

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

Článek je věnován 70. výročí založení Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

ŠTĚPÁN STRNAD, VLADIMÍR VRKOSLAV a JOSEF CVAČKA

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha, Česká republika  
josef.cvacka@uochb.cas.cz

Došlo 7.8.23, přijato 14.10.23.

Tento text je druhou částí přehledového článku o pokrocích hmotnostní spektrometrie při charakterizaci dvojných a trojných vazeb v acylových řetězcích lipidů metodami LC-MS a přímou ionizací kapalných vzorků za atmosférického tlaku. Je věnován využití epoxidace, tvorbě aduktů vznikajících z acetonitrilu při chemické ionizaci za atmosférického tlaku, fotodisociačním reakcím a technikám disociace iontů po interakci s elektrony.

Klíčová slova: dvojná vazba, epoxidace, fotodisociace, fragmentace, hmotnostní spektrometrie, lipidy, strukturní analýza, trojná vazba

## Obsah

1. Epoxidace dvojných vazeb
2. Adukty vytvořené při chemické ionizaci za atmosférického tlaku v přítomnosti acetonitrilu
3. Fotodisociace nenasyčených lipidů
4. Disociace nenasyčených lipidů indukovaná elektrony
5. Závěr

## 1. Epoxidace dvojných vazeb

Metody založené na epoxidaci dvojných vazeb byly původně vyvinuty pro GC-MS (cit.<sup>1</sup>). Později byly upraveny i pro analýzy v kapalně fázi, čímž se jejich použitelnost rozšířila na netěkavé lipidy, jako jsou např. glycerofosfolipidy. Epoxidace lze provádět chemickou derivatizací před MS analýzou<sup>2-5</sup>, nízkoteplotní plazmou<sup>6-8</sup> nebo elektrochemickými reakcemi<sup>9,10</sup>. Pro šetrnou epoxidaci dvojných vazeb se často používá kyselina *meta*-chlorperoxybenzoová (*m*-CPBA)<sup>2,3</sup>. Reakce s *m*-CPBA je rychlá, probíhá s vysokým výtěžkem a minimem vedlejších produktů. Epoxidovou skupinu lze štěpit pomocí kolizně indukované

disociace (CID) za vzniku charakteristické dvojice fragmentů odpovídajících alkenu a aldehydu, které se liší o 15,9949 Da (schéma 1). Kromě diagnostických produktových iontů jsou pozorovány fragmenty odpovídající ztrátě polární části lipidu nebo ztrátě acylového řetězce. Produkty epoxidace lze v závislosti na struktuře lipidu detekovat v kladném nebo záporném módu elektrosprejové ionizace (ESI). Epoxidace pomocí *m*-CPBA byla využita při analýze mastných kyselin, fosfolipidů a lysofosfolipidů<sup>2</sup>. Pozici dvojných vazeb v glycerofosfolipidech lze určit v záporném ionizačním módu pomocí MS<sup>3</sup> (cit.<sup>3</sup>). V MS<sup>2</sup> jsou vytvořeny záporně nabitě ionty epoxidovaných mastných kyselin, jejichž následné štěpení v MS<sup>3</sup> kroku poskytuje fragmenty určující polohu dvojných vazeb. U analýzy polynenasycených mastných kyselin je třeba optimalizovat reakční podmínky tak, aby se zabránilo epoxidaci dvou nebo více dvojných vazeb, protože spektra vícenásobně epoxidovaných látek se obtížně interpretují. Zang a spol.<sup>4</sup> představili kyselinu peroctovou (PPA) jako alternativní derivatizační činidlo pro epoxidaci dvojných vazeb. V porovnání s *m*-CPBA se reakční směs po použití PPA lépe čistí. Dalším alternativním epoxidacím činidlem je kyselina chlorozlatitá. Při ESI v přítom-

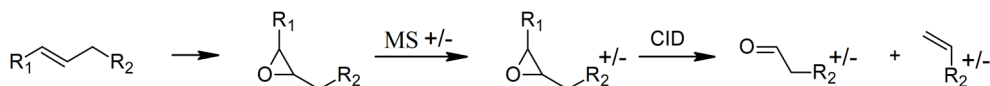


Schéma 1. Epoxidace, ionizace a CID epoxidovaných lipidových iontů

nosti kyseliny chlorozlatité dochází k epoxidaci dvojných vazeb a tvorbě diagnostických aldehydových iontů<sup>5</sup>.

Elektrochemické metody nebo metody využívající plasmu obvykle nevedou k neúplné epoxidaci. Výhodou je však jejich jednoduchost, rychlost a možnost uspořádání on-line. Epoxidace pomocí nízkoteplotní plazmy vyvinutá pro nenasyčené mastné kyseliny<sup>6</sup> byla později aplikována na všechny hlavní třídy fosfolipidů<sup>8</sup>. Epoxidaci lze rovněž provádět přímo v iontovém zdroji pro ESI, pokud je sprejovací jehla udržována při záporném napětí dostatečně vysokém k vytvoření korónového výboje<sup>7</sup>. Kromě epoxidace vznikají i peroxidované formy lipidů, jejichž fragmentační spektra lze rovněž využít pro lokalizaci dvojných vazeb. Elektrochemickou epoxidací nenasyčených lipidů lze řídit pomocí napětí vloženého na emitor během elektrosprejové ionizace<sup>9</sup>. NanoESI s neinertními kovovými elektrodami lze využít k epoxidaci nenasyčených mastných kyselin v krevní plazmě<sup>10</sup>.

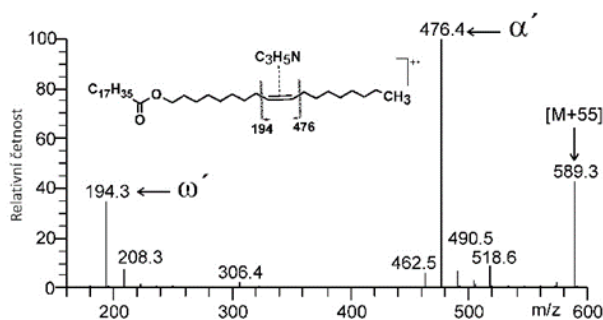
## 2. Adukty vytvořené při chemické ionizaci za atmosférického tlaku v přítomnosti acetonitrilu

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je vhodná pro méně polární a nepolární lipidy, které jsou pomocí ESI obtížně ionizovatelné. Při APCI se uplatňuje řada chemických procesů, které jsou primárně využívány k ionizaci analytů. Některé z těchto reakcí lze však s výhodou využít pro chemickou derivatizaci nenasyčených lipidů. Příkladem jsou reaktivní ionty vznikající z acetonitrilu, které se mohou adovat na dvojnou a trojnou vazbu lipidů. Reakční produkty poskytují fragmentační spektra, která jsou vhodná pro lokalizaci násobných vazeb v alifatických řetězcích lipidů.

V klasické chemické ionizaci (CI) při použití acetonitrilu jako reakčního plynu vzniká (1-methylenimino)-1-ethenyl ( $\text{H}_2\text{C}=\text{N}^+=\text{C}=\text{CH}_2$ ). Tato látka reaguje s nenasyčenými sloučeninami za vzniku aduktů  $[\text{M} + 54]^+$ , které poskytují fragmenty charakterizující polohu dvojnou vazby<sup>11,12</sup>. Reakce se obvykle provádí v hmotnostních spektrometrech s iontovou pastí s vnitřní ionizací, kde zmíněné reaktivní ionty vznikají iontově-molekulovou reakcí mezi  $\text{C}_2\text{H}_2\text{N}^+$  a neutrálním acetonitrem<sup>13,14</sup>. Diagnostické fragmenty jsou pozorovány buď ve spektrech  $\text{MS}^{13,15-17}$ , nebo ve spektrech  $\text{MS}^2$  po kolizní aktivaci aduktů  $[\text{M} + 54]^+$  (cit.<sup>18-26</sup>). Adukty  $[\text{M} + 54]^+$  lze generovat za atmosférického tlaku pomocí APCI-MS s využitím helia jako nebulizačního plynu<sup>27</sup>. Při APCI za běžných podmínek s dusíkem jako nebulizačním plynem vznikají odlišné ionty. Namísto iontu se sudým počtem elektronů  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}^+$  vzniká

radikálový kation  $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}^{+\bullet}$ , který reaguje s nenasyčenými lipidy. Reakční produkty typu  $[\text{M} + 55]^{+\bullet}$  pak při kolizní aktivaci poskytují intenzivní fragmentové ionty, které umožňují charakterizovat polohu dvojnou či trojnou vazbu. Experimenty a teoretické výpočty naznačují, že adukty lipidů s dvojnou vazbou jsou deriváty 2-methyl-1-pyrrolinu, které vznikají (3+2) cykloadiční reakcí s *N*-methylidem acetonitrilu ( $\text{H}_3\text{C}-\text{C}^*=\text{N}^+=\text{CH}_2$ ), viz schéma 2. Při CID se tyto deriváty štěpí otevřením kruhu a následnou eliminací alkylového radikálu. Vznikají dva diagnostické fragmenty, které představují štěpení na každé straně původní dvojnou či trojnou vazbu (obr. 1). Fragment alfa obsahuje lipidovou funkční skupinu, zatímco fragment omega charakterizuje druhou část řetězce s koncovou methylovou skupinou. Výhodou určování poloh dvojných a trojných vazeb pomocí acetonitrilu v APCI je jednoduchost této metody. Jedinou podmínkou je přítomnost acetonitrilu v iontovém zdroji, kterou lze snadno zajistit prostřednictvím mobilních fází obsahujících acetonitril. Metoda byla použita k objasnění struktury mnoha nenasyčených lipidů, včetně methylesterů kyseliny stearové (FAME, cit.<sup>28-31,35</sup>), hydroxy-FAME<sup>32</sup>, voskových esterů<sup>28</sup>, dioldiesterů<sup>33</sup> nebo triacylglycerolů<sup>34</sup>.

Adukty odvozené od acetonitrilu lze využít pro lipidy s různým uspořádáním dvojných či trojných vazeb. Jestliže jsou nenasyčené vazby v řetězci od sebe relativně daleko, každá z nich poskytuje intenzivní diagnostické fragmenty. Pokud jsou však dvě nebo více násobných vazeb blízko sebe, fragmenty odpovídající štěpení před první a za poslední násobnou vazbou bývají ve spektru intenzivnější. Tyto fragmenty jsou užitečné pro odvození uspořádání dvojných a trojných vazeb v polynenasycených řetězcích. Vychází se ze skutečnosti, že hmotnost polynenasycených



Obr. 1. CID  $\text{MS}^2$  spektrum aduktu  $[\text{M} + 55]^{+\bullet}$  vzniklého reakcí oleylstearátu (WE 18:1 (*n*-9)-18:0) s *N*-methylidem acetonitrilu v APCI zdroji. Přepracováno podle cit.<sup>28</sup>

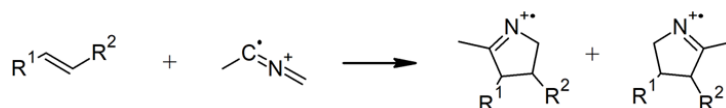


Schéma 2. Předpokládané schéma reakce dvojnou vazbu s *N*-methylidem acetonitrem v APCI zdroji

cené části řetězce se liší pro různá uspořádání násobných vazeb. Například uspořádání s dvěma dvojnými vazbami oddělenými methylenovou skupinou („methylene-interrupted“) odpovídá oblasti zahrnující první až poslední dvojnou vazbu elementárnímu složení  $C_5H_6$ , zatímco u dvou konjugovaných dvojných vazeb je to  $C_4H_4$ . Proto lze uspořádání násobných vazeb odhalit porovnáním hodnoty parametru MBR (multiple bond region) vypočteného z hmotností nejintenzivnějších fragmentů a prekursoru se seznamem teoretických MBR hodnot<sup>35</sup>. Obvykle jsou detekovány i fragmenty indikující jednotlivé dvojně vazby v polynenasyceném systému, které jsou užitečné pro potvrzení lokalizace všech násobných vazeb. Dvojně a trojně vazby lze rozlišit pomocí satelitních iontů, které vznikají fragmentací na vzdálenějších vazbách uhlík–uhlík. Satelitní ionty u dvojně vazby jsou výrazně méně intenzivní než diagnostické ionty a liší se od nich o 14 Da. Naopak satelitní ionty trojně vazby jsou obvykle velmi intenzivní. Od diagnostických fragmentů se liší o +15 Da, takže je lze ve spektrech snadno najít<sup>35</sup> (obr. 2).

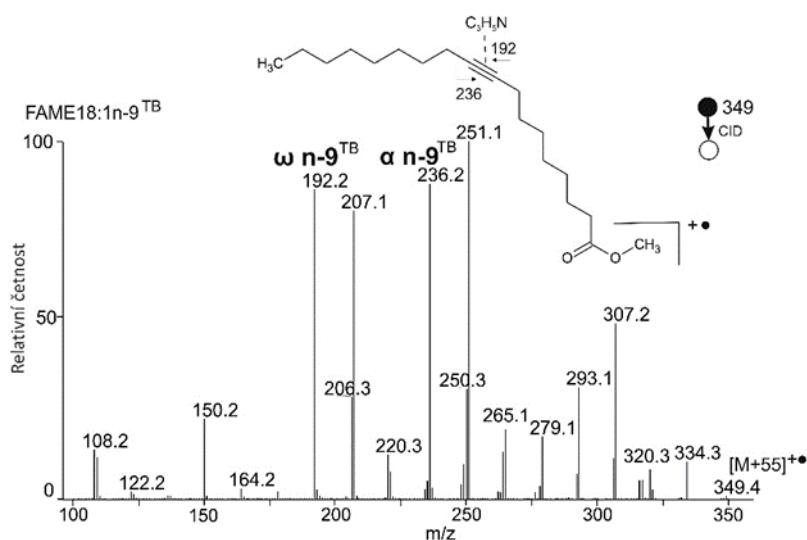
Nenasycené vazby ve složených lipidech mohou být přítomny ve dvou nebo více řetězcích. Další fragmentace diagnostických iontů nesoucích funkční skupinu (alfa fragmenty) pomáhá určit, kde se nenasyčená vazba v molekule nachází. Například dvojná vazba v mononenasycených voskových esterech může být přítomna v kyselinové nebo alkoholové části. Pokud se z alfa fragmentu při  $MS^3$  odštěpuje mastná kyselina, nachází se dvojná vazba v alkoholové části. Naopak, pokud se odštěpuje alkohol, je dvojná vazba součástí kyselinového řetězce<sup>28</sup>. S rostoucím počtem alifatických řetězců v molekulách lipidů<sup>33,34</sup> jsou interpretace spekter náročnější. V případě triacylglycerolů<sup>34</sup> jsou spektra jednoznačně interpretovatelná pro molekuly s jedním nenasyčeným řetězcem, nebo dvěma či tře-

mi identickými nenasyčenými řetězci. Protože se každá násobná vazba projevuje diagnostickými a satelitními ionty, mohou být hmotnostní spektra triacylglycerolů velmi komplexní. Pokud řetězce obsahují dvojně vazby ve stejné poloze od koncového methyly, jsou příslušné fragmenty ve spektrech intenzivnější a signály ve spektrech lze snáze korelovat se strukturou (obr. 3). Pokud se pro relativně velké lipidy, jako jsou triacylglyceroly nebo 1,2-diol diestery, používá hmotnostní spektrometr s iontovou pastí, mohou být hmotnosti omega fragmentů pod spodním limitem hmotnostního rozsahu analyzátoru. Ačkoli omega fragmenty nejsou nezbytné pro stanovení polohy dvojných vazeb, jsou užitečné pro potvrzení navržených struktur. Proto je pro fragmentaci aduktů výhodnější používat přístroje s kolizní celou.

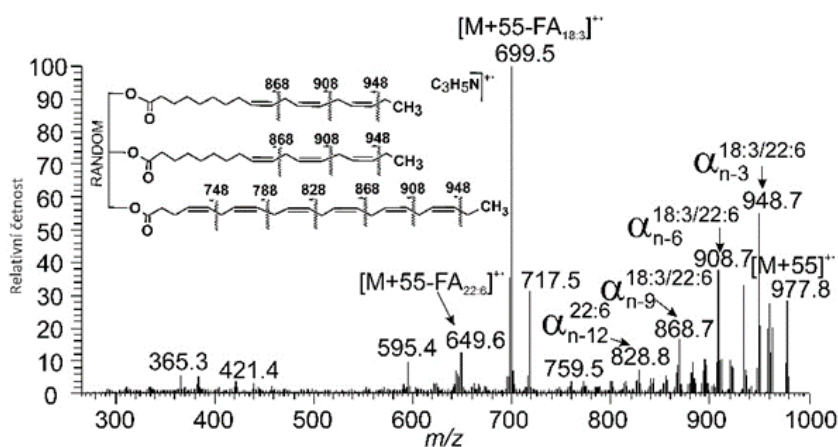
V APCI dochází k reakci nabitých acetonitrilových částic (iontů) s neutrální molekulou lipidu. Tento přístup se tak principiálně liší od metod využívajících ESI, které jsou založeny na modifikacích lipidových iontů neutrálními reaktanty (např. při ozonem indukované disociaci (OzID) nebo Paternò-Büchiho reakci). Adukt odvozené od acetonitrilu jsou vynikajícím nástrojem pro lokalizaci dvojných a trojných vazeb v neutrálních lipidech a vhodné doplňují portfolio metod založených na ionizaci elektro-sprejem.

### 3. Fotodisociace nenasyčených lipidů

První studie fotodisociace malých iontů spadají do 70. let 20. století<sup>36,37</sup>. V posledních letech se fotodisociace ultrafialovým zářením (UVPD) stala důležitou metodou pro strukturní analýzu lipidů a dalších biologických molekul<sup>38</sup>. UVPD spektra lipidů obsahují specifické fragmenty,



Obr. 2. CID  $MS^2$  spektrum aduktu  $[M + 55]^+$  vzniklého reakcí methylesteru kyseliny stearové (FAME 18:1  $n-9^{TB}$ ) s  $N$ -methylidem acetonitrilu v APCI zdroji. Prepracováno podle cit.<sup>35</sup>



Obr. 3. CID MS<sup>2</sup> spektrum aduktu  $[M + 55]^+$  vzniklého reakcí di-*n*-linolenin-dokosaheksaenoinu (TG 18:3 (*n*-3)\_18:3 (*n*-3)\_22:6 (*n*-3)) s *N*-methylidem acetonitrilu v APCI zdroji. Přepřacováno podle cit.<sup>34</sup>

kteří umožňují určit polohy násobných vazeb, methylových větvení, hydroxylových skupin, cyklopropanových modifikací nebo *sn*- pozice acylových řetězců v acylglycerolech. UV záření může aktivovat disociační mechanismy prostřednictvím excitovaných stavů, nebo vyvolat radikálově řízenou disociaci (radical-driven dissociation, RDD). Schopnost UVPD rozlišit *cis/trans* izomery dvojných vazeb je však omezená kvůli izomerizaci dvojných vazeb po absorpci UV fotonu<sup>39</sup>.

UV záření může vyvolat RDD vytvořením radikálových iontů z molekul se sudým počtem elektronů. Metody založené na této myšlence vyvinula skupina S. J. Blanksbyho<sup>40–43</sup> a R. R. Juliana<sup>44</sup>. Lipidy lze derivatizovat buď nekovalentně<sup>40,44</sup>, nebo kovalentně<sup>41–44</sup> činidly obsahujícími aryl-jodovou vazbu štěpitelnou UV zářením za vzniku radikálů. Po interakci prekurzoru s fotony o vlnové délce 266 nm se odštěpuje jodový radikál za vzniku radikál-kationtu a sekundárních fragmentů. Nevalentní komplexy mohou vznikat s 4-jodobenzoátem nebo 4-jodanilinem (glycerofosfolipidy, sfingomyeliny a triacylglyceroly)<sup>40</sup>, nebo 4-jodobenzoyl-18-crown-6 etherem (fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny)<sup>44</sup>. Následná CID fragmentů s lichým počtem elektronů vede k radikálově řízenému štěpení vazby uhlík–uhlík podél acylového řetězce, což se projevuje sérií ztrát alkylového radikálu nebo alkenu. Vzdálenost mezi sousedními píky je u jednoduchých vazeb 14 Da, zatímco vzdálenost mezi píky 12 Da identifikuje místo dvojných vazeb. Kovalentní deriváty mastných kyselin lze vytvořit esterifikací 4-jodobenzylalkoholem<sup>41</sup>. Po ozáření produktu UV zářením o vlnové délce 266 nm eliminují sodné adukty těchto derivátů atomární jod. Následná CID iontů  $[M + Na - I]^+$  poskytuje fragmenty nesoucí informace o poloze dvojných vazeb. Výrazně vyšší účinnosti fotofragmentace se dosahuje u *N*-(2-aminoethyl)-4-jodbenzamidových (NIBA) derivátů mastných kyselin<sup>43</sup>, které vykazují téměř úplnou konverzi prekurzorového iontu  $[M + Na]^+$  na kationtový radikál

$[M + Na - I]^+$ . Deriváty pro RDD lze rovněž navrhnout tak, aby se maximalizovala intenzita prekurzorových iontů. Toho lze docílit zavedením permanentního náboje, jako je tomu u derivátů 1-(3-(aminomethyl)-4-jodfenyl)pyridin-1-ia (4-I-AMPP<sup>+</sup>)<sup>42</sup>.

U výše popsaných RDD metod se využívá UV záření k tvorbě radikálových iontů, které po migraci radikálového místa poskytují diagnostické fragmenty. Pro strukturní analýzu lipidů má však také velký význam UVPD, která vyvolává fragmentace přímo z excitovaných stavů. Skupiny J. S. Brodbeltové a G. E. Reida zkoumaly UVPD lipidů při vlnové délce 193 nm, kdy dochází ke vzniku charakteristických iontů vhodných pro lokalizaci dvojných vazeb v acylových řetězcích<sup>45</sup>. Fotoexcitované ionty podléhají 1,2-eliminacím<sup>39</sup> (schéma 3). Obě vazby uhlík–uhlík sousedící s dvojnou vazbou se štěpí a vznikají dva produktové ionty lišící se o 24,000 Da (hmotnost dvou atomů uhlíku) (obr. 4). Tento způsob fragmentace je nezávislý na poloze a typu náboje. Pro UVPD lipidů v pozitivním módu lze použít jak protonované molekuly<sup>39,45</sup>, tak adukty s lithiem<sup>39,46,47</sup>, sodíkem<sup>45–47</sup> nebo draslíkem<sup>46,47</sup>. Fragmentace aduktů alkalických kovů poskytuje intenzivnější diagnostické produktové ionty, pravděpodobně v důsledku menší pohyblivosti iontu kovu ve srovnání s protonem<sup>39</sup>. Diagnostické fragmenty dvojných vazeb se tvoří také ze záporně nabitých prekurzorů<sup>48,49</sup>, např. u jedno- i dvojná-

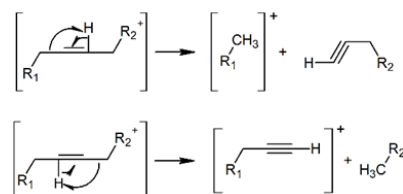
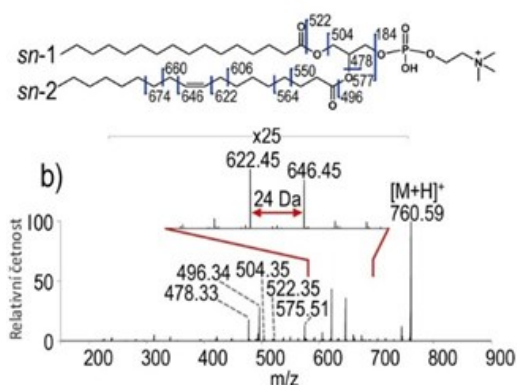


Schéma 3. Reakce dvojných vazeb vyvolané absorpcí UV fotonu vedoucí ke vzniku dvou produktových iontů lišících se o 24 Da



Obr. 4. UVPD (193 nm)-MS<sup>2</sup> fosfatidylcholinu PC 16:0/18:1 (9Z). Přepočteno podle cit.<sup>45</sup>

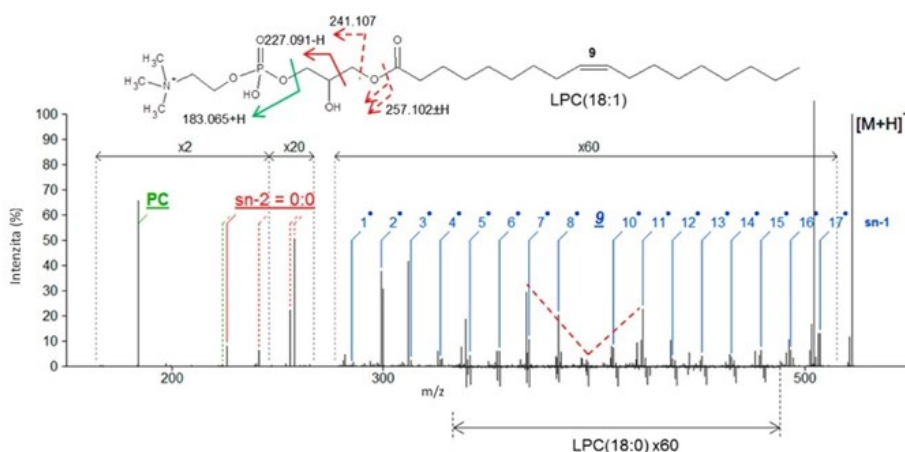
sobně deprotonovaných kardiolipinů<sup>48</sup>. Vzhledem ke složité struktuře těchto lipidů je k lokalizaci dvojných vazeb na všech acylových řetězcích nutná fragmentace ve dvou krocích (CID/UVPD). U fosfolipidů lze k určení poloh dvojných vazeb využít záporně nabitě prekurzory. Zatímco se kyseliny fosfatidové, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylseriny a fosfatidylinositoly deprotonují snadno, záporně nabitě ionty fosfatidylcholinů lze získat po přidavku mravenčanu. Všechny fosfolipidy pak v UVPD poskytují dvojice diagnostických fragmentových iontů<sup>49,50</sup>. UVPD lze využít k určení poloh dvojných vazeb i v polynenasycených acylových řetězcích, protože každá násobná vazba poskytuje zmíněné diagnostické ionty. Intenzity diagnostických iontů je možné použít k určení relativních koncentrací polohových izomerů dvojných vazeb ve směsích<sup>46</sup>. Navzdory omezené citlivosti lze UVPD použít také ve spojení s kapalinovou chromatografií<sup>49–51</sup>. Nedávno byly metodou RPLC-UVPD kvantifikovány fosfolipidy obsahující izomerní polynenasycené mastné kyseliny<sup>51</sup>.

UVPD v komerčně dostupných hmotnostních spektrometrech pracuje při 213 nm. Tyto přístroje lze využít obdobným způsobem jako laboratorní prototypy spektrometrů využívající fotony o vlnové délce 193 nm, protože i při této vlnové délce dochází k překryvu s absorpčními pásy nenasycených lipidů. UVPD při 213 nm v kombinaci s vysokoenergetickou kolizně indukovanou disociací (HCD) v MS<sup>3</sup> umožňuje např. kompletní strukturní analýzu esterů hydroxymastných kyselin (FAHFA)<sup>52</sup>. Pro UVPD se také používá záření vyšších vlnových délek, jako je 266 nm. Energie fotonů však již není dostatečně vysoká na to, aby došlo k jejich absorpci na dvojných vazbách<sup>53</sup>.

#### 4. Disociace nenasycených lipidů indukovaná elektrony

Disociace organických iontů po jejich interakci s elektrony má bohatou historii sahající až do konce 70. let 20. století. První fragmentace organických iontů pomocí elektronů byly prováděny v celách pro iontovou cyklotronovou rezonanci pomocí techniky známé jako EIEIO (electron impact excitation of ions from organics)<sup>54</sup>. Zájem o elektrony indukovanou fragmentaci jednonásobně nabitých iontů se v poslední době zvýšil v důsledku uvedení nového komerčního hmotnostního spektrometru Q-TOF s EID (cit.<sup>55</sup>). Jako fragmentační cela je zde použita radiofrekvenční iontová past, která umožňuje nezávislé manipulace s elektrony a ionty<sup>56</sup>.

Využití EID lze v analýze nenasycených lipidů demonstrovat na příkladu fosfolipidů, které lze pomocí této fragmentační techniky velmi podrobně charakterizovat<sup>57</sup>. Protonované prekurzory fragmentují za vzniku iontů charakteristických pro polární funkční skupiny fosfolipidů. Dále dochází k regioizomerně specifické ztrátě acylových řetězců a štěpení vazeb uhlík–uhlík v alifatických řetězcích. Fragmentacemi alifatického řetězce vznikají ionty se sudým a lichým počtem elektronů, které tvoří série iontů



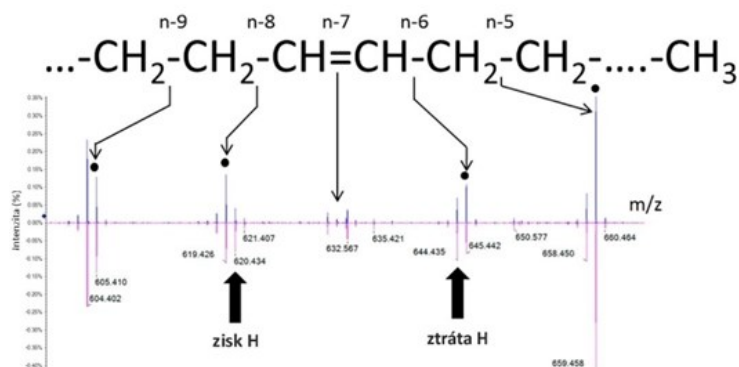
Obr. 5. EID (10 eV)-MS<sup>2</sup> spektrum lysosfosfatidylcholinu LPC 18:1 (9Z) ve srovnání s částí EID spektra LPC 18:0. Přepočteno podle cit.<sup>57</sup>

lišících se o 14 Da. Pokud je v řetězci přítomna dvojná vazba, intenzity fragmentů určující pozici dvojných vazby tvoří profil ve tvaru písmene V (obr. 5). Pro interpretaci spekter lipidů s vyšším počtem dvojných vazeb byl navržen automatický dekonvoluční program<sup>57</sup>.

Interakce s vysokoenergetickými elektrony (>20 eV) v ICR cele<sup>58</sup> umožňují podrobnější pohled na fragmentaci fosfatidylcholinů. Štěpení vazeb uhlík–uhlík v nasycených diacylfosfatidylcholinech formálně vede ke ztrátě alkanu. U nenasyčených fosfatidylcholinů jsou pozorovány produktové ionty s lichým počtem elektronů, které odpovídají homolytickému štěpení řetězců, a ionty se sudým počtem elektronů odpovídající neutrální ztrátě alkanů. Kromě lokalizace polohy dvojných vazeb nabízejí EID fragmenty také rozlišení stereoizomerů<sup>59</sup>. *Cis/trans* geometrie ovlivňuje intenzitu fragmentů sousedních vazeb uhlík–uhlík. *Trans* izomery vykazují zvýšené intenzity dvou iontů se sudým počtem elektronů lišících se o 24,000 Da, tj. pík „ztráty vodíku“ v místě (n–X–1) a pík „zisku vodíku“ v místě (n–X+1) (obr. 6).

Lokalizace dvojných vazeb pomocí EID byla dosud využita pro charakterizaci lipidů několika tříd, včetně fosfolipidů<sup>57</sup>, sfingolipidů<sup>60</sup> a triacylglycerolů<sup>61</sup>. Na počátku byla účinnost EID poměrně nízká, což vyžadovalo průměrování signálu po relativně dlouhou dobu, a délka sběru dat omezovala použití EID ve spojení s kapalinovou chromatografií. Nedávný technologický pokrok však zlepšil účinnost EID ve spektrometru typu QqTOF (cit.<sup>63</sup>). Zvýšená citlivost nyní umožňuje provádět strukturální lipidomiku založenou na EID ve spojení s kapalinovou chromatografií. Alternativní možnost separace komplexních vzorků lipidů při spojení s EID nabízí diferenční iontová mobilita (DMS)<sup>59–62</sup>.

Disociace s přenosem náboje (charge transfer dissociation, CTD) je aktivační technika, která generuje spektra podobná spektrům EID (cit.<sup>64</sup>). Při této metodě interagují analyzované ionty s vysokoenergetickými (keV) ionty helia. Rozsáhlé štěpení podél acylových řetězců lipidů poskytuje spektra s diagnostickými fragmenty pro lokalizaci dvojných vazeb.



Obr. 6. EID MS<sup>2</sup> spektra fosfatidylcholinu PC 18:1 (*n-9,cis*)/18:1 (*n-9,cis*) (nahore) a fosfatidylcholinu PC 18:1 (*n-9,trans*)/18:1 (*n-9,trans*) (dole). Přepřacováno podle cit.<sup>59</sup>

## 5. Závěr

V posledních letech jsme svědky rychlého rozvoje metod strukturální analýzy lipidů. Nové postupy jsou často založeny na využití nových derivatizačních reakcí a netradičních způsobech aktivace iontů. Vývoj v oblasti strukturální analýzy je poháněn technologickými novinkami v hmotnostní spektrometrii a dostupností přístrojů se stále se zlepšujícími parametry. Molekuly lipidů tak lze charakterizovat podrobněji a identifikovat je na nižších koncentračních úrovních a ve složitějších vzorcích. Jedním z klíčových požadavků na nové metody je jejich jednoduchá integrace do lipidomických pracovních postupů, což vyžaduje snadnou a jednoznačnou interpretaci spekter a kompatibilitu s chromatografií. Interpretace spekter složitějších lipidů nebo spekter s rozsáhlou fragmentací (např. EID, UVPD) může být velmi náročná. Lipidomické přístupy se proto neobejdou bez rychlých a spolehlivých počítačových programů pro automatické vyhodnocování dat.

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

## LITERATURA

1. Halket J. M., Zaikin V. G.: *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)* 11, 127 (2005).
2. Feng Y., Chen B., Yu Q., Li L.: *Anal. Chem.* 91, 1791 (2019).
3. Kuo T. H., Chung H. H., Chang H. Y., Lin C. W., Wang M. Y., Shen T. L., Hsu C. C.: *Anal. Chem.* 91, 11905 (2019).
4. Zhang H., Xu M., Shi X., Liu Y., Li Z., Jagodinsky J. C., Ma M., Welham N. V., Morris Z. S., Li L.: *Chem. Sci.* 12, 8115 (2021).
5. Luo K., Chen H., Zare R. N.: *Analyst* 146, 2550 (2021).

6. Zhao Y., Zhao H., Zhao X., Jia J., Ma Q., Zhang S., Zhang X., Chiba H., Hui S.-P., Ma X.: *Anal. Chem.* **89**, 10270 (2017).
7. Takashima S., Toyoshi K., Yamamoto T., Shimozawa N.: *Sci. Rep.* **10**, 12988 (2020).
8. Cao W., Ma X., Li Z., Zhou X., Ouyang Z.: *Anal. Chem.* **90**, 10286 (2018).
9. Tang S., Cheng H., Yan X.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 209 (2020).
10. Chintalapudi K., Badu-Tawiah A. K.: *Chem. Sci. J.* **11**, 9891 (2020).
11. Van Pelt C. K., Carpenter B. K., Brenna J. T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 1253 (1999).
12. Michaud A. L., Lawrence P., Adlof R., Brenna J. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 363 (2005).
13. Moneti G., Pieraccini G., Favretto D., Traldi P.: *J. Mass Spectrom.* **33**, 1148 (1998).
14. Oldham N. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1694 (1999).
15. Moneti G., Pieraccini G., Dani F., Turillazzi S., Favretto D., Traldi P.: *J. Mass Spectrom.* **32**, 1371 (1997).
16. Moneti G., Pieraccini G., Favretto D., Traldi P.: *J. Mass Spectrom.* **34**, 1354 (1999).
17. Oldham N. J., Svatos A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 331 (1999).
18. Van Pelt C. K., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **71**, 1981 (1999).
19. Van Pelt C. K., Huang M. C., Tschanz C. L., Brenna J. T.: *J. Lipid Res.* **40**, 1501 (1999).
20. Michaud A. L., Diau G. Y., Abril R., Brenna J. T.: *Anal. Biochem.* **307**, 348 (2002).
21. Michaud A. L., Yurawecz M. P., Delmonte P., Corl B. A., Bauman D. E., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **75**, 4925 (2003).
22. Saba A., Mazzini F., Raffaelli A., Mattei A., Salvadori P.: *J. Agr. Food Chem.* **53**, 4867 (2005).
23. Lawrence P., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **78**, 1312 (2006).
24. Gomez-Cortes P., Tyburczy C., Brenna J. T., Juarez M., de la Fuente M. A.: *J. Lipid Res.* **50**, 2412 (2009).
25. Alves S. P., Tyburczy C., Lawrence P., Bessa R. J., Brenna J. T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25**, 1933 (2011).
26. Kroiss J., Svatos A., Kaltenpoth M.: *J. Chem. Ecol.* **37**, 420 (2011).
27. Xu Y., Brenna J. T.: *Anal. Chem.* **79**, 2525 (2007).
28. Vrkoslav V., Hakova M., Peckova K., Urbanova K., Cvacka J.: *Anal. Chem.* **83**, 2978 (2011).
29. Vrkoslav V., Cvacka J.: *J. Chromatogr. A* **1259**, 244 (2012).
30. Barthelemy M., Elie N., Pellissier L., Wolfender J. L., Stien D., Touboul D., Eparvier V.: *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
31. Sorres J., Hebra T., Elie N., Leman-Loubiere C., Grayfer T., Grellier P., Touboul D., Stien D., Eparvier V.: *Molecules* **27**, 1182 (2022).
32. Kaluzikova A., Vrkoslav V., Harazim E., Hoskovec M., Plavka R., Budesinsky M., Bosakova Z., Cvacka J.: *J. Lipid Res.* **58**, 1579 (2017).
33. Subcikova L., Hoskovec M., Vrkoslav V., Cmelikova T., Hakova E., Mikova R., Coufal P., Dolezal A., Plavka R., Cvacka J.: *J. Chromatogr. A* **1378**, 8 (2015).
34. Hakova E., Vrkoslav V., Mikova R., Schwarzova-Peckova K., Bosakova Z., Cvacka J.: *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 5175 (2015).
35. Horka P., Vrkoslav V., Kindl J., Schwarzova-Peckova K., Cvacka J.: *Molecules* **26**, 6468 (2021).
36. Vanderhart W. J.: *Mass Spectrom. Rev.* **8**, 237 (1989).
37. Tecklenburg R. E., Russell D. H.: *Mass Spectrom. Rev.* **9**, 405 (1990).
38. Brodbelt J. S., Morrison L. J., Santos I.: *Chem. Rev.* **120**, 3328 (2020).
39. Ryan E., Nguyen C. Q. N., Shiea C., Reid G. E.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1406 (2017).
40. Pham H. T., Ly T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* **84**, 7525 (2012).
41. Pham H. T., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 805 (2013).
42. Narreddula V. R., Boase N. R., Ailuri R., Marshall D. L., Poad B. L. J., Kelso M. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Anal. Chem.* **91**, 9901 (2019).
43. Narreddula V. R., McKinnon B. I., Marlton S. J. P., Marshall D. L., Boase N. R. B., Poad B. L. J., Trevitt A. J., Mitchell T. W., Blanksby S. J.: *Analyst* **146**, 156 (2021).
44. Pham H. T., Julian R. R.: *Int. J. Mass Spectrom.* **370**, 58 (2014).
45. Klein D. R., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **89**, 1516 (2017).
46. Fang M. X., Rustam Y., Palmieri M., Sieber O. M., Reid G. E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 2339 (2020).
47. Williams P. E., Klein D. R., Greer S. M., Brodbelt J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 15681 (2017).
48. Macias L. A., Feider C. L., Eberlin L. S., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **91**, 12509 (2019).
49. Klein D. R., Blevins M. S., Macias L. A., Douglass M. V., Trent M. S., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **92**, 5986 (2020).
50. Blevins M. S., James V. K., Herrera C. M., Purcell A. B., Trent M. S., Brodbelt J. S.: *Anal. Chem.* **92**, 9146 (2020).
51. Macias L. A., Garza K. Y., Feider C. L., Eberlin L. S., Brodbelt J. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 14622 (2021).
52. Buenger E. W., Reid G. E.: *Eur. J. Mass Spectrom.* **26**, 311 (2020).
53. Waldchen F., Becher S., Esch P., Kompauer M., Heiles S.: *Analyst* **142**, 4744 (2017).
54. Cody R. B., Freiser B. S.: *Anal. Chem.* **51**, 547 (1979).
55. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Hager J. W., Thomson B. A.: *Anal. Chem.* **87**, 785 (2015).
56. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S., Hager J. W., Thomson B. A.: *Mass Spectrom.*

- 6, A0058 (2017).
57. Campbell J. L., Baba T.: *Anal. Chem.* 87, 5837 (2015).
58. Jones J. W., Thompson C. J., Carter C. L., Kane M. A.: *J. Mass Spectrom.* 50, 1327 (2015).
59. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *Anal. Chem.* 89, 7307 (2017).
60. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 858 (2016).
61. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S.: *J. Lipid Res.* 57, 2015 (2016).
62. Baba T., Campbell J. L., Le Blanc J. C. Y., Baker P. R. S., Ikeda K.: *J. Lipid Res.* 59, 910 (2018).
63. Baba T., Ryumin P., Duchoslav E., Chen K. Q., Chelur A., Loyd B., Chernushevich I.: *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 32, 1964 (2021).
64. Li P. F., Jackson G. P.: *J. Mass Spectrom.* 52, 271 (2017).

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

This text is the second part of a review article on advances in mass spectrometry for characterizing double and triple bonds in lipid acyl chains by LC-MS and direct ionization of liquid samples at atmospheric pressure. It is devoted to epoxidation, forming adducts from acetonitrile during atmospheric pressure chemical ionization, photodissociation, and electron-ion reaction-based dissociations.

**Keywords:** double bond, fragmentation, epoxidation, lipids, mass spectrometry, photodissociation, structural analysis, triple bond

*Acknowledgments*

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



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