

URČOVÁNÍ POLOH FUNKČNÍCH SKUPIN V ALIFATICKÝCH ŘETĚZCÍCH LIPIDŮ A POLOH ALIFATICKÝCH ŘETĚZCŮ V ACYLGLYCEROLIPIDECH METODAMI HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Tento článek je věnován profesorovi Jiřímu Barkovi u příležitosti jeho 75. narozenin.

ŠTĚPÁN STRNAD, VLADIMÍR VRKOSLAV a JOSEF CVAČKA

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

Došlo 2.10.24, přijato 16.10.24.

Lipidy hrají klíčové role v mnoha biologických procesech. Většina lipidů obsahuje dlouhé alifatické řetězce, jejichž variabilní struktura přispívá k rozmanitým fyzikálně-chemickým vlastnostem a biologickým funkcím těchto molekul. Alifatické řetězce lipidů mohou být rovné nebo rozvětvené, s dvojnými či trojnými vazbami, případně s různými funkčními skupinami. V posledních letech došlo k významnému pokroku ve strukturní analýze lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Nové metody jsou založeny na využití netradičních fragmentačních technik a nových derivatizačních reakcí. S jejich pomocí lze určovat podrobnou strukturu alifatických řetězců, včetně určení polohy násobných vazeb, funkčních skupin a uspořádání alifatických řetězců v komplexních lipidech. Tento přehledový článek navazuje na dva předchozí, které se zabývaly určováním poloh dvojných vazeb (Chem. Listy 117, 684 (2023), Chem. Listy 117, 747 (2023)). Tento text je zaměřen na určení polohy methylového větvení, kyslíkatých funkčních skupin, karbocyklů a stereospecifické polohy acylového řetězce na glycerolu.

Klíčová slova: fragmentace, funkční skupiny, karbocykly, lipidy, methylové větvení, *sn* pozice, strukturní analýza

Obsah

1. Úvod
2. Methylové větvení alifatických řetězců
3. Funkční skupiny obsahující kyslík a karbocykly
4. Stereospecifická poloha acylového řetězce na glycerolu
5. Závěr

1. Úvod

V posledních desetiletích se hmotnostní spektrometrie stala klíčovým nástrojem pro analýzu a charakterizaci biomolekul. Moderní hmotnostní spektrometrie díky citlivosti, novým fragmentačním technikám a vysokému rozlišení hmotnostních spekter umožňuje detailní studium struktury a složení směsí lipidů. Větvení alifatických řetězců a přítomnost funkčních skupin významně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti lipidů, jako je například jejich polarita, rozpustnost a schopnost tvořit membránové struktury. Tyto změny se mohou projevit v jejich biologické aktivitě a hrát klíčovou roli při vzniku a vývoji různých patologických stavů, včetně metabolických a kardiovaskulárních onemocnění. Proto je důležité mít k dispozici pokročilé

analytické nástroje, které umožňují podrobný popis struktury lipidů a jejich modifikací. Tento článek představuje přehled současných metod hmotnostní spektrometrie používaných k charakterizaci větvení alifatického řetězce, funkčních skupin lipidů a stereoizomerie na glycerolu. Stručné shrnutí principů, výhod a omezení hlavních metod je uvedeno v tabulce I.

2. Methylové větvení alifatických řetězců

Mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem (BCFA, z angl. branched-chain fatty acid) s jednou nebo více methylovými skupinami v řetězci se v biologických vzorcích vyskytují poměrně často¹⁻³. Nejběžnější BCFA mají methylovou skupinu v poloze *n*-2 (*iso*) nebo *n*-3 (*anteiso*). Tradiční metody určování poloh větvení alifatických řetězců jsou založeny na derivatizaci a následné GC-MS analýze⁴. Novější postupy využívají LC-MS s elektrosprejovou ionizací (ESI) a fragmentace vyvolané radikálovým centrem (RDD, radical-driven dissociation)⁵⁻¹² nebo fragmentace s odlehkým nábojem (CRF, charge remote fragmentation), často po změně polarity prekurzorového iontu (charge-switch)¹³⁻¹⁵.

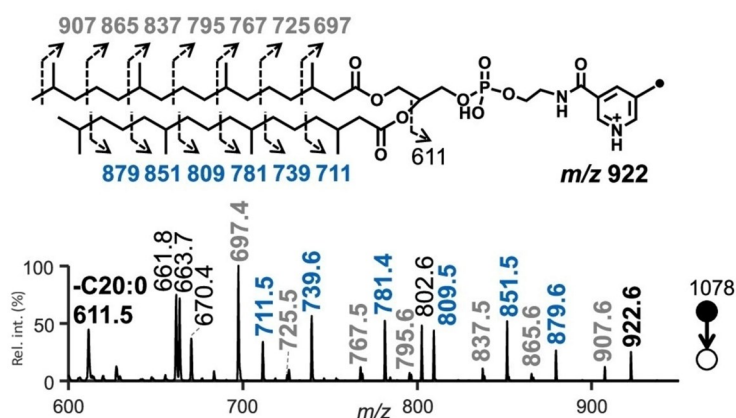
Tabulka I

Hlavní metody pro charakterizaci větvení alifatického řetězce, funkčních skupin lipidů a stereoisomerie na glycerolu

| Metoda | Princip | Výhody | Omezení |
|--|--|--|--|
| Fragmentace vyvolaná radikálovým centrem (RDD) | fragmentace iniciovaná radikálem, která vede ke štěpení vazeb C-C nebo C-H | lokalizace polohy větvení alifatického řetězce a dalších funkčních skupin | vyžaduje derivatizaci (I-AMPP ⁺ , činidla obsahující skupinu TEMPO atd.) |
| Fragmentace s odlehkým nábojem (CRF) | fragmentace iontů s pevně lokalizovaným nábojem | lokalizace polohy methylových skupin; lze využít běžně dostupnou fragmentační techniku – nízkoenergetickou CID | vyžaduje derivatizaci (AMPP ⁺ , [Mg(Terpy) ₂] ²⁺ , atd.) |
| Fotodisociace (UVPD) | fragmentace iontů po jejich interakci s UV zářením | charakterizace polohy funkčních skupin obsahujících kyslík; vhodné pro určení <i>sn</i> pozic | speciální nákladná instrumentace pro UVPD; nízká výtěžnost fragmentace |
| Disociace vyvolaná elektrony (EID) | fragmentace iontů po jejich interakci s elektrony | podrobná strukturní charakterizace lipidů | speciální nákladná instrumentace pro EID; nízká výtěžnost fragmentace; spektra složitých lipidů jsou náročná na interpretaci |

Při RDD vzniká z iontu se sudým počtem elektronů radikálový prekurzor, který se dále štěpí. Prekurzor s lichým počtem elektronů lze vytvořit pomocí kolizně indukované disociace (CID, collision-induced dissociation) nebo fotodisociace ultrafialovým zářením (UVPD, ultraviolet photodissociation). Fragmenty radikálového prekurzoru odpovídají štěpení jednotlivých C-C vazeb. Přítomnost methylového větvení v řetězci se projeví narušením pravidelného vzoru, přičemž mezi fragmenty vzniká mezera 28 Da. Dosud bylo navrženo několik derivátů, které poskytují RDD rozvětvených alifatických řetězců. Jedna z metod využívá amidaci mastných kyselin *o*-benzylhydroxylaminem⁸. Při kolizní aktivaci eliminují lithné adukty těchto derivátů benzylové radikály. Vznikají

nitroxidové radikál-kationty, které se následně rozkládají mechanismem RDD. Metoda byla použita pro LC-MS analýzu BCFA ve vzorcích jačihho mléka a lidské plazmy⁸. Lze také využít derivatizační činidla obsahující skupinu TEMPO, jako je 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester 3-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) pikolinové kyseliny (TPN) nebo 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl ester 5-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) nikotinové kyseliny (TBN). Při nízkoenergetické CID se TEMPO eliminuje a tvoří se pyridinmethylový radikál, který iniciuje RDD přenosem vodíku z řetězce na místo radikálu (obr. 1). Metoda byla využita pro studium modifikací v bakteriálních fosfoethanolaminech⁷.



Obr. 1. CID MS2 spektrum fosfatidylethanolaminu PE 4Me-16:0/4Me-16:0 derivatizovaného pomocí TPN (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl esterem 3-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yloxymethyl) pikolinové kyseliny). Upraveno dle cit.⁷. Fragmentace C-C vazeb v alifatických řetězcích je vyvolaná radikálem po eliminaci skupiny TEMPO. Modrou a šedou barvou jsou označeny série diagnostických iontů ve spektru a místa štěpení alifatických řetězců lipidů

Radikálový prekurzor lze vytvořit také fotodisociací nekovalentních⁵ nebo kovalentních^{6,16} derivátů obsahujících aryl-jodovou vazbu. Po interakci těchto derivátů s fotony o vlnové délce 266 nm dochází k eliminaci jodu, a vzniklý fragment s lichým počtem elektronů dále fragmentuje mechanismem RDD. Příkladem nekovalentního derivátu je komplex fosfatidylcholinu s 4-jodo-benzoovou kyselinou⁵. Kovalentní deriváty mastných kyselin lze připravit například esterifikací s 4-jodobenzylalkoholem⁶. Fotodisociací sodných aduktů těchto derivátů vznikají ionty $[M + Na - I]^{+}$, které se dále štěpí za vzniku fragmentů určujících polohu methylového větvení. Derivace pomocí 1-(3-(aminomethyl)-4-jodfenyl)pyridin-1-ia (I-AMPP⁺) nabízí kromě možnosti strukturální analýzy alifatických řetězců také vyšší citlivost detekce¹⁶. Tato derivatizace byla využita například pro strukturální analýzu rozvětvených mastných kyselin v lipidech v novorozeneckém mázku¹⁶. Účinnost interakce s fotony závisí na chemické struktuře látek, proto je důležité vyvinout derivatizační činidla s vysokým výtěžkem fotodisociace. V rámci zkoumání vztahu mezi strukturou a aktivitou bylo připraveno činidlo NIBA (*N*-(2-aminoethyl)-4-jodobenzamid)¹². Deriváty mastných kyselin s NIBA dosahují vysoké účinnosti konverze (97 %), což umožňuje využití fotodisociace při 266 nm pro LC-MS analýzu mastných kyselin.

Polohu methylových větvení lze určit také s využitím fragmentací s odlehlým nábojem (CRF, charge remote fragmentation), které probíhají u iontů s pevně lokalizovaným nábojem. Tyto reakce byly zpočátku sledovány u rozvětvených mastných kyselin pomocí ionizace ostřelováním urychlenými atomy (FAB, fast atom bombardment) na magnetických sektorových analyzátoch s vysokoenergetickou CID (cit.^{17,18}). Dnes běžně dostupná nízkoenergetická CID také umožňuje u některých iontů vyvolat CRF. Například deriváty AMPP⁺ umožnily charakterizaci methylového větvení v bakteriálních lipidech^{13,14}. Dále byly využity bis-terpyridinové hořečnaté dikationty $[Mg(Terpy)_2]^{2+}$, a to i v metodě LC-MS² (cit.¹⁵). Alternativou k tomuto ligandu pro charakterizaci struktury mastných kyselin je $[Mg(ttb-Terpy)_2]^{2+}$, který naopak ztrátou methylového radikálu podporuje RDD fragmentaci¹⁰.

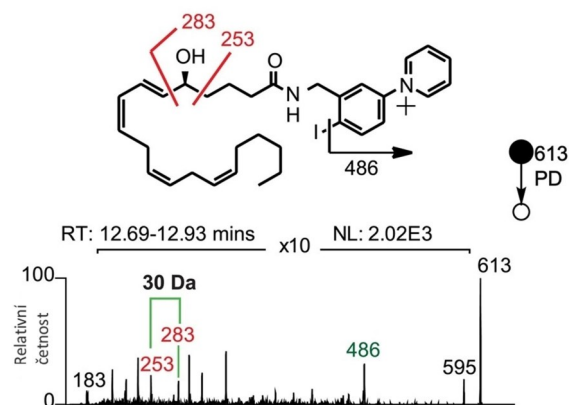
3. Funkční skupiny obsahující kyslík a karbocyklické sloučeniny

Kromě methylových skupin obsahují bioaktivní lipidy také různé funkční skupiny s kyslíkem a karbocyklické struktury. Oxylipiny jsou strukturálně různorodé molekuly s hydroxylovými, epoxidovými a dalšími funkčními skupinami obsahujícími kyslík, které hrají důležitou roli jako signální molekuly při zánětu a dalších biologických procesech^{19,20}. LC-MS je metodou první volby pro analýzu oxylipinů v rozličných biologických matricích^{21–23}. Analytické postupy obvykle využívají ESI v negativním módu, přičemž nižší citlivost v tomto módu lze obejít derivatizací, např. zavedením perfluorobenzylové (PFB) skupiny^{24–27}. MS² spektra záporně nabitých oxylipinových iontů jsou

strukturně specifická a poskytují informace o poloze skupin obsahujících kyslík. V případě hydroxylové skupiny obvykle dochází k α -hydroxy štěpení ve vinylové a/nebo allylové poloze s přenosem protonu^{28–30}. Pro analýzu oxylipinů v pozitivním módu byla použita široká škála derivátů^{31–35}, včetně derivátů *N*-(4-aminomethylfenyl)pyridinia (AMPP⁺)^{34,36,37}. Nedávno bylo demonstrováno využití derivatizace AMPP⁺ pro analýzu oxylipinů v plazmě, séru a buňkách pomocí necílené lipidomiky³⁸. CID derivátů AMPP⁺ byla rovněž použita k charakterizaci polymethylovaných, hydroxyftyoceranových a ftyoceranových kyselin v bakteriálních sulfolipidech³⁷. Fotodisociace a RDD fragmentace vedou ke specifickému štěpení vazeb uhlík-uhlík sousedících s hydroxylovými skupinami, díky čemuž jsou užitečné pro identifikaci místa hydroxylace v hydroxymastných kyselinách (HFA)^{6,39,40}. LC-MS² využívající fotodisociaci při vlnové délce 266 nm umožňuje strukturální identifikaci 4-I-AMPP⁺ derivatizovaných eikosanoidů ze skupiny hydroxyeikosatetraenových kyselin (HETE) a hydroxyeikosapentaenových kyselin (HEPE)³⁴ (obr. 2).

HFA lze derivatizovat také 4-jodobenzoovou kyselinou. RDD spektrum získané následnou CID iontu $[M + Na - I]^{+}$ obsahuje dva produktové ionty, které charakterizují pozici hydroxyly na alifatickém řetězci⁶. Brodbelt a spol. použili UVPD (193 nm) spektra těchto derivátů ke studiu hydroxylace acylových řetězců bakteriálních glycerofosfolipidů⁴⁰ a ke strukturální charakterizaci lipopolysacharidů³⁹.

Další důležitou funkční skupinou je esterová vazba vzniklá esterifikací hydroxyskupiny v HFA karboxylovou kyselinou. Poloha esterové vazby se často označuje polohou větvení⁴¹ a lipidy obsahující tento strukturální motiv se nazývají estolidy. Estery hydroxymastných kyselin (FAHFA) jsou skupinou estolidů s důležitými biologickými vlastnostmi. Jsou to endogenní bioaktivní lipidy s anti-diabetickými a protizánětlivými vlastnostmi. Poloha este-



Obr. 2. Fotodisociační hmotnostní spektrum 4-I-AMPP⁺ derivátu 5-hydroxyeikosatetraenové kyseliny (5-HETE). Upraveno dle cit.³⁴. Fotodisociací dochází k odštěpení jodu za vzniku radikálu, který vyvolá štěpení vazeb uhlík-uhlík sousedících s OH skupinou. Ionty určující polohu hydroxylové skupiny jsou ve schématu a ve spektru naznačeny červeně

rové vazby výrazně ovlivňuje jejich biologickou aktivitu. Ke strukturní charakterizaci FAHFA se většinou využívá CID záporně nabitých iontů vytvořených v ESI. Fragmentační MS² spektra obsahují deprotonované mastné a hydroxymastné kyseliny, a dále ionty odpovídající jejich dehydrataci^{42–49}. MS³ fragmentací iontu hydroxy mastné kyseliny nebo MS² fragmentací při vyšších energiích se ve spektrech objevují fragmentové ionty, které jsou specifické pro polohu hydroxylové skupiny v HFA^{43,45–47}. FAHFA odvozené od α -hydroxy mastné kyseliny poskytují v MS² spektrech⁴⁹ a MS³ spektrech⁴⁷ charakteristické fragmenty neutrálních ztrát (46 Da). Podobně jako u výše uvedených derivátů derivatizace karboxylové skupiny FAHFA pomocí činidel AMPP⁺ (cit.^{50,51}), 4-I-AMPP⁺ (cit.⁵¹), nebo dimethylaminoethylaminu (DMED)^{52,53} zvyšuje citlivost detekce a spektra těchto derivátů poskytují fragmenty k určení struktury. Kompletní charakterizace struktury FAHFA, včetně určení délky mastných kyselin, polohy dvojných vazeb a regioizomerie esterové vazby, lze provést fragmentací produktů vzniklých reakcí deprotonované FAHFA a trisfenantrolinového hořčnatého komplexu v plynné fázi⁵⁴. Tyto experimenty byly prováděny v modifikovaném hybridním hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem/lineárním iontovou pastí a se střídavě přepínanou polaritou napětí nanoelektrospreje. Úprava přístroje umožnila vstup dikationtů činidla i aniontů FAHFA do hmotnostního spektrometru a jejich reakci.

Cyklopropanové mastné kyseliny (CFA) vznikají *in situ* methylací dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin. CFA se často vyskytují v bakteriích, např. v *E. coli*⁵⁵. Charakterizace cyklopropylových skupin v alifatických řetězcích lipidů může byla provedena s využitím UVPD-MS (cit.⁵⁶), RDD (cit.^{7,16}), nebo inverze náboje v plynné fázi⁵⁷. V UVPD spektrech můžeme pozorovat štěpení vazby uhlík-uhlík na obou stranách cyklopropanového kruhu. Dvojice fragmentů vzdálených od sebe 14 Da charakterizuje polohu cyklopropanového kruhu. UVPD-MS s vlnovou délkou 213 nm bylo použito k charakterizaci CFA a mykolových kyselin v bakteriálních extraktech⁵⁶. RDD derivátů I-AMPP⁺ vedla ke štěpení řetězce na obou stranách cyklopropanové části a poskytla charakteristickou mezeru 40 Da mezi fragmentovými ionty¹⁶. Lipidy derivatizované činidly obsahujícími TEMPO poskytovaly fragmenty odpovídající štěpení vazeb na obou stranách cyklopropanového kruhu⁷ podobně jako v UVPD-MS. K charakterizaci polohy cyklopropylu v kardiolipinech *E. coli* byly negativně nabitě prekurzorové ionty fragmentovány pomocí CID a vzniklé produkty pak reagovaly s trisfenantrolinovými dikationty hořčičku⁵⁷. CID takto vzniklého komplexu poskytla diagnostické fragmenty pro určení polohy cyklopropanového kruhu.

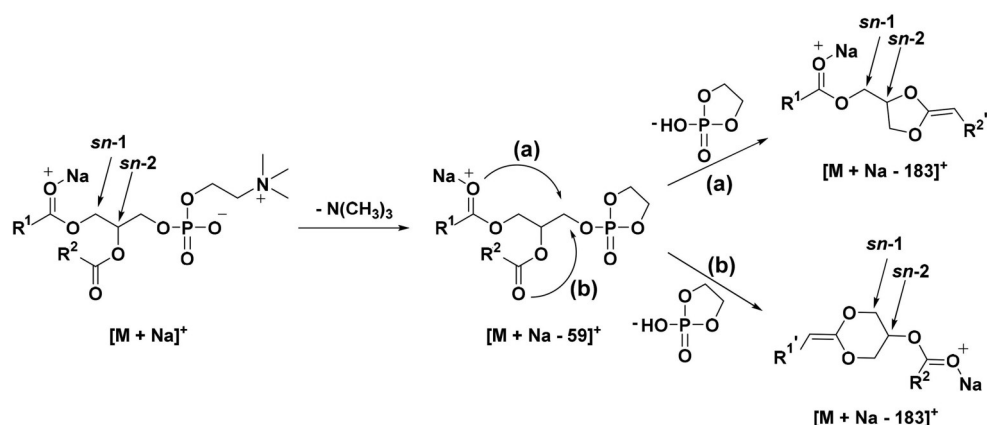
4. Stereospecifická poloha acylového řetězce na glycerolu

Glycerol sám o sobě není chirální, ale různé substituce na jeho hydroxyskupinách způsobují, že glycerolipidy

jsou chirální molekuly. Stereospecifický systém číslování definuje polohy substituentů jako *sn-1*, *sn-2* a *sn-3*. Analytické metody pro přiřazení polohy substituentů jsou důležité, protože poloha acylových skupin na glycerolu ovlivňuje biologické účinky glycerolipidů. Analýza může zahrnovat kroky, které umožňují separaci stereoizomerů, například stereoselektivní štěpení mastných acylů enzymy jako je fosfolipasa A2 (cit.⁵⁸) nebo separaci pomocí chromatografie či iontové mobility^{59–62}. Většina metod je omezena na rozlišení sekundární polohy od primární (*sn-2* vs. *sn-1/3*). Při fragmentaci v hmotnostním spektrometru je štěpení mastných kyselin z poloh *sn-1* a *sn-3* stejně výhodné, a pravděpodobnější než ztráta z polohy *sn-2*. K rozlišení substituentů *sn-2* od *sn-1/3* lze tedy využít relativní intenzity fragmentů⁶³. Například fosfatidylcholinové *sn*-izomery lze rozlišit a kvantifikovat porovnáním intenzit fragmentů pozorovaných v UVPD a CID spektrech dvojnásobně nabitých molekulových aduktů s kovy ([PC + Fe]²⁺)⁶⁴. Hsu a Turk podrobně zkoumali nízkoenergetické CID procesy vedoucí k regiospecifickým fragmentacím mastných kyselin v glycerofosfolipidech^{65–67}. Tandemová hmotnostní spektra deprotonovaných molekul a molekulových aduktů s různými alkalickými kovy poskytla podrobné strukturní informace včetně identifikace polární hlavy fosfolipidu, acylových substituentů a jejich *sn* pozic určených z relativních intenzit fragmentů. Aduktů fosfolipidů s alkalickými kovy (např. Li⁺, Na⁺) poskytují intenzivní fragmenty odpovídající neutrální ztrátě polární hlavičky. U fosfatidylcholinů probíhá eliminace této skupiny přes meziproduct s pětičlenným kruhem, čímž vzniká fragment s 1,3-dioxolanovým kruhem spojeným s *sn-2* acylovým řetězcem nově vytvořenou dvojnou vazbou (obr. 3a). Alternativní cesta může vést k 1,3-dioxolanovým fragmentům (obr. 3b)⁶⁶, nicméně se ukazuje, že převážně vznikají 1,3-dioxolanové izomery⁶⁸. Struktura těchto fragmentů byla nedávno potvrzena pomocí kryogenní infračervené spektrometrie⁶⁹.

Využití relativních intenzit fragmentačních iontů pro přiřazení mastných kyselin k *sn* pozicím nemusí být vždy spolehlivé, protože intenzity iontů jsou ovlivněny strukturou mastných acylových řetězců a polární hlavičkou lipidu. Intenzity iontů ovlivňuje i typ přístroje a velikost kolizní energie. Proto se ve spektrech hledají unikátní fragmenty pro jednoznačnou identifikaci regioizomerů^{70–72}. Ionty s 1,3-dioxolanovým motivem jsou vhodným cílem pro další fragmentaci. Brodbelt a spoluautoři představili MS³ metodu, která využívá HCD v kombinaci s UVPD (193 nm) pro přiřazení *sn* pozic v glycerofosfolipidech⁷⁰. Produktový iont ztráty polární hlavičky lipidu vytvořený při HCD je aktivován UV fotony. Mastná kyselina v poloze *sn-1* poskytuje allylesterový fragment vznikající fotolytickým štěpením přes dioxolanovou část. Menší pík generovaný jiným fotolytickým štěpením určuje mastnou kyselinu v poloze *sn-2* (obr. 4). Metoda byla testována pro různé fosfolipidy a integrována do LC-MS³ analýzy⁷⁰.

Kombinace epoxidace pomocí m-CPBA ve spojení s LC-MS³ byla využita k určení polohy dvojných vazeb a *sn* pozice fosfolipidů⁷³. Dvojná vazba 1,3-dioxolanového

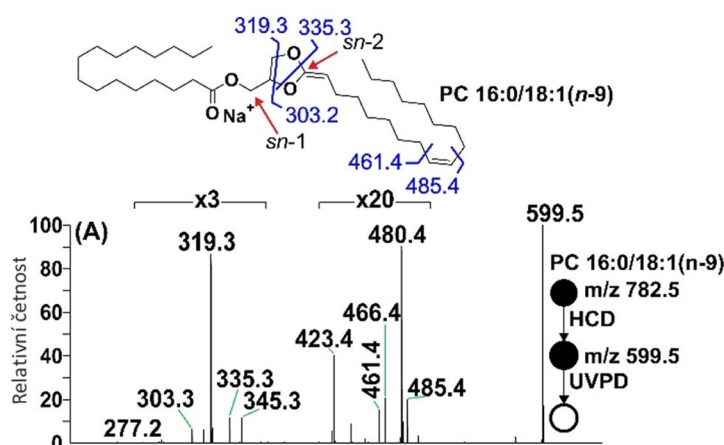


Obr. 3. Ztráta polární hlavičky fosfatidylcholinu z aduktu $[\text{PC} + \text{Na}]^+$ při nízkenergetické CID. Upraveno dle cit.⁶⁶. Eliminace cyklického ethylenfosfátu vede ke vzniku fragmentu s 1,3-dioxolanovým kruhem spojeným s *sn*-2 acylovým řetězcem nově vytvořenou dvojnou vazbou (a). Alternativní cesta může vést k 1,3-dioxanovým fragmentům (b)

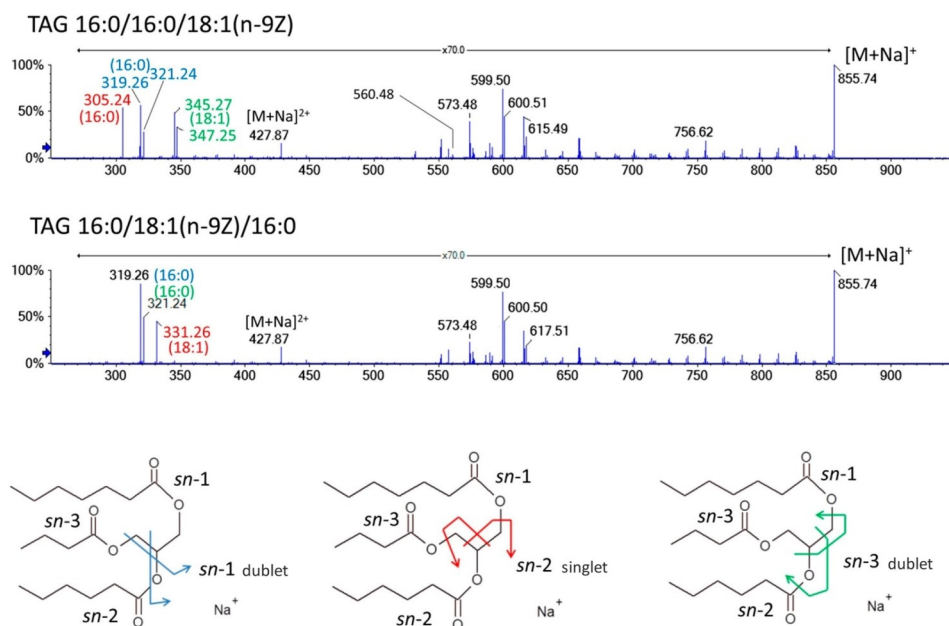
fragmentu může reagovat s ozonem, čehož lze využít jako dalšího způsobu identifikace *sn* izomerů. Tento způsob určení *sn* poloh byl aplikovaný na sodné adukty aduktů fosfolipidů v hmotnostním spektrometru s lineární iontovou pastí⁷¹. 1,3-dioxolanový fragment z CID byl následně podroben disociaci vyvolané ozonem (OzID, ozone-induced dissociation). Aktivace 1,3-dioxolanových fragmentů z lipidů derivatizovaných Paternò-Büchiho činidlem (PB) také umožňuje přiřazení mastných kyselin k *sn* pozicím⁷². Ma a spolupracovníci použili 2-acetylpyridin (2-AP) jako PB činidlo pro nenasycené glycerofosfolipidy. Výhodou 2-AP je jeho vysoká afinita k sodíku. Aktivace 1,3-dioxolanového fragmentu 2-AP derivátu poskytuje fragmenty, které charakterizují *sn* pozice mastných kyselin na glycerolu a polohy dvojných vazeb v ř-

těžcích. Tuto metodu lze snadno implementovat do lipidomické analýzy⁷².

Pro regiospecifickou analýzu mastných acylů ve fosfatidylcholinech může být dostačující MS², pokud jsou fragmentovány adukty s hydrogenuhličitanovým aniontem⁷⁴. Jejich fragmentace iniciovaná ztrátami H₂CO₃ a *N,N*-dimethylaminomethylového radikálu pokračuje eliminací mastné kyseliny z polohy *sn*-2. Vzniklý fragmentový iont obsahuje acyl z polohy *sn*-1, čímž se jednoznačně identifikují *sn* izomery. Tuto metodu lze snadno implementovat do LC-MS analýzy, pokud se do mobilní fáze přidá hydrogenuhličitan amonný⁷⁴. V navazující práci bylo zjištěno, že při fragmentaci dochází také ke vzniku iontů, které mají potenciál pro zjištění polohy dvojných vazeb a methylového větvení. V kombinaci s LC-MS analý-



Obr. 4. HCD/UVPD MS³ spektrum sodného aduktu fosfatidylcholinu PC 16:0/18:1 (*n*-9). Upraveno dle cit.⁷⁰. Produktový iont, který vznikl při HCD ztrátou polární hlavičky lipidu, je dále aktivován UV fotony. Mastná kyselina v poloze *sn*-1 poskytuje allylesterový fragment fotolytickým štěpením přes dioxolanovou část. Menší pík z jiného fotolytického štěpení identifikuje mastnou kyselinu v poloze *sn*-2



Obr. 5. EID MS² spektra sodíkových aduktů triacylglycerolových regioizomerů TG 16:0/16:0/18:1 (n-9Z), TG 16:0/18:1 (n-9Z)/16:0. Upraveno dle cit.⁷⁸. Spektra poskytují dvě odlišné skupiny píků, singlety a dublety lišící se o 2 Da. Singletový pík identifikuje acylový řetězec v poloze *sn*-2 (označeno červeně), dubletové píky charakterizují acylové řetězce v polohách *sn*-1 a *sn*-3 (označeno modře a zeleně)

zou byla tato metoda použita pro charakterizaci lysosfatidylcholinů v lidské plazmě⁹.

Při disociaci indukované elektrony (EID, electron-induced dissociation) interagují ionty lipidů se svazkem elektronů, přičemž vznikají diagnostické fragmenty (viz kapitola 4 části II článku Určení poloh násobných vazeb v lipidech pomocí hmotnostní spektrometrie⁷⁵). Spektra EID poskytují téměř úplnou strukturní charakterizaci lipidů, jak bylo prokázáno u fosfatidylcholinů⁷⁶, sfingomyelinů⁷⁷ a triacylglycerolů⁷⁸. Fragmenty glycerolipidů vznikající v místech štěpení glycerolové části charakterizují regioizomery. Například EID spektra triacylglycerolů poskytují dvě odlišné skupiny píků, singlety a dublety lišící se o 2 Da. Zatímco singletový pík identifikuje acylový řetězec v poloze *sn*-2, dubletové píky charakterizují acylové řetězce v polohách *sn*-1 a *sn*-3 (obr. 5).

5. Závěr

V tomto přehledovém článku jsme se zaměřili na nové metody pro podrobnou analýzu struktury lipidů se zvláštním důrazem na charakterizaci větvení, vybraných funkčních skupin a stereoizomerie na glycerolu. Pokročilé analytické postupy, jako jsou nové fragmentační techniky a nové derivatizační postupy ve spojení s tandemovou a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií nabízejí nové možnosti strukturní analýzy. Některé metody lze využít pro charakterizaci různých strukturních motivů

v alifatických řetězcích lipidů, například pro charakterizaci větvení i poloh násobných vazeb ze stejného hmotnostního spektra.

Další rozvoj strukturní analýzy lipidů bude nepochybně spjat s technologickými pokroky v hmotnostní spektrometrii. Lze očekávat nejen vyšší rozlišení a citlivost hmotnostních spektrometrů, ale i širší využití nových aktivačních metod, jako jsou EID a UVPD. Častější integrace iontové mobility umožní separaci lipidů na základě jejich tvaru před hmotnostně-spektrometrickou analýzou. Nové způsoby derivatizace lipidů zvýší účinnost ionizace a pomohou získat podrobnější informace o jejich struktuře. Všechny tyto inovace výrazně zlepší analýzu lipidů ve složitých biologických vzorcích, což pomůže k lepšímu pochopení jejich biologických funkcí. Nové přístupy mohou vést k důležitým objevům v oblasti biologie lipidů, například k lepšímu pochopení nemocí spojených s lipidovým metabolismem a k vývoji nových terapií.

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

LITERATURA

1. Ran-Ressler R. R., Devapatla S., Lawrence P., Brenna J. T.: *Pediatr. Res.* 64, 605 (2008).
2. Oku H., Nakanishi T., Kumamoto K., Chinen I.:

- Comp. Biochem. Physiol. B 96, 475 (1990).
3. Zhang W., Jian R., Zhao J., Liu Y., Xia Y.: J. Lipid Res. 63, 100219 (2022).
 4. Ran-Ressler R. R., Lawrence P., Brenna J. T.: J. Lipid Res. 53, 195 (2012).
 5. Pham H. T., Ly T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Anal. Chem. 84, 7525 (2012).
 6. Pham H. T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 27, 805 (2013).
 7. Lin Q., Li P., Jian R., Xia Y.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 33, 714 (2022).
 8. Jian R., Zhao X., Lin Q., Xia Y.: Analyst 147, 2115 (2022).
 9. Zhao X., Xia Y.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 32, 560 (2021).
 10. Nsiah S. T., Fabijanczuk K. C., McLuckey S. A.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 38, e9741 (2024).
 11. Zhao J., Qiao L., Xia Y.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 34, 2394 (2023).
 12. Narreddula V. R., McKinnon B. I., Marlton S. J. P., Marshall D. L., Boase N. R. B., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Analyst 146, 156 (2021).
 13. Tatituri R. V. V., Wolf B. J., Brenner M. B., Turk J., Hsu F. F.: Anal. Bioanal. Chem. 407, 2519 (2015).
 14. Flentie K. N., Stallings C. L., Turk J., Minnaard A. J., Hsu F. F.: J. Lipid Res. 57, 142 (2016).
 15. Randolph C. E., Beveridge C. H., Iyer S., Blanksby S. J., McLuckey S. A., Chopra G.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 33, 2156 (2022).
 16. 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).
 17. Jensen N. J., Gross M. L.: Lipids 21, 362 (1986).
 18. Contado M. J., Adams J.: Anal. Chim. Acta 246, 187 (1991).
 19. Funk C. D.: Science 294, 1871 (2001).
 20. Berglund L.: Am. J. Clin. Nutr. 78, 353 (2003).
 21. Gladine C., Ostermann A. I., Newman J. W., Schebb N. H.: Free Radicals Biol. Med. 144, 72 (2019).
 22. Thakare R. a 10 spoluautorů: Biomed. Chromatogr. 32, 4102 (2018).
 23. Puppolo M., Varma D., Jansen S. A.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 964, 50 (2014).
 24. Mesaros C., Blair I. A.: Metabolites 2, 337 (2012).
 25. Murphy R. C., Barkley R. M., Zemski Berry K., Hankin J., Harrison K., Johnson C., Krank J., McAnoy A., Uhlson C., Zarini S.: Anal. Biochem. 346, 1 (2005).
 26. Yang J., Schmelzer K., Georgi K., Hammock B. D.: Anal. Chem. 81, 8085 (2009).
 27. Chocholeušková M., Jirásko R., Vrána D., Gatěk J., Melichar B., Holčapek M.: Anal. Bioanal. Chem. 411, 1239 (2019).
 28. Lee S. H., Williams M. V., DuBois R. N., Blair I. A.: Rapid. Commun. Mass Spectrom. 17, 2168 (2003).
 29. Di Giovanni J. P., Barkley R. M., Jones D. N. M., Hankin J. A., Murphy R. C.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 29, 1231 (2018).
 30. Yuan Z. X., Majchrzak-Hong S., Keyes G. S., Iadarola M. J., Mannes A. J., Ramsden C. E.: Anal. Bioanal. Chem. 410, 6009 (2018).
 31. 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).
 32. Sun D., Meng X., Ren T., Fawcett J. P., Wang H., Gu J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 29, 1365 (2018).
 33. Liu X., Moon S. H., Mancuso D. J., Jenkins C. M., Guan S., Sims H. F., Gross R. W.: Anal. Biochem. 442, 40 (2013).
 34. Narreddula V. R., Sadowski P., Boase N. R. B., Marshall D. L., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 34, (2020).
 35. Bollinger J. G., Naika G. S., Sadilek M., Gelb M. H.: J. Lipid Res. 54, 3523 (2013).
 36. Meckelmann S. W., Hellhake S., Steuck M., Krohn M., Schebb N. H.: Prostaglandins Other Lipid Mediators 130, 8 (2017).
 37. Hsu F. F.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 27, 622 (2016).
 38. Hellhake S., Meckelmann S. W., Empl M. T., Rentmeister K., Wissdorf W., Steinberg P., Schmitz O. J., Benter T., Schebb N. H.: Anal. Bioanal. Chem. 412, 5743 (2020).
 39. Madsen J. A., Cullen T. W., Trent M. S., Brodbelt J. S.: Anal. Chem. 83, 5107 (2011).
 40. Blevins M. S., James V. K., Herrera C. M., Purcell A. B., Trent M. S., Brodbelt J. S.: Anal. Chem. 92, 9146 (2020).
 41. Brejchova K., Balas L., Paluchova V., Brezinova M., Durand T., Kuda O.: Prog. Lipid Res. 79, 101053 (2020).
 42. Butovich I. A., Wojtowicz J. C., Molai M.: J. Lipid Res. 50, 2471 (2009).
 43. Kuda O. a 11 spoluautorů: Diabetes 65, 2580 (2016).
 44. Kolar M. J., Nelson A. T., Chang T., Ertunc M. E., Christy M. P., Ohlsson L., Harrod M., Kahn B. B., Siegel D., Saghatelian A.: Anal. Chem. 90, 5358 (2018).
 45. Ma Y., Kind T., Vaniya A., Gennity I., Fahrman J. F., Fiehn O.: J. Cheminform. 7, 53 (2015).
 46. Marshall D. L., Saville J. T., Maccarone A. T., Ailuri R., Kelso M. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 30, 2351 (2016).
 47. Gowda S. G. B., Liang C., Gowda D., Hou F., Kawakami K., Fukiya S., Yokota A., Chiba H., Hui S. P.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 34, e8831 (2020).
 48. Hu T., Lin M., Zhang D., Li M., Zhang J.: Anal. Bioanal. Chem. 410, 7415 (2018).
 49. Vavrušová A., Vrkoslav V., Plavka R., Bosáková Z., Cvačka J.: Anal. Bioanal. Chem. 412, 2291 (2020).
 50. Hu C., Wang M., Duan Q., Han X.: Anal. Chim. Acta. 1105, 105 (2020).
 51. Hancock S. E. a 12 spoluautorů: J. Lipid. Res. 59, 1510 (2018).

52. Zhu Q. F., Yan J. W., Gao Y., Zhang J. W., Yuan B. F., Feng Y. Q.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1061, 34 (2017).
53. Zhu Q. F., Yan J. W., Zhang T. Y., Xiao H. M., Feng Y. Q.: *Anal. Chem.* 90, 10056 (2018).
54. Randolph C. E., Marshall D. L., Blanksby S. J., McLuckey S. A.: *Anal. Chim. Acta* 31, 1129 (2020).
55. Jiang X., Duan Y., Zhou B., Guo Q., Wang H., Hang X., Zeng L., Jia J., Bi H.: *J. Bacteriol.* 201, 374 (2019).
56. Blevins M. S., Klein D. R., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* 91, 6820 (2019).
57. Randolph C. E., Shenault D. S. M., Blanksby S. J., McLuckey S. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 455 (2021).
58. Mouchlis V. D., Chen Y., McCammon J. A., Dennis E. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 140, 3285 (2018).
59. Kawana H., Kano K., Shindou H., Inoue A., Shimizu T., Aoki J.: *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids* 1864, 1053 (2019).
60. Groessl M., Graf S., Knochenmuss R.: *Analyst* 140, 6904 (2015).
61. Bowman A. P., Abzalimov R. R., Shvartsburg A. A.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28, 1552 (2017).
62. Maccarone A. T., Duldig J., Mitchell T. W., Blanksby S. J., Duchoslav E., Campbell J. L.: *J. Lipid Res.* 55, 1668 (2014).
63. Laakso P.: *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 104, 43 (2002).
64. Becher S., Esch P., Heiles S.: *Anal. Chem.* 90, 11486 (2018).
65. Hsu F. F., Turk J.: *J. Mass Spectrom.* 35, 596 (2000).
66. Hsu F. F., Turk J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 352 (2003).
67. Hsu F. F., Turk J.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16, 1510 (2005).
68. Becher S., Berden G., Martens J., Oomens J., Heiles S.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 2874 (2021).
69. Kirschbaum C., Greis K., Polewski L., Gewinner S., Schöllkopf W., Meijer G., von Helden G., Pagel K.: *J. Am. Chem. Soc.* 143, 14827 (2021).
70. Williams P. E., Klein D. R., Greer S. M., Brodbelt J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* 139, 15681 (2017).
71. Pham H. T., Maccarone A. T., Thomas M. C., Campbell J. L., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Analyst* 139, 204 (2014).
72. Ma X. X., Zhang W. P., Li Z. S., Xia Y., Ouyang Z.: *Accounts Chem. Res.* 54, 3873 (2021).
73. Cao W., Tan J.: *Chinese J. Anal. Chem.* 51, 100290 (2023).
74. Zhao X., Zhang W., Zhang D., Liu X., Cao W., Chen Q., Ouyang Z., Xia Y.: *Chem. Sci. J.* 10, 10740 (2019).
75. Strnad Š., Vrkoslav V., Cvačka J.: *Chem. listy* 117, 747 (2023).
76. Campbell J. L., Baba T.: *Anal. Chem.* 87, 5837 (2015).
77. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 858 (2016).
78. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 2015 (2016).

Š. Strnad, V. Vrkoslav, and J. Cvačka (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Locations of Functional Groups in the Aliphatic Chains of Lipids and the Arrangement of Aliphatic Chains within Acyl-glycerolipids by the Methods of Mass Spectrometry**

Lipids play key roles in many biological processes. Most lipids contain long aliphatic chains whose variable structure contributes to diverse physicochemical properties and biological functions of these molecules. The aliphatic chains of lipids can be straight or branched, with double or triple bonds, or with various functional groups. In recent years, mass spectrometry has made significant progress in the structural analysis of lipids. New methods are based on unconventional fragmentation techniques and new derivatization reactions. They can be used to determine the detailed structure of aliphatic chains, including the position of multiple bonds, functional groups, and the arrangement of aliphatic chains in complex lipids. This review article is a follow-up to two previous articles that dealt with the determination of double bond positions (*Chem. Listy* 117, 684 (2023), *Chem. Listy* 117, 747 (2023)). Here, we focus on determining the position of methyl branching, oxygen-containing functional groups, carbocyclic structures, and the stereospecific position of the acyl chain on glycerol.

Keywords: carbocyclic compounds, fragmentation, functional groups, lipids, methyl branching, *sn*-positions, structural analysis

Acknowledgment

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.