyzátoru stejného nebo jiného typu. Možnosti identifikace komplexních lipidů a rozlišení jejich izomerií s využitím MS/MS jsou shrnuty v několika shrnujících článcích, kde je diskutována <sup>[56,57]</sup> identifikace na úrovni umístění dvojně vazby a polohy, jakož i charakterizace modifikací acylového řetězce. <sup>[58,59,56]</sup>

Pro energetickou aktivaci prekurzorových iontů a následnou disociaci se používá různých principů. Mezi nejběžnější aktivaci patří kolizně indukovaná disociace (CID), která je nejčastěji ve většině konfiguracích v nízkoenergetickém ( $E < 100\text{eV}$ ) nebo vysokoenergetické kolize ( $E < 100\text{eV}$ ), pomocí kterých lze dosáhnout i fragmentace na energeticky méně výhodných pozicích a získat tak informace o poloze dvojných vazeb v acylových řetězcích fragmentovaných lipidových iontů. Vysokoenergetické kolize lze ale uskutečnit pouze pomocí některých konfigurací hmotnostních spektrometrů (tandemové uspořádání analyzátorů doby letu nebo magnetických sektorových analyzátorů), v kterých ionty dokážou získat dostatečnou rychlost. <sup>[56]</sup> Nízkoenergetické kolize, které je možné uskutečnit na většině tandemových hmotnostních spektrometrech pro určení polohy dvojných vazeb, nejsou dostačující a používají se pouze pro rozlišení polohových izomerií, které lze určit na základě specifického poměru produktových iontů. Nicméně určitým řešením je tvorba speciálních aduktových iontů,  $[\text{M}+\text{Li}]^+$  nebo  $[\text{M}+\text{Ag}]^+$ , kde daný kation interaguje s dvojnou vazbou a následně po fragmentaci poskytuje typické produktové ionty, z kterých lze určit i polohu dvojně vazby v mastných acylech. <sup>[60,61]</sup>

Další disociační technikou, která je vhodná pro rozlišení dvojných vazeb, je fotodisociace ultrafialovým zářením (UVPD). Tato metoda byla zkoumána ve studiích, která se mimo to zaměřovala i na zkoumání polohy dvojně vazby v nenasycených mastných kyselinách. Ukázalo se, že UVPD poskytuje dvojici jedinečných diagnostických produktových iontů, které vznikly štěpením v blízkosti dvojně vazby, což umožňuje jednoznačnou lokalizaci místa nebo míst nenasycení v těchto lipidech. Na pozorované fragmentační chování a na účinnost metody mělo vliv několik experimentálních proměnných, mezi nimiž lze například uvést vliv energie použitého UV záření o vlnové délce 193 nm nebo typ fragmentovaných aduktových iontů. V této práci byl zkoumán i efekt pozice dvojných vazeb, konjugace dvojných vazeb, při čemž



bylo zjištěno, že ve všech případech lze získat informace o poloze dvojných vazeb, avšak relativní zastoupení diagnostických produktových iontů pro mastné kyseliny s konjugovanými dvojnými vazbami je v porovnání s nekonjugovanými analogy značně nižší. Závěrem bylo díky charakteristickým fragmentovým iontům možné charakterizovat změny poměrů polohových izomerů dvojných vazeb mastných kyselin v izogenních buněčných liniích kolorektálního karcinomu. [62]

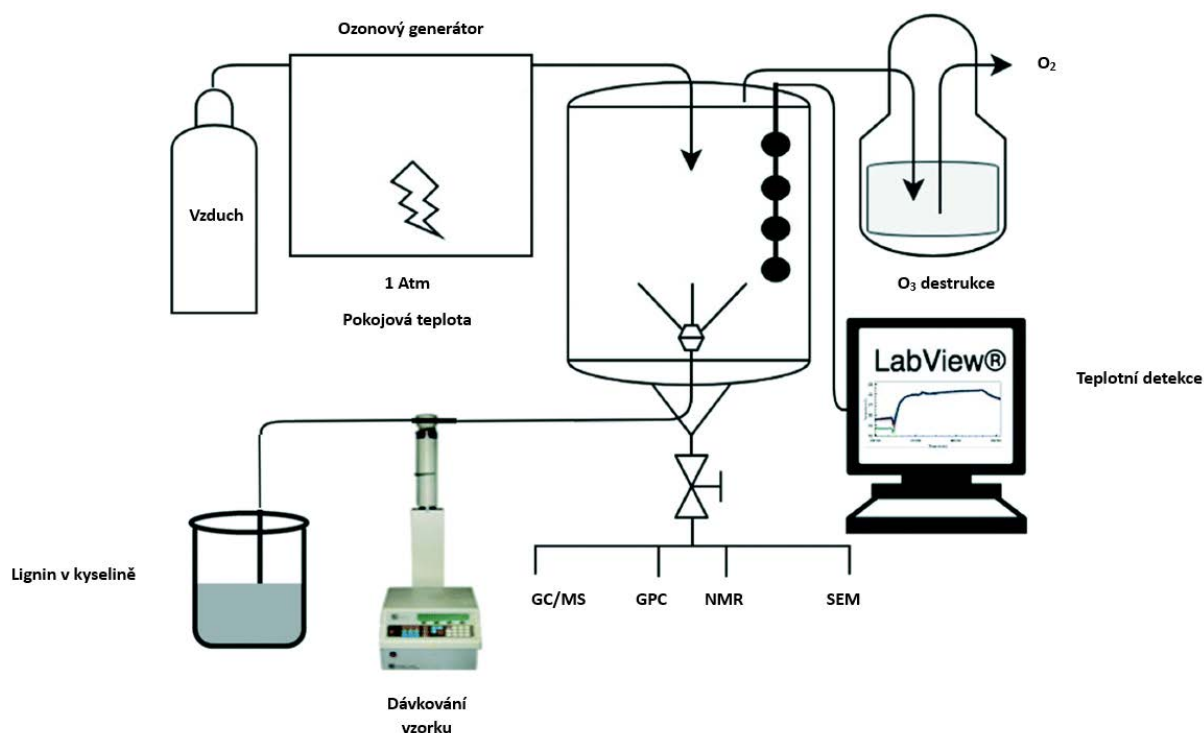
Další MS/MS metoda je disociace aktivovaná elektronem (EAD), která mimo jiné umožňuje určení polohy dvojných vazeb a cis/trans konfigurace. EAD byla použita pro objasnění struktury glycerofosfolipidů, sfingolipidů a acylglycerolů. Na rozdíl od metody CID poskytuje podobně jako UVPD množství unikátních fragmentových iontů, které jsou pro kompletní strukturní charakterizaci lipidů rozhodující. [63]

### **3.4 Principy založené na derivatizačních reakcích a následné MS/MS**

Pro určení polohy dvojných vazeb lze využít i vybrané derivatizační reakce, které lze zařadit před vlastní ionizaci nebo je lze v případě speciální úpravy hmotnostního spektrometru provést i uvnitř přístroje. V rámci této bakalářské práce uvádím dva příklady, kde prvním je využití ozonolýzy a v druhém Paternò–Büchi reakce.

#### **3.4.1 Stanovení dvojných vazeb v lipidech pomocí ozonolýzy ve spojení s MS/MS**

To, že reakce ozonolýzy ve spojení s MS poskytuje informace o lokalizaci dvojných vazeb bylo dokázáno v mnoha pracích. [64-67] Ozonolýzu lze provést například během ionizace, [64,66] avšak pokud jsou v daný okamžik při ionizaci přítomny i nečistoty, dochází ke komplexní fragmentaci, která může ovlivnit následnou interpretaci výsledků. Řešením je zavedení ozonu přímo do hmotnostního analyzátoru, čímž lze selektivně fragmentovat konkrétní prekurzor, avšak pro tento účel je potřeba komerční přístroje. [68]



Obrázek 13 - Schéma mikroreaktoru ozonolýzy [69]

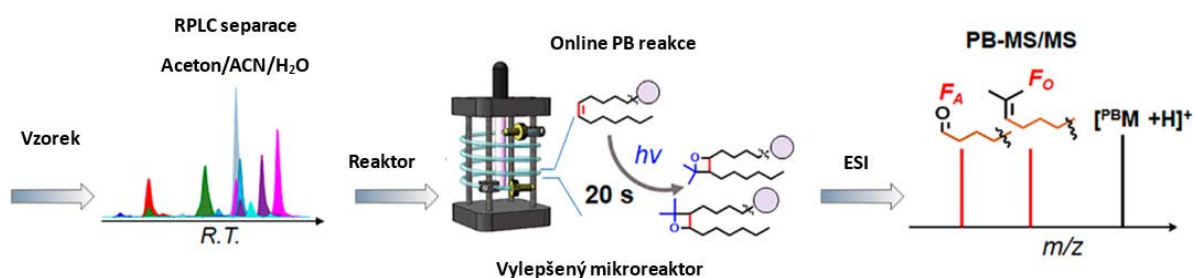
Dalším elegantním řešením je implementace průtokového reaktoru, v kterém je generován ozon pomocí nízkotlaké rtuťové lampy z přítomného kyslíku. Ozon dále reaguje s dvojnou vazbou v přítomnou v acylových řetězcích lipidů a generuje aldehydové produkty, které poskytují informaci o poloze dvojných vazby (podobně jako v předchozích případech). Tato konfigurace umožňuje online ozonolýzu pro LC/MS analýzy, nicméně diagnostické ionty a jejich intenzita značně závisí na rychlosti průtoku vzorku reaktorem. [6] Schéma reaktoru je vidět na obrázku 13. Další aplikace ozonolýzy je již popsána v kapitole 2.3.1.

### 3.4.2 Derivatizace dvojných vazeb pomocí Paternò–Büchi reakce

Mezi další derivatizační reakci hojně využívanou v lipidomice pro určení polohy dvojných vazeb je Paternò–Büchi reakce ve spojení s tandemovou spektrometrií (MS/MS). Této reakce lze využít v off-line [70,71] nebo online uspořádání, [59,72] přičemž praktičtější význam nabízí druhá zmíněná varianta.

Jedna z klíčových studií popisuje využití průtokového mikroreaktoru pro provedení online Paternò–Büchiho reakce při spojení kapalinové chromatografie s reverzní fází a hmotnostní spektrometrie (RP-LC/MS) s cílem lepší analýzy izomerů a izobarů fosfolipidů.

Jako složka mobilní fáze byl využit aceton, který vykazoval dobrý eluční výkon pro separaci fosfolipidů a zároveň působil jako reaktant pro PB reakci.



Obrázek 14 - Schéma pracovního postupu RP-LC-PB-MS/MS [73]

Vylepšený průtokový mikroreaktor umožňoval derivatizaci dvojné vazby u fosfolipidů za 20 sekund. Schéma mikroreaktoru je uvedeno na obrázku 14. Začlenění online Paternò–Büchi reakce do pracovního postupu RP-LC-MS umožňovalo identifikaci umístění dvojných vazeb v izobarických etherově vázaných diacylfosfolipidech, <sup>13</sup>C izobarech a izomerech acylového řetězce ve studovaných lipidových extraktech. [73]

## ZÁVĚR

V této práci byly shrnuty informace o lipidech a jednotlivých izomeriích, onemocněních, ve kterých mají důležitou roli, a jednotlivých metodách a principech pro jejich analýzu, které by do budoucna mohly pomoci s detekcí lipidových izomerů v různých aplikacích.

Vzhledem k dohledaným studiím bylo zjištěno, že důležitým nástrojem pro separaci polohových, a dokonce i geometrických izomerů lipidů, je kapalinová chromatografie v režimu obrácených fází. Tento typ chromatografie je vhodný aplikovat pro širokou škálu lipidů z různých lipidových tříd, a to i pro detailní charakterizaci triacylglycerolů v případě použití bezvodých mobilních fází. Důležitým faktorem je vhodný typ stacionární fáze a délka chromatografické kolony. Nicméně nezbytnou součástí je znalost retence jednotlivých separovaných izomerů, které lze získat proměřením vhodných standardů. Další možností je využití tandemové hmotnostní spektrometrie, která dokáže na základě charakteristických fragmentových iontů izomery rozlišit. Nejčastější možností, která je dostupná na většině přístrojů, je měření MS/MS s využitím kolizně indukované disociace, která vede k odlišným intenzitám fragmentů v závislosti na poloze acylu na glycerolu a pomáhá tak při identifikaci konkrétního regioizomeru. Více strukturních informací lze získat pomocí MS/MS s jiným typem aktivace prekurzoru jako je UVPD nebo EAD. Tyto techniky umožňují v mnoha případech určit i polohu dvojně vazby nebo dokonce i cis/trans izomerii, ale tento typ disociace lze provést pouze na vybraných typech přístrojů. Velmi silným nástrojem pro separaci izomerů je i iontová mobilitní spektrometrie, kterou lze implementovat mezi iontový zdroj a analyzátor hmotnostního spektrometru a získat tak další dimenzi informací. Podobně jako v chromatografii je však potřeba pořadí jednotlivých izomerů v získaném časovém záznamu ověřit pomocí standardů lipidů. Současným trendem je využití dodatečných derivatizačních reakcí (ozonolýza, Paternò–Büchi reakce), které vedou ke vzniku charakteristických produktů, které poskytují specifické produktové ionty, jenž poskytují informace o poloze dvojně vazby. Mezi derivatizační reakci lze svým způsobem zařadit i argentační chromatografii, při které dochází na stacionární k reverzibilní tvorbě komplexů stříbrných iontů s nenasycenými centry v organických molekulách, která následně vede k separaci nenasycených lipidů v závislosti na počtu, poloze a geometrii dvojných vazeb. V případě, kdy je potřeba rozlišit enantiomery lipidů je nejpreferovanějším řešením aplikace speciálních chirálních stacionárních fází, které jsou

v současné době k dispozici jak pro kapalinovou chromatografii, tak i superkritickou fluidní chromatografii.

Závěrem je nutné zmínit, že lipidomika je stále se rozvíjející vědní obor a v příštích letech můžeme očekávat obrovský vývoj v analytických postupech a následně i spoustu nových poznatku na poli porozumění onemocnění spojených s metabolismem lipidů.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LIPID MAPS: *LIPID MAPS Classification updates* [online]. 12.12.2022n. 1. [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: [https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/classification\\_updates](https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/classification_updates)
- [2] KUDA, Odřej, ed. Lipidomická sekce ČSBMB: *Lipidomomika* [online]. Praha, 2014 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <http://lipidomics.uochb.cas.cz/lipidomika.html>
- [3] CHRISTIE, William W. LipidMaps: *The LipidWeb* [online]. Skotsko, 2023 [cit. 2023-03-19]. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/index.php?page=lipids/fa-eic/fa-mono/index.htm>
- [4] ZÜLLIG, T., KÖFELER, H. C. High resolution mass spektrometry in lipidomic. *Mass*
- [5] ZHOU, Z., TU, J., ZHU, Z. J. Advancing the large-scale CCS database for metabolomics and lipidomics at the machine-learning era. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *42*, 34–41.
- [6] A New Glass-Forming Electrolyte Based on Lithium Glycerolate. In: ResearchGate [online]. [cit. 2023-06-26]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/a-The-a-b-and-g-conformations-of-glycerol-b-The-most-probable-conformations\\_fig1\\_327408222](https://www.researchgate.net/figure/a-The-a-b-and-g-conformations-of-glycerol-b-The-most-probable-conformations_fig1_327408222)
- [7] SAHA, Siddhartha S., GHOSH, Mahua. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. *British journal of nutrition.* **2012**, *108* (6), 974-983.
- [8] ROBERTS, Tania L., WOOD, D. A., RIEMERSMA, Rudolph, LAMPE, Fiona. Trans isomers of oleic and linoleic acids in adipose-tissue and sudden cardiac death. *Lancet.* **1995**, *345* (8945), 278-282.
- [9] SCHOOTS, I. G., NIEBOER, D., GIGANTI, F., MOORE, C. M., BANGMA, CH., ROOBOL, M. J. Is Magnetic Resonance Imaging-Targeted Biopsy a Useful Addition to Systematic Confirmatory Biopsy in Men on Active Surveillance for Low-Risk Prostate Cancer? A Systematic Review and Meta-Analysis. *BJU Int.* **2018** *122* (6), 946–58.
- [10] AHMED, H. U., AKIN, O., COLEMAN, J. A., CRANE, S., EMBERTON, M., GOLDENBERG, L., et al. Transatlantic Consensus Group on Active, S., Focal Therapy for Prostate, C., Transatlantic Consensus Group on Active Surveillance and Focal Therapy for Prostate Cancer. *BJU Int.* **2012**, *109* (11), 1636–1647.
- [11] PAN, M., QIN, C., & HAN, X. Lipid Metabolism and Lipidomics Applications in Cancer Research. *Advances in experimental medicine and biology.* **2021**, *1316*, 1–24.
- [12] ALBERTS, B. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

- [13] WOLRAB, D., JIRÁSKO, R., CÍFKOVÁ, E., HÖRING, M., MEI, D., CHOCHOLOUŠKOVÁ, M., PETERKA, O., IDKOWIAK, J., HRNČIAROVÁ, T., KUČAŘ, L., AHREND, R., BRUMAROVÁ, R., FRIEDECKÝ, D., VIVO-TRUYOLS, G., ŠKRHA, P., ŠKRHA, J., KUČERA, R., MELICHAR, B., LIEBISCH, G., BURKHARDT, R., WENK, M. R., CAZENAVE-GASSIOT, A., KARÁSEK, P., NOVOTNÝ, I., GREPLOVÁ, K., HRSTKA, R., HOLČAPEK, M. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. *Nature Communications*. **2022**, *13* (1), 1–13.
- [14] JIRÁSKO, R., IDKOWIAK, J., WOLRAB, D., KVASNIČKA, A., FRIEDECKÝ, D., POLAŇSKI, K., ŠTUDENTOVÁ, H., ŠTUDENT, V., MELICHAR, B., HOLČAPEK, M. Altered Plasma, Urine, and Tissue Profiles of Sulfatides and Sphingomyelins in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Cancers*. **2022**, *14* (19), 4622.
- [15] WOLRAB, D., JIRÁSKO, R., PETERKA, O., IDKOWIAK, J., CHOCHOLOUŠKOVÁ, M., VAŇKOVÁ, Z., HOŘEJŠÍ, K., BRABCOVÁ, I., VRÁNA, D., ŠTUDENTOVÁ, H., MELICHAR, B., HOLČAPEK, M. Plasma lipidomic profiles of kidney, breast and prostate cancer patients differ from healthy controls. *Scientific Reports*, **2021**, *11* (1), 1–14.
- [16] TOUSIGNANT, K. D., ROCKSTROH, A., POAD, B. L. J., TALEBI, A., YOUNG, R. S. E., FARD, A. T., GUPTA, R., ZANG, T., WANG, CH., LEHMAN, M. L., SWINNEN, J. V., BLANKSBY, S. J., NELSON, C. C., SADOWSKY, M. C. Therapy-induced lipid uptake and remodeling underpin ferroptosis hypersensitivity in prostate cancer. *Cancer and Metabolism*. **2020**, *8* (11).
- [17] FERLAY, J., COLOMBET, M., SOERJOMATARAM, I., MATHERS, C., PARKIN, D. M., PIÑEROS, M., et al. Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN. *Sources and Methods. Int J Cancer*. **2019**, *144* (8), 1941–53.
- [18] PAINE, M. L. R., POAD, J. B. L., EIJKEL, G. B., MARSHALL, D. L., BLANKSBY, S. J., HEEREN, A. R. M., ELLIS, S. R. Mass Spectrometry Imaging with Isomeric Resolution Enabled by Ozone-Induced Dissociation. *Angewandte Chemie International Edition*. **2018**, *57* (33), 10530–10534.
- [19] YOUNG, R. S. E., CLAES, B. S. R., BOWMAN, A. P., WILLIAMS, E. D., SHEPHERD, B., PERREN, A., POAD, B. L. J., ELLIS, S. R., HEEREN, R. M. A., SADOWSKI, M. C., BLANKSBY, S. J. Isomer-Resolved Imaging of Prostate Cancer Tissues Reveals

Specific Lipid Unsaturation Profiles Associated With Lymphocytes and Abnormal Prostate Epithelia. *Frontiers in Endocrinology*. **2021**, *12*.

- [20] DENNIS, E.A., et al. *Lipidomics Gateway* [online]. Dostupné z: <http://www.lipidmaps.org/>
- [21] QUEHENBERGER, O., ARMANDO, A. M., BROWN, A. H., MILNE, S. B., MYERS, D. S., MERRILL, A. H., BANDYOPADHYAY, S., JONES, K. N., KELLY, S., SHANER, R. L., SULLARDS, C. M., WANG, E., MURPHY, R. C., BARKLEY, R., M., LEIKER, T. J., RAETZ, C. R. H., GUAN, Z., LAIRD, G. M., SIX, D. A., RUSSELL, D. W., MCDONALD, J. G., SUBRAMANIAM, S., FAHY, E., DENNIS, E. A. J. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Lipid Res.* **2010**, *51* (11), 3299–3305.
- [22] VAN MEER, G., VOELKER, D. R., FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (2), 112–124.
- [23] LI, M., YANG, L., BAI, Y., LIU, H. Analytical methods in lipidomics and their applications. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 161–175.
- [24] ČAJKA, T., FIEHN, O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spektrometry. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *61*, 192–206.
- [25] LÍSA, M., HOLČAPEK, M. High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*. **2015**, *87* (14), 7187–7195.
- [26] CÍFKOVÁ, E., LÍSA, M., HRSTKA, R., VRÁNA, D., GATĚK, J., MELICHAR, B., HOLČAPEK, M. Correlation of lipidomic composition of cell lines and tissues of breast cancer patients using hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and multivariate data analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2017**, *31* (3), 253-263.
- [27] HOLČAPEK, M., DVOŘÁKOVÁ, H., LÍSA, M., GIRÓN, A. J., SANDRA, P., CVAČKA, J. Regioisomeric analysis of triacylglycerols using silver-ion liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: Comparison of five different mass analyzers. *Journal of Chromatography A*. **2010**, *1217*, 8186–8194.
- [28] ZHANG, Feng, CHU, Xiaogang, WANG, Xiujuan, YANG, Minli, LING, Yun, SUN, Li, LI, Xiuqin, YONG, Wei. Preparative argentation reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2008**, *1213* (2), 176–180.



- [29] OVČAČÍKOVÁ, M., LÍSA, M., CÍFKOVÁ, E., HOLČAPEK, M. Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2016**, *1450*, 76–85.
- [30] LÍSA, M., HOLČAPEK, M. J. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1198–1199*, 115–130.
- [31] HOLČAPEK, M., LÍSA, M., Silver-Ion Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. In *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*, **2017**, 115–140.
- [32] LÍSA, M., CÍFKOVÁ, E., HOLČAPEK, M. Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2011**, *1218* (31), 5146–5156.
- [33] HOLČAPEK, M., OVČAČÍKOVÁ, M., LÍSA, M., CÍFKOVA, E., HÁJEK, T. Continuous comprehensive two-dimensional liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry of complex lipidomic samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 5033–5043
- [34] HOLČAPEK, Michal, LIEBISCH, Gerhard, EKROOS, Kim. Lipidomic Analysis. *Analytical chemistry.* **2018**, *90*, 4249–4257.
- [35] KNITTELFELDER, O. L., WEBERHOFER, B. P., EICHMANN, T. O., KOHLWEIN, S. D., & RECHBERGER, G. N. A versatile ultra-high performance LC-MS method for lipid profiling. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* **2014**, *951-952*, 119–128.
- [36] GÓMEZ-CORTÉS, P., & MARTÍNEZ MARÍN, A. L. Detailed fatty acid profile of serum lipid classes in lactating women and their relationship with milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology.* **2017**, *119* (4), 1600095.
- [37] SORENSEN, M. J., MILLER, K. E., JORGENSEN, J. W., & KENNEDY, R. T. Ultrahigh-Performance capillary liquid chromatography-mass spectrometry at 35 kpsi for separation of lipids. *Journal of Chromatography A.* **2020**, *1611*, 460575.
- [38] MIYAZAKI, R., KTO, S., OTOKI, Y., RAHMANIA, H., SAKAINO, M., TAKEUCHI, S., TOSHIRO, S., IMAGI, J., NAKAGAWA, K. Elucidation of decomposition pathways of linoleic acid hydroperoxide isomers by GC-MS and LC-MS/MS. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **2023**, *87* (2), 179–190.

- [39] LÍSA, M., VELÍNSKÁ, H., HOLČAPEK, M. Regioisometric characterization of Triacylglycerols Using Silver-Ion HPLC/MS and Randomization Synthesis of Standards. *Analytical Chemistry*. **2009**, *81*, 3903–3910.
- [40] KOZLOV, O., HORÁKOVÁ, E., RADEMACHEROVÁ, S., MALIŇÁK, D., ANDRÝS, R., PRCHALOVÁ, E., LÍSA, M. Direct Chiral Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Monoacylglycerol and Diacylglycerol Isomers for the Study of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Triacylglycerols. *Analytical Chemistry*. **2023**, *95*, 5109–5116.
- [41] LÍSA, M., HOLČAPEK, M. Characterization of Triacylglycerol Enantiomers Using Chiral HPLC/APCI-MS and Synthesis of Enantiomeric Triacylglycerols. *Analytical Chemistry*. **2013**, *85*, 1852–1859.
- [42] ZHENG, X., WOJCIK, R., ZHANG, X., IBRAHIM, Y. M., BURNUM-JOHNSON, K. E., ORTON, D. J., MONROE, M. E., MOORE, R. J., SMITH, R. D., BAKER, E. S., ANNU. *Rev. Anal. Chem.* **2017**, *10*, 71–92.
- [43] D'ANTRI, V., CAUSON, T., HERNANDEZ-ALBA, O., MUTABAZI, A., VEUTHEY, J. L., CIANFERANI, S., GUILLARME, D., SEP, J. Adding a new separation dimension to MS and LC-MS: What is the utility of ion mobility spectrometry? *Scii*. **2018**, *41* (1), 20–67.
- [44] MAY, J. C., MCLEAN, J. A. Ion Mobility-Mass Spectrometry: Time-Dispersive Instrumentation *Anal. Chem.* **2015**, *87* (3), 1422–1436.
- [45] PAGLIA, G., ASTRITA, G. Metabolomics and lipidomics using traveling-wave ion mobility mass spectrometry *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (4), 797–813.
- [46] HINZ, C., LIGGI, S., GRIFFIN, J. L. The potential of Ion Mobility Mass Spectrometry for high-throughput and high-resolution lipidomic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *42*, 42–50.
- [47] ZHENG, X., SMITH, R. D., BAKER, E. S. Recent advances in lipid separations and structural elucidation using mass spectrometry combined with ion mobility spectrometry, ion-molecule reactions and fragmentation approaches. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *42*, 111–118.
- [48] TU, J., ZHOU, Z., LI, T., ZHU, Z. J. The emerging role of ion mobility-mass spectrometry in lipidomics to facilitate lipid separation and identification. *Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, *116*, 332–339.

- [49] DODDS, J. N., BAKER, E. S. Ion Mobility Spectrometry: Fundamental Concepts, Instrumentation, Applications, and the Road Ahead. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **2019**, *30* (11), 2185–2195.
- [50] TE BRINKE, E., ARRIZABALAGA-LARRAÑAGA, A., BLOKLAND, M. H. Insights of ion mobility spectrometry and its application on food safety and authenticity: A review. *Analytica Chimica Acta*. **2022**, *1222*, 340039.
- [51] VAŇKOVÁ, Z., PETERKA, O., CHOCHOLOUŠKOVÁ, M., WOLRAB, D., JIRÁSKO, R., HOLČAPEK, M. Retention dependences support highly confident identification of lipid species in human plasma by reversed-phase UHPLC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2022**, *414*, 319–331.
- [52] LEAPTROT, K. L., MAY, J. C., DODDS, J. N., & MCLEAN, J. A. Ion mobility conformational lipid atlas for high confidence lipidomics. *Nature Communications*. **2019**, *10* (1), 1–9.
- [53] HARRIS, R. A., LEAPTROT, K. L., MAY, J. C., & MCLEAN, J. A. New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, *116*, 316–323.
- [54] FINCHER, J. A., DJAMBAZOVA, K. V., KLEIN, D. R., DUFRESNE, M., MIGAS, L. G., VAN DE PLAS, R., CAPRIOLI, R. M., SPRAGGINS, J. M. Molecular Mapping of Neutral Lipids Using Silicon Nanopost Arrays and TIMS Imaging Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **2021**, *32* (10), 2519–2527.
- [55] WU, Q., WANG, J. Y., HAN, D. Q., YAO, Z. P. Recent advances in differentiation of isomers by ion mobility mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*. **2020**, *124*, 115801.
- [56] LU, H., ZHANG, H., LI, L. Review of Recent Advances in Lipid Analysis of Biological Samples via Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Metabolites*. **2021**, *11* (781), 1–18.
- [57] HSU, F. F., TURK, J. Electrospray Ionization Multiple-Stage Linear Ion-trap Mass Spectrometry for Structural Elucidation of Triacylglycerols: Assignment of Fatty Acyl Groups on the Glycerol Backbone and Location of Double Bonds. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*. **2010**, *21* (4), 657–669.
- [58] ZHANG, W., JIAN, R., ZHAO, J., LIU, Y., XIA, Y. Deep-lipidotyping by mass spectrometry: recent technical advances and applications. *J. Lipid Res*. **2022**, *63* (7), 1–15.

- [59] MA, X., ZHANG, W., LI, Z., XIA, Y., OUYANG, Z. Enabling High Structural Specificity to Lipidomics by Coupling Photochemical Derivatization with Tandem Mass Spectrometry. *Acc Chem Res.* **2021**, *54* (20), 3873–3882.
- [60] YU, Q., YU, B., YANG, H., LI, X., & LIU, S. Silver (I)-assisted enantiomeric analysis of ginsenosides using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry.* **2012**, *47* (10), 1313–1321.
- [61] HSU, F. F., TURK, J. Electrospray Ionization Multiple-Stage Linear Ion-trap Mass Spectrometry for Structural Elucidation of Triacylglycerols: Assignment of Fatty Acyl Groups on the Glycerol Backbone and Location of Double Bonds. *Journal of American Society for Mass Spectrometry.* **2010**, *21* (4), 657–669.
- [62] FANG, M., RUSTAM, Y., PALMIERI, M., SIEBER, O. M., REID, G. E. Evaluation of ultraviolet photodissociation tandem mass spectrometry for the structural assignment of unsaturated fatty acid double bond positional isomers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **2020**, *412*, 2339–2351.
- [63] PEARSON, M., HUNTER, CH., BABA, T. Complete structural elucidation of lipids in a single experiment using electron activated dissociation (EAD). *SCIEX.* 1–6.
- [64] THOMAS, M. C., MITCHELL, T. W., HARMAN, D. G., DEELEY, J. M., MURPHY, R. C., BLANKSBY, S. J. Elucidation of Double Bond Position in Unsaturated Lipids by Ozone Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (13), 5013–5022.
- [65] HARRIS, R. A., MAY, J. C., STINSON, C. A., XIA, Y., MCLEAN, J. A. Determining Double Bond Position in Lipids Using Online Ozonolysis Coupled to Liquid Chromatography and Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry.* **2018**, *90*, 1915–1924.
- [66] THOMAS, M. C., MITCHELL, T. W., BLANKSBY, S. J. Ozonolysis of Phospholipid Double Bonds during Electrospray Ionization: A New Tool for Structure Determination. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (1), 68–59.
- [67] YOUNG, R. S. E., BOWMAN, A. P., TOUSIGNANT, K. D., POAD, B. L. J., GUNTER, J. H., PHILP, L. K., NELSON, C. C., ELLIS, S. R., HEEREN, R. M. A., SADOWSKI, M. C., BLANKSBY, S. J. Isomeric lipid signatures reveal compartmentalized fatty acid metabolism in cancer. *Journal of Lipid Research.* **2022**, *63* (6), 1–16.

- [68] THOMAS, M. C., MITCHELL, T. W., HARMAN, D. G., DEELEY, J. M., NEALON, J. R., BLANKSBY, S. J. Ozone-Induced Dissociation: Elucidation of Double Bond Position within Mass-Selected Lipid Ions. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (1), 303–311.
- [69] SILVERMAN, J. R., DANBY, A. M., SUBRAMANIAM, B. Intensified ozonolysis of lignins in a spray reactor: insights into product yields and lignin structure. *Reaction Chemistry and Engineering.* **2019**, *4*, 1412–1430.
- [70] BEDNAŘÍK, A., BÖLSKER, S., SOLTWISCH, J., & DREISEWERD, K. An On-Tissue Paternò–Büchi Reaction for Localization of Carbon–Carbon Double Bonds in Phospholipids and Glycolipids by Matrix-Assisted Laser-Desorption–Ionization Mass-Spectrometry Imaging. *Angewandte Chemie International Edition*, **2018**, *57* (37), 12092–12096.
- [71] MA, X., & XIA, Y. Pinpointing Double Bonds in Lipids by Paternò–Büchi Reactions and Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition.* **2014**, *53* (10), 2592–2596.
- [72] ZHANG, W., ZHANG, D., CHEN, Q., WU, J., OUYANG, Z., & XIA, Y. Online photochemical derivatization enables comprehensive mass spectrometric analysis of unsaturated phospholipid isomers. *Nature Communications.* **2019**, *10* (1), 1–9.
- [73] ZHANG, W., SHANG, B., OUYANG, Z., XIA, Y. Enhanced Phospholipid Isomer Analysis by Online Photochemical Derivatization and RPLC-MS. *Analytical Chemistry.* **2020**, *92*, 6719–6726.