

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

Katedra analytické chemie

**Lipidomická analýza spojením separačních technik  
s hmotnostní spektrometrií**

**Disertační práce**

**Autor práce:** Ing. Ondřej Peterka

**Vedoucí práce:** prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.

**2021**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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

Ondřej Peterka

## **Poděkování**

Disertační práce byla realizována s finanční podporou grantových prostředků Grantové agentury ČR projektů č. 18-12204S, 20-23290Y a 21-20238S.

Poděkování za odborné vedení, cenné rady, přátelské prostředí a připomínky v průběhu celé práce patří především mému školiteli Michalu Holčápkovi a konzultantovi Robertovi Jiráskovi, ale i všem mým kolegům Michaele Chocholouškové, Denise Wolrab, Zuzaně Vaňkové, Jakubovi Idkowiakovi a Michele Antonelli. Zvláštní poděkování patří mé rodině a přítelkyni za trpělivost a podporu poskytovanou během celého studia.

## **ABSTRAKT**

Studium živých organismů bylo vždy zájmem vědeckých oborů a v dnešní době tomu není jinak. S moderními přístupy se otevírají nové možnosti, což souvisí i se značným rozmachem tzv. „omics“ metod, kam patří například genomika, proteomika, metabolomika nebo glykomika. Lipidomika je nejmladším podoborem metabolomiky a zaměřuje se na analýzu lipidů v živých organismech. Lipidy jsou rozsáhlou skupinou přírodních látek, které jsou obsaženy v rostlinách, houbách, bakteriích nebo v těle živočichů, kde plní životně důležité funkce. Hmotnostní spektrometrie je nejpoužívanější technikou v kvalitativní i kvantitativní analýze lipidů.

V teoretické části této práce jsou popsány základní poznatky o lipidech, současné názvosloví a biologické funkce v živých organismech. Současně je vysvětlena lipidomická analýza od přípravy vzorků až po nástroje využívané ke zpracování naměřených dat. Zvláštní pozornost je věnována principům chromatografických technik a využití jejich spojení s hmotnostní spektrometrií v lipidomické analýze, kdy jsou kromě výhod a limitací shrnuty také zásady pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Literární rešerše poté ukazuje potenciál lipidů pro diagnostiku různých typů onemocnění a přínos derivatizačních postupů v lipidomické analýze.

V experimentální části je diskutován vývoj nových metod pro analýzu lipidů v tělních tekutinách s využitím spojení chromatografických technik a hmotnostní spektrometrie. V této práci jsou použity dva přístupy využívané v lipidomické analýze, separace lipidů dle lipidových druhů pomocí kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi a separace dle lipidových tříd pomocí hydrofilní interakční chromatografie a superkritické fluidní chromatografie. Separace lipidů dle lipidových druhů je aplikována pro kvalitativní popis lidské plazmy s využitím klasického i derivatizačního přístupu, naopak metody založené na separaci dle lipidových tříd jsou využity pro kvantitativní analýzu velkého množství vzorků a pomocí statistických nástrojů jsou porovnávány lipidové profily zdravých jedinců a pacientů s diagnostikovanou rakovinou.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Lipidy, onkolipidomika, kapalinová a superkritická fluidní chromatografie, hmotnostní spektrometrie, derivatizace.

## **ABSTRACT**

The living organisms have always been studied by scientific disciplines, and it is also valid at the present time. New modern approaches open new possibilities, which relates to the considerable expansion of „omics“ methods including genomics, proteomics, metabolomics, or glycomics. Lipidomics is the youngest subgroup of metabolomics focusing on the analysis of lipids in living organisms. Lipids are a large group of natural substances, which are contained in plants, fungi, bacteria, or in the body of animals, where they are responsible for essential life functions. Mass spectrometry is the most widely used technique in the qualitative and quantitative analysis of lipids.

The theoretical part of this thesis describes the basic knowledge about lipids, systematic nomenclature, and biological functions in living organisms. At the same time, the lipidomic analysis is described from sample preparation to data processing. A special attention is paid to the principles of chromatographic techniques associated with mass spectrometry for lipidomic analysis, and advantages, disadvantages, and principles of qualitative and quantitative analysis are summarized. The review shows the potential of lipids for the diagnosis of various types of diseases and the benefits of derivatization procedures in lipidomic analysis.

The experimental part deals with the development of new methods for the analysis of lipids in body fluids by chromatographic techniques coupled with mass spectrometry. Lipidomic analysis follows two chromatographic approaches in this thesis, lipid species separation is achieved by reversed-phase liquid chromatography and lipid class separation by hydrophilic interaction chromatography and supercritical fluid chromatography. Lipid species separation is used for the qualitative analysis of human plasma by nonderivatization and derivatization approaches. On the other hand, the lipid class separation is used for the quantitative analysis of a large number of samples, and statistical tools are used to compare lipid profiles of healthy volunteers and cancer patients.

## **KEYWORDS**

Lipids, oncolipidomics, liquid and supercritical fluid chromatography, mass spectrometry, derivatization.

## Obsah

1	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
1.1	Lipidy .....	12
1.1.1	Názvosloví .....	12
1.1.2	Rozdělení lipidů .....	13
1.1.3	Funkce lipidů .....	13
1.1.3.1	Mastné kyseliny .....	15
1.1.3.2	Glycerolipidy .....	16
1.1.3.3	Glycerofosfolipidy .....	16
1.1.3.4	Sfingolipidy .....	17
1.1.3.5	Steroly .....	19
1.1.3.6	Prenoly .....	20
1.1.3.7	Sacharolipidy .....	20
1.1.3.8	Polyketidy .....	20
1.1.4	Potenciál lipidů v diagnostice nemocí .....	20
1.2	Hmotnostní spektrometrie .....	22
1.2.1	Ionizační techniky .....	22
1.2.2	Hmotnostní analyzátory .....	23
1.3	Lipidomická analýza .....	24
1.3.1	Příprava vzorku .....	24
1.3.1.1	Extrakce z kapaliny do kapaliny .....	24
1.3.1.2	Extrakce na pevné fázi .....	25
1.3.1.3	Superkritická fluidní extrakce .....	25
1.3.2	Kapalinová chromatografie .....	26
1.3.2.1	Hydrofilní interakční chromatografie .....	26
1.3.2.2	Kapalinová chromatografie s normálními fázemi .....	26
1.3.2.3	Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi .....	27
1.3.1	Superkritická fluidní chromatografie .....	27

1.3.2	Srovnání kapalinové a superkritické fluidní chromatografie.....	29
1.3.3	Lipidomická analýza pomocí hmotnostní spektrometrie.....	30
1.3.3.1	Přímá infúze.....	30
1.3.3.2	Separační techniky spojené s hmotnostní spektrometrií .....	31
1.3.3.3	Iontová mobilita.....	31
1.3.4	Kvalitativní analýza .....	32
1.3.5	Kvantitativní analýza .....	32
1.3.6	Softwary pro zpracování dat v lipidomické analýze.....	33
1.4	Derivatizace lipidů .....	34
1.4.1	Derivatizace mastných kyselin .....	34
1.4.2	Derivatizace glycerolipidů.....	35
1.4.3	Derivatizace fosfolipidů.....	36
1.4.4	Derivatizace sfingolipidů.....	36
1.4.5	Derivatizace sterolů .....	36
1.4.6	Fotochemická reakce dvojných vazeb .....	37
1.4.7	Využití značených derivatizačních činidel .....	38
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
2.1	Separace podle lipidových druhů .....	40
2.2	Separace dle lipidových tříd.....	42
2.3	Onkolipidomika.....	45
3	ZÁVĚR .....	49
4	VĚDECKÝ PROFIL.....	50
5	LITERATURA .....	56
6	PŘÍLOHY .....	75

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1:</b> Rozdělení lipidů dle LIPID MAPS.....	13
<b>Obrázek 2:</b> Struktura a složení lipidové dvojvrstvy .....	17
<b>Obrázek 3:</b> Biosyntetické dráhy sfingolipidů.....	18
<b>Obrázek 4:</b> Schéma vzniku oxysterolů z cholesterolu .....	19
<b>Obrázek 5:</b> Srovnání separačních principů v lipidomické analýze .....	27
<b>Obrázek 6:</b> Fázový digram oxidu uhličitého .....	28
<b>Obrázek 7:</b> Schéma SFC/MS.....	29
<b>Obrázek 8:</b> Srovnání (U)HPLC a (UHP)SFC .....	29
<b>Obrázek 9:</b> Princip identifikace při použití neznačeného a značeného der. činidla.....	38
<b>Tabulka 1:</b> Hlavní funkce jednotlivých lipidových tříd. ....	15
<b>Tabulka 2:</b> Extrakční metody používané v lipidomické analýze. ....	25
<b>Tabulka 3:</b> Softwary pro lipidomickou analýzu.....	34



## SEZNAM ZKRATEK

*U zkratek převzatých z anglosaské literatury je uvedeno původní znění v závorce.*

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AcylCAR</b>	Acylkarnitin ( <i>Acylcarnitine</i> )
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát ( <i>Adenosine triphosphate</i> )
<b>BMP</b>	Bismonoacylglycerofosfát ( <i>Bismonoacylglycerophosphate</i> )
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CCS</b>	Srážkový průřez iontu ( <i>Collision cross sections</i> )
<b>CE</b>	Cholesterol estery ( <i>Cholesteryl ester</i> )
<b>Cer</b>	Ceramid ( <i>Ceramide</i> )
<b>CL</b>	Kardiolipin ( <i>Cardiolipin</i> )
<b>CN</b>	Počet uhlíků ( <i>Carbon number</i> )
<b>CoA</b>	Koenzymu A ( <i>Coenzyme A</i> )
<b>DB</b>	Dvojná vazba ( <i>Double bond</i> )
<b>DG</b>	Diacylglycerol ( <i>Diacylglycerol</i> )
<b>DI</b>	Přímá infúze ( <i>Direct infusion</i> )
<b>ECN</b>	Ekvivalentní uhlíkové číslo ( <i>Equivalent carbon number</i> )
<b>EMA</b>	Evropská agentura pro léčivé přípravky ( <i>European Medicines Agency</i> )
<b>ESI</b>	Ionizace elektrosprejem ( <i>Electrospray ionization</i> )
<b>EtOAc</b>	Ethylacetát
<b>FA</b>	Mastná kyselina ( <i>Fatty acid</i> )
<b>FDA</b>	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FT</b>	Fourierova transformace ( <i>Fourier transform</i> )
<b>GalCer</b>	Galaktosylceramid ( <i>Galactosylceramide</i> )
<b>GB<sub>3</sub></b>	Globotriaosylceramid ( <i>Globotriaosylceramide</i> )
<b>GB<sub>4</sub></b>	Globotetraosylceramid ( <i>Globotetraosylceramide</i> )
<b>GlcCer</b>	Glukosylceramid ( <i>Glucosylceramide</i> )
<b>GP</b>	Glycerofosfolipidy ( <i>Glycerophospholipids</i> )
<b>GSL</b>	Glykosfingolipidy ( <i>Glycosphingolipids</i> )
<b>Hep</b>	Heptan
<b>Hex</b>	Hexan
<b>HexCer</b>	Hexosylceramid ( <i>Hexosylceramide</i> )

<b>HILIC</b>	Hydrofilní interakční chromatografie ( <i>Hydrophilic liquid chromatography</i> )
<b>HR</b>	Vysoko-rozlišující ( <i>High-resolution</i> )
<b>ICR</b>	Iontová cyklotronová rezonance ( <i>Ion cyclotron resonance</i> )
<b>IM</b>	Iontová mobilita ( <i>Ion mobility</i> )
<b>IS</b>	Vnitřní standard ( <i>Internal standard</i> )
<b>IUPAC</b>	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
<b>LacCer</b>	Laktosylceramid ( <i>Lactosylceramide</i> )
<b>(L)IT</b>	(Lineární) iontová past ( <i>Linear ion trap</i> )
<b>LOD</b>	Limit detekce ( <i>Limit of detection</i> )
<b>LOQ</b>	Limit kvantifikace ( <i>Limit of quantitation</i> )
<b>LPC</b>	Lysofosfatidylcholin ( <i>Lysophosphatidylcholine</i> )
<b>LPG</b>	Lysofosfatidylglycerol ( <i>Lysophosphatidylglycerol</i> )
<b>LR</b>	Nízko-rozlišující ( <i>Low-resolution</i> )
<b>MALDI</b>	Ionizace laserem za účasti matrice ( <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
<b>MDA</b>	Vícerozměrné statistické metody ( <i>Multivariate data analysis</i> )
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MG</b>	Monoacylglycerol ( <i>Monoacylglycerol</i> )
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass spectrometry</i> )
<b>MTBE</b>	Methyl- <i>terc</i> -butylether
<b>NAE</b>	<i>N</i> -acetylethanolamin
<b>NEFA</b>	Neesterifikovaná mastná kyselina ( <i>Non-esterified fatty acids</i> )
<b>NL</b>	Sken neutrálních ztrát ( <i>Neutral loss</i> )
<b>OPLS-DA</b>	Ortogonalní diskriminační analýzy nejmenších čtverců ( <i>Orthogonal partial least squares discriminant analysis</i> )
<b>PA</b>	Kyselina fosfatidová ( <i>Phosphatidic acid</i> )
<b>P-B</b>	Paternò–Büchi
<b>PC</b>	Fosfatidylcholin ( <i>Phosphatidylcholine</i> )
<b>PCA</b>	Analýza hlavních komponent ( <i>Principal component analysis</i> )
<b>PDAC</b>	Rakovinou slinivky břišní ( <i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> )
<b>PE</b>	Fosfatidylethanolamin ( <i>Phosphatidylethanolamine</i> )
<b>PG</b>	Fosfatidylglycerol ( <i>Phosphatidylglycerol</i> )

<b>PI</b>	Fosfatidylinositol ( <i>Phosphatidylinositol</i> )
<b>PIS</b>	Sken prekurzorových iontů ( <i>Precursor ion scan</i> )
<b>PS</b>	Fosfatidylserin ( <i>Phosphatidylserine</i> )
<b>ppm</b>	Parts per milion
<b>Q</b>	Quadrupól
<b>QC</b>	Vzorek kontroly kvality ( <i>Quality control</i> )
<b>RP</b>	Obrácené fáze ( <i>Reversed phase</i> )
<b>RSD</b>	Relativní směrodatná odchylka ( <i>Relative standard deviation</i> )
<b>scCO<sub>2</sub></b>	Superkritický oxid uhličitý ( <i>Supercritical carbon dioxide</i> )
<b>SF</b>	Stacionární fáze
<b>SFE</b>	Superkritická fluidní extrakce ( <i>Supercritical fluid extraction</i> )
<b>SHexCer</b>	Sulfatidy ( <i>Sulfohexosylceramides</i> )
<b>SPB</b>	Sfingoidní báze ( <i>Sphingoid base</i> )
<b>SPE</b>	Extrakce na tuhé fázi ( <i>Solid phase extraction</i> )
<b>S1P</b>	Sfingosin-1-fosfát ( <i>Sphingosine-1-phosphate</i> )
<b>SM</b>	Sfingomyelin ( <i>Sphingomyelin</i> )
<b>SP</b>	Sfingolipidy ( <i>Sphingolipids</i> )
<b>TG</b>	Triacylglycerol ( <i>Triacylglycerol</i> )
<b>TOF</b>	Analyzátor doby letu ( <i>Time-of-flight</i> )
<b>(UHP)LC</b>	(Ultra-vysokoúčinná) kapalinová chromatografie ( <i>Ultrahigh-performance liquid chromatography</i> )
<b>(UHP)SFC</b>	(Ultra-vysokoúčinná) superkritická fluidní chromatografie ( <i>Ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography</i> )
<b>ŽK</b>	Žlučové kyseliny

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lipidy

Lipidy jsou rozmanitou skupinou biomolekul, které je složité definovat. Nejčastěji jsou popisovány jako mastné kyseliny, jejich deriváty a látky, které s těmito sloučeninami souvisejí biosynteticky nebo funkčně [1]. Obecněji mohou být také definovány jako hydrofobní nebo amfipatické malé molekuly, které vznikají celkovou nebo částečnou kondenzací thioesterů nebo isoprenových jednotek [2]. V současné době je evidováno v databázi LIPID MAPS přes 44 500 molekul, přičemž toto číslo se neustále navyšuje [1].

### 1.1.1 Názvosloví

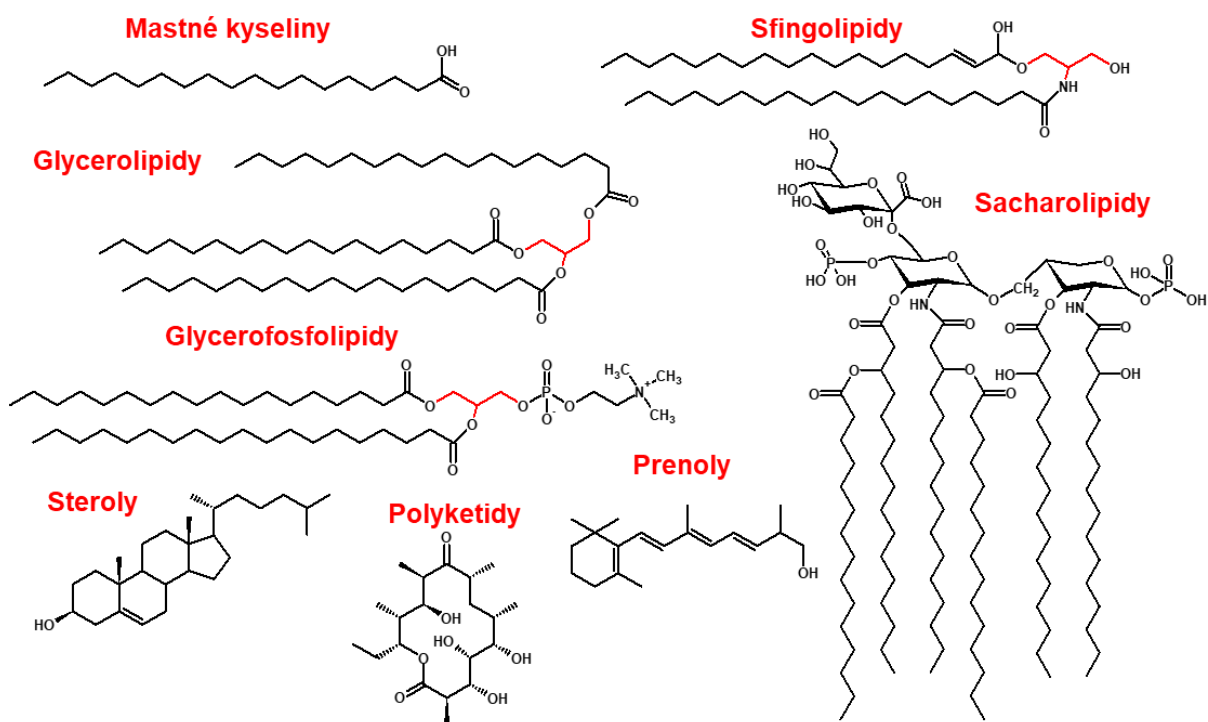
Podobně jako v každé nové vědní disciplíně bylo nutné zavést přesně definované termíny a ujednotit názvosloví. Dle LIPID MAPS bylo poprvé ustanoveno názvosloví v roce 2005 [3], které potvrdila Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC), jejichž součástí jsou také zkratky jednotlivých lipidových tříd. V roce 2009 došlo k její první aktualizaci [4], kterou následovaly další v roce 2013 [5] a 2020 [6]. Současné jsou ale stále hojně používány i triviální názvy, zejména pro mastné kyseliny jako kyselina olejová, palmitová, stearová a další [4,5].

Lipidy se v rámci jedné lipidové třídy neliší pouze počtem uhlíků (CN) nebo počtem dvojných vazeb (DB), ale v přírodě se vyskytuje celá řada izomerů (regioizomery, enantiomery, *cis/trans* izomery). Jako příklad správného zápisu vzorce byl vybrán fosfatidylcholin (PC) obsahující kyselinu palmitovou (16:0) a olejovou (18:1). Nejobecnější zápis PC 34:1, tzv. úroveň lipidového druhu, udává lipidovou třídu a číselný údaj sumarizující počet uhlíků v acylovém řetězci a dvojných vazeb (CN:DB). Při využití tandemové hmotnostní spektrometrie umožňující identifikaci mastných kyselin je možno vzorec o tuto informaci rozšířit formou PC 16:0\_18:1 (tzv. molekulární úroveň). V případě znalosti *sn*-pozice jednotlivých mastných kyselin získané z poměrů fragmentačních iontů nebo iontovou mobilitou je zápis PC 16:0/18:1 (tzv. úroveň *sn*-pozice). Nejdetajnější vzorec zahrnující pozici dvojných vazeb, kdy je informace získána derivatizačními metodami využívající princip ozonolýzy nebo fotochemické reakce, je zapisován způsobem PC 16:0/18:1(9Z) (tzv. strukturální úroveň). V případě je-li mastná kyselina vázána alkenylovou (plasmalogen) nebo etherovou vazbou, je označována písmeny *P*-, resp. *O*-. Aby nedocházelo k chybné

interpretaci, je nezbytné dbát na správný zápis a uvádět pouze ověřené informace získané správnou analytickou metodou [6].

### 1.1.2 Rozdělení lipidů

Stejně jako na látky v ostatních disciplínách můžeme nahlížet i na lipidy z různého hlediska a podle toho je rozdělovat do skupin. Obecné dělení podle počtu produktů vznikající při hydrolýze na jednoduché (nanejvýš dva produkty) a složené (dva a více produktů) lipidy není příliš praktické. V současné době je nejčastěji používán klasifikační systém dle LIPID MAPS rozdělující lipidy do 8 kategorií (obr. 1), které se následně dělí na lipidové třídy, popř. podtřídy [4]. Následně lze jednotlivé kategorie dělit podle charakteru na nepolární (mastné kyseliny, glycerolipidy, steroly a prenoly) a polární (fosfolipidy, sacharolipidy, sfingolipidy a polyketidy) [2].



**Obrázek 1:** Rozdělení lipidů dle LIPID MAPS s příklady molekul reprezentující jednotlivé lipidové kategorie.

### 1.1.3 Funkce lipidů

Lipidy jsou nezbytné pro existenci živých organismů, kde plní mnoho důležitých funkcí. Na buněčné úrovni jsou lipidy obsaženy především v membránách jednotlivých organel, ale i celé buňky. Právě tvorba fosfolipidové dvojvrstvy, která se neskládá pouze z fosfolipidů, ale i

sfingolipidů, sterolů či proteinů, je asi nejznámější funkcí. Spolu s bílkovinami poté tvoří cytoplazmatickou membránu, která ohraničuje a udává tvar buňky [7]. Podíl nasycených a nenasyčených acylových řetězců v membránových lipidech je klíčovým faktorem určující viskozitu membrány a propustnost pro vodu. Nasycené acylové řetězce se vyznačují vyšší hustotou a vytváří málo propustné rozhraní, zatímco mononenasyčené acylové řetězce tvoří lomený tvar a umožňují vznik tekuté dvojvrstvy při fyziologických podmínkách. Polynenasycené acylové řetězce vytváří volný prostor mezi sousedními molekulami, který je vyplňován cholesterolem (maximálně 50–66 mol %) zvyšující tloušťku membrány a stabilizující její strukturu [8,9]. Zakřivení membrány určuje její lipidové složení závislé na strukturním rozložení polární skupiny a nepolárních acylových řetězců. Strukturně objemnější polární skupina v kombinaci s méně objemnou nepolární částí se formují do kónického tvaru (např. lysofosfatidylcholinu), naopak objemnější nepolární skupina vytváří tvar kužele (např. fosfatidylethanolaminu). Objemově srovnatelné části tvoří strukturu válce (např. fosfatidylcholinu) [8,10].

Při pohledu na lidské tělo se lipidy vyskytují ve všech orgánech i částech těla, přičemž nejpestřejší složení nabízí mozek [11]. V lidském těle se vyskytují převážně lipidy s nerozvětveným acylovým řetězcem se sudým počtem uhlíků o délce C12 – C24, přičemž nejzastoupenější lipidové kategorie jsou steroly, fosfolipidy a glycerolipidy [12]. V minulých letech byla lipidům v lidském organismu přiřazována převážně funkce stavební, ochranná a zásobní, ale detailnější zkoumání ukázalo, že také plní důležitou signální funkci. Z tohoto důvodu začalo být o těchto biomolekulách uvažováno ve spojitosti s koncentrační dysregulací lipidů způsobené vlivem onemocnění. V dnešní době se prokazuje jejich potenciál při diagnóze více či méně závažných onemocnění. K nejběžnějším vyšetřením patří měření hladiny cholesterolu v krvi signalizující kardiovaskulární problémy [13,14]. Kromě stravy, životního stylu a nemoci významně ovlivňuje lipidom i pohlaví, věk a léčiva [15]. Dysregulace lipidů v různých onemocněních bude popsána v sekci 1.1.4.

**Tabulka 1:** Hlavní funkce jednotlivých lipidových tříd.

Lipidová kategorie	Membránové lipidy	Zásobní funkce	Signální funkce
Mastné kyseliny	–	NEFA, AcylCAR	NEFA, AcylCAR, NAE, oxylipiny
Glycerolipidy	–	TG, DG, MG	DG, MG
Glycerofosfolipidy	PC, PE, PI, PG, PA, PS, CL	–	Lyso-formy
Sfingolipidy	SM, HexCer, SHexCer, gangliosidy	–	Cer, SPB, S1P
Steroly	Cholesterol	–	–

### 1.1.3.1 Mastné kyseliny

Jako mastné kyseliny jsou označovány monokarboxylové kyseliny s uhlíkovým řetězcem (C2 – C36) vyskytující se volně nebo vázaně. Kromě délky řetězce se mastné kyseliny liší počtem dvojných vazeb a podle toho jsou děleny na nasycené, mononenasycené a polynenasycené. Délka a linearita, případně větvení řetězce závisí na principu biosyntézy daného lipidu. Rozvětvené řetězce jsou produkovány především bakteriemi, u kterých syntéza vychází z 2-methylpropanoyl-CoA (derivát z valinu) nebo 3-methylbutyryl-CoA (derivát z leucinu) a současně vstupující intermediát udává lichý, popřípadě sudý, počet uhlíků v řetězci. V lidském organismu jsou běžné mastné kyseliny o délce C12 – C24 se sudým počtem uhlíků, nejčastěji C16 a C18 [1]. Převaha mastných kyselin se sudým počtem uhlíků vyplývá z biosyntézy v cytosolu buňky, kde dochází z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) k tvorbě kyseliny palmitové, která je dále prodlužovaná v endoplazmatickém retikulu a mitochondrii o jednotky acetylu, tzv. elongace. V případně působení enzymu desaturasy, dochází ke vzniku dvojných vazeb (desaturace) s geometrickou izomerií *cis* [16]. Ovšem bylo popsáno i několik molekul s konformací *trans*, lichým počtem uhlíků nebo rozvětveným řetězcem [1].

Kromě dobře známých volných mastných kyselin do této kategorie patří také bioaktivní oxylipiny vycházející z polynenasycených mastných kyselin, jako je kyselina arachidonová, linolová nebo eikosapentaénová. Charakteristickým znakem je oxidovaná dvojná vazba, k čemuž dochází převážně působením enzymů. Prostaglandiny spolu s tromboxany jsou produkovány působením cyklooxygenázy, zatímco leukotrieny pomocí lipooxygenázy. Ačkoliv jsou tyto látky nestabilní a příprava vzorku je mnohdy komplikovaná, jejich analýza přináší cennou informaci, neboť se jedná o signální molekuly spojené s celou řadou

fyziologických procesů, například alergické reakce, záněty, srážení krve nebo inhibice HCl v žaludku [17,18].

Mastné kyseliny se také vyznačují vysokou reaktivitou vedoucí ke vzniku esterů (karnitiny) nebo amidů (*N*-acylethanolaminy). V lidské plazmě se jedná o látky zastoupené ve výrazně nižších koncentracích než volné mastné kyseliny [1].

### 1.1.3.2 Glycerolipidy

Glycerolipidy jsou estery mastných kyselin a glycerolu, přičemž podle počtu vázaných acylů rozlišujeme monoacylglyceroly (MG), diacylglyceroly (DG) a triacylglyceroly (TG). Triacylglyceroly disponují vysokou energickou hodnotou a jsou hojně obsaženy v olejnatých semenech rostlin a tukové tkáni živočichů, kde plní ochranou a zásobní funkcí [1]. Energie je uvolňována metabolickými procesy počínajícími štěpením TG pomocí pankreatických a střevních lipáz, které produkují volné mastné kyseliny a glycerol (v případě částečného štěpení MG, popř. DG). Mastné kyseliny jsou následně štěpeny v procesu  $\beta$ -oxidace až na acetyl-CoA a glycerol je přeměněn v procesu glykolýzy nebo glukoneogeneze na dihydroxyacetonfosfát. Energie je uvolněna ve formě adenosin trifosfátu (ATP), přičemž jedna molekula kyseliny stearové poskytne 147 molekul ATP a glycerolu 20 molekul ATP [16].

Diacylglyceroly a monoacylglyceroly jsou významnými prekurzory v buněčném metabolismu, kdy působením enzymů probíhá fosforylace vedoucí ke vzniku glycerofosfolipidů. Enzymatická reakce může probíhat i obrácenou cestou a DG, popř. MG, mohou být metabolické produkty [19]. Směr a průběh reakce je podstatou studia metabolických drah vedoucí k pochopení metabolických procesů na buněčné úrovni [20].

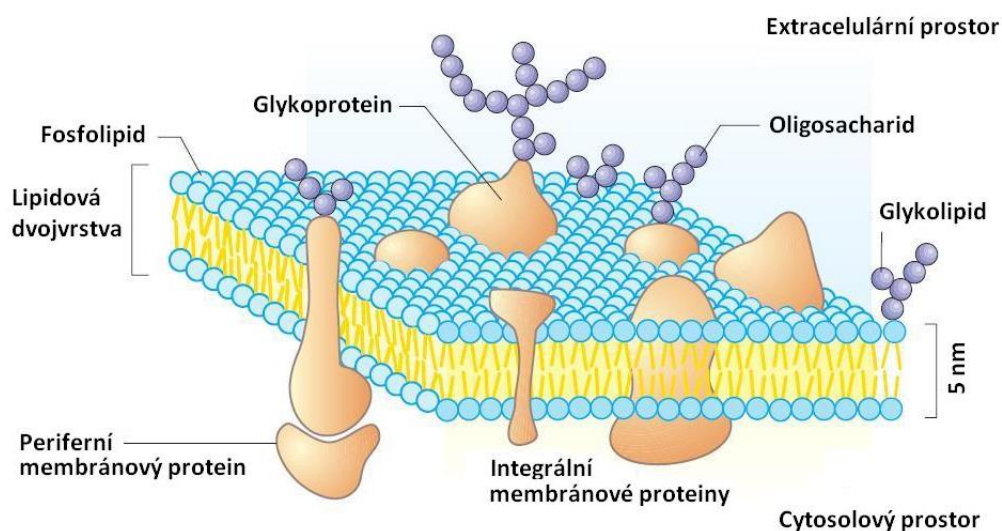
### 1.1.3.3 Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy (GP) jsou nejobsáhlejší lipidovou kategorií, která se dále dělí na 20 lipidových tříd, které se od sebe liší navázanou polární/iontovou funkční skupinou [4]. Mezi nejzastoupenější lipidy této kategorie patří fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylserin (PS), fosfatidylglycerol (PG) a fosfatidové kyseliny (PA). Lipidy obsahující pouze jeden acylový řetězec jsou poté označovány jako *lyso*, například lysofosfatidylcholin (LPC), přičemž acylový řetěz může být vázaný v poloze *sn*-1 nebo *sn*-2, jedná se tedy o regioizomery. Jelikož jsou GP strukturně podobné, pozorujeme u nich i další druhy izomerií, například strukturní



izomerii u bismonoacylglycerofosfátů (BMP) a fosfatidylglycerolů. PG disponují dvěma acylovými řetězci vázanými na glycerolu na rozdíl od BMP, které mají druhý acylový řetězec vázaný na glycerofosfátu (vycházejí z LPG) [1]. Jednotlivé izomery mohou být od sebe rozlišeny separačními metodami nebo pomocí specifických fragmentů v tandemové hmotnostní spektrometrii [21,22]. Další zajímavou třídou jsou kardiolipiny (CL), nikoliv z pohledu izomerie, ale strukturního, jelikož se jedná o lipidy biosyntetizované ze dvou molekul PG [1].

Hlavní funkcí GP je tvorba membrán eukaryotických buněk (obr. 2), kde fosfatidylcholin představují více než 50 % z fosfolipidů v membráně. Nepolární části lipidů jsou propleteny, a právě složení acylů udává vlastnosti membrány. Polární skupiny jsou ve styku s cytosolovým a extracelulárním prostorem a regulují transport látek přes membránu. Kromě stavební jednotky lipidové dvojvrstvy jsou také součástí lipoproteinů a plní funkci signální molekuly nebo enzymatického aktivátoru [1,7].



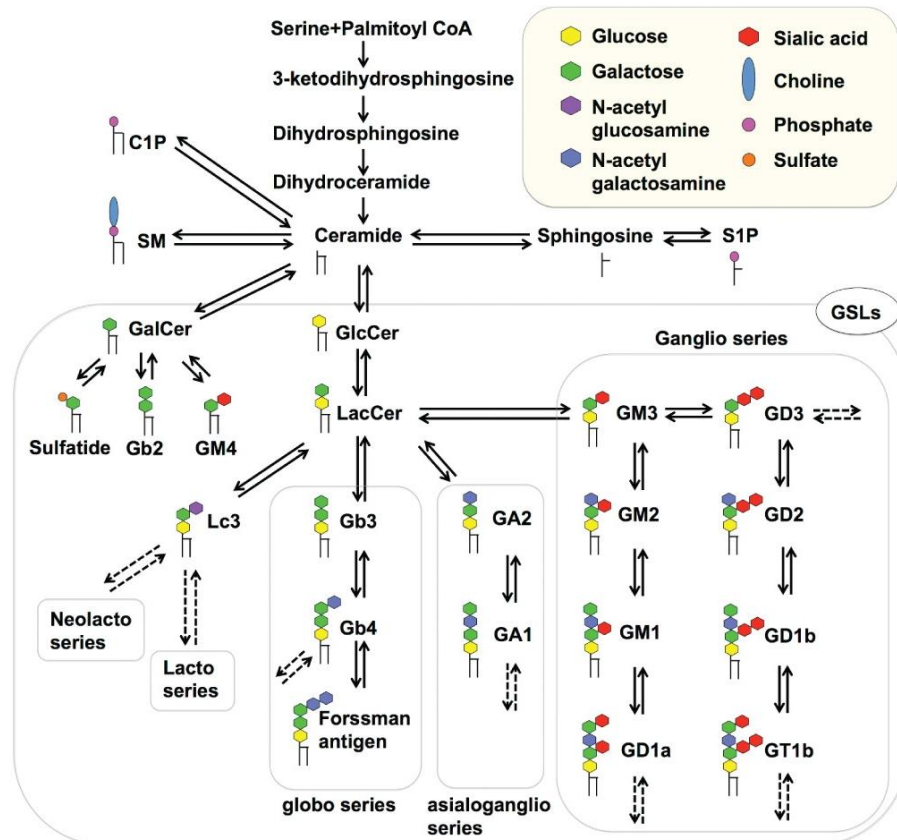
**Obrázek 2:** Struktura a složení lipidové dvojvrstvy [23].

#### 1.1.3.4 Sfingolipidy

Základním stavebním kamenem sfingolipidů (SP) jsou sfingoidní báze (SPB), ze kterých se vytváří navázáním mastné kyseliny na amidovou vazbu ceramidu. Právě tyto dvě třídy jsou meziprodukty při biosyntéze a metabolismu všech sfingolipidů. Volná primární hydroxylová skupina umožňuje strukturní změny, jako například fosforylaci produkující sphingosin-1-fosfát, resp. ceramid-1-fosfát, což jsou molekuly odpovědné za signální funkci a mezibuněčnou komunikaci. Ceramidy spolu s fosfatidylcholinem jsou intermediáty pro biosyntézu sfingomyelinů (SM) v endoplazmatickém retikulu, přičemž reakce je katalyzována

sřingomyelin syntázou. SM jsou nejrozřířenější řingolipidy v řivočiřné tkáni a jejich hlavní funkce je stavební, podobně jako PC, avřak volná hydroxylová skupina a amidová vazba umožňují vodíkové interakce a mění tak vlastnosti membrán [1,19].

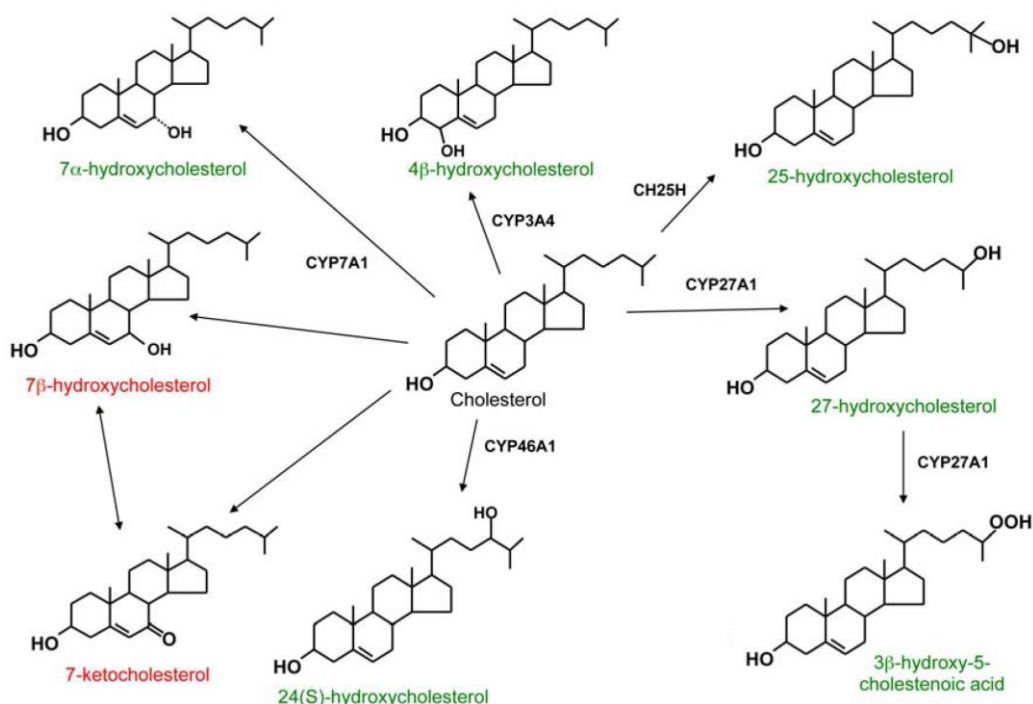
Sřingolipidy obsahující cukernou složku ve své struktuře jsou souhrnně označovány jako glykosřingolipidy (GSL). Ty lze podle povahy rozdělit na neutrální, zahrnující monoglykosylceramidy (cerebrosidy) spolu s oligoglykosylceramidy (globosidy), a kyselé zahrnující sialoglykosylceramidy (gangliosidy) a sulfoglykosylceramidy (sulfatidy). Dalřím možným kritériem pro kategorizaci je počet monosacharidových jednotek. Jednu monosacharidovou jednotku obsahují např. glukosylceramidy (GlcCer), galaktosylceramidy (GalCer), které jsou souhrnně nazývány hexosylceramidy (HexCer) nebo jednoduché sulfatidy (SHexCer). Dvě cukerné jednotky poté obsahují laktosylceramidy (LacCer), tři a více globotriaosylceramidy (GB<sub>3</sub>) nebo globotetraosylceramidy (GB<sub>4</sub>) [24,25]. Strukturní složení a metabolické dráhy řingolipidů jsou naznačeny v obr. 3. Glykosřingolipidy jsou také stavební jednotky buněčných membrán, signální molekuly aktivující buněčné procesy (apoptóza, stárnutí a nekroptóza) a umožňují buněčnou komunikaci, přičemž jsou hojně zastoupeny v mozku a nervovém systému [26].



Obrázek 3: Biosyntetické dráhy řingolipidů [27].

### 1.1.3.5 Steroly

Obecně se jedná o polycyklické látky, kam se řadí cholesterol estery (CE), žlučové kyseliny (ŽK), oxysteroly nebo hopanoidy, ale bezpochyby nejznámější zástupce této kategorie je cholesterol [1]. Steroly je také možné dělit na základě jejich výskytu ve strukturách hub (mykosteroly), rostlin (fytoosteroly) a živočichů (zoosteroly). Živočišné steroly se vyznačují strukturální podobností s cholesterolem, který může být jak prekursorem, tak produktem metabolických cest, a je nezbytný při tvorbě hormonů a vitamínů [28]. Jak již bylo popsáno dříve, cholesterol je součástí buněčných membrán, přičemž každá buňka obratlovců je schopna cholesterol biosyntetizovat i metabolizovat [1]. Cholesterol estery jsou transportní a skladovací formy cholesterolu vzbuzující velký zájem v oborech zabývajících se rakovinou [21] nebo aterosklerózou [29]. Oxysteroly jsou oxidované deriváty cholesterolu, které vznikají na principu enzymatické nebo autooxidační reakce (obr. 4) a mají signální funkci v imunitním systému [30]. Žlučové kyseliny vznikají metabolickými přeměnami cholesterolu v jaterních buňkách, které spolu s ostatními látkami (vodou, žlučovými barvivy a anorganickými solemi) tvoří žluč napomáhající při trávení lipidů. Téměř 90 % ŽK je poté resorbováno zpět ve střevech (enterohepatální oběh) a zbytek je z těla vyloučen. Nadbytečně produkováná žluč se hromadí ve žlučníku, ve kterém dochází k jejímu zahuštění. Opětovné uvolnění do dvanáctníku je řízeno hormonem cholecystokininem [16].



**Obrázek 4:** Schéma vzniku oxysterolů enzymatickými (zelené) nebo autooxidačními (červené) reakcemi z cholesterolu [31].

### **1.1.3.6 Prenoly**

Prenoly jsou syntetizovány z izoprenových jednotek a vytvářejí struktury čítající jednotky, desítky, ale i stovky jednotek. Prenoly se poté dělí na isoprenoidy, chinony/hydrochinony a polyprenoly [1]. Nejznámějšími zástupci této kategorie jsou vitamíny rozpustné v tucích, kromě vitamínu D regulujícího ukládání vápníku a hořčíku v kostech, který je řazen do sterolů. Vitamín A (retinol) je důležitý pro správnou funkci zraku, přičemž je získáván metabolickou cestou z provitaminu A (především z  $\beta$ -karotenu). Vitaminy E (tokoferoly) jsou důležité antioxidanty chránící buňky před volnými radikály a vitaminy K pro správnou funkci srážení krve. Dále do této kategorie je řazena i rodina koenzymů (Q10, Q8, Q6 a další), které působí jako antioxidanty a zároveň jsou nezbytné pro správnou prosperitu organismu a funkci hormonálního systému [16].

### **1.1.3.7 Sacharolipidy**

Sacharolipidy jsou málo početnou skupinou látek, které se vyznačují dobrou kompatibilitou s membránovými lipidy. Jak již napovídá název, jedná se o látky obsahující sacharidovou část ve své struktuře. Je ale nutno poznamenat, že mastné acylové/alkylové řetězce musejí být vázány přímo na cukerné části, která nahrazuje glycerolový skelet obsažený v glycerofosfolipidech nebo sfingolipidech [1,4]. Nejrozšířenější třídou je acylovaný glukosan, který je důležitou složkou lipopolysacharidů a také prekursorem lipidu A, který je klíčovou složkou membrány gram-negativních bakterií na něž organismus reaguje silnou imunitní reakcí [32].

### **1.1.3.8 Polyketidy**

Polyketidy jsou cyklické látky vznikající kondenzací ketoacylových podjednotek, které jsou produkty metabolismu bakterií, hub, rostlin a bezobratlých živočichů. Některé látky tohoto typu jsou pro lidské tělo škodlivé (aflatoxiny), ale na druhou stranu jsou také předmětem zájmu farmakochemiků a využívají se jako antibiotika, antimykotika, cytostatika, antiparazitika nebo kokcidiostatika [1,4].

## **1.1.4 Potenciál lipidů v diagnostice nemocí**

Lipidy jsou důležitou součástí lidského organismu plnící nejrůznější funkce, přičemž spojení lipidomické analýzy s diagnostikou různých onemocnění vyvolává zájem hlavně o

lipidy s funkcí signální. Jak již bylo popsáno dříve, zvýšené množství cholesterolu v krvi je spojeno s možností ucpávání cév, zvyšování krevního tlaku a vede až k mozkové mrtvici nebo srdečnímu infarktu. Množství cholesterolu v krvi však lze regulovat správnou stravou, aktivním pohybem nebo případně vhodnou medikací [13,14]. Nejen cholesterol, ale i další lipidy jsou spojovány s odhalením rizika výskytu kardiovaskulárních onemocnění. Dysregulované lipidové třídy spojené s tímto druhem onemocnění jsou zejména fosfolipidy [33-35] a ceramidy [34-37].

Neurodegenerativní onemocnění jsou další skupinou nemocí podléhajících intenzivnímu výzkumu spojeného s dysregulací lipidů, a to vzhledem k tomu, že koncentrace lipidů v mozku a obecně v celém nervovém systému je vysoká. Změny složení byly popsány u Alzheimerovi [38,39], Parkinsonovi [40-42], Huntingtonovovi [43,44], Gaucherovi [45] a Niemann-Pickovi [46] choroby. Při pohledu na dysregulované lipidové třídy se podobně jako u kardiovaskulárních onemocnění opět jedná o sfingolipidy (zejména GSL) [38,40,45,47] a steroly (cholesterol [43,48] a jeho estery [38,44,46]).

Rakovina je další velmi rozšířenou civilizační nemocí, která při pozdní diagnóze vykazuje vysokou mortalitu. Procento přeživších se u jednotlivých typů rakovin liší a za nejagresivnější typ je považována rakovina slinivky břišní, u které je počet přeživších pacientů během pěti let menší než 7 % [49]. Potenciální biomarkery byly publikovány v případě rakoviny jater [50], ledvin [51-53], močového měchýře [54,55], plic [56-58], prostaty [59,60], prsu [17,61,62], vaječníku [63,64], slinivky břišní [65,66] a tlustého střeva [67,68] na základě analýzy tkání, tělních tekutin (plazma, sérum nebo moč), buněk a jejich derivátů. Jelikož se jedná o několik různých typů rakovin, je možné nalézt celou řadu dysregulujících lipidů, ale jako vhodné biomarkery byly opakovaně uváděny převážně fosfolipidy a sfingomyeliny [21].

Rozsáhlé studie byly věnovány také diabetu I. a II. typu, kde byly prokázány změny v metabolickém složení, včetně lipidů. Výsledky studií umožňují kromě diagnózy již probíhajícího onemocnění také rozpoznání predispozice [69,70]. Lipidomická analýza nabízí potenciál ve spoustě vědních oborů, především v medicíně, kde nové poznatky přinášejí nejen možnost diagnózy různých onemocnění. Hlavně ale pomáhá porozumění signálnímu mechanismu a roli jednotlivých molekul pomocí mapování metabolických drah až na buněčnou úroveň [20,71]. Jak napovídají předchozí odstavce, téměř všechny onemocnění mají spojitost se sfingolipidy a právě tato lipidová kategorie podléhá intenzivnímu zkoumání metabolických drah, přičemž ceramidy jsou jejich středem (obr. 3) [37,72]. Kromě již zmíněných onemocnění byla v menším měřítku věnována pozornost změně lipidového složení u lidí trpících

deprese [73], nakažených virem eboly [74], a dalšími nemocemi ovlivňující lidský metabolismus [75,76].

## 1.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je destruktivní analytická technika převádějící molekuly na ionty, které jsou rozlišeny podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následně jsou zaznamenány jejich intenzity. Jedná se o vysoce selektivní, univerzální a citlivou metodu umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu. Převedení molekul na ionty dochází v iontovém zdroji, jehož konstrukce se liší v závislosti na ionizační technice. Vzniklé ionty jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení dle  $m/z$ . Rovněž existuje i několik typů hmotnostních analyzátorů, které se mohou rozdělovat podle různých kritérií, ale nejčastěji jsou děleny na analyzátory s nízkou a vysokou rozlišovací schopností. Intenzity iontů jsou poté zaznamenány pomocí elektronásobiče, fotonásobiče nebo Faradayovy klece. U analyzátorů s Fourierovou transformací (FT) je detekce prováděna přímo v hmotnostním analyzátoru [77].

### 1.2.1 Ionizační techniky

Ionizační techniky můžeme dělit podle získané vnitřní energie na tvrdé (vysoká fragmentace iontů) a měkké (minimální fragmentace iontů) ionizační techniky. Ionizace může probíhat za sníženého tlaku (např. elektronová ionizace, chemická ionizace, ionizace laserem za účasti matrice) nebo za atmosférického tlaku (např. ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku nebo fotoionizace za atmosférického tlaku). Ionizační technika je volena podle charakteru analytu, případně podle povahy použité separační techniky [77]. V této práci se ale budeme blíže zabývat pouze ionizací elektrosprejem, jelikož je jedná o nejpoužívanější techniku v metabolické a lipidomické analýze [78]. Princip elektrospreje je založen na zmlžení eluentu na výstupu z kapiláry, na kterou je vloženo vysoké napětí přenášející náboj na povrch kapiček. Odpařováním rozpouštědla dochází ke kumulaci povrchového náboje následovanou Coulombickou explozí. Opakováním tohoto procesu dochází ke vzniku iontu. Ionizace elektrosprejem je vhodná pro středně polární až iontové látky s molární hmotností až v řádu 100 tisících kvůli možnosti tvorby vícenásobně nabitých iontů [79]. Stabilita elektrospreje je také spjata s množstvím přiváděného eluentu z LC systému, pro který je vhodné rozmezí 0,1 – 1 ml/min. Pokud separace využívá malých průtoků, pak je vhodnější nanoelektrospej. Při použití nanoelektrospreje je složitější instrumentace a zajištění

stabilního sprejování z důvodu nízkých průtoků. Výhodou je malá spotřeba vzorku, vyšší ionizační účinnost a vyšší citlivost analýzy [80].

### 1.2.2 Hmotnostní analyzátory

Jelikož existuje velké množství hmotnostních analyzátorů, nebude v této práci popisován jejich princip, ale pozornost bude věnována hlavně jejich srovnání. Hmotnostní analyzátory jsou charakterizovány pěti základními parametry, a to hmotnostní rozsah, skenovací rychlost, lineární dynamický rozsah, přesnost určení hmoty a rozlišovací schopnost. Volba hmotnostního spektrometru je závislá na aplikaci, neboť neexistuje univerzální analyzátor a musí se volit kompromis. Skenovací rychlost je důležitá zejména při spojení se separačními technikami kvůli dostatečnému počtu bodů na pík. Analyzátor s vysokou skenovací rychlostí je analyzátor doby letu (TOF), se střední rychlostí quadrupólový (Q) či iontová past (IT) a s nízkou rychlostí orbitální past nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR). Přesnost určení hmoty se udává nejčastěji v jednotkách *parts per milion* (ppm) a nejpřesnější hodnoty udávají analyzátory využívající Fourierovu transformaci (<1 ppm), následované TOF (1–5 ppm) a Q spolu s IT (>5 ppm). Mezi analyzátory s nízkou rozlišovací schopností (<10 000) řadíme Q nebo IT, vysokou (10 000 – 100 000) TOF a ultra-vysokou (>100 000) orbitální past a ICR. Se zvyšující rozlišovací schopností se také významně zvyšují pořizovací a provozní náklady [77].

Pro strukturní analýzu je nezbytná tandemová hmotnostní spektrometrie, kde mají výhodu analyzátory na principu pastí nabízející  $MS^n$ . Pro cílenou kvantitativní analýzu s využitím specifických skenů, jako je sken iontů prekurzoru (PIS), sken neutrálních ztrát (NL) a sken iontových reakcí, se nejčastěji využívá uspořádání tří kvadrupólů, kde prostřední slouží jako kolizní cela (QqQ). Pro zlepšení vlastností přístroje jsou konstruovány tzv. hybridní analyzátory, které se skládají z dvou a více různých analyzátorů za účelem  $MS/MS$  a  $MS^n$  experimentů. Nejčastěji jsou kombinovány analyzátory s vysokým rozlišením a konstrukčně jednoduchým quadrupólem, který slouží jako kolizní cela nebo filtr pro výběr určitého iontu. Často dochází i ke kombinaci sektorového analyzátoru s kvadrupólem nebo lineární iontové pasti (LIT) s FT analyzátory. Komerčně dostupnými jsou přístroje s analyzátory typu QTOF, TOF-TOF, LIT-Orbitální past nebo Q-Orbitální past [77].

### 1.3 Lipidomická analýza

Jak již bylo popsáno, lipidy jsou rozsáhlá skupina látek, na což je nutné brát zřetel při úpravě vzorku a výběru analytické techniky. Důležitá je také správná volba ionizační techniky a následná optimalizace parametrů. Lipidy se liší svojí polaritou, stabilitou a mohou podléhat fragmentaci uvnitř iontového zdroje, což znemožňuje kvalitativní, popř. kvantitativní analýzu. Tato část se zaměřuje na popis přípravy biologického vzorku následovanou lipidomickou analýzou se zavedením vzorku do hmotnostního spektrometru přímou infúzí (DI-MS) nebo spojením se separačními technikami, přičemž bude kladen důraz především na superkritickou fluidní chromatografii (SFC) a kapalinovou chromatografii (LC).

#### 1.3.1 Příprava vzorku

Pre-analytická část (odběr vzorků a skladování) a příprava vzorku k samotné analýze jsou nejdůležitější částí celé analýzy. Je nezbytné dodržovat odběrové protokoly, aby nedocházelo vlivem oxidace nebo enzymatických reakcí ke změně lipidového složení. Pokud dojde k pochybení v jedné z těchto částí, tak je celá analýza chybná a je nemožné zaručit reprodukovatelné výsledky mezi vzorky nebo studii. Extrakční principy jsou založeny na distribuci analytu mezi 2 nemísitelné fáze. Nejběžnější extrakční technikou je extrakce z kapaliny do kapaliny, následovanou extrakcí na pevné fázi (SPE), až po použití superkritické fluidní extrakce (SFE). U těchto technik je třeba pečlivě zvážit vhodný výběr rozpouštědel, aditiv, sorbentu, množství vzorků a v neposlední řadě použití interních standardů (IS) pro kvantitativní analýzu [2,75,81].

##### 1.3.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce dle Folcha [82] a Bligh-Dyera [83] patří mezi nejstarší, ale stále hojně využívané metody. Kvůli omezování halogenovaných rozpouštědel byl kladen důraz na vývoj nových postupů reprezentující metody BuMe [84], BuHe [85] nebo MTBE [86]. Kromě již zmíněných dvoufázových extrakcí, byla popsána také třífázová [87] a jednofázová [88] extrakce. Použitá rozpouštědla a jejich poměry jsou shrnuty v tabulce 2, přičemž lomítkem jsou odděleny rozpouštědla přidané v druhém kroku extrakce. V poslední době se kvůli rychlosti a jednoduchosti stala populární metoda srážení proteinů pomocí organických činidel, jako je acetonitril (ACN), aceton, ethanol, methanol (MeOH) a směsí například BuOH/MeOH nebo



MeOH/MTBE/CHCl<sub>3</sub> [89]. Jednoduchost a rychlost je v tomto případě ale na úkor vyšších matričních efektů [2].

**Tabulka 2:** Extrakční metody používané v lipidomické analýze.

<b>Extrakční metoda</b>	<b>Rozpouštědla</b>	<b>Poměr rozpouštědel</b>
Folch	CHCl <sub>3</sub> :MeOH/H <sub>2</sub> O	8:4/3
Bligh-Dyer	CHCl <sub>3</sub> :MeOH/CHCl <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O	1:2/1:1
BuMe	BuOH:MeOH/Hep:EtOAc	3:1/3:1
BuHe	BuOH:Hep/H <sub>2</sub> O	2:3/1
MTBE	MTBE:MeOH/H <sub>2</sub> O	1:0,3/0,25
1-fázová extrakce	MeOH:MTBE:CHCl <sub>3</sub>	2:1:1
3-fázová extrakce	Hex:EtOAc:H <sub>2</sub> O:ACN	1:1:1:0,75

### 1.3.1.2 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi je technika založená na rozdílné afinitě látek k sorbentu umožňující zachycení analytu nebo matrice vzorku. Před samotným nanesením vzorku je nutné SPE kolonku aktivovat rozpouštědlem (kondicionace), poté je nanesen samotný vzorek a po jeho prosátí následuje eluce. Důležitý je nejen správný výběr sorbentu (nejpoužívanější náplní je C18) a elučního rozpouštědla (iontová síla a pH), ale také rychlost prosátí vzorku a samotné eluce. Všechny parametry je proto nutné pečlivě optimalizovat. SPE je velmi specifická technika přípravy vzorků, která poskytuje vysoce obohacené vzorky a používá se převážně při cílené analýze lipidů. Tato metoda pracuje s malými objemy rozpouštědel (v porovnání s extrakcí kapalina – kapalina) a umožňuje nejen zakoncentrování vzorku, ale i případnou frakcionaci. Nevýhodou je složitější protokol a vyšší finanční náklady [90,91].

### 1.3.1.3 Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce využívá k extrakci tekutiny v nadkritickém stavu, přičemž její viskozita je podobná plynu (10 – 100x nižší než u kapaliny) a hustota zase kapalině. Jedná se o rychlou, selektivní a účinnou extrakci, která je řízena převážně teplotou a tlakem. Jako extrakční tekutina může být použita například voda, amoniak, halogenované uhlovodíky nebo CO<sub>2</sub>. Právě oxid uhličitý je levný, chemický stálý, netoxický, nehořlavý a jeho kritické hodnoty jsou poměrně nízké, proto je nejčastěji používanější tekutinou pro SFE. Nezanechává chemické zbytky v extraktu ani v matrici, což ve výsledku poskytuje čistý a koncentrovaný

extrakt bez použití rozpouštědel. Také je vhodný pro extrakci termolabilních látek bez rizika degradace. Jelikož se polarita CO<sub>2</sub> blíží hexanu, extrakční schopnost je především pro sloučeniny s nízkou polaritou. Rozsah použití SFE je rozšířen na látky s vyšší polaritou přidáním modifikátorů, jako je methanol, acetonitril, toluen nebo voda. Vzhledem k využití CO<sub>2</sub> jako extrakčního rozpouštědla je kromě offline spojení snadno realizovatelné i online spojení SFE a SFC [92,93].

### **1.3.2 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je separační technika vhodná pro netěkavé nepolární až iontové organické látky. K rozdělení směsi látek dochází v závislosti rozdílné afinity mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází [94]. Kapalinová chromatografie nabízí širokou škálu separačních režimů, které umožňují separaci téměř všech existujících lipidů včetně izomerických a izobarických forem. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je klíčovou analytickou metodou pro lipidomickou analýzu [2,78].

#### **1.3.2.1 Hydrofilní interakční chromatografie**

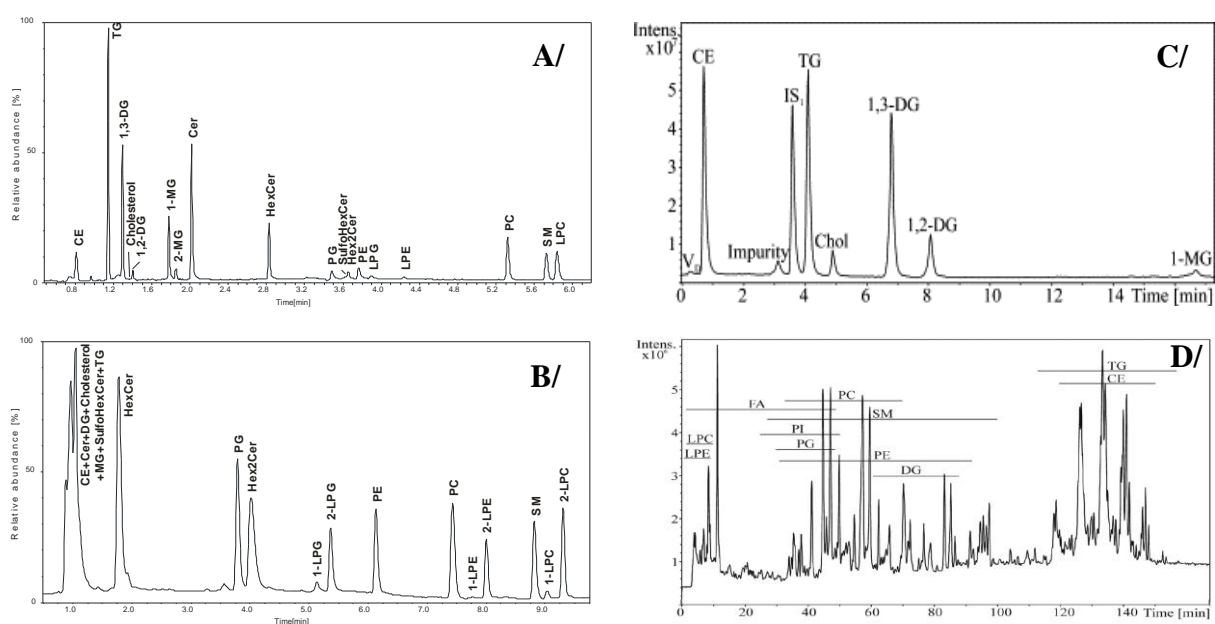
Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je separační technika vhodná pro polární a hydrofilní látky. Polární stacionární fáze (silikagel nebo jeho modifikovaná forma) a polární mobilní fáze obsahující vysoké procento organické fáze s minimálně 2,5 % vody způsobují zvyšování retence u látek se zvyšující se polaritou. Retence lipidů se liší dle polární/iontové skupiny, což vede k separaci dle lipidových tříd. Výhodou této techniky je krátká doba analýzy a použití vyšších průtoků mobilní fáze (nízký zpětný tlak). Naopak nevýhodou je citlivost systému na jakoukoliv změnu mobilní fáze, delší doba ekvibrace kolony a eluce nepolárních látek v mrtvém objemu (obr. 5B) [94].

#### **1.3.2.2 Kapalinová chromatografie s normálními fázemi**

Kapalinová chromatografie s normálními fázemi je nejstarší LC technikou, která v dnešní době již nenachází výraznější použití. U systému s normálními fázemi je stacionární (SF) fáze polárnější (silikagel, alumina) než mobilní fáze (hexan, heptan, chloroform). Retence tedy roste s rostoucí polaritou látek. Nevýhodou je používání toxických rozpouštědel a špatná reprodukovatelnost metod [94]. Tato technika umožňuje separaci nepolárních lipidů, a to dle lipidových tříd (obr. 5C) [2,91].

### 1.3.2.3 Kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi

System s obrácenými fázemi (RP) je v dnešní době nepoužívanější separační technikou i kvůli široké aplikaci od nepolárních až po iontové látky. Stacionární fáze je nepolární (nejčastěji modifikovaný silikagel C18 nebo C8) a mobilní fáze polární (směs metanolu, acetonitrilu nebo isopropanolu s vodou). Do mobilní fáze jsou také přidávána aditiva pro lepší separaci a vyšší ionizační účinnost [94]. Jednotlivé molekuly jsou separovány podle interakcí s hydrofobní stacionární fází, což vede k silnější retenci lipidů s delšími mastnými acylovými řetězci. Polární skupiny v tomto případě mají výrazně menší vliv na retenci než u NP-LC nebo HILIC-LC. Lipidy jsou v tomto případě separovány dle lipidových druhů (obr. 5D) [2,21,91].

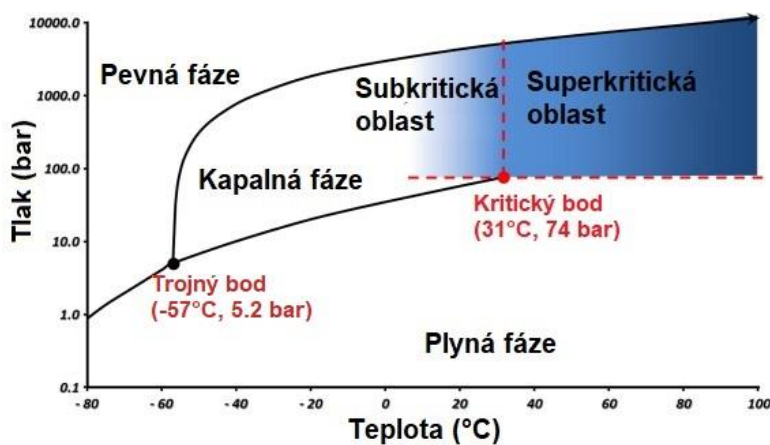


**Obrázek 5:** Srovnání separačních principů v lipidomické analýze pomocí **A/** UHPSFC/MS [95], **B/** HILIC-UHPLC/MS [95], **C/** NP-UHPLC/MS [96], a **D/** RP-UHPLC/MS [97].

### 1.3.1 Superkritická fluidní chromatografie

Ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie (UHPSFC) je moderní metoda s velkým potenciálem, která využívá výhod superkritických vlastností mobilní fáze popsaných v předchozím odstavci. Jako mobilní fáze se opět nejčastěji používá superkritický oxid uhličitý ( $\text{scCO}_2$ ), čímž se snižuje potřeba organických rozpouštědel a technika je řazena do tzv. zelené chemie. Nízká polarita mobilní fáze umožňuje separaci nepolárních látek, ale už nikoliv separaci těch polárních. Z toho důvodu je do mobilní fáze přidáván modifikátor (organické rozpouštědlo s přidávkem aditiva). Methanol, ethanol a acetonitril jsou nejběžnější

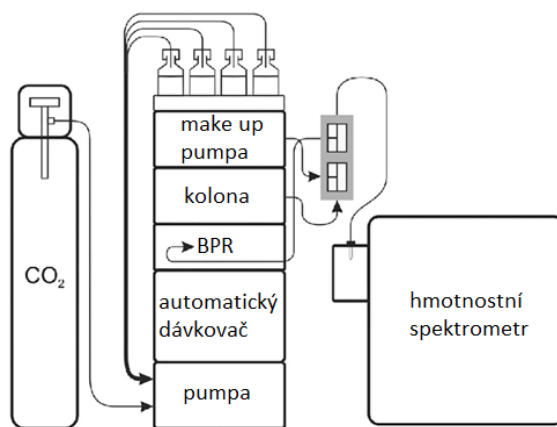
modifikátory s rozmezím 2–40 % (v/v). Tímto přídatkem se z nadkritických podmínek můžeme přesunout do oblasti sub-kritických (obr. 6) [98-100].



Obrázek 6: Fázový digram oxidu uhličitého [98].

Stacionární fáze se využívají podobně jako v kapalinové chromatografii. Jedná se nejčastěji o modifikovaný silikagel od nepolární (C4 až C18 či fenyl-hexyl) až po polární (čistý silikagel, ethyl-pyridin, kyanová-, diolová- a aminová SF) substituenty volené dle aplikace. Rozměry kolony i částic jsou rovněž stejné jako pro UHPLC [98,100]. Kolony s částicemi pod 2- $\mu\text{m}$  jsou v současné době nejpoužívanější kvůli rychlosti a účinnosti separace. Teplota kolony představuje výrazný parametr při eluci látek, neboť se zvyšující se teplotou se zvyšuje eluční čas nepolárních látek a retenční chování polárních látek se může měnit. Metodou UHPSFC (v módu podobném HILIC) dochází k separaci lipidů dle lipidových tříd (obr. 5A), ale také k dílčí separaci v rámci jednoho píku způsobené délkou acylového řetězce a počtem dvojných vazeb. Retence všech látek se zvyšuje se vzrůstajícím počtem dvojných vazeb. U nepolárních lipidů vzrůstá retenční čas s počtem uhlíků, zatímco u polárních lipidů se snižuje. Toto chování je totožné jako u kapalinové chromatografie v módu HILIC [101]. Technika UHPSFC/MS se využívá při analýze široké škály látek v lipidomické [101], metabolické [99] nebo farmaceutické analýzy [100]. Instrumentace SFC/MS je znázorněna na obr. 7.

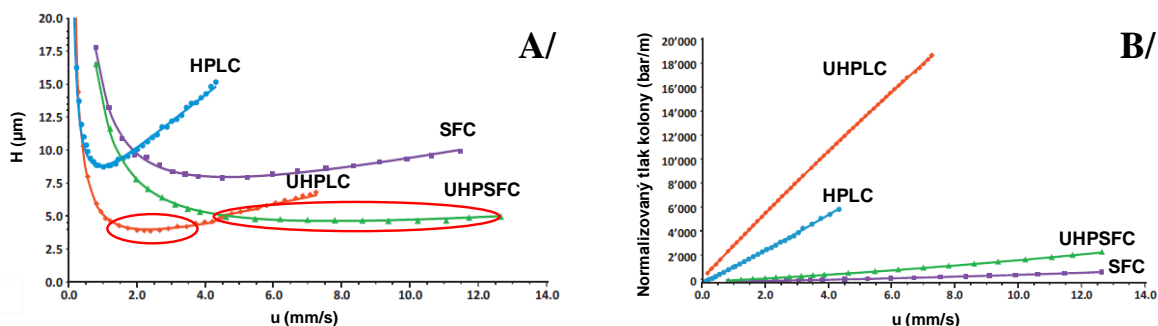
Nový potenciál nabízí zvýšení píkovej kapacity pomocí dvoudimenzionální analýzy ve spojení SFC $\times$ RP-LC [102,104] nebo SFC $\times$ SFC [105]. Již tradičně nejprve bylo zkonstruováno offline spojení [102], ale poté následovalo i online [103,104]. Dvoudimenzionální systém je konstrukčně složitější stejně jako vyhodnocení naměřených dat, a proto prozatím nepodléhá takové oblibě jako jednodimenzionální uspořádání.



Obrázek 7: Schéma SFC/MS.

### 1.3.2 Srovnání kapalinové a superkritické fluidní chromatografie

Jelikož obě separační techniky umožňují použití stejných stacionárních fází, je možné jejich reálné srovnání. Nováková a kol. [98] provedli porovnání systému s kolonami  $50 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  (HPLC a SFC) a  $50 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,7 \mu\text{m}$  (UHPLC a UHPSFC). Pro porovnání obou technik byla zkonstruována van Deemeterova křivka (obr. 8A) a křivka zpětného tlaku (obr. 8B). Při porovnání výškového ekvivalentu teoretického patra vyznívají výsledky nejhůře pro běžné HPLC následované SFC. Hodnoty pro ultra-vysokoúčinné techniky jsou srovnatelné, ale ve prospěch UHPSFC vypovídá výrazně delší oblast s minimální hodnotou. Druhý graf znázorňuje rozdílné hodnoty tlaku v systému, přičemž u techniky SFC, resp. UHPSFC, jsou hodnoty významně nižší. Z toho vyplývá možnost použití vyšších průtoků mobilní fáze vedoucí k snížení délky analýzy.



Obrázek 8: Srovnání (U)HPLC a (U)HPSFC pomocí A/ van Deemeterovy křivky B/ tlaku v systému [98].

Pokud budeme obě techniky srovnávat v lipidomické analýze, je nutné rozdělit metody separující v módu HILIC (separace dle lipidových tříd podle charakteru polární/iontové skupiny) a RP módu (separace dle lipidových druhů v závislosti na poměru délky acylového

řetězce a počtu dvojných vazeb). UHPSFC/MS technika oproti UHPLC/MS v módu HILIC nabízí několik výhod. Především se jedná o výrazně kratší dobu analýzy a možnost separace nepolárních a polárních lipidů v jedné analýze. Metoda UHPSFC/MS je citlivější pro nepolární látky (Cer, DG a TG), ale naopak méně citlivá pro polární lipidy (LacCer, LPE, LPG, PE a PG) [85,95,106]. Berkecz a kolektiv srovnávali metody UHPSFC a UHPLC v systému s obrácenými fázemi při analýze oxylipinů v lidské plazmě. Metoda UHPLC vykazovala vyšší retenci u hydrofobních látek, ale u UHPSFC byl tento trend opačný. Metoda UHPLC byla také účinnější při separaci izomerů a citlivost stanovení byla cca 3,5x vyšší [107]. Z výsledků předchozích prací vyplývá, že zejména metoda UHPSFC/MS v HILIC modu přináší výhody v lipidomické analýze a je vhodná pro klinickou analýzu velkých sérií biologických vzorků.

### **1.3.3 Lipidomická analýza pomocí hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je nejpoužívanější technikou v lipidomické analýze, zejména kvůli možnosti strukturní analýzy, jelikož biologické vzorky se vyznačují komplexním složením. Vzorek může být dávkován do hmotnostního spektrometru bez předchozí separace (přímou infúzí nebo pomocí desorpční ionizační techniky) nebo může být předřazena separační technika. Přímá infúze představuje rychlou analýzu a technicky jednodušší systém, kdy dochází k ionizaci všech látek ve stejném čase. Oproti tomu, spojení chromatografie s MS je technicky složitější, ale získaná informace o retenčním chování snižuje riziko chybné identifikace [21,78].

#### **1.3.3.1 Přímá infúze**

Během přímé infúze je vzorek kontinuálně dávkován do hmotnostního spektrometru a podmínkou reprodukovatelné analýzy je stabilní signál. Pro dávkování se nejčastěji používá binární pumpa s nízkými průtoky [22] nebo robotických systém na bázi čipu (TriVersa NanoMate) [108,109]. DI metody s nízkým rozlišením (LR) k identifikaci využívají specifické MS/MS skeny, jakou jsou sken iontů prekurzoru, sken neutrálních ztrát a sken jedné nebo více iontových reakcí [110]. Nejvhodnější hmotnostní analyzátoři pro tento typ analýzy jsou trojitý quadrupól a hybridní quadrupól – lineární iontová past [2]. Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením využívající Fourierovu transformaci umožňují identifikaci na základě přesného určení hodnoty  $m/z$  a také umožňují rozlišení izobarických látek nebo interferujících nečistot [111]. Výhodou DI je koionizace interního standardu s analyty, proto je dostačující jeden IS pro lipidovou třídu. Ionizace všech látek v jednu chvíli ale přináší i

komplikaci v podobě interferencí a nelze opomenout nutnost izotopických korekcí pro správnou kvantitativní analýzu [2,21].

### 1.3.3.2 Separační techniky spojené s hmotnostní spektrometrií

Biologické vzorky obsahují velmi složité matrice, které snižují ionizační účinnost, a proto se využívají chromatografické techniky umožňující separaci analytů vedoucí ke zvýšení citlivosti. Pokud je před hmotnostním spektrometrem zařazena separační technika, získáváme důležitou informaci v podobě retenčního chování látek. U RP-LC technik je prvním ukazatelem hodnota ekvivalentního počtu uhlíku (ECN), která vyjadřuje poměr mezi počtem uhlíků a dvojných vazeb, kdy  $ECN = CN - 2 \times DB$ . Další možnost je kontrola homologické řady dané lipidové třídy pomocí závislosti retenčního času na počtu uhlíků nebo dvojných vazeb. Separační techniky také umožňují rozdělení polohové izomerie [35,97]. Techniky na bázi separace lipidových tříd nám poskytují informaci pouze o sumárním vzorci, protože dochází k eluci celé lipidové třídy v rámci jednoho píku. Z toho důvodu není možné těmito technikami odseparovat izomerní látky [90]. Oproti přímé infúzi, lze také stanovit látky podléhající fragmentaci v iontovém zdroji vedoucí k chybné identifikaci, případně kvantifikaci. Jedná se například o acylglyceroly poskytující fragmentační řadu  $TG \rightarrow DG \rightarrow MG$  [112].

### 1.3.3.3 Iontová mobilita

Iontová mobilita (IM) je technika, která v poslední dekádě získává na popularitě a ani v lipidomické analýze tomu není jinak. Začlenění iontové mobility do systému umožňuje získání dalších informací a jeho rozšíření o další dimenzi. Látky jsou separovány v plynné fázi, přičemž rychlost pohybu iontů závisí na velikosti, náboji iontů a tvaru částic (driftový čas). Iontová mobilita umožňuje rozlišení regioizomerů, poloh dvojných vazeb, stereoizomerů nebo geometrické izomerie. Další využití IM nabízí při redukci pozadí, které vede k zvýšení citlivosti stanovení [113,114]. Tato technika nám umožňuje experimentálně měřit, případně vypočítat, srážkový průřez iontu (CCS) vyjadřující efektivní plochu interakce mezi iontem a neutrálním plynem. Driftový čas a hodnota CCS poté mohou být použity pro identifikaci látky, ale prozatím tyto hodnoty nedosahují takové obliby jako retenční časy [115,116].

### 1.3.4 Kvalitativní analýza

Pokud má být správně kvalitativně popsán biologický vzorek, je nutná správná příprava reprezentativního (směšného) vzorku, jelikož je v této oblasti zastoupení jednotlivých analytů i matrice různorodé. V případě menšího množství vzorků je odebrán podíl z každého vzorku, pokud se jedná o větší množství vzorků, jsou vybrány vzorky reprezentující celý soubor. U tělních tekutin (plazma, sérum nebo moč) je směšný vzorek připraven pipetováním určitého objemu. U vzorků tkání nebo buněk se operátor řídí hmotností, resp. počtem buněk [90]. Jestliže je správně připraven vzorek, lze přistoupit k samotné identifikaci. K tomu účelu se využívá již zmíněný reprezentativní vzorek bez přidavku interních standardů.

Informace poskytované separačními metodami jsou pouze podpůrné a jistotu struktury získáme až pomocí hmotnostní, resp. tandemové hmotnostní spektrometrie. Určení molekulárního iontu a interpretace dalších aduktů, získané s určitou odchylkou (podle rozlišení daného analyzátoru), vede k vysoké pravděpodobnosti správné identifikace dané látky. Naprostou jistotu struktury ale získáváme až pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Lipidové třídy, popř. druhy, poskytují charakteristické fragmenty, které se v pozitivním a negativním módu liší. V negativním módu jsou pozorovány ztráty acylů vedoucí k identifikaci složení mastných kyselin. V pozitivním módu jsou poté pozorovány ionty prekurzoru (např. PC a SM  $m/z$  184, PS  $m/z$  185 a PI  $m/z$  189) nebo neutrální ztráty (např. PE  $\Delta m/z$  141). Souhrn získaných informací nám poté dává jistotu správné identifikace, kterou je nutné správně interpretovat podle platného názvosloví [2].

### 1.3.5 Kvantitativní analýza

Po úspěšné identifikaci je možno postoupit ke kvantitativní analýze, přičemž základem je použití interních standardů, jejichž volba vychází z identifikace reprezentativního vzorku. Při volbě IS existují dvě možnosti, které jsou v mnoha případech ovlivněny finančními možnostmi pracoviště. Možné je použít exogenní lipidy, tedy lipidy běžně se nevyskytující v přírodě, které obsahují krátké (PC 14:0/14:0), dlouhé (PC 22:0/22:0) nebo liché (LPC 19:0) acylové řetězce. Druhou variantou jsou značené IS pomocí  $^2\text{H}$  nebo  $^{13}\text{C}$ , které jsou často výrazně dražší a použití pro velké množství vzorků je finančně velmi náročné [2]. Inovativní myšlenka byla publikována autorkou Koellensperger a kol., která využila kvasnice k *in-vivo* produkci více než 200 vlastních  $^{13}\text{C}$  izotopicky značených IS [117].

Směs interních standardů je možné zakoupit již připravenou o známé koncentraci jednotlivých lipidů (např. SPLASH LIPIDOMIX od firmy Avanti Polar Lipids nebo Lipidizer



od firmy Sciex) nebo si operátor může připravit směs samostatně smícháním jednotlivých IS s koncentrací úměrně odpovídající endogenním lipidům [85]. V ideálním případě je mít pro každý analyt odpovídající IS koeluuující ve stejném čase, protože strukturní rozdíly a změna složení mobilní fáze mění i ionizační účinnost. Pro techniky separující dle lipidových tříd je nezbytný minimálně jeden standard na lipidovou třídu, ale v případě dvou IS je možno zpětně vypočítat chybu stanovení. Pokud se jedná o RP-LC techniky, mělo by být interními standardy pokryto celé retenční okno dané lipidové třídy [81]. Nedostatek IS lze odstranit použitím odezvových faktorů, které musí být vypočteny pro všechny analyty [111]. Doporučení ohledně kvantitativní analýzy a používání IS jsou vydávány sdružením Lipidomics Standards Initiative [81].

Každá kvantitativní metoda by měla projít analytickou validací, při které je doporučeno následovat postupy vydané Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) [118] nebo Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA) [119], přičemž validace prověří správnost, přesnost a reprodukovatelnost metody. Do měření by také měly být zahrnuty vzorky kontroly kvality (QC), které umožňují sledování poklesu signálu v rámci jedné sekvence nebo můžou být využity k normalizaci dat v rámci více datových sad [120]. K porovnání výsledů z různých pracovišť slouží referenční lidská plazma označovaná jako NIST SRM 1950 [28,121], která reprezentuje rasy, pohlaví a zdravotní stav americké populace ve stáří 40–50 let [122].

### 1.3.6 Softwary pro zpracování dat v lipidomické analýze

V současné době, kdy jsou měřeny velké série vzorků, jsou softwary pro rychlejší a efektivnější vyhodnocování naměřených dat téměř nutností. Manuální vyhodnocení může přinést nižší chybovost, ale také zavedené individuální chyby. Analýza dat naměřených přímou infúzí využívá přesnost hmoty  $m/z$  a MSMS data. V případě LC-MS, resp. SFC-MS, je další informací retenční čas snižující chybovost identifikace. U dat naměřených DI nebo separační technikou separující dle lipidových tříd, je nutná aplikace izotopické korekce druhého typu. Ta zohledňuje vliv izotopické obálky na látky lišící se o dvojnou vazbu. Softwary využívané pro lipidomickou analýzu jsou shrnuty v tabulce 3. Kromě těchto převážně volně dostupných softwaru je možné využít i komerční nástroje firem, například LipidView (Sciex), Progenesis QI (Waters), LipidAnnotator (Agilent), LipidSearch (Thermo Fisher Scientific), MetaboScope (Bruker) nebo Profiling Solution (Schimadzu). Tyto softwary však nebývají cílené pouze na lipidomickou analýzu a jejich pořizovací cena je značně vysoká. Na druhou

stranu ale mohou obsahovat praktické nástroje usnadňující identifikaci/kvantifikaci s vysokou účinností.

**Tabulka 3:** Softwary pro lipidomickou analýzu.

Název softwaru	Typ dat	Kvantitativní analýza	Reference
ALEX	DI	Ano	[123]
Greazy	DI	Ne	[124]
LipidBlast	LC-MS, DI	Ne	[125]
Lipid Data Analyzer	LC-MS	Ano	[126]
LipiDex	LC-MS	Ne	[127]
LipidHunter	LC-MS, DI	Ne	[128]
LipidIMMS	LC/IM-MS	Ne	[129]
LipidInspector	DI	Ano	[109]
LipidMatch	LC-MS, DI	Ne	[130]
LipidMiner	LC-MS	Ano	[131]
LipidQA	DI	Ano	[132]
Lipid-Pro	LC-MS	Ne	[133]
LipidQuant	LC-MS, DI	Ano	[134]
LipidXplorer	DI	Ano	[135]
LIQUID	LC-MS, DI	Ne	[136]
LPPTiger	LC-MS	Ne	[137]
MS2Analyzer	LC-MS, DI	Ne	[138]
MZmine	LC-MS	Ne	[139]

## 1.4 Derivatizace lipidů

Derivatizace je proces, kdy dochází ke strukturálním obměnám umožňujících změnu fyzikálně–chemických vlastností a využívá se především ke zlepšení chromatografických vlastností (separace a tvar píku) nebo vyšší citlivosti detekce. Nejběžnější reakcí je zavádění chromoforu nebo fluoroforu umožňující stanovení spektrálními metodami. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií se derivatizace využívá zejména ke zlepšení ionizační účinnosti, změně iontové polariry nebo při mapování metabolických drah pomocí izotopicky značených činidel [140]. V této části bude kladen důraz na derivatizace pro kapalinovou a superkritickou fluidní chromatografii lipidových tříd přítomných v lidském organismu.

### 1.4.1 Derivatizace mastných kyselin

Nejběžnější reakce mastných kyselin, které se stále hojně využívají, jsou silylace vhodné především pro analýzu pomocí plynové chromatografie kvůli své těkavosti. Nestabilita

ve vodných prostředí znemožňuje jejich stanovení pomocí LC technik, ale technika SFC jejich separaci umožňuje [141]. Pro kapalinovou chromatografii se tradičně využívá přípravy fenacyl esterů [142,143] a hydrazonů [144], které patří k nejstarším reakcím pro spektrofotometrické stanovení mastných kyselin. K citlivějšímu fluorimetrickému stanovení poté byly využívány deriváty substituovaného kumarinu [145] nebo chinoxalin [146]. Při stanovení kapalinovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrometrií se derivatizační postupy obvykle nevyužívají a přírodní forma se stanovuje přímo v negativním módu. Derivatizace se využívají pro stanovení mastných kyselin v pozitivním módu, přičemž vzniklý derivát umožňuje snadnější fragmentaci a použití specifického fragmentu pro MRM skeny výrazně zvyšující citlivost stanovení. Reakce mastných kyselin s cholaminem vedla ke snížení limitu detekce až na jednotky femtogramů [147,148] a tvorba cyklického derivátu kyseliny arachidonové s tris(hydroxymethyl)aminomethanem snížila mez kvantifikace 2krát a u kyseliny olejové a palmitové dokonce 200x [149]. Další použitá činidla byly 2-nitrofenylhydrazin [150], trimethylsilyldiazomethan [151], modifikovaný benzo[a]karbazol [152,153] nebo činidla na základě organických bází dansyl piperazin [154] a 2,4-dimethoxy-6-piperazin-1-yl pyrimidin [155].

#### 1.4.2 Derivatizace glycerolipidů

Monoacylglyceroly a diacylglyceroly jsou důležité uzly metabolických drah, kterým prozatím nebyla v lipidomické analýze věnována dostatečná pozornost i kvůli problematičnosti jejich stanovení. Tyto neutrální lipidy obsahují volné hydroxylové skupiny, které nabízejí možnost derivatizace. Nejrozšířenější reakcí je použití izokyanátů tvořící uretany, přičemž využití chirální separace vede k rozlišení jednotlivých izomerů. Deriváty byly poté detekovány pomocí UV detekce [156,157], MS [158,159], dvojitou detekcí spojením UV a MS [160,161] nebo nukleární magnetickou rezonancí [162]. Další skupinou derivátů jsou estery tvořené reakcí s dinitrobenzoyl chloridem [163], acetanhydridem [164,165] nebo 9-anthroyl chloridem [166]. Pro hmotnostní spektrometrii jsou výhodnější nízkomolekulární derivatizační činidla obsahující iontovou skupinu výrazně zvyšující ionizační účinnost. Ideálním příkladem je použití *N*-chlorbetainyl chloridu zvyšující 9krát LOQ u diacylglycerolů [167].

### 1.4.3 Derivatizace fosfolipidů

Fosfolipidy obsahují tři typy derivatizovatelných skupin, a to primární aminovou skupinu (PE, PS), hydroxylovou (PG, PI a *lyso*-formy) a pro všechny třídy společnou fosfatidovou skupinu. K derivatizaci aminové skupiny lipidů jsou využívány stejná činidla jako v případě běžných alifatických aminů, jako je dansyl chlorid [168,169], 4-fluor-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazol [170] a činidla na bázi sukcinimidylu [171,172]. Aceton je sice netradiční derivatizační činidlo, ale jeho využití spolu s redukčním  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  vede k alkylnaci primárního aminu isopropylovou skupinou [173,174]. Asi nepoužívanějším činidlem je vysoce reaktivní diazomethan i navzdory svým toxickým a zdraví nebezpečným vlastnostem. Dříve se využíval ve své reaktivnější surové formě [175-177], nyní se ale upřednostňuje modifikovaná forma trimethylsilyldiazomethan [178-171] kvůli snížení rizika otravy. Derivatizace probíhá na amino, hydroxy (včetně permethylace u PI) i fosfatidové skupině, proto je vhodná pro všechny fosfolipidy. Vzniklé deriváty je možné stanovit přímou infúzí nebo spojením separačních metod (UHPLC a UHPSFC) s MS. Ke stanovení fosfolipidů je možné použít i specifické enzymatické reakce umožňující odštěpení polární části za vzniku diacylglycerolu, který lze následně jednodušeji derivatizovat [166,182,183].

### 1.4.4 Derivatizace sfingolipidů

Sfingomyeliny jsou v lidské plazmě hojně zastoupeny, a i proto jsou nejběžněji stanovované z řad sfingolipidů. Ke stanovení se používá specifických skenů, přičemž SM poskytují intenzivní fragment fosfatidylcholinového iontu, případně sfingoidní báze [2]. Derivatizace sfingolipidů není příliš rozšířená a používá se pouze výjimečně. Výjimkou jsou sfingoidní báze, které byly derivatizovány fluorescenčními činidly o-ftalaldehydem [184,185] a naftalen-2,3-dikarboxaldehydem [186] za tvorby cyklických derivátů. Podobně jako u fosfolipidů, je možné využít diazomethan k methylaci fosfatidové skupiny obsažené u sfingomyelinů, ceramid-1-fosfátů nebo sfingosyl-1-fosfátů, což výrazně zlepšuje chromatografické vlastnosti a zvyšuje citlivost stanovení [175,178].

### 1.4.5 Derivatizace sterolů

Deriváty sterolů jsou běžně produkovány i lidským organismem, což poukazuje na jejich vysokou reaktivitu. Cholesterol estery jsou přírodní deriváty cholesterolu vznikající reakcí mastných kyselin s hydroxylovou skupinou, které už ale nenabízejí další reakční skupinu

pro cílenou derivatizaci. Cholesterol je jedním z nejčastěji derivatizovaným steroidem kvůli problematické kvantitativní analýze přírodní formy pomocí MS. Esterifikace pomocí acetylchloridu je jednoduchá reakce prováděna za laboratorních podmínek, která umožňuje použití MRM skenů zvyšující 400krát citlivost a zamezuje chybné kvantifikaci způsobené fragmentací CE ve zdroji analýzou DI-ESI/MS [111,29]. Dimethylglycin [187] a kyselina pikolinová [188] jsou esterifikační činidla použita k objasnění fragmentačního chování oxysterolů a jejich charakterizaci v lidské plazmě. Dalším přístupem je příprava hydrazonů, přičemž musí předcházet enzymatická oxidace hydroxylové skupiny na keton, pomocí reakcí Girardových činidel obsahující hydrazinovou skupinu a terciální dusík na alifatické (Girard T) [189] nebo aromatické (Girard P) částí [190]. Reakci na bázi tvorby uretanů využívající činidlo 4-(dimethylamino)fenyl isokyanát zvolili Ayciriex a kol. taktéž pro charakterizaci oxysterolů v souvislosti s neurodegenerativními onemocněními [191].

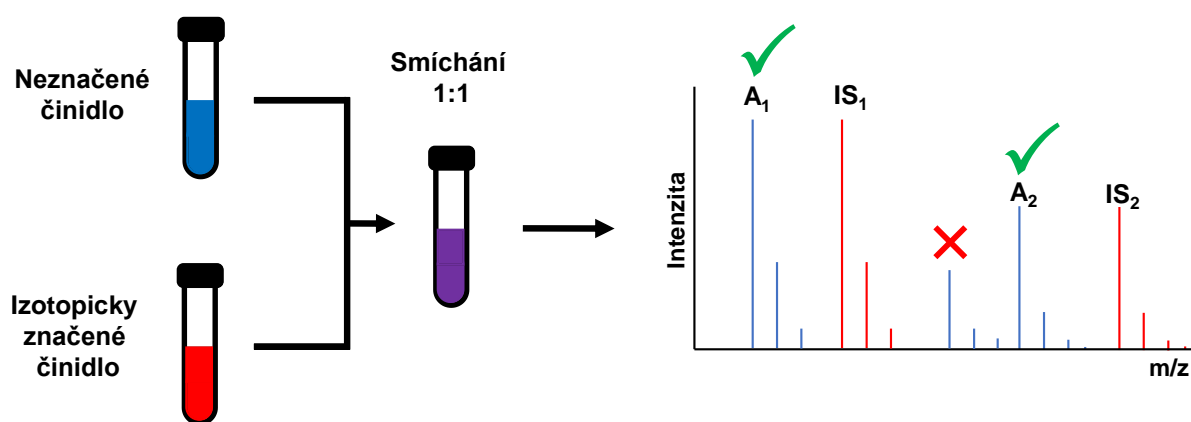
#### **1.4.6 Fotochemická reakce dvojných vazeb**

Jak již bylo popsáno, v přírodě existuje velké množství lipidů, které se navzájem liší pouze pozicí dvojných vazeb, přičemž tyto rozdíly mohou hrát důležitou roli v jejich vlastnostech a biochemických procesech. Z tohoto důvodu se v posledních letech výrazně zvýšil zájem o rozlišení jednotlivých izomerů, což může být konvenčními metodami složité a u některých i nemožné. Fotochemické reakce vytváří cyklické produkty s dvojnou vazbou, které jsou následně identifikovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Dva nejrozšířenější fotochemické přístupy pro identifikaci dvojných vazeb jsou Paternò–Büchi (P-B) reakce a ozonolýza. Paternò–Büchi je [2+2] fotochemická reakce tvořící oxetanový cyklus s organickým činidlem (aldehyd, keton), která je iniciována UV zářením (254 nm) [192]. Jako organické činidlo se nejčastěji využívá aceton a acetofenon, případně v kombinaci s jejich izotopicky značenou formou. Tato metoda byla využita k identifikaci dvojných vazeb u celé řady lipidových tříd, jako jsou volné mastné kyseliny [193,194], fosfolipidy [195,196] nebo steroly [197].

Ozonolýza je reakce dvojných vazeb s ozonem v plynné fázi, při které vznikají ozonidy, které jsou stejně jako v předchozím případě identifikovány pomocí charakteristických fragmentů. V případě ozonolýzy je poměrně složitá instrumentace, neboť hmotnostní spektrometr je online spojen s reaktorem obsahující nezbytný generátor ozonu. Podobně jako v předchozím případě i tato metoda byla aplikována pro volné mastné kyseliny [198,199], fosfolipidy [200,201], steroly [202], ale také pro glycerolipidy [203,204] a sphingolipidy [205].

### 1.4.7 Využití značených derivatizačních činidel

Derivatizace byla dříve využívána hlavně pro zlepšení chromatografických vlastností a zvýšení citlivosti stanovení. V dnešní době, ve spojení s hmotností spektrometrií, je také využívána k vyšší spolehlivosti identifikace a kvantifikace kombinací neznačeného a izotopicky značeného derivátu (nejčastěji  $^2\text{H}$  nebo  $^{13}\text{C}$ ). Tato myšlenka byla rozvinuta prozatím hlavně v metabolické analýze skupinou prof. Liang Li využívající různě modifikovaný 5-dimethylamino naftalen vhodný pro derivatizaci hydroxylové [206], aminové [207], karbonylové [208] a karboxylové [209] skupiny. Princip je založen na smíchání derivatizovaného vzorku neznačeným činidlem a derivatizovaného referenčního vzorku izotopicky značeným činidlem v poměru 1:1 (obr. 9). Tím dojde v hmotnostním spektru k vytvoření dvojic, které se od sebe liší podle počtu značených jednotek a tyto dublety poté potvrzují správnost identifikace. Pokud chybí referenční hodnota  $m/z$ , danou látku nelze identifikovat [210]. Pro snadnější identifikaci byla vytvořena databáze nazvaná MyCompoundID obsahující dansylované metabolity s izotopicky značeným činidlem [211]. Další předností tohoto přístupu je vytvoření vnitřních standardů (referenční vzorek) pro všechny molekuly. Použití takového množství interních standardů pomocí komerční nabídky není možné, jelikož pořízení některých látek je omezeno kvůli dostupnosti nebo finanční náročnosti. Jelikož obě látky mají téměř totožné složení, jejich rozdíly v retenčním chování jsou minimální, a tedy dochází k požadované ionizaci analytu a IS ve stejném čase. Podmínkou správné absolutní kvantifikace je nutné nejprve správně standardizovat referenční vzorek, což v některých případech může být složité. Z toho důvodu se častěji využívá pouze relativní, poměrová, kvantifikace.



Obrázek 9: Princip identifikace při použití neznačeného a izotopicky značeného derivatizačního činidla.

Využití tohoto způsobu v lipidomické analýze bylo prozatím publikováno pouze v několika případech. Následující práce využívají princip identifikace pomocí charakteristických dvojic následovanou relativní kvantitativní analýzou. Činidlo 2-dimethylaminoethylamin ( $H_6/H_2D_4$ ) bylo použito k derivatizaci mastných kyselin v myších tkáních a lidském séru [148] a eikosanoidů při analýze metabolitů arachidonové kyseliny působením cytochromu P450 [212]. Strukturně podobný cholamin ( $H_9/D_9$ ) byl rovněž použitý při stanovení mastných kyselin, tentokrát ale ve slepičích vejcích [213]. Studie zabývající se poměrem dlouhých a krátkých řetězců mastných kyselin u pacientů s atopickou dermatitidou v porovnání s kontrolní skupinou využila k derivatizaci modifikovaný 1-methylpyridinium jodid ( $H_3/D_3$ ) [214]. Reakce acetonu ( $H_6/D_6$ ) s amino skupinou fosfolipidů (PE a PS) byla využita k charakterizaci jaterní tkáně u myši [174] a sledování vlivu podávání rozdílné potravy na jejich lipidomické složení v játrech [173]. Methylace fosfolipidů pomocí diazometanu byla také využita pro metodu izotopového značení. Charakterizace buněčných linií byla provedena s činidly obsahující deuterium ( $CH_3/CHD_2$ ) [179], tak i s izotopicky značeným uhlíkem ( $^{12}C/^{13}C$ ) [176]. Derivatizaci sfingoidních bází pomocí 3-(*N, N*-dimethylamino)propyl isothiokyanátu ( $H_6/H_2D_4$ ) byla využita při analýze lidského séra k určení dysregulujících sfingoidních bází u pacientů s diabetem II. typu v porovnáním se zdravými dobrovolníky [215].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Během mého doktorského studia jsem se zabýval lipidomickou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie spojenou s chromatografickou separací. Pro svou práci jsem využil separaci podle lipidových tříd (UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS) i separaci podle lipidových druhů (RP-UHPLC/MS). V některých případech byly pro podložení výsledků použity i MS techniky bez předcházející separace, jako DI-MS (LR) a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) spojenou s HRMS, které byly měřeny výhradně spoluautory. Techniky byly využity pro analýzu lidských tělních tekutin (plazma a sérum) a buněčných derivátů (exosomy). Metody byly použity ke kvalitativní i kvantitativní analýze, přičemž byla kladena pozornost především na lipidové třídy MG, DG, TG, CE, Cer, PC, LPC, PE a SM.

### 2.1 Separace podle lipidových druhů

S využitím spojení kapalinového chromatografu Agilent 1290 Infinity series a hmotnostního spektrometru Xevo G2-XS (Waters) s vysoko-rozlišujícím hybridním analyzátozem QTOF byla vyvinuta nová RP-UHPLC/MS metoda. K separaci byla použita kolona UPLC BEH C18 (150 mm × 2,1 mm, 1,7 μm) s následnou optimalizací složení mobilní fáze a gradientové eluce pomocí 42 standardů reprezentujících 18 lipidových tříd. Nejlepší podmínky byly při složení mobilní fáze A acetonitril/voda (60/40, v/v) a mobilní fáze B acetonitril/2-propanol (10/90, v/v), přičemž obě fáze obsahovaly 0,1 % kyseliny mravenčí a 5 mM mravenčanu amonného. Optimalizovaná metoda byla aplikována na lidskou plazmu, přičemž identifikace lipidů byla provedena na základě přesně určené  $m/z$  (<5 ppm) a tandemové hmotnostní spektrometrie v pozitivním i negativním iontovém módu. Identifikace byla navíc podpořena vytvořením závislostí retenčního času na počtu dvojných vazeb, příp. na délce uhlíkových řetězců, v rámci dané lipidové třídy. Tato práce následuje moderní trend bezchybné identifikace na úkor mírného snížení počtu reportovaných molekul. Celkově bylo tímto způsobem v lidské plazmě (NIST SRM 1950) identifikováno 503 lipidů z 26 lipidových tříd, přičemž byly shrnuty charakteristické ionty pozorované v MS a MS/MS pro všechny identifikované lipidové třídy. V porovnání s přístupy využívající separaci dle lipidových tříd je počet identifikovaných lipidů několikanásobně vyšší z důvodu rozlišení izomerních a izobarických forem. Složení a pozice mastných kyselin bylo určeno z MS/MS spekter, přičemž pozice mastných kyselin byly určeny z poměru jejich fragmentových iontů a v případě sfingolipidů pomocí fragmentů odpovídající dané sfingoidní bázi. Článek popisuje velké množství lipidů identifikovaných v lidské plazmě, přičemž budoucí plány budou směřovány



k validované kvantitativní metodě. Můj přínos pro tento rukopis spočíval v pomoci při měření, vyhodnocování dat a s celkovou přípravou článku (**Příloha I**).

Další práce následující separaci podle lipidových druhů vychází z předchozí publikace, jelikož využívá k separaci stejnou metodu i instrumentaci. Na rozdíl od předchozí práce, se ale liší v přípravě vzorku, neboť po deproteinaci plazmy následuje její derivatizace. Cílem práce bylo zlepšení extrakční účinnosti pro polární látky při Folchově extrakci a zvýšení citlivosti pro nepolární látky. Jako vhodný kandidát na derivatizační činidlo byl vybrán bezpečný, dostupný a vysoce reaktivní benzoyl chlorid. Jeho potenciál byl testován reakcí v bazickém prostředí pyridinu se standardy ze 13 lipidových tříd, přičemž vykazoval vysokou reaktivitu s hydroxylovou (MG, DG, *lyso*-GP, HexCer, SM, Cer a cholesterol), karboxylovou (FA) a primární aminovou skupinou (PE a SPB). Sekundární aminy (Cer, HexCer a SM) reagovaly v nepatrném výtěžku a fosfátová skupina nereagovala vůbec (PC). Deriváty byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a tandemovou hmotnostní spektrometrií v pozitivním i negativním iontovém módu. Povaha derivátů je více nepolární, což se projevilo zvýšením retenčních časů (s výjimkou LPC a PE plasmalogenů). Po objasnění reakčního chování následovala optimalizace derivatizačního procesu pomocí obohacené lidské plazmy směsí interních standardů. Poměr a objem reakčních činidel, reakční čas a reakční teplota byly optimalizované parametry, kdy nejlepší výsledek poskytl reakce při molárním poměru 4:1 (pyridin/benzoyl chlorid) probíhající hodinu při laboratorních podmínkách. Poté následovalo testování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti reakce. Opakovatelnost byla zhodnocena pomocí 10 reakcí provedených jedním operátorem (RSD <15 %), zatímco reprodukovatelnost dvěma operátory provedením 5 reakcí (RSD <15 %, s výjimkou pro Cer, HexCer a SPB u prvního operátora bez předchozích derivatizačních zkušeností udávající RSD 20-40 %). Stabilita derivátů byla určena periodickým měřením nejméně po dobu 28 dní a 5 rozmrazovacích cyklů při uchování vzorků při teplotě -80 °C. Přínos derivatizační metody pro lipidomickou analýzu byl zkoumán pomocí parametrů (lineární rozsah, LOD a směrnice křivky) vypočtených/určených na základě kalibračních křivek pro derivatizační a klasický přístup. Pro sestavení kalibračních křivek byla použita lidská plazma obohacená o 22 interních standardů (10 koncentračních hladin) z 12 lipidových tříd. Lineární rozsah byl širší pro MG, DG, SPB a cholesterol a pro ostatní lipidové třídy srovnatelný. Citlivost vyjádřená poměrem směrnic byla vyšší 2 – 10krát téměř pro všechny lipidové třídy (s výjimkou pro SM a PE) a dokonce více než 100x pro MG. Limit detekce byl nejvýrazněji snížen 9x u MG (0,9 – 1,0 nmol/ml), 6,5x u SPB (0,2 nmol/ml) a 3x u DG (0,9 nmol/ml). Derivatizační metoda byla následně aplikována na lidskou plazmu, kde bylo identifikováno

169 derivatizovaných lipidů z 11 lipidových tříd. Pomocí interních standardů fosfatidylcholinů byla zkoumána potenciální degradace nederivatizovaných lipidových tříd, která se ovšem nepotvrdila, a proto by i tyto lipidy mohly být případně identifikovány. K identifikaci bylo jako v předchozím případě využito přesné určení hodnoty  $m/z$ , MS/MS spekter a retenčních závislostí. V porovnání s dalšími publikacemi využívající klasické RP-UHPLC/MS přístupy, umožnila derivatizační metoda identifikaci více monoacylglycerolů, diacylglycerolů a sfingoidních bází. Další výhodou je stanovení mastných kyselin v pozitivním iontovém módu a volného cholesterolu, u kterého lze detekovat molekulární ion na rozdíl od nederivatizované formy poskytující pouze cholestadienový fragment. Budoucím krokem bude aplikace derivatizační metody pro cílenou kvantitativní metodu využívající charakteristických skenů (PIS, NL, případně SRM) s využitím izotopicky značeného derivatizačního činidla. Můj přínos pro tento rukopis spočíval v naplánování designu celého experimentu, naměření a vyhodnocení dat a přípravě rukopisu (**Příloha II**).

## 2.2 Separace dle lipidových tříd

Ke kvantitativní analýze velkého počtu vzorků čítající až několik stovek extraktů lidské plazmy a séra byly vyvinuty robustní metody UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS. Metody byly plně validovány dle požadavků EMA a FDA pro TG, DG, MG, Cer, PC, LPC, PE a SM. Součástí validace byl výběr vhodných IS a příprava jejich směsi s koncentrací odpovídající hladině lipidů v lidské plazmě/séru. Námi připravená směs byla porovnána s komerčně dostupnou, přičemž námi navržená směs obsahuje IS pro více lipidových tříd a ve většině případů alespoň 2 IS na lipidovou třídu. Pro výběr vhodného extrakčního postupu bylo testováno šest běžně používaných lipidových extrakcí, přičemž pro výše popsané lipidové třídy byla zvolena jako nejvhodnější extrakce podle Folcha. Optimalizované a validované metody byly použity ke kvantitativní analýze plazmy NIST SRM 1950 a stanovené koncentrace lipidů byly porovnány pomocí korelačních grafů. V porovnání obou metod byly pozorovány mírně odlehle hodnoty pro glycerolipidy u metody HILIC-UHPLC/MS, způsobené zřejmě kvůli kvantifikaci v mrtvém objemu. Porovnání s hodnotami uváděnými v literatuře pro obě metody ukazuje shodu pro fosfolipidy a sfingolipidy, ale i menší rozdíly pro glycerolipidy. Rozdíly pro obtížně kvantifikovatelné DG a MG však mohou být zavádějící, jelikož prozatím nebyly stanoveny certifikované hodnoty a nelze proto rozhodnout, které koncentrace jsou přesnější. Srovnání dvou typů biologických vzorků (plazma a sérum) získaných od stejných subjektů ukazuje podobné lipidové složení, avšak v séru jsou koncentrace lipidů o 20–30 % vyšší.

Porovnání UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS metod ukázalo potenciál v jejich využití pro analýzu velkých počtů vzorků plazmy a séra, přičemž byly popsány výhody a nevýhody jednotlivých technik. Kratší délka analýzy (8 vs. 10,5 min), separace nepolárních lipidů a větší robustnost poukazuje ve prospěch metody UHPSFC/MS, naopak metoda HILIC-UHPLC/MS vykazovala lepší výsledky pro polární lipidové třídy. Můj přínos pro tento rukopis spočíval v optimalizaci UHPSFC/MS metody a závěrečné editaci celého rukopisu (**Příloha III**).

Manuální zpracování naměřených dat je časově velmi náročné a kvůli zvýšení dostupnosti vzorků je při vyhodnocování dat nezbytná automatizace. LipidQuant 1.0 umožňuje automatické zpracování dat pro techniky využívající separaci dle lipidových tříd, v našem případě pro UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS. Jedná se makroskript vytvořený pro Microsoft Excel, což umožňuje jeho využití v každém počítači s Microsoft Office bez složitých instalací. Vyhodnocení probíhá na základě porovnání experimentální a teoretické hodnoty  $m/z$  z databáze, přičemž toleranci je možno měnit podle přesnosti určení hodnoty hmotnosti iontu (v našem případě byl použit rozsah  $\pm 10$  mDa). Databáze obsahuje 23 lipidových tříd (1 470 lipidů) pro pozitivní mód a 24 lipidových tříd (1 999 lipidů) pro negativní mód, přičemž je ale možné databázi upravovat dle potřeb uživatele. Skript umožňuje kvantifikaci pomocí interních standardů (až 3 IS na lipidovou třídu) a umožňuje automatickou izotopickou korekci II. typu. Funkčnost skriptu byla demonstrována na kvantitativní analýze lidského séra metodou UHPSFC/MS, kdy bylo analyzováno 8 lipidových tříd (CE, TG, DG, MG, Cer, PC, LPC a SM) v pozitivním iontovém módu a celkem bylo kvantifikováno 152 lipidů. Kvantitativní data byla použita pro zkoumání potencionálních rozdílů v koncentracích lipidů mezi muži a ženami pomocí vícerozměrných statistických metod (MDA). Do experimentu bylo zahrnuto 22 mužů a 43 žen v podobném věkovém rozmezí a již analýza hlavních komponent (PCA) naznačila dílčí separaci pohlaví, přičemž QC vzorky byly soustředěny v blízkosti jednoho bodu, což potvrdilo správnost měření. Metoda ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců (OPLS-DA) rozdělila pohlaví bez jakéhokoliv překryvu a S-křivka ukázala vyšší koncentrace glycerofosfolipidů u žen, zatímco u mužů převážně glycerolipidů. Rozdíly v koncentracích byly poté znázorněny pomocí krabicových grafů pro nejvíce dysregulované lipidy. Tento článek však slouží hlavně jako demonstrace využití skriptu LipidQuant 1.0, nikoliv pro popis rozdílů lipidomu mužů a žen. Pro tento účel by studie musela obsahovat mnohem více subjektů, u kterých by byl při výběru kladen větší důraz na podobnost klinických údajů. Můj přínos pro tento rukopis spočíval v přípravě databáze a kontroly správného fungování skriptu (**Příloha IV**).

Dříve vyvinuté metody UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS spojené s automatickým zpracováním dat pomocí skriptu LipidQuant 1.0 byly využity k monitorování stability lidského lipidomu 99 subjektů po dobu jednoho roku, přičemž krevní odběry byly prováděny každých 6 měsíců. Metodou UHPSFC/MS bylo kvantifikováno a sledováno 171 lipidů z osmi lipidových tříd a metodou HILIC-UHPLC/MS 122 lipidů ze čtyř lipidových tříd. Pro porovnání jednotlivých měření probíhající v dlouhém časovém rozestupu, kdy mohlo dojít ke změnám stavu hmotnostního spektrometru vlivem znečištění, byla současně měřena plazma NIST SRM 1950, která byla posléze využita k normalizaci dat. Kvalita měření byla opět monitorována pomocí QC vzorků. Stabilní profil vykazovaly především SM, LPC a Cer oproti glycerolipidům, u kterých byly pozorovány menší odchylky, ale v celkovém měřítku nedocházelo k významným změnám. Současně byl zkoumán vliv odběrových zkumavek, kdy byly testovány zkumavky pro izolaci krevní plazmy zabraňující krevnímu srážení pomocí heparinu a ethylendiamintetraoctové kyseliny. Při porovnání stanovených koncentrací nebyly pozorovány výrazné změny, přičemž RSD bylo menší než 20 % v případě 79 % lipidů (u obou metod). Porovnání heparinové plazmy se sérem při druhém krevním odběru potvrdilo závěry z předchozí publikace, kdy lipidová složení byla podobná, ale koncentrace lipidů v séru byla vyšší přibližně o 20 %. V případě krevních odběrů byl porovnán také vliv odběrového místa, kdy bylo porovnáno 99 vzorků odebraných v Pardubicích se skupinou dobrovolníků (81 vzorků) odebraných v Olomouci. Koncentrace lipidů u těchto dvou různých skupin byly srovnatelné pro CE, SM, PC, LPC a Cer, ale mírně se lišily u glycerolipidů. Vysvětlením by mohl být vliv preklinických faktorů, u kterých ale bude nutné ještě detailnější zkoumání. Poslední srovnání heparinové plazmy s NIST SRM 1950 (99 subjektů z České republiky vs. 100 lidí z americké populace) analyzované oběma metodami ukazuje rozdílné lipidové složení na základě geografického původu vzorku. Tato práce popisuje kvantitativní metody využívající separaci dle lipidových tříd pro větší počet vzorků včetně použití vzorků kontroly kvality měření. Výsledkem bylo zjištění stabilního lipidového profilu většiny zkoumaných lipidových tříd v průběhu jednoho roku. Současně byl prokázán minimální vliv na lipidový profil způsobený odběrovým materiálem pro izolaci plazmy, což je důležité zejména pro retrospektivní studie. Můj přínos pro tento rukopis spočíval při sběru vzorků a závěrečné editaci celého rukopisu (**Příloha V**).

Techniky využívající princip separace dle lipidových tříd byly rovněž použity k charakterizaci exosomů izolovaných z lidské plazmy. Kromě metod UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS byla v tomto případě zařazena navíc ještě metoda MALDI-HRMS. Exosomy byly extrahovány z plazmy dvanácti dobrovolníků pomocí komerčně dostupného kitu a následně

byly analyzovány všemi třemi metodami stejně jako původní plazma. Celkem bylo kvantifikováno 244 lipidů v exosomech a 191 lipidů v plazmě z 10 lipidových tříd. Pro porovnání absolutních koncentrací byly koncentrace vztaženy k objemu zpracované plazmy, přičemž koncentrace lipidů v plazmě byla v průměru 5x vyšší. To lze vysvětlit dalšími zdroji lipidů vstupujícími do krevního řečiště než jen na buněčné úrovni. Pokud však hodnoty převedeme na relativní koncentrace, lépe se nám zvýrazní obohacení jednotlivých tříd mezi oběma typy vzorků. Plazma na první pohled obsahuje více PC a LPC oproti exosomům obohaceným o TG, DG a MG. Zvýšená koncentrace TG by mohla být způsobena spojením lipoproteinů a exosomů, případně vycházet z funkce exosomů jako zdroje substrátů pro vzdálená metabolická místa. Zvýšená koncentrace DG by poté mohla souviset s degradací TG uvolňující mastné kyseliny jako substrát pro tkáň či buňky nebo vlivem působení fosfolipáz produkujících DG, což koreluje s nižší koncentrací PC. Snížení množství PC a LPC oproti SM a Cer by mohlo být také způsobeno rozdílným složením membránových lipidů vycházející z biogeneze exosomů endosomální cestou. Jedná se totiž o malý kompaktní sféroid s odolnou membránou prodlužující jejich poločas rozpadu v plazmě. To pravděpodobně souvisí i s vyšší koncentrací nasycených lipidů jako LPC 18:0 a PC 32:0 oproti dysregulovanému LPC 18:2. Porovnání bylo provedeno pomocí statistických nástrojů a vícerozměrné statistické analýzy. K zobrazení koncentračních rozdílů byly poté využity krabicové grafy. Jelikož funkce, význam a složení těchto extracelulárních částic nebyl doposud plně popsán, jedná se spíše o hypotézy popisující změny, které vycházejí z doposud popsaných případů. Každopádně jsme ale prokázali rozdíl lipidového složení mezi plazmou a exosomy, přičemž právě exosomy nabízejí velký potenciál při další studii buněčné komunikace. Můj přínos pro tento rukopis spočíval v měření a vyhodnocení dat pro UHPSFC/MS metodu, následné statistické vyhodnocení všech výsledků a přípravě rukopisu (**Příloha VI**).

### **2.3 Onkolipidomika**

Onkolipidomika je nově zavedený termín spojující lipidomickou analýzu biologických vzorků a výzkum rakoviny. První část review shrnuje základní poznatky o lipidech, biologických materiálech využívaných v klinické analýze a běžné techniky pro přípravu vzorku. Druhá část se už detailněji zabývá lipidomickou analýzou s využitím hmotnostní spektrometrie spojenou s přímým zaváděním vzorku, předřazenou chromatografickou separací nebo s desorpčně ionizačními technikami. Pro každou techniku byly shrnuty obecné principy, výhody a nevýhody pro kvantitativní analýzu. Další spektroskopické techniky jako

nukleární magnetická rezonance, Ramanova a infračervená spektroskopie byly zmíněny okrajově, neboť se pro kvantitativní analýzu využívají pouze sporadicky. Poslední část byla věnována klinické aplikaci lipidomické analýzy popisující dysregulaci lipidů ve 12 typech rakovin. Literární rešerše byla zaměřena na analýzu tkání a tělních tekutin (plazma, sérum a moč) různými metodami. Výsledky 74 prací byly shrnuty do rozsáhlé tabulky, přičemž z nich byly vybrány nejčastěji uváděné upregulované a downregulované lipidy. Toto review ukazuje potenciál lipidomické analýzy pro detekci rakoviny, přičemž i napříč několika typů rakovin a velkého množství použitých metod v různých laboratořích byly uváděny podobné dysregulované molekuly. Jedná se například o LPC dysregulované v obou směrech, upregulované mono- a dinenasycené PC a downregulované polynenasycené PC. Můj přínos pro tento článek spočíval v přípravě několika částí rukopisu, obrázků a závěrečné editaci celého rukopisu (**Příloha VII**).

Následující studie se zabývala porovnáním lipidového složení séra u pacientů s rakovinou slinivky břišní (PDAC) a zdravých subjektů. Studie probíhala ve 3 fázích, kdy první fáze (výzkumná) probíhala v naší laboratoři s využitím tří metod (UHPSFC/MS, DI-MS (LR) a MALDI-MS), kdy bylo cílem popsat rozdíly mezi lipidomem zdravých jedinců a pacientů s rakovinou slinivky břišní. Metodami UHPSFC/MS a DI-MS (LR) bylo analyzováno 262 pacientů a 102 zdravých dobrovolníků. Metodou MALDI-MS bylo měřeno pouze 64 vzorků z důvodu náročnosti jejich přípravy. K zjištění rozdílů byly využity statistické nástroje a vizualizace pomocí MDA, přičemž docházelo k mírnému dělení už v PCA modelu, což ještě zlepšilo rozdělení vzorků podle pohlaví. Metodou OPLS-DA byla zřejmá separace zdravých jedinců od pacientů s rakovinou včetně ranných stádií. Pro ověření správnosti byly vzorky rozděleny na tzv. tréninkovou a validační sadu vzorků, přičemž specifita, citlivost a správnost byla při predikci validační řady více než 95 % pro všechny parametry při separaci pohlaví. Druhá fáze (kvalifikační) probíhala na třech různých pracovištích (Česká republika, Německo a Singapur), kdy každá laboratoř analyzovala stejnou sadu vzorků s využitím metod zavedených v dané laboratoři. K přípravě vzorku byly využity extrakční postupy dle Folcha, Bligh-Dyera a srážení proteinů směsí BuOH/MeOH. Extrakty 554 vzorků byly poté analyzovány metodami UHPSFC/MS, DI-MS (LR), DI-MS (HR) a RP-UHPLC/MS. K porovnání byla využita normalizovaná data pomocí plazmy NIST SRM 1950, přičemž krabicové grafy znázorňují stejné trendy u dysregulovaných lipidů. Současně pro většinu vzorků byla RSD menší než 40 %, což je při použití různých technik, interních standardů a extrakčních postupů přijatelné. Jednotlivé metody byly opět zhodnoceny pomocí statistických nástrojů, přičemž hodnoty pro specifitu, citlivost a správnost byly mírně horší. Poslední fáze

(ověřovací) byla prováděna opět v naší laboratoři metodou UHPSFC/MS, kdy bylo analyzováno 830 vzorků odebraných na 4 různých místech v ČR. Vzorky byly opět rozděleny do 2 sad, přičemž specificita, citlivost a správnost byla pro tréninkovou sadu >90% a pro validační >80%. Současně byly popsány nejvíce dysregulované lipidy, SM 41:1, SM 42:1, Cer 41:1, Cer 42:1, SM 39:1, LPC 18:2, a PC O-36:3, které byly určeny na základě S-křivky a následně potvrzeny pomocí poměru koncentrací ( $x \geq 20\%$ ),  $p$ -hodnot ( $x < 0,05$ ) a VIP hodnot ( $x > 1$ ). V této fázi byly současně měřeny také vzorky od pacientu s chronickou pankreatitidou, což je nejčastější nenádorové onemocnění slinivky. Při použití lipidomického profilu však koncentrace dysregulovaných lipidů odpovídají zdravým subjektům, což umožňuje odlišení pacientů s pankreatitidou a rakovinou slinivky. Dosažené výsledky na základě lipidomického profilování byly porovnány pomocí ROC křivky se zavedeným biomarkerem CA 19-9 pro PDAC a metodou CancerSeek kombinující analýzu proteinů a ctDNA. Nejlepší výsledek vykazovala kombinace lipidomického profilování a CA 19-9 následovaná samotným lipidomickým profilováním, CancerSeek testem a nejhůře dopadl samotný biomarker CA 19-9. Z pohledu specificity však je lipidomické profilování mírně horší, naopak výhodou je citlivost na ranná stadia rakoviny, což je důležité pro včasné odhalení nemoci a zahájení léčby. Můj přínos pro tento článek spočíval v distribuci vzorků mezi pracoviště, formátování tabulek, příprava obrázku a závěrečné editaci celého rukopisu (**Příloha VIII**).

Porovnáním lipidomu zdravých subjektů a pacientů s rakovinou se zabývala i poslední publikace, která se ale zaměřila na rakovinu ledvin, prsu a prostaty. Kvantitativní lipidomická analýza plazmy byla provedena metodou UHPSFC/MS a DI-MS (LR) pro 289 vzorků od pacientů s rakovinou (119 ledvin, 103 prsu a 67 prostaty) a 192 vzorků od dobrovolníků bez diagnostikované rakoviny. Vzorky byly opět rozděleny do rozsáhlejší testovací sady a menší validační sady v podobném procentuálním zastoupení jednotlivých typů vzorků a pomocí MDA byly vytvořeny OPLS-DA modely, do kterých byly predikovány data z validační sady. Průměrná hodnota specificity, citlivosti a správnosti byla více než 85 % pro všechny typy rakovin a jako nejvíce dysregulované lipidy byly identifikovány pomocí statistických nástrojů CE 16:0, Cer 42:1, LPC 18:2, PC 36:2, PC 36:3, SM 32:1 a SM 41:1. Současně byl také testován vliv počtu kvantifikovaných lipidů na správnost predikce. Lipidy byly z modelu vyřazovány na základě statistických parametrů, jako jsou poměry koncentrací,  $p$ -hodnot, VIP hodnot a pomocí Bonferroniho korekce. Počet proměnných byl postupně snižován z původních 138 lipidů na 91, 23, až na 7 nejvíce dysregulovaných lipidů. Snížení počtu proměnných mělo nejvýraznější vliv na citlivost, naopak specificita byla ovlivněna minimálně. Současně byl také testován potenciální rozdíl mezi jednotlivými typy rakovin v závislosti na pohlaví (rakovina ledvin vs.

prostaty u mužů a ledvin vs. prsu u žen), přičemž v modelu OPLS-DA došlo k jejich rozdělení ovšem s částečným překryvem. Výsledky naznačují potenciál pro rozlišení zdravých dobrovolníků od tří typů rakoviny na základě lipidomického profilování a současně i rozlišení daného typu rakoviny. Můj přínos pro tento článek spočíval v přípravě vzorků a závěrečné editaci celého rukopisu (**Příloha IX**).



### 3 ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývala analýzou lipidů v biologických vzorcích pomocí různých chromatografických technik spojených s hmotnostní spektrometrií. Celkem byly pro lipidomickou analýzu vyvinuty tři nové metody využívající separaci dle lipidových tříd (UHPSFC/MS a HILIC-UHPLC/MS), tak i separaci dle lipidových druhů (RP-UHPLC/MS).

Pro identifikaci maximálního počtu lipidů v lidské plazmě byla zvolena technika RP-UHPLC, která oproti UHPSFC a HILIC-UHPLC technikám umožňuje separaci izomerních a izobarických látek. Byla vyvinuta a zoptimalizována nová RP-UHPLC metoda, která ve spojení s hmotnostní spektrometrií, resp. tandemovou hmotnostní spektrometrií, umožnila identifikaci velkého počtu lipidů v lidské plazmě. Kromě klasického přístupu byla vyvinuta i nová derivatizační metoda, která přinesla zlepšení především pro nepolární lipidy, přičemž byly navíc detekovány sfingoidní báze a vyšší počet monoacylglycerolů a diacylglycerolů. Identifikace byla založena na kombinaci MS a MS/MS dat, přičemž bylo zdůrazněno využití retenčního chování jako dalšího faktoru pro bezchybnou identifikaci. V lidské plazmě bylo těmito metodami popsáno více než 500 lipidů z 27 lipidových tříd.

Techniky využívající separaci dle lipidových tříd umožňují snadnější kvalitativní a kvantitativní analýzu, jelikož dochází ke koeluci všech lipidů z dané lipidové třídy. Z tohoto důvodu byly tyto metody využity pro kvantitativní analýzu lidské plazmy a séra, přičemž bylo kvantifikováno více než 150 lipidů z 8 lipidových tříd. Použití makroskriptu (LipidQuant 1.0) významně usnadnilo vyhodnocování naměřených dat a spolu s plně validovanými metodami bylo umožněno porovnání lipidomů zdravých dobrovolníků a pacientů s diagnostikovanou rakovinou. Ve studiích byly zahrnuty vzorky pacientů s rakovinou slinivky břišní, prsu, prostaty a ledvin. Pomocí vícerozměrných statistických nástrojů byly identifikovány nejvíce dysregulované lipidy, přičemž u čtyř zkoumaných druhů rakoviny se jednalo o CE 16:0, Cer 42:1, Cer 41:1, LPC 18:2, PC 36:2, PC 36:3, PC O-36:3, SM 32:1, SM 41:1 a SM 39:1.

Prezentované práce demonstrují, že spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií přináší mnoho výhod a má v lipidomické analýze velký potenciál. Prozatím byl kladen důraz především na lipidové třídy hojně obsažené v lidské krvi, které byly kvantifikovány metodami neseparující izomerní látky. Budoucí plány směřují právě na minoritní lipidové třídy a kvantitativní analýzu jednotlivých izomerů, což by mohlo přinést další cenné poznatky spojené s vylepšením spolehlivosti predikce statistických modelů.

## 4 VĚDECKÝ PROFIL

### Publikované články v recenzovaných časopisech

1. D. Wolrab, R. Jirásko, **O. Peterka**, J. Idkowiak, M. Chocholoušková, Z. Vaňková, K. Hořejší, I. Brabcová, D. Vrána, H. Študentová, B. Melichar, M. Holčapek. Plasma Lipidomic Profiles of Kidney, Breast, and Prostate Cancer Patients Differ from Healthy Controls. *Scientific Reports*. 2021 (v tisku). Preprint dostupný na <https://www.researchsquare.com/article/rs-734203/v1>. **(Q1; IF\* = 5,133)**
2. **O. Peterka**, R. Jirásko, Z. Vaňková, M. Chocholoušková, D. Wolrab, J. Kulhánek, F. Bureš, M. Holčapek. Simple and Reproducible Derivatization with Benzoyl Chloride: Improvement of Sensitivity for Multiple Lipid Classes in RP-UHPLC/MS. *Analytical Chemistry*. 2021 (v tisku). **(Q1; IF\* = 6,755)**
3. Z. Vaňková, **O. Peterka**, M. Chocholoušková, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Holčapek. Retention dependences support highly confident identification of lipid species in human plasma by reversed-phase UHPLC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021 (v tisku). DOI: 10.1101/2021.05.17.444517. **(Q2; IF\* = 3,863)**
4. D. Wolrab, E. Cífková, P. Čáň, M. Lísa, **O. Peterka**, M. Chocholoušková, R. Jirásko, M. Holčapek. LipidQuant 1.0: automated data processing in lipid class separation - mass spectrometry quantitative workflows. *Bioinformatics*. 2021 (v tisku). Preprint dostupný na <https://zenodo.org/record/5151201#.YREgBddR1PY>. **(Q1/D1; IF\* = 8,470)**
5. D. Wolrab, M. Chocholoušková, R. Jirásko, **O. Peterka**, V. Nováková Mužáková, B. Melichar, M. Holčapek. Effect of blood collection tubes and collection time on lipidomic profiles determined by UHPSFC/MS and HILIC-UHPLC/MS. *Analytica Chimica Acta*. 2020, 1137, 74-84. **(Q1; IF = 5,977; počet citací: 4)**
6. **O. Peterka**, R. Jirásko, M. Chocholoušková, L. Kuchar, D. Wolrab, R. Hajek, D. Vrana, O. Strouhal, B. Melichar, M. Holčapek. Lipidomic characterization of exosomes isolated from human plasma using various mass spectrometry techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2020, 1865, 158634. **(Q1; IF = 4,519; počet citací: 7)**

7. D. Wolrab, M. Chocholoušková, R. Jirásko, **O. Peterka**, M. Holčapek. Validation of lipidomic analysis of human plasma and serum by supercritical fluid chromatography–mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2020, 412 (10), 2375-2388. **(Q2; IF = 3,637; počet citací: 14)**
8. D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**, M. Holčapek, Oncolipidomics: Mass Spectrometric Quantitation of Lipids in Cancer Research, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, 120, 115480. **(Q1/D1; IF = 9.801; počet citací: 13)**

### Články v recenzním řízení

1. D. Wolrab, R. Jirásko, E. Cífková, M. Höring, D. Mei, M. Chocholoušková, **O. Peterka**, J. Idkowiak, T. Hrnčiarová, L. Kuchař, R. Ahrends, R. Brumarová, D. Friedecký, G. Vivo-Truyols, P. Škrha, J. Škrha, R. Kučera, B. Melichar, G. Liebisch, R. Burkhardt, M. R. Wenk, A. Cazenave-Gassiot, P. Karásek, I. Novotný, K. Greplová, R. Hrstka, M. Holčapek. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. *Nature Communication*. 2021. Druhá revize. Preprint dostupný na <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.01.22.21249767v1.full.pdf>. **(Q1/D1; IF\* = 15,805)**

*Hodnoty kvartilů, impaktní faktory a počty citací jsou uvedeny na základě údajů z Web of Science dne 30.9.2021. U článků přijatých v roce 2021 je udáván impaktní faktor časopisu za posledních 5 let (IF\*), u dříve publikovaných článků jsou údaje udávány k roku vydání.*

### Plakátová sdělení

1. **O. Peterka**, R. Jirásko, F. Bureš, M. Holčapek. Chemical derivatization of lipid functional groups for analysis of human plasma by RP-UHPLC/MS. 21. Škola MS, Srní, 13. - 18. 9. 2020.
2. Z. Vaňková, M. Chocholoušková, **O. Peterka**, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Holčapek. Analysis of Lipids in Human Plasma Samples Using RP-UHPLC/MS. 21. Škola MS, Srní, 13. - 18. 9. 2020.
3. **O. Peterka**, R. Jirásko, M. Chocholoušková, D. Wolrab, L. Kuchař, M. Holčapek. Lipidomic analysis and comparison of human body fluids and exosomes by various MS techniques. HPLC 2019, Milan, Italy, 16. – 20. 6. 2019.

4. **O. Peterka**, M. Chocholoušková, R. Jirásko, D. Wolrab, R. Hájek, L. Kuchař, M. Holčapek. Lipidomic comparison of exosomes and human plasma by mass spectrometry. 20. Škola hmotnostní spektrometrie, Špindlerův Mlýn, 9. – 13. 9. 2019. **Druhé místo pro nejlepší plakátové sdělení.**
5. **O. Peterka**, R. Jirásko, I. Brabcová, D. Wolrab, L. Kuchař, M. Holčapek. Lipidomic analysis of human plasma and exosomes by various MS techniques. 30<sup>th</sup> MassSpec-Forum, Vienna, 19. – 20. 2. 2019.
6. **O. Peterka**, D. Wolrab, L. Kuchař, M. Holčapek. Optimization of UHPSFC/ESI-MS and Application of Method for Characterization of Biological Samples. Lipidomics Forum, Dortmund, 11. – 13. 11. 2018.
7. **O. Peterka**, D. Wolrab, M. Holčapek. Optimalizace stanovení polárních a nepolárních lipidů v plazmě pomocí UHPSFC/ESI-MS. 19. Škola hmotnostní spektrometrie, Špindlerův Mlýn, 10. – 14. 9. 2018.
8. **O. Peterka**, D. Wolrab, M. Holčapek. Optimization of UHPSFC/ESI-MS Determination of Polar and Nonpolar Lipids in Biological Samples. 66<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Diego, USA, 3. - 7. 6. 2018.
9. **D. Wolrab**, **O. Peterka**, R. Hrstka, M. Holčapek. Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography Hyphenated with Mass Spectrometry: Clinical Monitoring of Wide Range of Lipid Species. 66<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, San Diego, USA, 3. - 7. 6. 2018.

## Ústní prezentace

1. **O. Peterka**. Benzoylace nepolárních a polárních lipidových tříd v lidské plazmě charakterizované RP-UHPLC/MS. 22. Škola MS, Srní, 5. – 10. 9. 2021. **Třetí místo pro nejlepší přednášku v sekci "Mládí vpřed".**
2. **M. Chocholoušková**, **O. Peterka**, R. Jirásko, M. Holčapek. Lipidomická analýza (krátký kurz). 22. Škola MS, Srní, 5. – 10. 9. 2021.
3. **M. Holčapek**, M. Chocholoušková, D. Wolrab, R. Jirásko, **O. Peterka**. Kvantitativní lipidomická analýza. 22. Škola MS, Srní, 5. – 10. 9. 2021.
4. **M. Holčapek**, D. Wolrab, J. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**, Z. Vaňková, K. Hořejší. Chromatography of Lipids – Potential for Separation of Various Types of Lipid Isomers. LIPID MAPS Spring School, Online. 12. – 16. 4. 2021.

5. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**. UHPSFC/MS and UHPLC/MS High-throughput Quantitation of Blood Lipids of Cancer Patient, 49th International Symposium on high-Performance Liquid Phase Separations and Related techniques. Kyoto, Japan, 1. – 5. 12. 2019.
6. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**. Quality Assurance and Quality Control in the Lipidomic Quantitation Using Lipid Class Separation – Mass Spectrometry. Lipidomics Forum, Borstel, Germany, 10. – 12. 11. 2019.
7. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**. Applied Lipidomics: Quantitative Approaches and Cancer Applications, Opening of the Center for Explorative Lipidomics. Graz, Austria, 25. 9. 2019.
8. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**. High-throughput Lipidomic Quantitation of Biological Samples, 25th International Symposium on Separation Sciences. Lodz, Poland, 15. – 18. 9. 2019.
9. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**. Kvantitativní přístupy v lipidomice. 20. Škola hmotnostní spektrometrie. Špindlerův Mlýn, 9. – 13. 9. 2019.
10. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**. High-throughput Lipidomic Quantitation of Biological Samples. 15<sup>th</sup> Annual Conference of the Metabolomics Society. Hague, Netherlands, 23. – 27. 6. 2019.
11. D. Wolrab, M. Chocholoušková, **O. Peterka**, R. Jirásko, R. Hrstka, D. Vrána, B. Melichar, M. Holčapek. Quantitative Lipidomic Analysis of Biological Samples: Optimization and Application for the Analysis of Clinical Samples using UHPSFC/MS. HPLC 2019. Milano, Italy, 16. – 20. 6. 2019.
12. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, **O. Peterka**, D. Vrána, B. Melichar, R. Hrstka. High-throughput Lipidomic Profiling of Human Blood: Potential for Early Screening of Multiple Cancer Types. HPLC 2019. Milano, Italy, 16. – 20. 6. 2019.
13. D. Wolrab, M. Chocholoušková, R. Jirásko, **O. Peterka**, M. Holčapek. UHPSFC/MS: A powerful Tool for the Lipid Analysis of Biological samples. 30<sup>th</sup> MassSpec Forum. Vienna, Austria, 19 – 20. 2. 2019.

14. D. Wolrab, **O. Peterka**, R. Jirásko, M. Holčapek. UHPSFC/MS: A powerful Tool for Lipidomic Quantitation in Clinical Samples. Lipidomics Forum. Dortmund, Germany, 11. – 13. 11. 2018.
15. M. Holčapek, D. Wolrab, **O. Peterka**, R. Jirásko, D. Vrána, B. Melichar, R. Hrstka. Supercritical fluid chromatography – mass spectrometry: novel approach for high-throughput lipidomics. Lipidomics Forum. Dortmund, Germany, 11. – 13. 11. 2018.
16. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, E. Cífková, **O. Peterka**, M. Chocholoušková, I. Brabcová, D. Vrána, B. Melichar, R. Hrstka. Lipidomic Analysis in Cancer Biomarker Research. Torun, Poland, 26. – 28. 10. 2018.
17. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, E. Cífková, **O. Peterka**, M. Chocholoušková, I. Brabcová, D. Vrána, B. Melichar, R. Hrstka. Lipid cancer biomarkers in early diagnosis: where we are now and what are future steps. 32nd International Symposium on Chromatography (ISC). Cannes, France, 23. – 27. 9. 2018.
18. M. Holčapek, D. Wolrab, R. Jirásko, E. Cífková, **O. Peterka**, M. Chocholoušková, I. Brabcová, D. Vrána, B. Melichar, R. Hrstka, Lipidomická analýza hmotnostní spektrometrií ve screeningu nádorových onemocnění. 19 Škola MS, Špindlerův Mlýn, 9. – 14. 9. 2018.
19. M. Holčapek, D. Wolrab, E. Cífková, **O. Peterka**, R. Jirásko, T. Hrnčiarová, M. Lísa, D. Vrána, B. Melichar, R. Hrstka. MS Approaches for Lipidomic Quantitation: Applications in Cancer Biomarker Research. 66<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry. San Diego, USA, 3. – 7. 6. 2018.
20. D. Wolrab, **O. Peterka**, R. Hrstka, M. Holčapek. UHPSFC/MS Lipidomic Analysis of Biological Samples. Advances in Chromatography and Electrophoresis and Chiranal 2018. Olomouc, Czech Republic, 29.1. – 1. 2. 2018.

### Člen organizačního výboru

- 22. Škola hmotnostní spektrometrie, Srní, 5. – 10. 9. 2021
- 21. Škola hmotnostní spektrometrie, Srní, 13. – 18. 9. 2020

## **Zahraniční stáž**

- University Hospital of Regensburg, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Lipidomic analysis by direct flow injection analysis coupled to mass spectrometry. **Vedoucí práce:** Gerhard Liebisch, PD Dr. rer. nat. 1.3.2020 – 30.3.2020.

## 5 LITERATURA

- [1] Lipid Web, citováno 8. 3. 2021 z <https://www.lipidmaps.org/>.
- [2] M. Holcapek, G. Liebisch, K. Ekroos. Lipidomic Analysis. *Anal. Chem.* 2018, 90 (7), 4249-4257. DOI:10.1021/acs.analchem.7b05395.
- [3] E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 2005, 46 (5), 839-861. DOI: 10.1194/jlr.E400004-JLR200.
- [4] E. Fahy, S. Subramaniam, R. C. Murphy, M. Nishijima, C. R. H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. J. O. Wakelam, E. A. Dennis. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 2009, 50, 9-14. DOI: 10.1194/jlr.R800095-JLR200.
- [5] G. Liebisch, J. A. Vizcaino, H. Köfeler, M. Trötz Müller, W. J. Griffiths, G. Schmitz, F. Spener, M. J. O. Wakelam. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 2013, 54 (6), 1523-1530. DOI: 10.1194/jlr.M033506.
- [6] G. Liebisch, E. Fahy, J. Aoki, E. A. Dennis, T. Durand, C. S. Ejsing, M. Fedorova, I. Feussner, W. J. Griffiths, H. Köfeler, A. H. Merrill, R. C. Murphy, V. B. O'Donnell, O. Oskolkova, S. Subramaniam, M. J. O. Wakelam, F. Spener. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J. Lipid Res.* 2020, 61 (12), 1539-1555. DOI:10.1194/jlr.S120001025.
- [7] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2008, 9 (2), 112-124. DOI: 10.1038/nrm2330.
- [8] R. Ernst, C. S. Ejsing, B. Antonny. Homeoviscous Adaptation and the Regulation of Membrane Lipids. *J. Mol. Biol.* 2016, 428 (24), 4776-4791. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.013.
- [9] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 2002, 41 (1), 66-97. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00020-0.
- [10] H. Sprong, P. van der Sluijs, G. van Meer. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2001, 2 (7), 504-513. DOI: 10.1038/35080071.
- [11] S. Trojan a kolektiv. Lékařská fyziologie. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [12] O. Quehenberger, E. A. Dennis. Mechanisms of Disease The Human Plasma Lipidome. *New Engl. J. Med.* 2011, 365 (19), 1812-1823. DOI: 10.1056/Nejmra1104901.
- [13] N. J. Stone, J. G. Robinson, A. H. Lichtenstein, C. N. B. Merz, C. B. Blum, R. H. Eckel, A. C. Goldberg, D. Gordon, D. Levy, D. M. Lloyd-Jones, P. McBride, J. S. Schwartz, S. T. Shero, S. C. Smith, K. Watson, P. W. F. Wilson. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014, 129 (25), 1-45. DOI: 10.1161/01.cir.0000437738.63853.7a.



- [14] C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson, L. E. Holland, C. Reith, N. Bhala, R. Peto, E. H. Barnes, A. Keech, J. Simes, R. Collins, C. T. Trialists. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010, 376 (9753), 1670-1681. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61350-5.
- [15] S. Sales, J. Graessler, S. Ciucci, R. Al-Atrib, T. Vihervaara, K. Schuhmann, D. Kauhanen, M. Sysi-Aho, S. R. Bornstein, M. Bickle, C. V. Cannistraci, K. Ekroos, A. Shevchenko. Gender, Contraceptives and Individual Metabolic Predisposition Shape a Healthy Plasma Lipidome. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1-14. DOI: 10.1038/Srep27710.
- [16] B. Matouš a kolektiv. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [17] M. Chocholouskova, R. Jirasko, D. Vrana, J. Gatek, B. Melichar, M. Holcapek. Reversed phase UHPLC/ESI-MS determination of oxylipins in human plasma: a case study of female breast cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, 411 (6), 1239-1251. DOI: 10.1007/s00216-018-1556-y.
- [18] K. Strassburg, A. M. L. Huijbrechts, K. A. Kortekaas, J. H. Lindeman, T. L. Pedersen, A. Dane, R. Berger, A. Brenkman, T. Hankemeier, J. van Duynhoven, E. Kalkhoven, J. W. Newman, R. J. Vreeken. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 404 (5), 1413-1426. DOI: 10.1007/s00216-012-6226-x.
- [19] X. L. Han. Lipidomics for studying metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016, 12 (11), 668-679. DOI: 10.1038/nrendo.2016.98.
- [20] M. Masoodi, O. Kuda, M. Rossmeis, P. Flachs, J. Kopecky. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *BBA - Mol. Cell Biol. L.* 2015, 1851 (4), 503-518. DOI: 10.1016/j.bbalip.2014.09.023.
- [21] D. Wolrab, R. Jirasko, M. Chocholouskova, O. Peterka, M. Holcapek. Oncolipidomics: Mass spectrometric quantitation of lipids in cancer research. *Trac-Trend Anal. Chem.* 2019, 120, 115480. DOI: 10.1016/J.Trac.2019.04.012.
- [22] J. N. Wang, C. Y. Wang, X. L. Han. Tutorial on lipidomics. *Anal. Chim. Acta.* 2019, 1061, 28-41. DOI:10.1016/j.aca.2019.01.043.
- [23] J. Kolman a K. H. Roehm. *Color Atlas of Biochemistry*. Druhé vydání, Stuttgart: Thieme, 2005. ISBN 3-13-100372-3.
- [24] R. Malhotra. Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* 2012, 1 (2), 1-5. DOI: 10.4172/2161-1009.1000108.
- [25] K. Horejsi, R. Jirasko, M. Chocholouskova, D. Wolrab, D. Kahoun, M. Holcapek. Comprehensive Identification of Glycosphingolipids in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Metabolites*. 2021, 11 (3). DOI: 10.3390/Metabo11030140.
- [26] A. S. B. Olsen, N. J. Faergeman. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol.* 2017, 7 (5), 1-17. DOI: 10.1098/Rsob.170069.
- [27] T. Yamaji, K. Hanada. Sphingolipid Metabolism and Interorganellar Transport: Localization of Sphingolipid Enzymes and Lipid Transfer Proteins. *Traffic*. 2015, 16 (2), 101-122. DOI: 10.1111/tra.12239.

- [28] O. Quehenberger, A. M. Armando, A. H. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, A. H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. N. Jones, S. Kelly, R. L. Shaner, C. M. Sullards, E. Wang, R. C. Murphy, R. M. Barkley, T. J. Leiker, C. R. H. Raetz, Z. Q. Guan, G. M. Laird, D. A. Six, D. W. Russell, J. G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, E. A. Dennis. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J. Lipid Res.* 2010, *51* (11), 3299-3305. DOI: 10.1194/jlr.M009449.
- [29] G. Liebisch, M. Binder, R. Schifferer, T. Langmann, B. Schulz, G. Schmitz. High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *BBA - Mol. Cell Biol. L.* 2006, *1761* (1), 121-128. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2005.12.007.
- [30] W. J. Griffiths, P. J. Crick, Y. C. Wang, M. Ogundare, K. Tuschl, A. A. Morris, B. W. Bigger, P. T. Clayton, Y. Q. Wang. Analytical strategies for characterization of oxysterol lipidomes: Liver X receptor ligands in plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, *59*, 69-84. DOI: 10.1016/j.freeradiomed.2012.07.027.
- [31] V. M. Olkkonen, O. Béaslas, E. Nissilä. Oxysterols and their cellular effectors. 2012, *2* (1), 76-103. DOI: 10.3390/biom2010076.
- [32] A. Steimle, I. B. Autenrieth, J. S. Frick. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 2016, *306* (5), 290-301. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.03.001.
- [33] C. Stegemann, R. Pechlaner, P. Willeit, S. R. Langley, M. Mangino, U. Mayr, C. Menni, A. Moayyeri, P. Santer, G. Rungger, T. D. Spector, J. Willeit, S. Kiechl, M. Mayr. Lipidomics Profiling and Risk of Cardiovascular Disease in the Prospective Population-Based Bruneck Study. *Circulation.* 2014, *129* (18), 1821-1831. DOI: 10.1161/Circulationaha.113.002500.
- [34] M. Hilvo, P. J. Meikle, E. R. Pedersen, G. S. Tell, I. Dhar, H. Brenner, B. Schoöttker, M. Lääperi, D. Kauhanen, K. M. Koistinen, A. Jylhä, K. Huynh, N. A. Mellett, A. M. Tonkin, D. R. Sullivan, J. Simes, P. Nestel, W. Koenig, D. Rothenbacher, O. Nygård, R. Laaksonen. Development and variation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *Eur. Heart J.* 2020, *41* (3), 371-380. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz387.
- [35] K. Huynh, C. K. Barlow, K. S. Jayawardana, J. M. Weir, N. A. Mellett, M. Cinel, D. J. Magliano, J. E. Shaw, B. G. Drew, P. J. Meikle. High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chem. Biol.* 2019, *26* (1), 71-84. DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.10.008.
- [36] R. Laaksonen, K. Ekroos, M. Sysi-Aho, M. Hilvo, T. Vihervaara, D. Kauhanen, M. Suoniemi, R. Hurme, W. März, H. Scharnagl, T. Stojakovic, E. Vlachopoulou, M. L. Lokki, M. S. Nieminen, R. Klingenberg, C. M. Matter, T. Hornemann, P. Jüni, N. Rodondi, L. Räber, S. Windecker, B. Gencer, E. R. Pedersen, G. S. Tell, O. Nygård, F. Mach, J. Sinisalo, T. F. Lüscher. Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur. Heart J.* 2016, *37* (25), 1967-1976. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw148.
- [37] J. L. Stith, F. N. Velazquez, L. M. Obeid. Advances in determining signaling mechanisms of ceramide and role in disease. *J. Lipid Res.* 2019, *60* (5), 913-918. DOI: 10.1194/jlr.S092874.

- [38] R. B. Chan, T. G. Oliveira, E. P. Cortes, L. S. Honig, K. E. Duff, S. A. Small, M. R. Wenk, G. H. Shui, G. Di Paolo. Comparative Lipidomic Analysis of Mouse and Human Brain with Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.* 2012, 287 (4), 2678-2688. DOI: 10.1074/jbc.M111.274142.
- [39] R. G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W. A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J. C. Troncoso, M. P. Mattson. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101 (7), 2070-2075. DOI: 10.1073/pnas.0305799101.
- [40] K. E. Murphy, A. M. Gysbers, S. K. Abbott, N. Tayebi, W. S. Kim, E. Sidransky, A. Cooper, B. Garner, G. M. Halliday. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain.* 2014, 137, 834-848. DOI: 10.1093/brain/awt367.
- [41] Y. P. Shao, T. B. Li, Z. Y. Liu, X. L. Wang, X. J. Xu, S. Li, G. W. Xu, W. D. Le. Comprehensive metabolic profiling of Parkinson's disease by liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol. Neurodegener.* 2021, 16 (1), 1-15. DOI:10.1186/s13024-021-00425-8.
- [42] J. M. Vukajlovic, D. Drakulic, S. Pejic, T. V. Ilic, A. Stefanovic, M. Petkovic, J. Schiller. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. *Rapid Comm. Mass Spec.* 2020, 34 (4). DOI: 10.1002/Rcm.8595.
- [43] V. Leoni, C. Caccia. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *BBA - Mol. Cell Biol. L.* 2015, 1851 (8), 1095-1105. DOI:10.1016/j.bbalip.2014.12.018.
- [44] G. R. Phillips, S. E. Hancock, S. H. J. Brown, A. M. Jenner, F. Kreilaus, K. A. Newell, T. W. Mitchell. Cholesteryl ester levels are elevated in the caudate and putamen of Huntington's disease patients. *Sci. Rep.* 2020, 10 (20314), 1-11. DOI: 10.1038/S41598-020-76973-8.
- [45] T. Farfel-Becker, E. B. Vitner, S. L. Kelly, J. R. Bame, J. Duan, V. Shinder, A. H. Merrill, K. Dobrenis, A. H. Futerman. Neuronal accumulation of glucosylceramide in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease leads to neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2014, 23 (4), 843-854. DOI: 10.1093/hmg/ddt468.
- [46] X. T. Jiang, R. Sidhu, F. D. Porter, N. M. Yanjanin, A. O. Speak, D. T. T. Vrucite, F. M. Platt, H. Fujiwara, D. E. Scherrer, J. Zhang, D. J. Dietzen, J. E. Schaffer, D. S. Ory. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J. Lipid Res.* 2011, 52 (7), 1435-1445. DOI: 10.1194/jlr.D015735.
- [47] D. van Kruining, Q. Luo, G. van Echten-Deckert, M. M. Mielke, A. Bowman, S. Ellis, T. G. Oliveira, P. Martinez-Martinez. Sphingolipids as prognostic biomarkers of neurodegeneration, neuroinflammation, and psychiatric diseases and their emerging role in lipidomic investigation methods. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020, 159, 232-244. DOI:10.1016/j.addr.2020.04.009.
- [48] F. Kreilaus, A. S. Spiro, C. A. McLean, B. Garner, A. M. Jenner. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2016, 42 (6), 535-546. DOI: 10.1111/nan.12286.

- [49] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018, 68 (6), 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [50] S. Shimma, Y. Sugiura, T. Hayasaka, Y. Hoshikawa, T. Noda, M. Setou. MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *J. Chromatogr. B.* 2007, 855 (1), 98-103. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.02.037.
- [51] J. L. Zhang, S. Q. Li, J. Q. Lin, W. D. Yu, L. S. Eberlin. Mass Spectrometry Imaging Enables Discrimination of Renal Oncocytoma from Renal Cell Cancer Subtypes and Normal Kidney Tissues. *Cancer Res.* 2020, 80 (4), 689-698. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2522.
- [52] R. Hajek, M. Lisa, M. Khalikova, R. Jirasko, E. Cifkova, V. Student, D. Vrana, L. Opalka, K. Vavrova, M. Matzenauer, B. Melichar, M. Holcapek. HILIC/ESI-MS determination of gangliosides and other polar lipid classes in renal cell carcinoma and surrounding normal tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410 (25), 6585-6594. DOI: 10.1007/s00216-018-1263-8.
- [53] R. Jirasko, M. Holcapek, M. Khalikova, D. Vrana, V. Student, Z. Prouzova, B. Melichar. MALDI Orbitrap Mass Spectrometry Profiling of Dysregulated Sulfoglycosphingolipids in Renal Cell Carcinoma Tissues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, 28 (8), 1562-1574. DOI: 10.1007/s13361-017-1644-9.
- [54] B. M. Wittmann, S. M. Stirdivant, M. W. Mitchell, J. E. Wulff, J. E. McDunn, Z. Li, A. Dennis-Barrie, B. P. Neri, M. V. Milburn, Y. Lotan, R. L. Wolfert. Bladder Cancer Biomarker Discovery Using Global Metabolomic Profiling of Urine. *Plos One.* 2014, 9 (12), 1-19. DOI: 10.1371/journal.pone.0115870.
- [55] G. Cruciani, R. M. Pellegrino, A. Di Veroli, S. Cataldi, D. Marocco, E. Costantini, A. Sidoni, M. Viola-Magni. Diagnostic application of lipidomics fingerprints to bladder carcinoma. *Trans. Cancer Res.* 2017, 6 (6), 1197-1206. DOI: 10.21037/tcr.2017.11.11.
- [56] E. Marien, M. Meister, T. Muley, S. Fieuws, S. Bordel, R. Derua, J. Spraggins, R. Van de Plas, J. Dehairs, J. Wouters, M. Bagadi, H. Dienemann, M. Thomas, P. A. Schnabel, R. M. Caprioli, E. Waelkens, J. V. Swinnen. Non-small cell lung cancer is characterized by dramatic changes in phospholipid profiles. *Int. J. Cancer.* 2015, 137 (7), 1539-1548. DOI: 10.1002/ijc.29517.
- [57] Y. M. Guo, X. M. Wang, L. Qiu, X. Z. Qin, H. Liu, Y. Y. Wang, F. Li, X. D. Wang, G. Q. Chen, G. G. Song, F. J. Li, S. Guo, Z. L. Li. Probing gender-specific lipid metabolites and diagnostic biomarkers for lung cancer using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 2012, 414, 135-141. DOI: 10.1016/j.cca.2012.08.010.
- [58] A. J. Alberg, K. Armeson, J. S. Pierce, J. Bielawski, A. Bielawska, K. Visvanathan, E. G. Hill, B. Ogretmen. Plasma Sphingolipids and Lung Cancer: A Population-Based, Nested Case-Control Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2013, 22 (8), 1374-1382. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-12-1424.
- [59] H. K. Min, S. Lim, B. C. Chung, M. H. Moon. Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 399 (2), 823-830. DOI: 10.1007/s00216-010-4290-7.

- [60] T. Skotland, K. Ekroos, D. Kauhanen, H. Simolin, T. Seierstad, V. Berge, K. Sandvig, A. Llorente. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur. J. Cancer*. 2017, *70*, 122-132. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.10.011.
- [61] M. Hilvo, C. Denkert, L. Lehtinen, B. Müller, S. Brockmöller, T. Seppänen-Laakso, J. Budczies, E. Bucher, L. Yetukuri, S. Castillo, E. Berg, H. Nygren, M. Sysi-Aho, J. L. Griffin, O. Fiehn, S. Loibl, C. Richter-Ehrenstein, C. Radke, T. Hyötyläinen, O. Kallioniemi, K. Iljin, M. Oresic. Novel theranostic opportunities offered by characterization of altered membrane lipid metabolism in breast cancer progression. *Cancer Res*. 2011, *71* (9), 3236-3245. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3894.
- [62] D. Calligaris, D. Caragacianu, X. H. Liu, I. Norton, C. J. Thompson, A. L. Richardson, M. Golshan, M. L. Easterling, S. Santagata, D. A. Dillon, F. A. Jolesz, N. Y. R. Agar. Application of desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging in breast cancer margin analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014, *111* (42), 15184-15189. DOI: 10.1073/pnas.1408129111.
- [63] Y. Liu, Y. F. Chen, A. Momin, R. Shaner, E. Wang, N. J. Bowen, L. V. Matyunina, L. D. Walker, J. F. McDonald, M. C. Sullards, A. H. Merrill. Elevation of sulfatides in ovarian cancer: An integrated transcriptomic and lipidomic analysis including tissue-imaging mass spectrometry. *Mol. Cancer*. 2010, *9*. DOI: 10.1186/1476-4598-9-186.
- [64] M. Sans, K. Gharpure, R. Tibshirani, J. L. Zhang, L. Liang, J. S. Liu, J. H. Young, R. L. Dood, A. K. Sood, L. S. Eberlin. Metabolic Markers and Statistical Prediction of Serous Ovarian Cancer Aggressiveness by Ambient Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Cancer Res*. 2017, *77* (11), 2903-2913. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3044.
- [65] S. Urayama, W. Zou, K. Brooks, V. Tolstikov. Comprehensive mass spectrometry based metabolic profiling of blood plasma reveals potent discriminatory classifiers of pancreatic cancer. *Rapid. Commun. Mass Spectrom*. 2010, *24* (5), 613-620. DOI: 10.1002/rcm.4420.
- [66] G. X. Xie, L. G. Lu, Y. P. Qiu, Q. X. Ni, W. Zhang, Y. T. Gao, H. A. Risch, H. Yu, W. Jia. Plasma Metabolite Biomarkers for the Detection of Pancreatic Cancer. *J. Proteome Res*. 2015, *14* (2), 1195-1202. DOI: 10.1021/pr501135f.
- [67] S. A. Ritchie, P. W. K. Ahiahonu, D. Jayasinghe, D. Heath, J. Liu, Y. S. Lu, W. Jin, A. Kavianpour, Y. Yamazaki, A. M. Khan, M. Hossain, K. K. Su-Myat, P. L. Wood, K. Krenitsky, I. Takemasa, M. Miyake, M. Sekimoto, M. Monden, H. Matsubara, F. Nomura, D. B. Goodenowe. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. *BMC Med*. 2010, *8* (13), 1-20. DOI: 10.1186/1741-7015-8-13.
- [68] D. B. Liesenfeld, D. Grapov, J. F. Fahrman, M. Salou, D. Scherer, R. Toth, N. Habermann, J. Bohm, P. Schrotz-King, B. Gigic, M. Schneider, A. Ulrich, E. Herpel, P. Schirmacher, O. Fiehn, J. W. Lampe, C. M. Ulrich. Metabolomics and transcriptomics identify pathway differences between visceral and subcutaneous adipose tissue in colorectal cancer patients: the ColoCare study. *Am. J. Clin. Nutr*. 2015, *102* (2), 433-443. DOI: 10.3945/ajcn.114.103804.

- [69] E. P. Rhee, S. Cheng, M. G. Larson, G. A. Walford, G. D. Lewis, E. McCabe, E. Yang, L. Farrell, C. S. Fox, C. J. O'Donnell, S. A. Carr, R. S. Vasani, J. C. Florez, C. B. Clish, T. J. Wang, R. E. Gerszten. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. *J. Clin. Invest.* 2011, *121* (4), 1402-1411. DOI:10.1172/JCI44442.
- [70] P. J. Meikle, G. Wong, C. K. Barlow, B. A. Kingwell. Lipidomics: Potential role in risk prediction and therapeutic monitoring for diabetes and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 2014, *143* (1), 12-23. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.02.001.
- [71] D. N. Slenter, M. Kutmon, K. Hanspers, A. Riutta, J. Windsor, N. Nunes, J. Melius, E. Cirillo, S. L. Coort, D. Digles, F. Ehrhart, P. Giesbertz, M. Kalafati, M. Martens, R. Miller, K. Nishida, L. Rieswijk, A. Waagmeester, L. M. T. Eijssen, C. T. Evelo, A. R. Pico, E. L. Willighagen. WikiPathways: a multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic. Acids Res.* 2018, *46*, 661-667. DOI: 10.1093/nar/gkx1064.
- [72] Y. Pewzner-Jung, O. Brenner, S. Braun, E. L. Laviad, S. Ben-Dor, E. Feldmesser, S. Horn-Saban, D. Amann-Zalcenstein, C. Raanan, T. Berkutzki, R. Erez-Roman, O. Ben-David, M. Levy, D. Holzman, H. Park, A. Nyska, A. H. Merrill, A. H. Futerman. A Critical Role for Ceramide Synthase 2 in Liver Homeostasis II. INSIGHTS INTO MOLECULAR CHANGES LEADING TO HEPATOPATHY. *J. Biol. Chem.* 2010, *285* (14), 10911-10923. DOI: 10.1074/jbc.M109.077610.
- [73] N. Brunkhorst-Kanaan, K. Klatt-Schreiner, J. Hackel, K. Schroter, S. Trautmann, L. Hahnefeld, S. Wicker, A. Reif, D. Thomas, G. Geisslinger, S. Kittel-Schneider, I. Tegeder. Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder. *Metabolism.* 2019, *95*, 65-76. DOI: 10.1016/j.metabol.2019.04.002.
- [74] J. E. Kyle, K. E. Burnum-Johnson, J. P. Wendler, A. J. Einfeld, P. J. Halfmann, T. Watanabe, F. Sahr, R. D. Smith, Y. Kawaoka, K. M. Waters, T. O. Metz. Plasma lipidome reveals critical illness and recovery from human Ebola virus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019, *116* (9), 3919-3928. DOI: 10.1073/pnas.1815356116.
- [75] K. Yang, X. Han. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem. Sci.* 2016, *41* (11), 954-969. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.08.010.
- [76] N. E. Braverman, A. B. Moser. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *BBA - Mol. Basis Dis.* 2012, *1822* (9), 1442-1452. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.05.008.
- [77] E. De Hoffmann a V. Stroobant. Mass spectrometry: principles and applications. Třetí vydání. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [78] T. Cajka, O. Fiehn. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trac-Trend Anal. Chem.* 2014, *61*, 192-206. DOI: 10.1016/j.trac.2014.04.017.
- [79] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse. Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science.* 1989, *246* (4926), 64-71. DOI: 10.1126/science.2675315.
- [80] M. Wilm, M. Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* 1996, *68* (1), 1-8. DOI: 10.1021/Ac9509519.

- [81] G. Liebisch, R. Ahrends, M. Arita, M. Arita, J. A. Bowden, C. S. Ejsing, W. J. Griffiths, M. Holcapek, H. Köfeler, T. W. Mitchell, M. R. Wenk, K. Ekroos. Lipidomics needs more standardization. *Nat. Metab.* 2019, 1 (8), 745-747. DOI: 10.1038/s42255-019-0094-z.
- [82] J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226 (1), 497-509. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
- [83] E. G. Bligh, W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 1959, 37 (8), 911-917. DOI: 10.1139/o59-099.
- [84] L. Löfgren, G. B. Forsberg, M. Ståhlman. The BUMÉ method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Sci. Rep.* 2016, 6 (27688), 1-11. DOI: 10.1038/Srep27688.
- [85] D. Wolrab, M. Chocholouskova, R. Jirasko, O. Peterka, M. Holcapek. Validation of lipidomic analysis of human plasma and serum by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, 412 (10), 2375-2388. DOI: 10.1007/s00216-020-02473-3.
- [86] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 2008, 49 (5), 1137-1146. DOI: 10.1194/jlr.D700041-JLR200.
- [87] Y. Shibusawa, Y. Yamakawa, R. Noji, A. Yanagida, H. Shindo, Y. Ito. Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2006, 1133 (1-2), 119-125. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.08.004.
- [88] A. Gil, W. X. Zhang, J. C. Wolters, H. Permentier, T. Boer, P. Horvatovich, M. R. Heiner-Fokkema, D. J. Reijngoud, R. Bischoff. One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410 (23), 5859-5870. DOI: 10.1007/s00216-018-1200-x.
- [89] J. Blanchard. Evaluation of the Relative Efficacy of Various Techniques for Deproteinizing Plasma Samples Prior to High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis. *J. Chromatogr.* 1981, 226 (2), 455-460. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)86080-6.
- [90] T. Züllig, M. Trötz Müller, H. C. Köfeler. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, 412 (10), 2191-2209. DOI: 10.1007/s00216-019-02241-y.
- [91] T. Cajka, O. Fiehn. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal. Chem.* 2016, 88 (1), 524-545. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04491.
- [92] Y. F. Shen, R. Zhao, N. Tolic, M. M. Tfaily, E. W. Robinson, R. Boiteau, L. Pasa-Tolic, N. J. Hess. Online supercritical fluid extraction mass spectrometry (SFE-LC-FTMS) for sensitive characterization of soil organic matter. *Faraday Discuss.* 2019, 218, 157-171. DOI: 10.1039/c9fd00011a.

- [93] Y. N. Belo, S. Al-Hamimi, L. Chimuka, C. Turner. Ultrahigh-pressure supercritical fluid extraction and chromatography of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* seed lipids. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019, 411 (16), 3685-3693. DOI: 10.1007/s00216-019-01850-x.
- [94] L. Nováková a M. Douša. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. První vydání. Praha, 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- [95] M. Lisa, E. Cifkova, M. Khalikova, M. Ovcacikova, M. Holcapek. Lipidomic analysis of biological samples: Comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods. *J. Chromatogr. A.* 2017, 1525, 96-108. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.10.022.
- [96] M. Holcapek, E. Cifkova, B. Cervena, M. Lisa, J. Vostalova, J. Galuszka. Determination of nonpolar and polar lipid classes in human plasma, erythrocytes and plasma lipoprotein fractions using ultrahigh-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2015, 1377, 85-91. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.12.023.
- [97] M. Ovcacikova, M. Lisa, E. Cifkova, M. Holcapek. Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2016, 1450, 76-85. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.04.082.
- [98] L. Novakova, A. G. G. Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillarme. Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2  $\mu$  m particles: A tutorial. *Anal. Chim. Acta.* 2014, 824, 18-35. DOI: 10.1016/j.aca.2014.03.034.
- [99] G. L. Losacco, O. Ismail, J. Pezzatti, V. Gonzalez-Ruiz, J. Boccard, S. Rudaz, J. L. Veuthey, D. Guillarme. Applicability of Supercritical fluid chromatography-Mass spectrometry to metabolomics. II-Assessment of a comprehensive library of metabolites and evaluation of biological matrices. *J. Chromatogr. A.* 2020, 1620, 1-10. DOI: 10.1016/J.Chroma.2020.461021.
- [100] V. Desfontaine, D. Guillarme, E. Francotte, L. Novakova. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 113, 56-71. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.03.007.
- [101] M. Lisa, M. Holcapek. High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2015, 87 (14), 7187-7195. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01054.
- [102] P. G. Stevenson, A. Tarafder, G. Guiochon. Comprehensive two-dimensional chromatography with coupling of reversed phase high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2012, 1220, 175-178. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.11.020.
- [103] M. Sarrut, A. Corgier, G. Cretier, A. Le Masle, S. Dubant, S. Heinisch. Potential and limitations of on-line comprehensive reversed phase liquid chromatography x supercritical fluid chromatography for the separation of neutral compounds: An approach to separate an aqueous extract of bio-oil. *J. Chromatogr. A.* 2015, 1402, 124-133. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.05.005.



- [104] L. Yang, H. G. Nie, F. Zhao, S. Y. Song, Y. Meng, Y. Bai, H. W. Liu. A novel online two-dimensional supercritical fluid chromatography/reversed phase liquid chromatography-mass spectrometry method for lipid profiling. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, *412* (10), 2225-2235. DOI: 10.1007/s00216-019-02242-x.
- [105] L. Zeng, R. D. Xu, Y. N. Zhang, D. B. Kassel. Two-dimensional supercritical fluid chromatography/mass spectrometry for the enantiomeric analysis and purification of pharmaceutical samples. *J. Chromatogr. A.* 2011, *1218* (20), 3080-3088. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.03.041.
- [106] D. Wolrab, M. Chocholouskova, R. Jirasko, O. Peterka, V. Muzakova, H. Studentova, B. Melichar, M. Holcapek. Determination of one year stability of lipid plasma profile and comparison of blood collection tubes using UHPSFC/MS and HILIC-UHPLC/MS. *Anal. Chim. Acta.* 2020, *1137*, 74-84. DOI: 10.1016/j.aca.2020.08.061.
- [107] R. Berkecz, M. Lisa, M. Holcapek. Analysis of oxylipins in human plasma: Comparison of ultrahigh-performance liquid chromatography and ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2017, *1511*, 107-121. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.06.070.
- [108] R. Almeida, C. Mosoarca, M. Chirita, V. Udrescu, N. Dinca, Z. Vukelic, M. Allen, A. D. Zamfir. Coupling of fully automated chip-based electrospray ionization to high-capacity ion trap mass spectrometer for ganglioside analysis. *Anal. Biochem.* 2008, *378* (1), 43-52. DOI:10.1016/j.ab.2008.03.039.
- [109] C. S. Ejsing, E. Duchoslav, J. Sampaio, K. Simons, R. Bonner, C. Thiele, K. Ekroos, A. Shevchenko. Automated identification and quantification of glycerophospholipid molecular species by multiple precursor ion scanning. *Anal. Chem.* 2006, *78* (17), 6202-6214. DOI: 10.1021/ac060545x.
- [110] G. Liebisch, B. Lieser, J. Rathenber, W. Drobnik, G. Schmitz. High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *BBA - Mol. Cell Biol. L.* 2004, *1686* (1-2), 108-117. DOI: 10.1016/j.bbalip.2004.09.003.
- [111] M. Horing, C. S. Ejsing, M. Hermansson, G. Liebisch. Quantification of Cholesterol and Cholesteryl Ester by Direct Flow Injection High-Resolution Fourier Transform Mass Spectrometry Utilizing Species-Specific Response Factors. *Anal. Chem.* 2019, *91* (5), 3459-3466. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05013.
- [112] B. M. Ham, J. T. Jacob, M. M. Keese, R. B. Cole. Identification, quantification and comparison of major non-polar lipids in normal and dry eye tear lipidomes by electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2004, *39* (11), 1321-1336. DOI: 10.1002/jms.725.
- [113] R. A. Harris, K. L. Leaptrot, J. C. May, J. A. McLean. New frontiers in lipidomics analyses using structurally selective ion mobility-mass spectrometry. *Trac-Trend Anal. Chem.* 2019, *116*, 316-323. DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.031.
- [114] K. L. Leaptrot, J. C. May, J. N. Dodds, J. A. McLean. Ion mobility conformational lipid atlas for high confidence lipidomics. *Nat. Commun.* 2019, *10*, 1-9. DOI: 10.1038/s41467-019-08897-5.

- [115] L. C. Nye, J. P. Williams, N. C. Munjoma, M. P. M. Letertre, M. Coen, R. Bouwmeester, L. Martens, J. R. Swann, J. K. Nicholson, R. S. Plumb, M. McCullagh, L. A. Gethings, S. Lai, J. I. Langridge, J. P. C. Vissers, I. D. Wilson. A comparison of collision cross section values obtained via travelling wave ion mobility-mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography-ion mobility-mass spectrometry: Application to the characterisation of metabolites in rat urine. *J. Chromatogr. A*. 2019, *1602*, 386-396. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.06.056.
- [116] K. J. D. Fouque, C. E. Ramirez, R. L. Lewis, J. P. Koelmel, T. J. Garrett, R. A. Yost, F. Fernandez-Lima. Effective Liquid Chromatography-Trapped Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry Separation of Isomeric Lipid Species. *Anal. Chem.* 2019, *91* (8), 5021-5027. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04979.
- [117] E. Rampler, C. Coman, G. Hermann, A. Sickmann, R. Ahrends, G. Koellensperger. LILY-lipidome isotope labeling of yeast: in vivo synthesis of C-13 labeled reference lipids for quantification by mass spectrometry. *Analyst*. 2017, *142* (11), 1891-1899. DOI: 10.1039/c7an00107j.
- [118] U.S. Food and Drug Administration. Citováno 20. 3. 2021 z <https://www.fda.gov>.
- [119] European Medicines Agency. Citováno 20. 3. 2021 z <https://www.ema.europa.eu/en>.
- [120] A. Triebel, B. Burla, J. Selvalatchmanan, J. Oh, S. H. Tan, M. Y. Chan, N. A. Mellett, P. J. Meikle, F. Torta, M. R. Wenk. Shared reference materials harmonize lipidomics across MS-based detection platforms and laboratories. *J. Lipid Res.* 2020, *61* (1), 105-115. DOI: 10.1194/jlr.D119000393.
- [121] J. A. Bowden, A. Heckert, C. Z. Ulmer, C. M. Jones, J. P. Koelmel, L. Abdullah, L. Ahonen, Y. Alnouti, A. M. Armando, J. M. Asara, T. Bamba, J. R. Barr, J. Bergquist, C. H. Borchers, J. Brandsma, S. B. Breitkopf, T. Cajka, A. Cazenave-Gassiot, A. Checa, M. A. Cinel, et al. Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950-Metabolites in Frozen Human Plasma. *J. Lipid Res.* 2017, *58* (12), 2275-2288. DOI: 10.1194/jlr.M079012.
- [122] National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Material. Citováno 20. 3. 2021 z [https://www-s.nist.gov/srmors/view\\_cert.cfm?srm=1950](https://www-s.nist.gov/srmors/view_cert.cfm?srm=1950)
- [123] S. R. Ellis, M. R. L. Paine, G. B. Eijkel, J. K. Pauling, P. Husen, M. W. Jervelund, M. Hermansson, C. S. Ejsing, R. M. A. Heeren. Automated, parallel mass spectrometry imaging and structural identification of lipids. *Nat. Methods*. 2018, *15* (7), 515-518. DOI: 10.1038/s41592-018-0010-6.
- [124] M. A. Kochen, M. C. Chambers, J. D. Holman, A. I. Nesvizhskii, S. T. Weintraub, J. T. Belisle, M. N. Islam, J. Griss, D. L. Tabb. Greazy: Open-Source Software for Automated Phospholipid Tandem Mass Spectrometry Identification. *Anal. Chem.* 2016, *88* (11), 5733-5741. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00021.
- [125] T. Kind, K. H. Liu, D. Y. Lee, B. DeFelice, J. K. Meissen, O. Fiehn. LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nat. Methods*. 2013, *10* (8), 755-758. DOI: 10.1038/nmeth.2551.
- [126] J. Hartler, M. Trotsmuller, C. Chitraju, F. Spener, H. C. Kofeler, G. G. Thallinger. Lipid Data Analyzer: unattended identification and quantitation of lipids in LC-MS data. *Bioinformatics*. 2011, *27* (4), 572-577. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq699.

- [127] P. D. Hutchins, J. D. Russell, J. J. Coon. LipiDex: An Integrated Software Package for High-Confidence Lipid Identification. *Cell Syst.* 2018, 6 (5), 621-625. DOI: 10.1016/j.cels.2018.03.011.
- [128] Z. X. Ni, G. Angelidou, M. Lange, R. Hoffmann, M. Fedorova. LipidHunter Identifies Phospholipids by High-Throughput Processing of LC-MS and Shotgun Lipidomics Datasets. *Anal. Chem.* 2017, 89 (17), 8800-8807. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01126.
- [129] Z. W. Zhou, X. T. Shen, X. Chen, J. Tu, X. Xiong, Z. J. Zhu. LipidIMMS Analyzer: integrating multi-dimensional information to support lipid identification in ion mobility-mass spectrometry based lipidomics. *Bioinformatics.* 2019, 35 (4), 698-700. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty661.
- [130] J. P. Koelmel, N. M. Kroeger, C. Z. Ulmer, J. A. Bowden, R. E. Patterson, J. A. Cochran, C. W. W. Beecher, T. J. Garrett, R. A. Yost. LipidMatch: an automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinf.* 2017, 18 (331), 1-11. DOI:10.1186/S12859-017-1744-3.
- [131] D. Meng, Q. B. Zhang, X. L. Gao, S. Wu, G. Lin. LipidMiner: a software for automated identification and quantification of lipids from multiple liquid chromatography/mass spectrometry data files. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, 28 (8), 981-985. DOI: 10.1002/rcm.6865.
- [132] H. Song, F. F. Hsu, J. Ladenson, J. Turk. Algorithm for processing raw mass spectrometric data to identify and quantitate complex lipid molecular species in mixtures by data-dependent scanning and fragment ion database searching. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18 (10), 1848-1858. DOI: 10.1016/j.jasms.2007.07.023.
- [133] Z. Ahmed, M. Mayr, S. Zeeshan, T. Dandekar, M. J. Mueller, A. Fekete. Lipid-Pro: a computational lipid identification solution for untargeted lipidomics on data-independent acquisition tandem mass spectrometry platforms. *Bioinformatics.* 2015, 31 (7), 1150-1153. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu796.
- [134] D. Wolrab, E. Cifkova, P. Can, M. Lisa, O. Peterka, M. Chocholouskova, R. Jirasko, M. Holcapek. LipidQuant 1.0: automated data processing in lipid class separation - mass spectrometry quantitative workflows. 2021. DOI:10.5281/zenodo.5151201.
- [135] R. Herzog, K. Schuhmann, D. Schwudke, J. L. Sampaio, S. R. Bornstein, M. Schroeder, A. Shevchenko. LipidXplorer: A Software for Consensual Cross-Platform Lipidomics. *Plos One.* 2012, 7 (1), 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0029851.
- [136] J. E. Kyle, K. L. Crowell, C. P. Casey, G. M. Fujimoto, S. Kim, S. E. Dautel, R. D. Smith, S. H. Payne, T. O. Metz. LIQUID: an-open source software for identifying lipids in LC-MS/MS-based lipidomics data. *Bioinformatics.* 2017, 33 (11), 1744-1746. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx046.
- [137] Z. Ni, G. Angelidou, R. Hoffmann, M. Fedorova. LPPtiger software for lipidome-specific prediction and identification of oxidized phospholipids from LC-MS datasets. *Sci. Rep.* 2017, 7 (15138), 1-14. DOI: 10.1038/S41598-017-15363-Z.
- [138] Y. Ma, T. Kind, D. W. Yang, C. Leon, O. Fiehn. MS2Analyzer: A Software for Small Molecule Substructure Annotations from Accurate Tandem Mass Spectra. *Anal. Chem.* 2014, 86 (21), 10724-10731. DOI: 10.1021/ac502818e.

- [139] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Oresic. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinf.* 2010, *11* (395), 1-11. DOI: 10.1186/1471-2105-11-395.
- [140] X. E. Zhao, S. Y. Zhu, H. W. Liu. Recent progresses of derivatization approaches in the targeted lipidomics analysis by mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2020, *43* (9-10), 1838-1846. DOI: 10.1002/jssc.201901346.
- [141] G. Gutnikov. Fatty-Acid Profiles of Lipid Samples. *J. Chromatogr. B.* 1995, *671* (1-2), 71-89. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00116-Z.
- [142] H. M. Chen, R. E. Anderson. Quantitation of phenacyl esters of retinal fatty-acids by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* 1992, *578* (1), 124-129. DOI: 10.1016/0378-4347(92)80234-H.
- [143] S. M. Momchilova, B. M. Nikolova-Damyanova. Separation of isomeric octadecenoic fatty acids in partially hydrogenated vegetable oils as p-methoxyphenacyl esters using a single-column silver ion high-performance liquid chromatography (Ag-HPLC). *Nat. Protoc.* 2010, *5* (3), 473-478. DOI: 10.1038/nprot.2009.232.
- [144] H. Miwa, M. Yamamoto. Rapid liquid chromatographic determination of fatty acids as 2-nitrophenylhydrazine derivatives. *J. AOAC. Int.* 1996, *79* (2), 493-497. DOI: 10.1093/jaoac/79.2.493
- [145] J. P. Vicente, J. V. G. Adelantado, M. T. D. Carbo, R. M. Castro, F. B. Reig. Identification of lipid binders in old oil paintings by separation of 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin derivatives of fatty acids by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 2005, *1076* (1-2), 44-50. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.136.
- [146] T. Iwata, K. Inoue, M. Nakamura, M. Yamaguchi. Simple and Highly Sensitive Determination of Free Fatty-Acids in Human Serum by High-Performance Liquid-Chromatography with Fluorescence Detection. *Biomed. Chromatogr.* 1992, *6* (3), 120-123. DOI: 10.1002/bmc.1130060304.
- [147] X. Q. Bian, B. Q. Sun, P. Y. Zheng, N. Li, J. L. Wu. Derivatization enhanced separation and sensitivity of long chain-free fatty acids: Application to asthma using targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometry approach. *Anal. Chim. Acta.* 2017, *989*, 59-70. DOI: 10.1016/j.aca.2017.08.009.
- [148] Q. F. Zhu, J. W. Yan, Y. Gao, J. W. Zhang, B. F. Yuan, Y. Q. Feng. Highly sensitive determination of fatty acid esters of hydroxyl fatty acids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2017, *1061*, 34-40. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.06.045.
- [149] J. Williams, L. Pandarinathan, J. Wood, P. Vouros, A. Makriyannis. Endocannabinoid metabolomics: A novel liquid chromatography-mass spectrometry reagent for fatty acid analysis. *AAPS J.* 2006, *8* (4), 655-660. DOI: 10.1208/Aapsj080474.
- [150] Z. Chen, Y. Wu, R. Shrestha, Z. J. Gao, Y. Y. Zhao, Y. Miura, A. Tamakoshi, H. Chiba, S. P. Hui. Determination of total, free and esterified short-chain fatty acid in human serum by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ann. Clin. Biochem.* 2019, *56* (2), 190-197. DOI: 10.1177/0004563218801393.

- [151] H. J. Mok, J. W. Lee, R. Bandu, H. S. Kang, K. H. Kim, K. P. Kim. A rapid and sensitive profiling of free fatty acids using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) after chemical derivatization. *RSC Adv.* 2016, 6 (38), 32130-32139. DOI: 10.1039/c6ra01344a.
- [152] L. A. Xia, J. M. You, G. L. Li, Z. W. Sun, Y. R. Suo. Compositional and Antioxidant Activity Analysis of Zanthoxylum bungeanum Seed Oil Obtained by Supercritical CO<sub>2</sub> Fluid Extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011, 88 (1), 23-32. DOI: 10.1007/s11746-010-1644-4.
- [153] X. M. Chen, X. L. Dong, Y. R. Suo, J. M. You. Determination of Free Fatty Acids in Cortex Lycii by High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry with Fluorescence Detection and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Identification. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2014, 37 (11), 1548-1557. DOI: 10.1080/10826076.2013.803199.
- [154] R. Q. Jiang, Y. Jiao, P. Zhang, Y. Liu, X. Wang, Y. Huang, Z. J. Zhang, F. G. Xu. Twin Derivatization Strategy for High-Coverage Quantification of Free Fatty Acids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2017, 89 (22), 12223-12230. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03020.
- [155] T. X. Zhou, J. P. Leng, Y. S. Peng, L. Zhang, Y. L. Guo. Mass spectrometric analysis of free fatty acids in infant milk powders by frozen pretreatment coupled with isotope-labeling derivatization. *J. Sep. Sci.* 2016, 39 (5), 873-879. DOI:10.1002/jssc.201501032.
- [156] T. Takagi, T. Suzuki. Effect of Temperature on Chiral and Achiral Separations of Diacylglycerol Derivatives by High-Performance Liquid-Chromatography on a Chiral Stationary Phase. *J. Chromatogr.* 1992, 625 (2), 163-168. DOI: 10.1016/0021-9673(92)85198-3.
- [157] Y. Choi, J. Y. Park, P. S. Chang. Integral Stereoselectivity of Lipase Based on the Chromatographic Resolution of Enantiomeric/Regioisomeric Diacylglycerols. *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (1), 325-331. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c07430.
- [158] Y. Takahashi, Y. Itabashi, M. Suzuki, A. Kuksis. Determination of stereochemical configuration of the glycerol moieties in glycoglycerolipids by chiral phase high-performance liquid chromatography. *Lipids.* 2001, 36 (7), 741-748. DOI: 10.1007/s11745-001-0780-y.
- [159] T. Suzuki, T. Ota, T. Takagi. Temperature Effect on Enantiomeric Separation of Diacylglycerol Derivatives by Hplc on Various Chiral Columns. *J. Chromatogr. Sci.* 1992, 30 (8), 315-318. DOI: 10.1093/chromsci/30.8.315.
- [160] N. Tada, H. Fujita, Y. Ando. Synthesis of Urethane Derivatives of Mono- and Diacylglycerols for Use as HPLC Standards in the Enantiomeric Separation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2014, 91 (7), 1131-1137. DOI: 10.1007/s11746-014-2452-z.
- [161] Y. Itabashi, L. Marai, A. Kuksis. Identification of Natural Diacylglycerols as the 3,5-Dinitrophenylurethanes by Chiral Phase Liquid-Chromatography with Mass-Spectrometry. *Lipids.* 1991, 26 (11), 951-956. DOI: 10.1007/Bf02535983.
- [162] O. Rosati, S. Albrizio, D. Montesano, R. Riccieri, L. Cossignani, M. Curini, M. S. Simonetti, L. Rastrelli, P. Damiani. HPLC separation and NMR structural elucidation of sn-1,2-, 2,3-, and 1,3-diacylglycerols from olive oil as naphthylethylurethane derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55 (2), 191-196. DOI: 10.1021/jf062221f.

- [163] J. C. S. Goncalves, M. Sclavons, J. H. Poupaert, P. Dumont. High-Performance Liquid-Chromatography of 1,2-Diacyl-Rac-Glycerols and 1,3-Diacylglycerols through Chromogenic Derivatization with 3,5-Dinitrobenzoyl. *J. Chromatogr.* 1987, *411*, 472-475. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)94002-0.
- [164] K. Yang, B. G. Dilthey, R. W. Gross. Shotgun Lipidomics Approach to Stabilize the Regiospecificity of Monoglycerides Using a Facile Low-Temperature Derivatization Enabling Their Definitive Identification and Quantitation. *Anal. Chem.* 2016, *88* (19), 9459-9468. DOI:10.1021/acs.analchem.6b01862.
- [165] R. O. Adlof. Analysis of fatty acid mono- and diacylglycerol positional isomers by silver ion high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1996, *741* (1), 135-138. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00258-0.
- [166] C. Thévenon, S. El Bawab, B. Chantegrel, M. Lagarde. Highly sensitive measurement of lipid molecular species from biological samples by fluorimetric detection coupled to high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1998, *708* (1-2), 39-47. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00665-8.
- [167] Y. L. Li, X. Su, P. D. Stahl, M. L. Gross. Quantification of diacylglycerol molecular species in biological samples by electrospray ionization mass spectrometry after one-step derivatization. *Anal. Chem.* 2007, *79* (4), 1569-1574. DOI: 10.1021/ac0615910.
- [168] P. J. Ryan, K. Mcgoldrick, D. Stickney, T. W. Honeyman. Formation and Separation of Fluorescent Derivatives of Phosphatidic-Acid. *J. Chromatogr.* 1985, *320* (2), 421-425. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)90522-9.
- [169] S. L. Abidi, T. L. Mounts, K. A. Rennick. Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography of Phospholipids with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr.* 1993, *639* (2), 175-184. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80252-4.
- [170] N. E. L. Saris, P. Somerharju. Fluorimetric Assay of Phospholipase-a Acting on Biomembrane Phospholipids. *Acta. Chem. Scand.* 1989, *43* (1), 82-85. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.43-0082.
- [171] K. A. Z. Berry, W. W. Turner, M. S. VanNieuwenhze, R. C. Murphy. Characterization of oxidized phosphatidylethanolamine derived from RAW 264.7 cells using 4-(dimethylamino) benzoic acid derivatives. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2010, *16* (3), 463-470. DOI: 10.1255/ejms.1083.
- [172] C. J. Fhaner, S. C. Liu, H. Ji, R. J. Simpson, G. E. Reid. Comprehensive Lipidome Profiling of Isogenic Primary and Metastatic Colon Adenocarcinoma Cell Lines. *Anal. Chem.* 2012, *84* (21), 8917-8926. DOI: 10.1021/ac302154g.
- [173] H. F. Ma, F. Wei, B. F. Wu, C. Yang, Y. Xie, Z. Y. Wu, X. Lv, H. Chen. Profiling and quantification of aminophospholipids based on chemical derivatization coupled with HPLC-MS. *J. Lipid Res.* 2019, *60* (1), 121-134. DOI: 10.1194/jlr.M089482.
- [174] X. Wang, F. Wei, J. Q. Xu, X. Lv, X. Y. Dong, X. L. Han, S. Y. Quek, F. H. Huang, H. Chen. Profiling and relative quantification of phosphatidylethanolamine based on acetone stable isotope derivatization. *Anal. Chim. Acta.* 2016, *902*, 142-153. DOI: 10.1016/j.aca.2015.11.003.

- [175] S. W. J. Shields, C. A. Rosales, J. A. Roberts, P. J. Pallister, K. V. Wasslen, J. M. Manthorpe, J. C. Smith. iTrEnDi: In Situ Trimethylation Enhancement Using Diazomethane: Improved and Expanded Glycerophospholipid and Sphingolipid Analyses via a Microscale Autonomous Derivatization Platform. *Anal. Chem.* 2021, 93 (2), 1084-1091. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04088.
- [176] C. R. Canez, S. W. J. Shields, M. Bugno, K. V. Wasslen, H. P. Weinert, W. G. Willmore, J. M. Manthorpe, J. C. Smith. Trimethylation Enhancement Using C-13-Diazomethane (C-13-TrEnDi): Increased Sensitivity and Selectivity of Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine, and Phosphatidylserine Lipids Derived from Complex Biological Samples. *Anal. Chem.* 2016, 88 (14), 6996-7004. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04524.
- [177] T. X. Cai, Q. B. Shu, J. J. Hou, P. B. Liu, L. L. Niu, X. J. Guo, C. C. Liu, F. Q. Yang. Profiling and Relative Quantitation of Phosphoinositides by Multiple Precursor Ion Scanning Based on Phosphate Methylation and Isotopic Labeling. *Anal. Chem.* 2015, 87 (1), 513-521. DOI: 10.1021/ac503224j.
- [178] J. W. Lee, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba. Simultaneous profiling of polar lipids by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry with methylation. *J. Chromatogr. A.* 2013, 1279, 98-107. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.020.
- [179] J. C. Lee, S. K. Byeon, M. H. Moon. Relative Quantification of Phospholipids Based on Isotope-Labeled Methylation by Nanoflow Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Enhancement in Cardiolipin Profiling. *Anal. Chem.* 2017, 89 (9), 4969-4977. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00297.
- [180] M. Wang, J. P. Palavicini, A. Cseresznye, X. L. Han. Strategy for Quantitative Analysis of Isomeric Bis(monoacylglycero)phosphate and Phosphatidylglycerol Species by Shotgun Lipidomics after One-Step Methylation. *Anal. Chem.* 2017, 89 (16), 8490-8495. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b02058.
- [181] C. Y. Wang, J. P. Palavicini, M. Wang, L. Y. Chen, K. Yang, P. A. Crawford, X. L. Han. Comprehensive and Quantitative Analysis of Polyphosphoinositide Species by Shotgun Lipidomics Revealed Their Alterations in db/db Mouse Brain. *Anal. Chem.* 2016, 88 (24), 12137-12144. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02947.
- [182] Z. Z. Guan, J. Grunler, S. F. Piao, P. J. Sindelar. Separation and quantitation of phospholipids and their ether analogues by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 2001, 297 (2), 137-143. DOI: 10.1006/abio.2001.5303.
- [183] A. Palyzova, T. Rezanka. Separation and identification of diacylglycerols containing branched chain fatty acids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2021, 1635 (461708), 1-10. DOI: 10.1016/J.Chroma.2020.461708.
- [184] J. J. Butter, R. P. Koopmans, M. C. Michel. A rapid and validated HPLC method to quantify sphingosine 1-phosphate in human plasma using solid-phase extraction followed by derivatization with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 2005, 824 (1-2), 65-70. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.06.040.
- [185] B. A. Sanchez, F. P. Capote, M. D. L. de Castro. Targeted analysis of sphingoid precursors in human biofluids by solid-phase extraction with in situ derivatization prior to mu-LC-LIF determination. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 400 (3), 757-765. DOI: 10.1007/s00216-011-4821-x.

- [186] X. X. He, C. L. Huang, E. H. Schuchman. Quantitative analysis of sphingosine-1-phosphate by HPLC after naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) derivatization. *J. Chromatogr. B.* 2009, *877* (10), 983-990. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.02.048.
- [187] X. T. Jiang, D. S. Ory, X. L. Han. Characterization of oxysterols by electrospray ionization tandem mass spectrometry after one-step derivatization with dimethylglycine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, *21* (2), 141-152. DOI: 10.1002/rcm.2820.
- [188] A. Honda, K. Yamashita, H. Miyazaki, M. Shirai, T. Ikegami, G. R. Xu, M. Numazawa, T. Hara, Y. Matsuzaki. Highly sensitive analysis of sterol profiles in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2008, *49* (9), 2063-2073. DOI: 10.1194/jlr.D800017-JLR200.
- [189] H. Roberg-Larsen, M. F. Strand, A. Grimsmo, P. A. Olsen, J. L. Dembinski, F. Rise, E. Lundanes, T. Greibrokk, S. Krauss, S. R. Wilson. High sensitivity measurements of active oxysterols with automated filtration/filter backflush-solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2012, *1255*, 291-297. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.02.002.
- [190] W. J. Griffiths, M. Hornshaw, G. Woffendin, S. F. Baker, A. Lockhart, S. Heidelberger, M. Gustafsson, J. Sjoall, Y. Q. Wang. Discovering oxysterols in plasma: A window on the metabolome. *J. Proteome Res.* 2008, *7* (8), 3602-3612. DOI: 10.1021/pr8001639.
- [191] S. Ayciriex, A. Regazzetti, M. Gaudin, E. Prost, D. Dargere, F. Massicot, N. Auzeil, O. Laprevote. Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, *404* (10), 3049-3059. DOI: 10.1007/s00216-012-6396-6.
- [192] G. Büchi, C. G. Inman, E. S. Lipinsky. Light-Catalyzed Organic Reactions .1. The Reaction of Carbonyl Compounds with 2-Methyl-2-Butene in the Presence of Ultraviolet Light. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, *76* (17), 4327-4331. DOI: 10.1021/Ja01646a024.
- [193] X. X. Ma, X. Zhao, J. J. Li, W. P. Zhang, J. X. Cheng, Z. Ouyang, Y. Xia. Photochemical Tagging for Quantitation of Unsaturated Fatty Acids by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2016, *88* (18), 8931-8935. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02834.
- [194] R. C. Murphy, T. Okuno, C. A. Johnson, R. M. Barkleyte. Determination of Double Bond Positions in Polyunsaturated Fatty Acids Using the Photochemical Paterno-Buchi Reaction with Acetone and Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2017, *89* (16), 8545-8553. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b02375.
- [195] C. A. Stinson, Y. Xia. A method of coupling the Paterno-Buchi reaction with direct infusion ESI-MS/MS for locating the C=C bond in glycerophospholipids. *Analyst.* 2016, *141* (12), 3696-3704. DOI: 10.1039/c6an00015k.
- [196] X. X. Ma, L. Chong, R. Tian, R. Y. Shi, T. Y. Hu, Z. Ouyang, Y. Xia. Identification and quantitation of lipid C=C location isomers: A shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016, *113* (10), 2573-2578. DOI: 10.1073/pnas.1523356113.
- [197] J. Ren, E. T. Franklin, Y. Xia. Uncovering Structural Diversity of Unsaturated Fatty Acyls in Cholesteryl Esters via Photochemical Reaction and Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, *28* (7), 1432-1441. DOI: 10.1007/s13361-017-1639-6.



- [198] C. X. Sun, Y. Y. Zhao, J. M. Curtis. The direct determination of double bond positions in lipid mixtures by liquid chromatography/in-line ozonolysis/mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2013, *762*, 68-75. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.012.
- [199] N. Cetraro, R. B. Cody, J. Y. Yew. Carbon-carbon double bond position elucidation in fatty acids using ozone-coupled direct analysis in real time mass spectrometry. *Analyt.* 2019, *144* (19), 5848-5855. DOI: 10.1039/c9an01059a.
- [200] H. T. Pham, A. T. Maccarone, M. C. Thomas, J. L. Campbell, T. W. Mitchell, S. J. Blanksby. Structural characterization of glycerophospholipids by combinations of ozone- and collision-induced dissociation mass spectrometry: the next step towards "top-down" lipidomics. *Analyt.* 2014, *139* (1), 204-214. DOI: 10.1039/c3an01712e.
- [201] R. A. Harris, J. C. May, C. A. Stinson, Y. Xia, J. A. McLean. Determining Double Bond Position in Lipids Using Online Ozonolysis Coupled to Liquid Chromatography and Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2018, *90* (3), 1915-1924. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04007.
- [202] M. K. Pulfer, R. C. Murphy. Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant. *J. Biol. Chem.* 2004, *279* (25), 26331-26338. DOI: 10.1074/jbc.M403581200.
- [203] B. L. J. Poad, H. T. Pham, M. C. Thomas, J. R. Nealon, J. L. Campbell, T. W. Mitchell, S. J. Blanksby. Ozone-Induced Dissociation on a Modified Tandem Linear Ion-Trap: Observations of Different Reactivity for Isomeric Lipids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, *21* (12), 1989-1999. DOI: 10.1016/j.jasms.2010.08.011.
- [204] S. Pleik, B. Spengler, D. R. Bhandari, S. Luhn, T. Schafer, D. Urbach, D. Kirsch. Ambient-air ozonolysis of triglycerides in aged fingerprint residues. *Analyt.* 2018, *143* (5), 1197-1209. DOI: 10.1039/c7an01506b.
- [205] S. R. Ellis, J. R. Hughes, T. W. Mitchell, M. I. H. Panhuis, S. J. Blanksby. Using ambient ozone for assignment of double bond position in unsaturated lipids. *Analyt.* 2012, *137* (5), 1100-1110. DOI: 10.1039/c1an15864c.
- [206] S. Zhao, X. Luo, L. Li. Chemical Isotope Labeling LC-MS for High Coverage and Quantitative Profiling of the Hydroxyl Submetabolome in Metabolomics. *Anal. Chem.* 2016, *88* (21), 10617-10623. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02967.
- [207] R. K. Zhou, K. Guo, L. Li. 5-Diethylamino-naphthalene-1-sulfonyl Chloride (DensCl): A Novel Triplex Isotope Labeling Reagent for Quantitative Metabolome Analysis by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2013, *85* (23), 11532-11539. DOI: 10.1021/ac403000n.
- [208] S. Zhao, M. Dawe, K. Guo, L. Li. Development of High-Performance Chemical Isotope Labeling LC-MS for Profiling the Carbonyl Submetabolome. *Anal. Chem.* 2017, *89* (12), 6758-6765. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01098.
- [209] S. Zhao, L. Li. Dansylhydrazine Isotope Labeling LC-MS for Comprehensive Carboxylic Acid Submetabolome Profiling. *Anal. Chem.* 2018, *90* (22), 13514-13522. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03435.
- [210] K. Guo, L. Li. Differential C-12/C-13-Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome. *Anal. Chem.* 2009, *81* (10), 3919-3932. DOI: 10.1021/ac900166a.

- [211] T. Huan, Y. M. Wu, C. Q. Tang, G. H. Lin, L. Li. DnsID in MyCompoundID for Rapid Identification of Dansylated Amine- and Phenol-Containing Metabolites in LC-MS-Based Metabolomics. *Anal. Chem.* 2015, 87 (19), 9838-9845. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02282.
- [212] Q. F. Zhu, Y. H. Hao, M. Z. Liu, J. Yue, J. Ni, B. F. Yuan, Y. Q. Feng. Analysis of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid by stable isotope probe labeling coupled with ultra high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2015, 1410, 154-163. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.100.
- [213] S. M. Lamos, M. R. Shortreed, B. L. Frey, P. J. Belshaw, L. M. Smith. Relative quantification of carboxylic acid metabolites by liquid chromatography - Mass spectrometry using isotopic variants of cholamine. *Anal. Chem.* 2007, 79 (14), 5143-5149. DOI: 10.1021/ac062416m.
- [214] I. Dapic, R. Kobetic, L. Brkljacic, S. Kezic, I. Jakasa. Quantification of free fatty acids in human stratum corneum using tandem mass spectrometry and surrogate analyte approach. *Biomed. Chromatogr.* 2018, 32 (2), 1-9. DOI: 10.1002/Bmc.4056.
- [215] S. J. Zheng, J. Zheng, H. M. Xiao, D. M. Wu, Y. Q. Feng. Simultaneous quantitative analysis of multiple sphingoid bases by stable isotope labeling assisted liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2019, 1082, 106-115. DOI: 10.1016/j.aca.2019.07.016.