

## URČENÍ POLOH NÁSOBNÝCH VAZEB V LIPIDECH POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE. ČÁST I

ŠTĚPÁN STRNAD, VLADIMÍR VRKOSLAV a JOSEF CVAČKA

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Česká republika  
josef.cvacka@uochb.cas.cz

Došlo 7.8.23, přijato 5.10.23.

Strukturální analýza lipidů je jedním z klasických témat organické hmotnostní spektrometrie. V posledních letech jsme svědky rychlého vývoje nových metod, které umožňují charakterizovat struktury lipidů přesněji, rychleji, a ze složitějších vzorků. Tyto metody jsou většinou založeny na derivatizačních reakcích nebo nově dostupných fragmentačních technikách. Základní hmotnostně-spektrometrická analýza lipidů, tj. určení třídy lipidů, délky acylového řetězce a stupně nenasycení bývá poměrně snadná, podrobnější popis struktury je však složitější. Ve dvoudílném přehledovém článku představujeme pokroky hmotnostní spektrometrie při charakterizaci dvojných a trojných vazeb v acylových řetězcích lipidů metodami LC-MS a přímou ionizací kapalných vzorků za atmosférického tlaku. V prvním článku se věnujeme derivatizacím doprovázeným změnou polaritý náboje, ozonolýze a Paternò-Büchiho reakci.

Klíčová slova: dvojná vazba, fragmentce, hmotnostní spektrometrie, lipidy, ozonolýza, Paternò-Büchi, strukturální analýza, trojná vazba

### Obsah

1. Úvod
2. Fragmentační techniky
3. Poloha a izomerie násobných vazeb v alifatických řetězcích lipidů
4. Derivatizace mastných kyselin doprovázená změnou polaritý náboje
5. Disociace vyvolaná ozonem – ozonolýza
6. Paternò-Büchiho reakce
7. Závěr

### 1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie je důležitým nástrojem pro strukturální analýzu lipidů<sup>1</sup>. Při ionizaci lipidů vznikají kladně či záporně nabitý ionty se sudým nebo lichým počtem elektronů, které lze využít pro strukturální charakterizaci. Charakter iontů závisí na druhu iontového zdroje, jeho nastavení a také na použitých rozpouštědlech a aditivech. Lipidy, které neposkytují strukturálně diagnostické ionty, lze chemicky modifikovat<sup>2</sup>. V iontových zdrojích pracujících za atmosférického tlaku (elektrosprejová ionizace, ESI; chemická ionizace za atmosférického tlaku, APCI; fotoionizace za atmosférického tlaku, APPI) vznikají v kladném ionizačním módu nejčastěji protonované molekuly. Ne vždy vede fragmentace těchto iontů k požadované strukturální informaci, a proto se cíleně připravují a fragmentují

i další typy iontů, například adukty s alkalickými kovy, kovy alkalických zemin nebo přechodnými kovy. Někdy může být výhodné vytvořit a fragmentovat ionty s lichým počtem elektronů. Takové ionty vznikají typicky při elektronové ionizaci (EI), lze je však také vytvořit za specifických podmínek v iontových zdrojích pro APCI a APPI (cit.<sup>3</sup>). Některé deriváty lipidů umožňují získat radikálové ionty fragmentací neradikálových prekurzorových iontů. Příkladem mohou být deriváty obsahující jod na aromatickém jádře, které po elektrosprejové ionizaci a aktivaci UV zářením odštěpují jod za vzniku radikálového iontu<sup>4</sup>.

### 2. Fragmentační techniky

Pro získání fragmentů nesoucích informace o struktuře lze lipidové ionty aktivovat různými způsoby: interakcemi s neutrálními molekulami nebo atomy v plynném stavu, s povrchy, fotony nebo elektrony<sup>5</sup>. Fragmentace lze dosáhnout i použitím chemické reakce<sup>6</sup>.

Kolizně indukovaná disociace (CID) je nejběžnějším způsobem aktivace iontů v hmotnostní spektrometrii. K fragmentaci dochází při srážkách urychlených iontů s neutrálními atomy nebo molekulami v plynné fázi. Ve většině přístrojů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii je k dispozici nízkoeenergetická CID, která pracuje s relativně malými kinetickými energiemi prekurzorů (< 1 keV). Dochází při ní ke štěpení nejslabších chemických vazeb. Při vysokoenergetické CID (1–20 keV) se

zvyšuje pravděpodobnost přímého štěpení vazeb, což umožňuje podrobnější strukturní analýzu lipidů. Příkladem disociací pozorovaných při vysokých energiích jsou fragmentace s odlehlým nábojem (charge remote fragmentation; CRF). Vysokoenergetickou CID je možno realizovat pouze s méně běžnými přístroji, jako jsou sektorové hmotnostní spektrometry nebo tandemové analyzátoři doby letu (TOF/TOF). Další technika, povrchem indukovaná disociace (surface-induced dissociation, SID), je založena na srážkách prekurzorových iontů s povrchem pevného terče. SID je dnes využívána hlavně pro charakterizaci proteinových komplexů, včetně těch, které vážou lipidy<sup>7,8</sup>. Přestože je tato aktivací technika známá více než 40 let, komerční přístroje s možností SID se objevily teprve nedávno a její využití pro strukturní analýzu lipidů není proto příliš prozkoumáno.

Ve fotodisociačních technikách se využívají interakce prekurzorových iontů s fotony<sup>9</sup>. K aktivaci dochází pohlcením jednoho fotonu nebo postupnou absorpcí několika fotonů. Zatímco v případě vysokoenergetických fotonů stačí k fragmentaci absorpce jediného kvanta, fotony s nízkou energií aktivují ion postupně, podobně jako v nízkenergetické CID. Postupná aktivace nízkenergetickými fotony se využívá při infračervené multifotonové disociaci (infrared multiple photon dissociation, IRMPD). Jak nízkenergetická CID, tak IRMPD poskytují relativně jednoduchá spektra, která popisují základní strukturní rysy lipidů. Naproti tomu fotodisociace ultrafialovým zářením (ultraviolet photodissociation, UVPD) vede ke vzniku specifických fragmentů, například produktů štěpení vazeb uhlík–uhlík v acylových řetězcích. UV fotony mají dostatek energie k excitaci iontů do vyšších elektronových stavů, a tím k fragmentaci vazeb s vyšší vazebnou energií. UVPD spektra se liší v závislosti na vlnové délce laserového záření<sup>10</sup>.

Disociace iontů interakcemi s elektrony se využívá v několika metodách známých jako disociace záchytem elektronu (electron capture dissociation, ECD), disociace přenosem elektronu (electron transfer dissociation, ETD), disociace indukovaná elektrony (electron-induced dissociation, EID) a disociace odtržením elektronů (electron detachment dissociation, EDD). Tyto techniky se souhrnně označují jako ExD (cit.<sup>11</sup>). Metody ECD a ETD se obvykle využívají pro peptidy a proteiny. Vícenásobně kladně nabitě prekurzorové ionty interagují s termálními elektrony (ECD) nebo reaktivními radikálovými anionty (ETD) a vznikající ionty s redukováným nábojem a lichým počtem elektronů dále fragmentují. Použití ECD a ETD pro lipidy je omezené, protože jejich molekuly většinou neposkytují vícenásobně nabitě ionty. Dvojnásobně nabitě ionty lipidů lze nicméně vytvořit adicí vícemocných iontů kovů<sup>12</sup> nebo několika jednomocných iontů<sup>13</sup>. Při EDD je využívána interakce vícenásobně záporně nabitých iontů s elektrony. Dochází ke ztrátě elektronu a vzniku excitovaných radikálových iontů s vyšším záporným nábojem, které se rozpadají na fragmenty. EDD nachází uplatnění například při strukturní analýze glykolipidů<sup>14</sup>. EID se používá k fragmentaci jednonásobně nabitých iontů, které se

při ionizaci lipidů obvykle tvoří. Vícenásobné interakce s elektrony vedou k elektronovým i vibračním excitacím a získaná EID spektra jsou proto informačně bohatá, s rozsáhlým štěpením vazeb v acylových řetězcích.

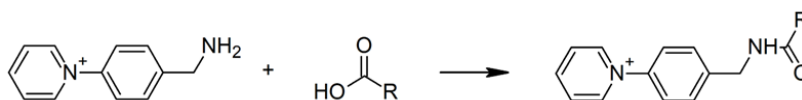
### 3. Poloha a izomerie násobných vazeb v alifatických řetězcích lipidů

Lipidy mohou tvořit polohové izomery dvojně nebo trojně vazby. Poloha a stereoizomerie násobné vazby ovlivňuje fyzikální a chemické vlastnosti lipidů a odráží se proto i v biologické aktivitě lipidů<sup>15</sup>. Lokalizace dvojných vazeb v nenasycených alifatických řetězcích lipidů je klasický analytický problém, který lze řešit hmotnostní spektrometrií. První metody určování polohy násobné vazby byly založeny na EI. Spektra EI většinou nedovolují určit polohu dvojně vazby přímo, a proto se využívaly chemické derivatizace lipidů v místě dvojně vazby<sup>16</sup> nebo na jiné funkční skupině<sup>17</sup>. V prvním případě oslabují nově zavedené skupiny vazbu uhlík–uhlík v místě původní dvojně vazby, zatímco druhý přístup umožňuje fragmentaci, která probíhá vzdáleně od místa náboje. Derivatizační strategie využívající fragmentaci v místě náboje a fragmentaci s odlehlým nábojem (CRF) byly později vyvinuty také pro měkké ionizační techniky. Chromatografická separace stereoizomerů dvojných vazeb (*cis/trans* izomerů) je poměrně snadná<sup>18–21</sup>, ale jejich identifikace z hmotnostních spekter bývá obtížná. Malé rozdíly ve spektrech stereoizomerů jsou většinou pouze v intenzitách fragmentů. Důkazy o geometrii dvojně vazby lze nalézt ve spektrech získaných vysokoenergetickou CID (cit.<sup>22</sup>), EID (cit.<sup>23</sup>) nebo ozonem indukovanou disociací (OzID)<sup>24,25</sup>.

Doposud bylo vyvinuto jen několik metod pro určení polohy trojných vazeb. EI spektra 4,4-dimethyloxazolínových (DMOX) derivátů mastných kyselin s trojnými vazbami poskytují CRF ionty s rozdílem *m/z* 10 (cit.<sup>26</sup>). Pravděpodobně jediná metoda ionizace za atmosférického tlaku pro určení polohy trojně vazby využívá chemickou reakci acetonitrilu v plynné fázi při APCI (cit.<sup>27</sup>).

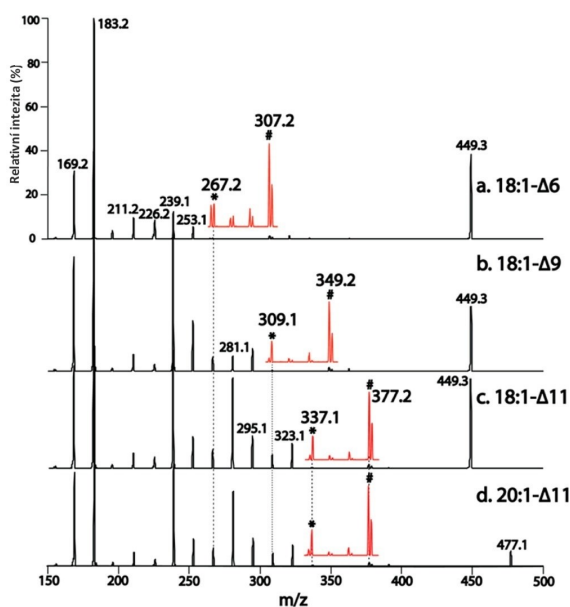
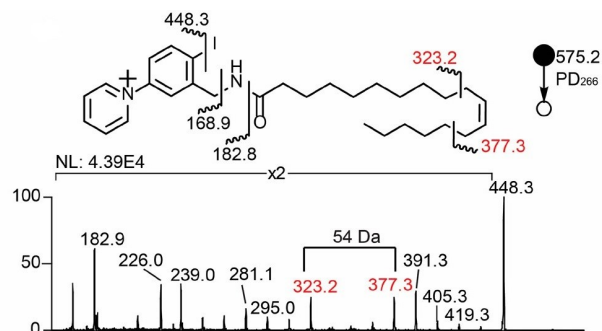
### 4. Derivatizace mastných kyselin doprovázená změnou polaritu náboje

Lipidy jsou často hydrolyzovány na mastné kyseliny nebo transesterifikovány. Identifikace mastných kyselin a jejich strukturní analýza se tradičně provádí pomocí (GC)/EI-MS (cit.<sup>2,28</sup>). Nejvíce informací poskytují spektra derivátů s funkční skupinou, na které se po ionizaci lokalizuje kladný náboj, např. pyrrolidiny<sup>29,30</sup>, pikolinyl (3-hydroxymethylpyridinyl)ové estery<sup>17</sup> nebo dimethyloxazoliny (DMOX)<sup>17,31</sup>. CRF přímých, nesubstituovaných alkylových řetězců poskytuje sérii fragmentů lišících se o 14 hmotnostních jednotek. Přítomnost dvojně vazby nebo jiné funkční skupiny tuto pravidelnou distribuci naruší, čehož lze využít k určení její polohy v řetězci<sup>32–35</sup>.

Schéma 1. Derivatizace mastné kyseliny *N*-(4-aminomethylfenyl)pyridiniem (AMPP<sup>+</sup>)

Kromě kladně nabitých iontů lze pro strukturní analýzu pomocí CRF využít i záporně nabitě ionty. Volné mastné kyseliny poskytují při ionizaci ostřelováním urychlenými atomy (FAB) deprotonované molekuly se záporným nábojem lokalizovaným na karboxylové skupině. Tyto ionty lze následně fragmentovat pomocí vysokoenergetické CID (cit.<sup>36</sup>).

Nástup ionizačních technik za atmosférického tlaku, zejména elektrospreje, umožnil analyzovat mastné kyseliny pomocí HPLC-MS nebo přímým nástřikem kapalného vzorku do hmotnostního spektrometru. Analýza nederivatizovaných mastných kyselin pomocí ESI-MS není příliš využívána, protože citlivost detekce je nízká a nízkoenergetická CID spektra neposkytují důležité informace o struktuře alifatických řetězců. Zvýšení signálu bylo dosaženo derivatizačními reakcemi, které zavádějí do molekuly permanentní kladný náboj<sup>25,37–40</sup>. Protože deriváty s permanentním kladným nábojem pocházejí z molekul, které se před derivatizací snadno deprotonovaly na záporně nabitě ionty, označují se takovéto reakce jako „charge-switch“ derivatizace, tj. derivatizace se změnou polarity náboje. Pro strukturní analýzu mastných kyselin se osvědčila derivatizace *N*-(4-aminomethylfenyl)pyridiniem

Obr. 1. MS<sup>2</sup> spektra AMPP<sup>+</sup> derivátů mononenasyčených mastných kyselin s různými polohami dvojných vazeb. Přepřacováno podle cit.<sup>37</sup>Obr. 2. Fotodisociační hmotnostní spektrum 4-I-AMPP<sup>+</sup> derivátu kyseliny *cis*-vackenové. Přepřacováno podle cit.<sup>42</sup>

(AMPP<sup>+</sup>)<sup>41</sup> (schéma 1). Činidlo bylo navrženo tak, aby minimalizovalo fragmentaci derivátů v blízkosti místa permanentního náboje a poskytovalo tak CRF ionty o vysoké intenzitě. CID spektra nasycených mastných kyselin derivatizovaných pomocí AMPP<sup>+</sup> (cit.<sup>41</sup>) obsahují sérii fragmentů lišících se o 14 hmotnostních jednotek. Tyto ionty jsou produkty štěpení vazeb uhlík–uhlík, vznikající 1,4-eliminací vodíku. Přítomnost jedné nebo více dvojných vazeb snižuje intenzitu některých iontů a vytváří nové fragmenty, které jednoznačně identifikují polohu dvojných vazeb (obr. 1). Kromě dvojných vazeb pomáhají deriváty AMPP<sup>+</sup> lokalizovat také místa methylového větvení<sup>42,43</sup> nebo hydroxyskupiny<sup>44,45</sup>. Pro zvýšení výtěžnosti fragmentových iontů byly vyvinuty deriváty schopné tvořit ionty s lichým počtem elektronů<sup>46</sup>. Radikálové ionty vznikají fotodisociací prekurzorů se sudým počtem elektronů, které obsahují fotoštěpitelný jod. Derivatizace mastných kyselin 1-(3-(aminomethyl)-4-jodfenyl)pyridin-1-iem (4-I-AMPP<sup>+</sup>) a 1-(4-(aminomethyl)-3-jodfenyl)pyridin-1-iem (3-I-AMPP<sup>+</sup>) probíhá obdobně jako v případě AMPP<sup>+</sup> (cit.<sup>40</sup>). Fragmentací těchto derivátů laserovým UV zářením (266 nm) se získá radikál-kation [M – I]<sup>++</sup> a sekundární fragmenty, které odpovídají štěpení acylového řetězce a eliminaci AMPP<sup>+</sup> (obr. 2).

## 5. Disociace vyvolaná ozonem – ozonolýza

Reakci dvojných vazeb s ozonem popsal Christian F. Schönbein<sup>47</sup> v roce 1847 a její mechanismus vysvětlil o sto let později Rudolf Criegee<sup>48</sup>. Reaktanty nejprve tvoří

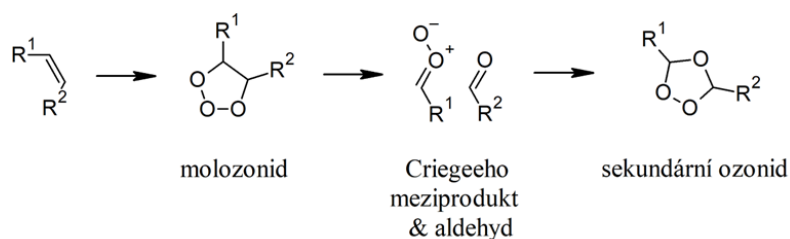
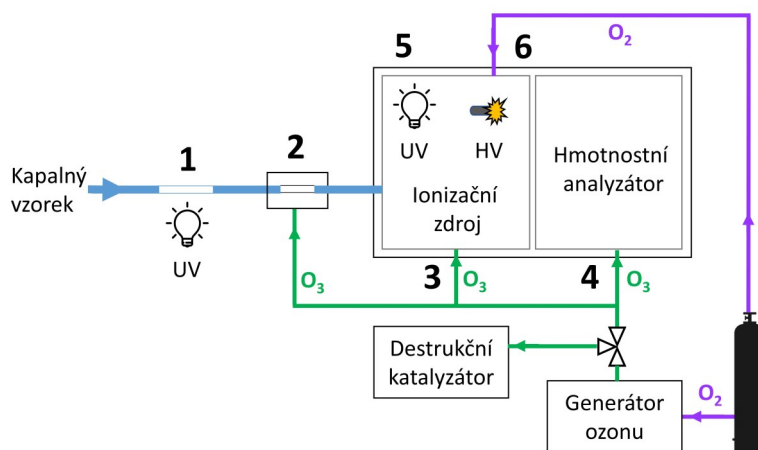


Schéma 2. Derivatizace dvojně vazby ozonem

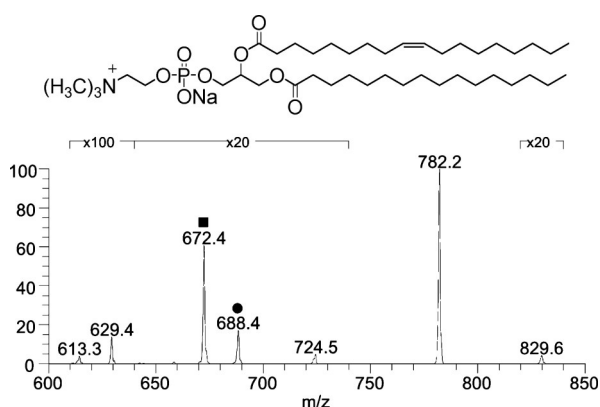
nestabilní molozonid (1,2,3-trioxolan), který se zpětně mění na odpovídající karbonyl oxid (Criegeeho meziprodukt) a aldehyd. Oxid a aldehyd opět reagují za vzniku sekundárního ozonidu se strukturou 1,2,4-trioxolanu (schéma 2).

Při rozkladu ozonidů vznikají aldehydy, které lze použít k určení polohy dvojně vazby. V 60. letech 20. století byla vyvinuta metoda určení polohy dvojně vazby založená na tepelném rozkladu ozonidů v injektoru plynového chromatografu a následné separaci produktů rozkladu<sup>49</sup>. První hmotnostně spektrometrická analýza intaktních ozonidů byla provedena pomocí chemické ionizace (CI)<sup>50</sup>. Později se ukázalo, že elektrosprejová ionizace a tandemová hmotnostní spektrometrie ozonidů fosfatidylcholinu poskytuje fragmenty určující polohu dvojně vazby<sup>51,52</sup>. V následujících letech se ozonizace rozvinula v široce používaný přístup pro stanovení polohy dvojných vazeb. Reakce nenasyčených lipidů s ozonem může probíhat v různých fázích hmotnostně spektrometrické analýzy, jak je uvedeno na obr. 3.

K analytickému využití ozonolýzy významně přispěla především australská skupina prof. S. Blanksbyho<sup>24,55,56,58–77</sup>, která vypracovala metody pro provádění reakcí s ozonem přímo v hmotnostním spektrometru. Zpočátku se ozonolýza prováděla v elektrosprejovém iontovém zdroji (OzESI-MS). První experimenty využívaly ke generování ozonu kyslík zaváděný do iontového zdroje. Při vysokém záporném potenciálu se na hrotu elektrosprejové jehly tvořila plazma, ve které vznikal ozon<sup>58</sup>. Později byl ozon do iontového zdroje přiváděn z externího generátoru, což zlepšilo citlivost a umožnilo používat obě polarizace<sup>55</sup>. OzESI-MS poskytuje pro každou dvojnou vazbu dvojici fragmentů, které lze využít pro určení její polohy: aldehydový ion a Criegeeho meziprodukt. Pro analýzu komplexních směsí však ozonolýza v iontovém zdroji není příliš výhodná. Proto byla zavedena metoda OzID (disociace vyvolaná ozonem), při níž jsou působení ozonu vystaveny ionty v hmotnostním analyzátoru<sup>24,56,59–61,63–69,71–80</sup>. První OzID byla realizována v hmotnostním spektrometru s iontovou pastí, do jehož analyzátoru byl ozon zaváděn spolu s flu-

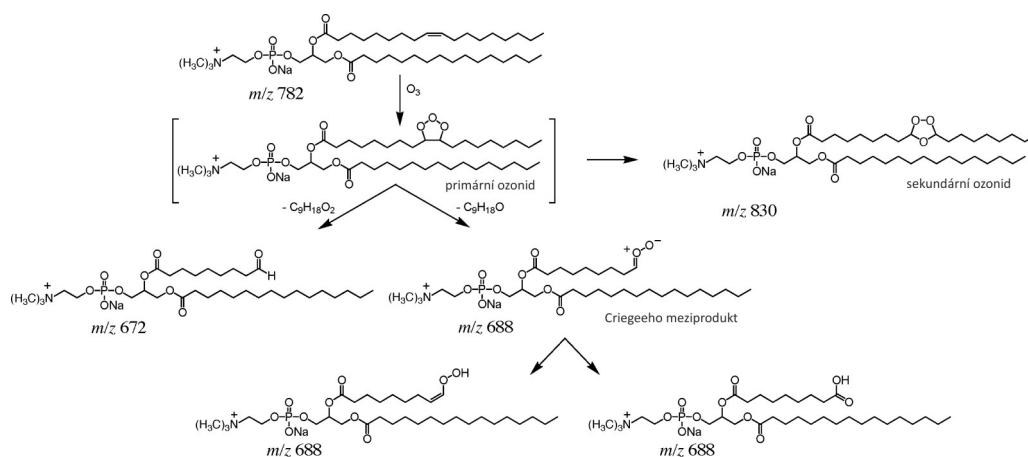


Obr. 3. **Různé způsoby ozonolýzy v LC-MS přístroji.** (1) Ozonolýza v kapalné fázi po ozáření vzorku v průtokové cele z taveného oxidu křemičitého UV světlem [49]; (2) ozonolýza v kapalné fázi ozonem pronikajícím přes polopropustné teflonové hadičky ( $\text{O}_3$ -MS) [50]; (3) ozonolýza ve zdroji během ionizace elektrosprejem (OzESI)<sup>51</sup>; (4) ozonem indukovaná disociace (OzID) v hmotnostním analyzátoru<sup>52</sup>; (5) ozonolýza ve zdroji pomocí ozonu generovaného ozářením kyslíku UV světlem<sup>53</sup>; (6) ozonolýza ve zdroji pomocí ozonu generovaného z kyslíku korónovým výbojem<sup>54</sup>



Obr. 4. OzID hmotnostní spektrum sodného aduktu fosfatidylcholinu PC (16:0/9Z-18:1). Přepracováno podle cit.<sup>52</sup>

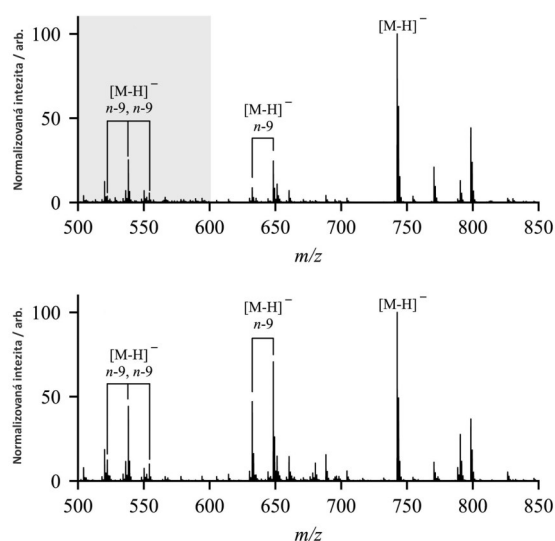
mícím plynem, tj. heliem<sup>56</sup>. Pro každou dvojnou vazbu se tvoří dva diagnostické ionty charakterizující polohu dvojně vazby, viz obr. 4 a 5. K významnému zlepšení došlo při použití hybridního hmotnostního spektrometru Q-trap (AB SCIEX), kde jsou od sebe jednotlivé fáze procesu, tj. výběr iontů, reakce s ozonem a detekce produktů, fyzicky odděleny<sup>24</sup>. Zlepšení citlivosti a rychlosti detekce bylo dosaženo díky vyšší koncentraci ozonu v tlumícím plynu. Spektra OzID lze zaznamenávat v krátkém časovém intervalu, proto je metoda vhodná i pro lipidomickou analýzu s rychlým sběrem dat, včetně metod založených na LC-MS (cit.<sup>65,66</sup>). Technika OzID se stala užitečným nástrojem také pro zkoumání geometrie dvojných vazeb a polohy nenasyceného acylového řetězce na glycerolu<sup>24</sup>. Experimenty ukázaly, že reaktivita *cis* a *trans* dvojných vazeb s ozonem se výrazně liší, což se projevuje různým poměrem intenzity charakteristických OzID iontů (obr. 6). U mnoha lipidových tříd je reaktivita *trans* izomeru vyšší<sup>72,77,78</sup>.



Obr. 5. Předpokládaný mechanismus reakce  $[PC(16:0/9Z-18:1) + Na]^+$  s ozonem při OzID. Přepracováno podle cit.<sup>52</sup>

OzID lze kombinovat s CID a získat tak podrobnější informace o struktuře daného lipidu. Experimenty CID/OzID v lineární iontové pasti nebo přístroji Q-trap jsou užitečné pro jednoznačné přiřazení polohy dvojně vazby a *sn*-pozice acylových řetězců v glycerofosfolipidech<sup>64</sup>. OzID lze také využít v hmotnostních spektrometrech s iontově mobilní celou s pohybující se vlnou (travelling wave ion mobility, TWIM). OzID v hmotnostním spektrometru Synapt (Waters) je možné uskutečnit dvěma způsoby<sup>68,78</sup>. V jednom uspořádání je ozon přiváděn přívodem pro kolizní plyn do „trap“ a „transfer“ cely<sup>78</sup>, zatímco ve druhém je ozon veden do iontově mobilní cely<sup>68</sup>. Vysoká koncentrace ozonu zajišťuje vznik velkého množství produktových iontů během krátké doby a OzID na těchto přístrojích tak dosahuje vynikajících parametrů. OzID na přístrojích Synapt je kompatibilní s ultra účinnou kapalinovou chromatografií, což bylo ukázáno pro izomerní fosfatidylcholin<sup>68</sup>. Při analýzách vzorků plazmy bylo demonstrováno, že OzID na přístroji s velmi vysokým rozlišením typu orbitální past může pomoci zvýšit počet identifikovaných lipidů<sup>75</sup>. Vysoké rozlišení umožňuje rozlišit téměř izobarické lipidy, jako jsou plazmalogeny a plazmanyletherové lipidy. OzID v kombinaci s iontovou mobilitou otvírá další možnosti pro analýzu izomerů lipidů v biologických vzorcích. Rozlišení stereoizomerů dvojných vazeb bylo dosaženo na přístroji Agilent IMSQTOF v uspořádání LC-OzID-IMS-MS (cit.<sup>72</sup>). Spektrometr byl upraven tak, aby mohl být ozon zaváděn do oblasti vysokotlaké iontové nálevky (ion trapping funnel), která je v tomto přístroji předřazená iontově mobilní cele. *Cis* a *trans* izomery tak bylo možné rozlišit na základě jejich driftových časů a poměrů OzID produktových iontů. Tento postup nezahrnuje žádný krok izolace iontů, a díky své rychlosti je proto vhodný pro lipidomiku<sup>72</sup>.

Reakční rychlost ozonolyzy závisí na druhu aduktu alkalickeho kovu a na uspořádání dvojných vazeb v alifatických řetězcích lipidů<sup>63</sup>. V případě methylesterů oktadecadienových mastných kyselin s konjugovanými dvojnými



Obr. 6. OzID spektra fosfatidylethanolaminu PE 18:1 (*n*-9, *cis*)/18:1 (*n*-9, *cis*) (horní spektrum) a PE 18:1 (*n*-9, *trans*)/18:1 (*n*-9, *trans*) (dolní spektrum) ukazující vyšší intenzitu produktových iontů OzID pro *trans* izomer. Přepřacováno podle cit.<sup>68</sup>

mi vazbami (konjugované kyseliny linolové, CLA) je reakce tak rychlá, že již není nutný krok zachycení v iontové pasti a pro ozonolýzu lze použít trojitý kvadrupól<sup>63</sup>. Byl zkoumán vliv kationizace různými ionty kovů na iontové mobilní separaci OzID produktů fosfatidylcholinů a triacylglycerolů. Pro experimenty byla použita iontová mobilní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnovou funkcí (FAIMS) spojená s přístrojem s iontovou pastí<sup>77</sup>. Ačkoli kationizace ionty  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Cu}^+$  separaci zlepšila, výtěžnost OzID reakce se snížila pravděpodobně v důsledku silných interakcí kovů s dvojnými vazbami.

Jak je uvedeno v předchozí kapitole, deriváty  $\text{AMPP}^+$  zlepšují detekci mastných kyselin díky permanentnímu kladnému náboji. Účinnou ionizaci  $\text{AMPP}^+$  derivátů lze využít také pro zvýšení citlivosti OzID (cit.<sup>76</sup>), zejména při zavádění vzorku přímou infuzí. Metoda je založená na skenu prekurzorového iontu  $\text{AMPP}^+$ , kdy v případě jeho detekce se automaticky spustí OzID. Tento postup byl použit pro strukturní analýzu mastných kyselin v novorozeneckém mázku (*vernix caseosa*)<sup>76</sup>. Bylo prokázáno, že OzID poskytuje informace o dvojných vazbách v mnoha různých lipidech, včetně fosfolipidů<sup>24,56,59,64–69,72,75,77,79</sup>, sfingolipidů<sup>56,71,72,79,81</sup>, acylglycerolů<sup>24,56,72,75,77</sup>, methylesterů mastných kyselin<sup>63,78</sup>, (*O*-acyl) hydroxymastných kyselin<sup>70</sup>,  $\text{AMPP}^+$  derivátů

mastných kyselin<sup>76</sup>, cholesterylesterů<sup>72,74,75</sup> a rostlinných metabolitů<sup>73,80</sup>.

OzID je výborným nástrojem pro studium struktury nenasyčených lipidů, ale vyžaduje úpravy hmotnostních spektrometrů. Pokud takové modifikace nejsou možné, lze ozonolýzu provést jednoduše pomocí in-line reaktoru před hmotnostním spektrometrem<sup>54</sup>. Kapalný vzorek protéká teflonovou hadičkou vloženou do láhve obsahující ozon. Nenasyčené lipidy reagují s ozonem, který proniká stěnou hadičky, a aldehydové produkty ozonolýzy jsou následně ionizovány v iontovém zdroji ( $\text{O}_3$ -MS). Tento přístup byl použit při LC analýze methylesterů mastných kyselin<sup>54</sup>, CLA<sup>82</sup>, a fosfolipidů<sup>83,84</sup>. Další způsob ozonolýzy v roztoku je založen na ozařování křemenné kapiláry nízkotlakou rtuťovou UV lampou<sup>53</sup>. Kyslík rozpuštěný v mobilní fázi se přemění na ozon, který následně reaguje s nenasyčenými lipidy. V jiném uspořádání je mikroreaktorem semipermeabilní teflonová hadička obtočená kolem UV lampy<sup>57</sup>. Okolní ozon generovaný lampou difunduje do reaktoru a iniciuje ozonolýzu. UV lampa může být také umístěna v blízkosti sprejovacího emitoru v iontovém zdroji pro nanoESI (cit.<sup>57</sup>).

## 6. Paternò-Büchiho reakce

Paternò-Büchiho (PB) reakce, známá od roku 1909, je fotochemická reakce mezi karbonylovou sloučeninou a alkenem, při níž vznikají oxetanové produkty (schéma 3). Reakce se řadí mezi [2+2] cykloadice<sup>85</sup>. Užitečnost PB reakce pro lokalizaci dvojných vazeb v lipidech ukázali Ma a spol. v roce 2014 (cit.<sup>86</sup>). Reakce probíhala během nanoelektrosprejové ionizace působení UV záření nízkotlaké rtuťové výbojky (254 nm) v přítomnosti acetonu. Oxetanové produkty byly podrobeny CID, při které vznikaly produktové ionty specifické pro pozici dvojných vazeb.

Metoda PB-MS/MS má řadu výhod: jednoduché experimentální provedení, vysokou rychlost, použitelnost pro více tříd lipidů a činidla, která jsou kompatibilní s ESI i LC (cit.<sup>87,88</sup>). Od svého zavedení byla metoda použita k charakterizaci široké škály nenasyčených lipidů, včetně fosfolipidů<sup>89–97</sup>, sfingolipidů<sup>98</sup>, glycerolipidů<sup>94–101</sup>, mastných kyselin<sup>102–106</sup> a steroidů<sup>107–109</sup> v různých maticích.

Aceton použitý v původním článku<sup>86</sup> je stále nejpoužívanějším PB činidlem. Je kompatibilní s ESI ionizací, dobře se mísí s vodou a organickými rozpouštědly a rozpouští lipidy v širokém rozsahu polarit<sup>86,87,110</sup>. Nevýhodou je jeho sklon k bočním reakcím, které snižují výtěžek

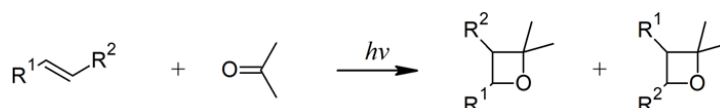


Schéma 3. Paternò-Büchiho derivatizace dvojných vazeb acetonem

a citlivost detekce. Mezi vedlejší reakce patří například oxidace lipidů a adice acetylových radikálů na lipidy (Norrishovy reakce)<sup>86</sup>. Proto byla navržena činidla umožňující provádění PB reakcí při delších vlnových délkách, např. benzofenon<sup>93,106</sup>, benzaldehyd<sup>111</sup>, acetylpyridiny<sup>97</sup>, 2-benzoylpyridin<sup>112</sup> nebo antrachinon<sup>113</sup>. Aktivace karbonylové skupiny fotony s nižší energií částečně eliminuje vedlejší reakce<sup>114</sup> a světelné zdroje delších vlnových délek minimalizují zdravotní rizika<sup>105,113</sup>. Jednou z možností zlepšení výtěžku PB reakce je zavedení elektronegativních skupin. Příkladem může být 2,4,6-trifluoracetofenon, který poskytuje dobrý výtěžek reakce a výrazně snižuje chemické interference<sup>115</sup>. V první práci o tvorbě oxetanů ve viditelném světle je popsáno použití benzofenonu a fluorescenční lampy (>400 nm) nebo OPO laseru (520 nm)<sup>116</sup>. Za těchto podmínek vede cykloadiční reakce ke vzniku oxetanů jiným mechanismem než PB reakce. Viditelné záření aktivuje protonově vázaný komplex vytvořený z činidla a nenasyceného lipidu, nikoliv samotnou karbonylovou skupinu, jako je tomu u PB reakce iniciované UV světlem.

PB derivatizace probíhající online nebo off-line se používají v řadě lipidomických experimentů, a to jak při analýze přímou infuzí vzorku („shotgun“)<sup>86,89,106,110</sup>, tak při LC-MS analýze<sup>94,96,117,118</sup>. V „shotgun“ analýze je nanoESI emitör ozáren UV nebo Vis lampou a derivatizované lipidy jsou charakterizovány pomocí MS<sup>2</sup> (cit.<sup>86</sup>). V případě LC separace je do systému zapojen průtokový mikroreaktor, kde probíhá derivatizace<sup>96</sup>. PB-MS/MS je rovněž použitelná pro analýzu jedné buňky. Derivatizační reakce probíhá v mikropipetě, která slouží k odběru buněk a buněčné lyzaci, a zároveň také jako PB mikroreaktor a nano-ESI emitör<sup>101</sup>. PB reakci lze také provádět v hmotnostních spektrometrech s iontovou mobilitou, což vede ke zlepšení separace a identifikace lipidů<sup>100,119</sup>. Xie a spol. vyvinuli metodu pro kvantitativní analýzu konjugovaných mastných kyselin. Tato metoda kombinuje PB derivatizaci s iontově mobilní separací známou jako TIMS (Trapped Ion Mobility Spectrometry) před MS<sup>2</sup>. Technika byla použita ke stanovení geometrie a polohy dvojných vazeb CLA (cit.<sup>119</sup>).

## 7. Závěr

V první dílu přehledového článku je shrnuta část nových moderních metod hmotnostní spektrometrie pro charakterizaci násobných vazeb v acylových řetězcích lipidů s využitím LC-MS a ionizace za atmosférického tlaku. V této oblasti došlo v posledních letech k rychlému vývoji. Byla publikována řada dalších zajímavých metod, které se do první části nevešly a budou popsány ve druhé části článku. Druhá část bude věnována určení polohy násobných vazeb s využitím epoxidace, tvorby aduktů vznikajících z acetonitrilu při chemické ionizaci za atmosférického tlaku, fotodisociačním reakcím a technikám disociace iontů po interakci s elektrony.

*Podpořeno projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.*

## LITERATURA

- Murphy R. C.: *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge 2015.
- Zaikin V., Halket J. M.: *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*. IM Publications, Chichester, West Sussex 2009.
- Strmen T., Vrkoslav V., Bosakova Z., Cvačka J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 34, (2020).
- Pham H. T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 805 (2013).
- Sleno L., Volmer D. A.: *J. Mass Spectrom.* 39, 1091 (2004).
- McLuckey S. A., Mentinova M.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 3 (2011).
- Harvey S. R., Liu Y., Liu W., Wysocki V. H., Laganowsky A.: *Chem. Commun.* 53, 3106 (2017).
- Heidemann J., Kolbel K., Konijnenberg A., Van Dyck J., Garcia-Alai M., Meijers R., Sobott F., Utrecht C.: *Int. J. Mass Spectrom.* 447, 116240 (2020).
- Brodbeck J. S.: *Chem. Soc. Rev.* 43, 2757 (2014).
- Becher S., Spengler B., Heiles S.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 24, 54 (2018).
- Chen X. F., Wang Z., Wong Y. L. E., Wu R., Zhang F., Chan T. W. D.: *Mass Spectrom. Rev.* 37, 793 (2018).
- James P. F., Perugini M. A., O'Hair R. A. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19, 978 (2008).
- Liang X. L. R., Liu J., Leblanc Y., Covey T., Ptak A. C., Brenna J. T., McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 1783 (2007).
- McFarland M. A., Marshall A. G., Hendrickson C. L., Nilsson C. L., Fredman P., Mansson J. E.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 752 (2005).
- Natesan V., Kim S. J.: *Biomol. Ther. (Seoul)* 29, 596 (2021).
- Halket J. M., Zaikin V. G.: *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)* 11, 127 (2005).
- Dobson G., Christie W. W.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 15, 130 (1996).
- Bird S. S., Marur V. R., Stavrovskaya I. G., Kristal B. S.: *Anal. Chem.* 84, 5509 (2012).
- Huang W., Hong B., Sun J., Tan R., Bai K., Yang T., Wu H., Yi R.: *Lipids Health Dis.* 18, 86 (2019).
- Vrkoslav V., Horká P., Jindřich J., Buděšínský M., Cvačka J.: *Molecules* 28, 3794 (2023).
- Vrkoslav V., Urbanová K., Háková M., Cvačka J.: *J. Chromatogr. A* 1302, 105 (2013).
- Jensen N., Lam K., Cody R. B., Tamura J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4, 239 (1990).
- Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P.

- R. S.: *Anal. Chem.* 89, 7307 (2017).
24. Poad B. L. J., Pham H. T., Thomas M. C., Nealon J. R., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 1989 (2010).
  25. Young R. S. E., Flakelar C. L., Narreddula V. R., Jekimovs L. J., Menzel J. P., Poad B. L. J., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 94, 16180 (2022).
  26. Zhang J. Y., Yu X. J., Wang H. Y., Liu B. N., Yu Q. T., Huang Z. H.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66, 256 (1989).
  27. Horka P., Vrkoslav V., Kindl J., Schwarzova-Peckova K., Cvacka J.: *Molecules* 26, 6468 (2021).
  28. Christie W. W.: *Lipids* 33, 343 (1998).
  29. Andersson B. A., Holman R. T.: *Lipids* 9, 185 (1974).
  30. Andersson B. A., Christie W. W., Holman R. T.: *Lipids* 10, 215 (1975).
  31. Spitzer V.: *Prog. Lipid Res.* 35, 387 (1996).
  32. Harvey D. J.: *Biomed. Mass Spectrom.* 9, 33 (1982).
  33. Tulloch A. P.: *Lipids* 20, 652 (1985).
  34. Balazy M., Nies A. S.: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18, 328 (1989).
  35. Harvey D. J.: *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 187 (1984).
  36. Tomer K. B., Crow F. W., Gross M. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, 5487 (1983).
  37. Barry S. J., Carr R. M., Lane S. J., Leavens W. J., Monte S., Waterhouse I.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 603 (2003).
  38. Lamos S. M., Shortreed M. R., Frey B. L., Belshaw P. J., Smith L. M.: *Anal. Chem.* 79, 5143 (2007).
  39. Bollinger J. G., Thompson W., Lai Y., Oslund R. C., Hallstrand T. S., Sadilek M., Turecek F., Gelb M. H.: *Anal. Chem.* 82, 6790 (2010).
  40. Bollinger J. G., Rohan G., Sadilek M., Gelb M. H.: *J. Lipid Res.* 54, 3523 (2013).
  41. Yang K., Dilthey B. G., Gross R. W.: *Anal. Chem.* 85, 9742 (2013).
  42. Tatituri R. V. V., Wolf B. J., Brenner M. B., Turk J., Hsu F. F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 2519 (2015).
  43. Flentie K. N., Stallings C. L., Turk J., Minnaard A. J., Hsu F. F.: *J. Lipid Res.* 57, 142 (2016).
  44. Hsu F. F.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27, 622 (2016).
  45. Meckelmann S. W., Hellhake S., Steuck M., Krohn M., Schebb N. H.: *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 130, 8 (2017).
  46. Narreddula V. R., Boase N. R., Ailuri R., Marshall D. L., Poad B. L. J., Kelso M. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 91, 9901 (2019).
  47. Schönbein C. F.: *Bericht über die Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel.* 7, 7 (1847).
  48. Criegee R.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 14, 745 (1975).
  49. Davison V. L., Dutton H. J.: *Anal. Chem.* 38, 1302 (1966).
  50. Wu M., Church D. F., Mahier T. J., Barker S. A., Pryor W. A.: *Lipids* 27, 129 (1992).
  51. Harrison K. A., Murphy R. C.: *Anal. Chem.* 68, 3224 (1996).
  52. Harrison K. A., Davies S. S., Marathe G. K., McIntyre T., Prescott S., Reddy K. M., Falck J. R., Murphy R. C.: *J. Mass Spectrom.* 35, 224 (2000).
  53. Harris R. A., May J. C., Stinson C. A., Xia Y., McLean J. A.: *Anal. Chem.* 90, 1915 (2018).
  54. Sun C. X., Zhao Y. Y., Curtis J. M.: *Anal. Chim. Acta* 762, 68 (2013).
  55. Thomas M. C., Mitchell T. W., Harman D. G., Deeley J. M., Murphy R. C., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 79, 5013 (2007).
  56. Thomas M. C., Mitchell T. W., Harman D. G., Deeley J. M., Nealon J. R., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 80, 303 (2008).
  57. Stinson C. A., Zhang W. P., Xia Y.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29, 481 (2018).
  58. Thomas M. C., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 58 (2006).
  59. Deeley J. M., Thomas M. C., Truscott R. J. W., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 81, 1920 (2009).
  60. Thomas M. C., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Methods Mol. Biol.* 579, 413 (2009).
  61. Brown S. H. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 807 (2011).
  62. Ellis S. R., Hughes J. R., Mitchell T. W., Panhuis M. I. H., Blanksby S. J.: *Analyst* 137, 1100 (2012).
  63. Pham H. T., Maccarone A. T., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24, 286 (2013).
  64. Pham H. T., Maccarone A. T., Thomas M. C., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Analyst* 139, 204 (2014).
  65. Kozłowski R. L., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 5053 (2015).
  66. Kozłowski R. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Eur. J. Mass Spectrom.* 21, 191 (2015).
  67. Kozłowski R. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Sci. Rep.* 5, 9243 (2015).
  68. Poad B. L. J., Green M. R., Kirk J. M., Tomczyk N., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 89, 4223 (2017).
  69. Batarseh A. M., Abbott S. K., Duchoslav E., Alqarni A., Blanksby S. J., Mitchell T. W.: *Int. J. Mass Spectrom.* 431, 27 (2018).
  70. Hancock S. E. a 12 spoluautorů: *J. Lipid Res.* 59, 1510 (2018).
  71. Poad B. L. J., Maccarone A. T., Yu H. B., Mitchell T. W., Saied E. M., Arenz C., Hornemann T., Bull J. N., Bieske E. J., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 90, 5343 (2018).
  72. Poad B. L. J., Zheng X. Y., Mitchell T. W., Smith R. D., Baker E. S., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* 90, 1292 (2018).
  73. Auranwiwat C., Maccarone A. T., Carroll A. W.,



- Rattanajak R., Kamchonwongpaisan S., Blanksby S. J., Pyne S. G., Limtharakul T.: *Tetrahedron* 75, 2336 (2019).
74. Hancock S. E., Maccarone A. T., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Chem. Phys. Lipids* 221, 198 (2019).
75. Marshall D. L., Criscuolo A., Young R. S. E., Poad B. L. J., Zeller M., Reid G. E., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 1621 (2019).
76. Poad B. L. J. a 11 spoluautorů: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 2135 (2019).
77. Berthias F., Poad B. L. J., Thurman H. A., Bowman A. P., Blanksby S. J., Shvartsburg A. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 2827 (2021).
78. Vu N., Brown J., Giles K., Zhang Q. B.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 31, 1415 (2017).
79. Barrientos R. C., Zhang Q. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 1609 (2019).
80. Knowles S. L., Vu N., Todd D. A., Raja H. A., Rokas A., Zhang Q. B., Oberlies N. H.: *J. Nat. Prod.* 82, 3421 (2019).
81. Barrientos R. C., Vu N., Zhang Q. B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 2330 (2017).
82. Sun C. X., Black B. A., Zhao Y. Y., Ganzle M. G., Curtis J. M.: *Anal. Chem.* 85, 7345 (2013).
83. Sun C. X., Zhao Y. Y., Curtis J. M.: *J. Chromatogr. A* 1351, 37 (2014).
84. Sun C. X., Zhao Y. Y., Curtis J. M.: *J. Agr. Food Chem.* 63, 1442 (2015).
85. Büchi G., Inman C. G., Lipinsky E. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4327 (1954).
86. Ma X. X., Xia Y.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 53, 2592 (2014).
87. Ma X. X., Zhang W. P., Li Z. S., Xia Y., Ouyang Z.: *Acc. Chem. Res.* 54, 3873 (2021).
88. Hu Q. Y., Xia Y., Ma X. X.: *Methods Mol. Biol.* 2306, 53 (2021).
89. Stinson C. A., Xia Y.: *Analyst* 141, 3696 (2016).
90. Franklin E. T., Shields S. W. J., Manthorpe J. M., Smith J. C., Xia Y., McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31, 938 (2020).
91. Ren H. L., Triebel A., Muralidharan S., Wenk M. R., Xia Y., Torta F.: *Analyst* 146, 3899 (2021).
92. Liu Z. Q., Rochfort S.: *Food Chem.* 373, 131515 (2022).
93. Waldchen F., Becher S., Esch P., Kompauer M., Heiles S.: *Analyst* 142, 4744 (2017).
94. Lin Q. H., Zhang D. H., Xia Y.: *Analyst* 145, 513 (2020).
95. Xia T., Ren H. L., Zhang W. P., Xia Y.: *Anal. Chim. Acta* 1128, 107 (2020).
96. Zhang W. P., Zhang D. H., Chen Q. H., Wu J. H., Ouyang Z., Xia Y.: *Nat. Commun.* 10, 79 (2019).
97. Cao W. B., Cheng S. M., Yang J., Feng J. X., Zhang W. P., Li Z. S., Chen Q. H., Xia Y., Ouyang Z., Ma X. X.: *Nat. Commun.* 11, 375 (2020).
98. Zhao X., Wu G., Zhang W., Dong M., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 14775 (2020).
99. Franklin E. T., Xia Y.: *Analyst* 145, 6532 (2020).
100. Xia T., Yuan M., Xu Y. W., Zhou F., Yu K. T., Xia Y.: *Anal. Chem.* 93, 8345 (2021).
101. Zhu Y. L., Wang W. H., Yang Z. B.: *Anal. Chem.* 92, 11380 (2020).
102. Murphy R. C., Okuno T., Johnson C. A., Barkleyte R. M.: *Anal. Chem.* 89, 8545 (2017).
103. Chonglo L., Tian R., Shi R. Y., Ouyang Z., Xia Y.: *Front Chem.* 7, (2019), <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00807>.
104. Xu S. L., Wei F., Xie Y., Wu B. F., Lv X., Qin Z. J., Chen H.: *Int. J. Food Sci. Technol.* 55, 2883 (2020).
105. Han Y. H., Chen P. P., Li Z. C., Wang X., Sun C. L.: *J. Chromatogr. A* 1662, 462742 (2022).
106. Xu T. F., Pi Z. F., Song F. R., Liu S., Liu Z. Q.: *Anal. Chim. Acta* 1028, 32 (2018).
107. Ren J., Franklin E. T., Xia Y.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 1432 (2017).
108. Xie X. B., Zhao J., Lin M., Zhang J. L., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 8487 (2020).
109. Maddox S. W., Olsen S. S. H., Velosa D. C., Burkus-Matesevac A., Peverati R., Chouinard C. D.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31, 2086 (2020).
110. Ma X. X., Chong L., Tian R., Shi R. Y., Hu T. Y., Ouyang Z., Xia Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 2573 (2016).
111. Bednarik A., Bolsker S., Soltwisch J., Dreisewerd K.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 57, 12092 (2018).
112. Wäldchen F., Mohr F., Wagner A. H., Heiles S.: *Anal. Chem.* 92, 14130 (2020).
113. Feng G., Hao Y., Wu L., Chen S.: *Chem. Sci. J.* 11, 7244 (2020).
114. Rykaczewski K. A., Schindler C. S.: *Org. Lett.* 22, 6516 (2020).
115. Zhao J., Xie X. B., Lin Q. H., Ma X. X., Su P., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 13470 (2020).
116. Li H.-F., Cao W., Ma X., Xie X., Xia Y., Ouyang Z.: *J. Am. Chem. Soc.* 142, 3499 (2020).
117. Jeck V., Korf A., Vosse C., Hayen H.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33, 86 (2019).
118. Zhang W., Shang B., Ouyang Z., Xia Y.: *Anal. Chem.* 92, 6719 (2020).
119. Xie X. B., Xia Y.: *Anal. Chem.* 91, 7173 (2019).

Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, CAS, Prague, Czech Republic*): **Location of Double or Triple Bonds in Lipids Using Mass Spectrometry, Part I**

Structural analysis of lipids is one of the classical topics of organic mass spectrometry. In recent years, we have witnessed a rapid development of new methods that allow the characterization of lipid structures more accurately, more rapidly, and in more complex samples. These methods are mostly based on derivatization reactions or newly available fragmentation techniques. Basic mass

spectrometric analysis of lipids, i.e., determination of lipid class, acyl chain length, and degree of unsaturation, is usually relatively easy but the detailed structural description is more challenging. In this two-part review article, we present advances in mass spectrometry for characterizing double and triple bonds in lipid acyl chains by LC-MS and direct ionization of liquid samples at atmospheric pressure. The first paper discusses charge-switch derivatizations, ozonolysis, and the Paternò-Büchi reaction.

**Keywords:** double bond, fragmentation, lipids, mass spectrometry, ozonolysis, Paternò-Büchi, structural analysis, triple bond

*Acknowledgments*

*This work was supported by the project National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU.*



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.