



IOCB
PRAGUE



Faculty of Science
Charles University

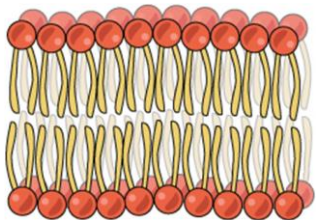
Od molekulové hmotnosti ke struktuře: hmotnostní spektrometrie v analýze lipidů

Josef Cvačka

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha & Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

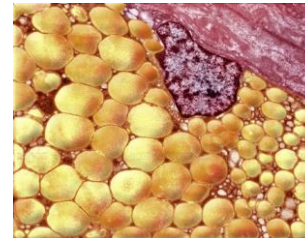
Lipidy

- hydrofobní nebo amfipatické biomolekuly, klíčové role v živých organismech



Strukturní složky

- základní součásti buněčných membrán, ovlivňují a regulují jejich vlastnosti



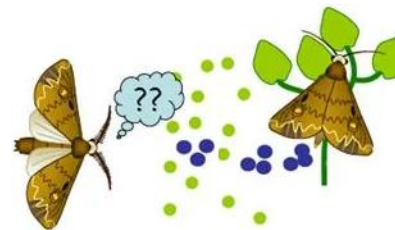
Ukládání energie

- vysoký energetický obsah, dlouhodobá zásoba energie u rostlin i živočichů



Ochrana a voděodolnost

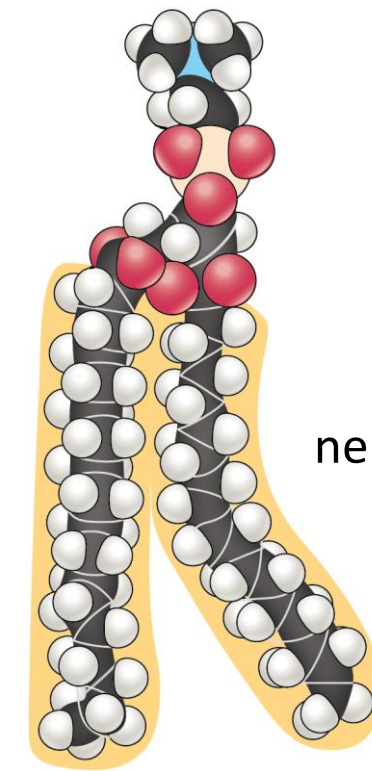
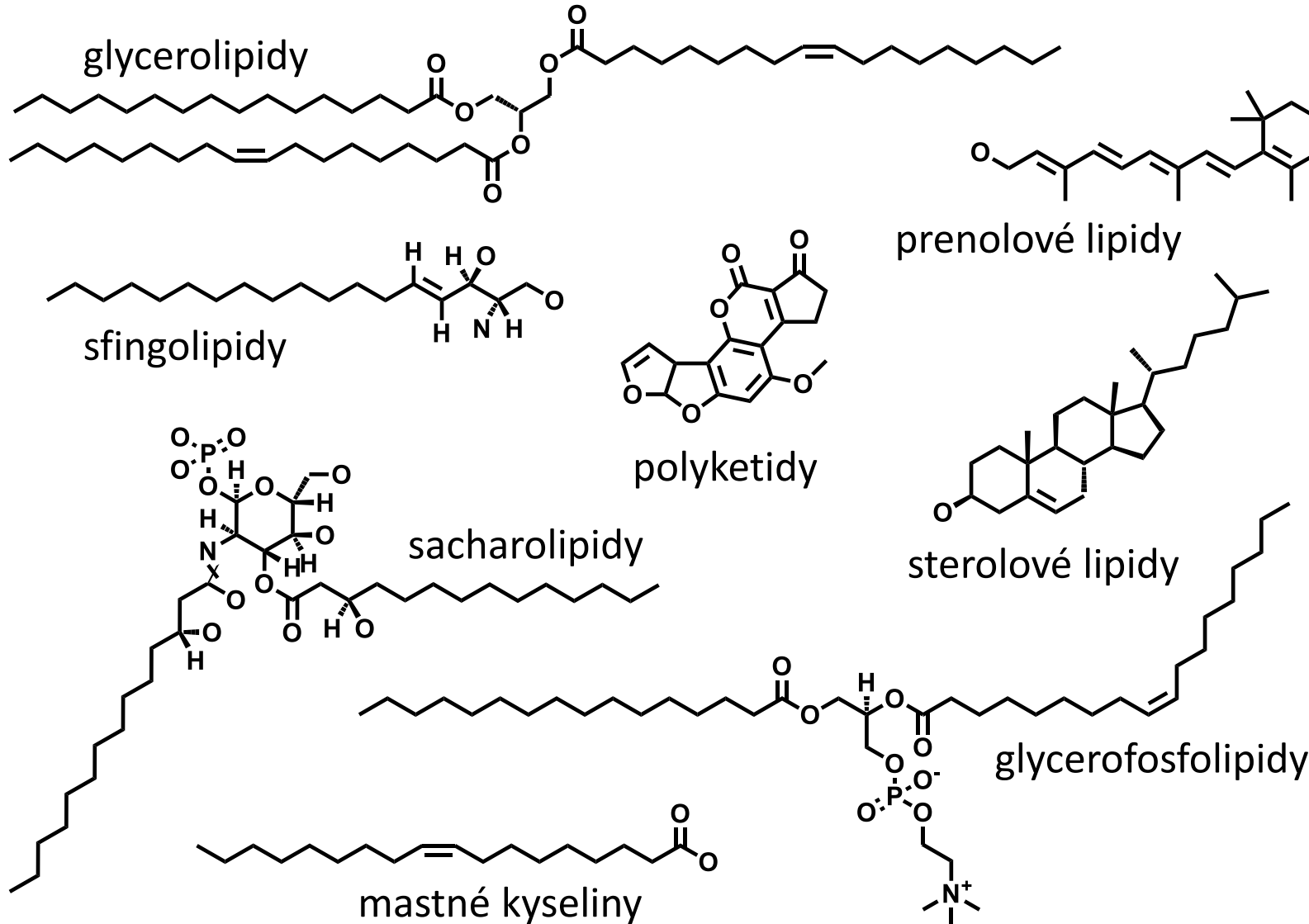
- lipidové vrstvy na povrchu snižují ztrátu vody a chrání před vlivy prostředí



Komunikace a signalizace

- signalizace a chemická komunikace v různých fyziologických procesech

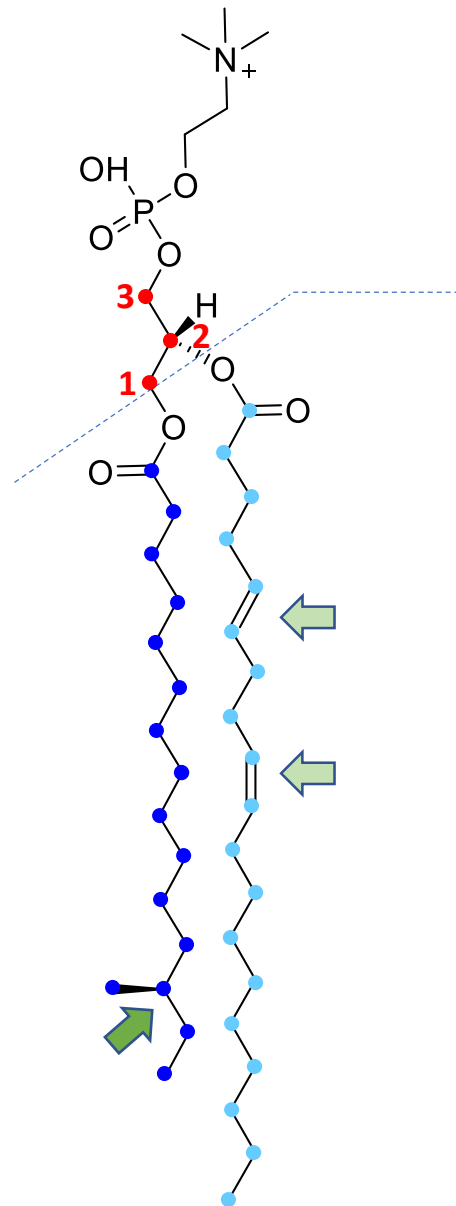
Struktura lipidů



polární část:
hlavička

nepolární část:
alifatické
řetězce

Struktura lipidů



Polární hlavička

Alifatická část

Uspořádání alifatických řetězců na polární hlavičce (glycerolu)

Struktura jednotlivých alifatických řetězců

Celková délka (počet uhlíkových atomů v řetězci)

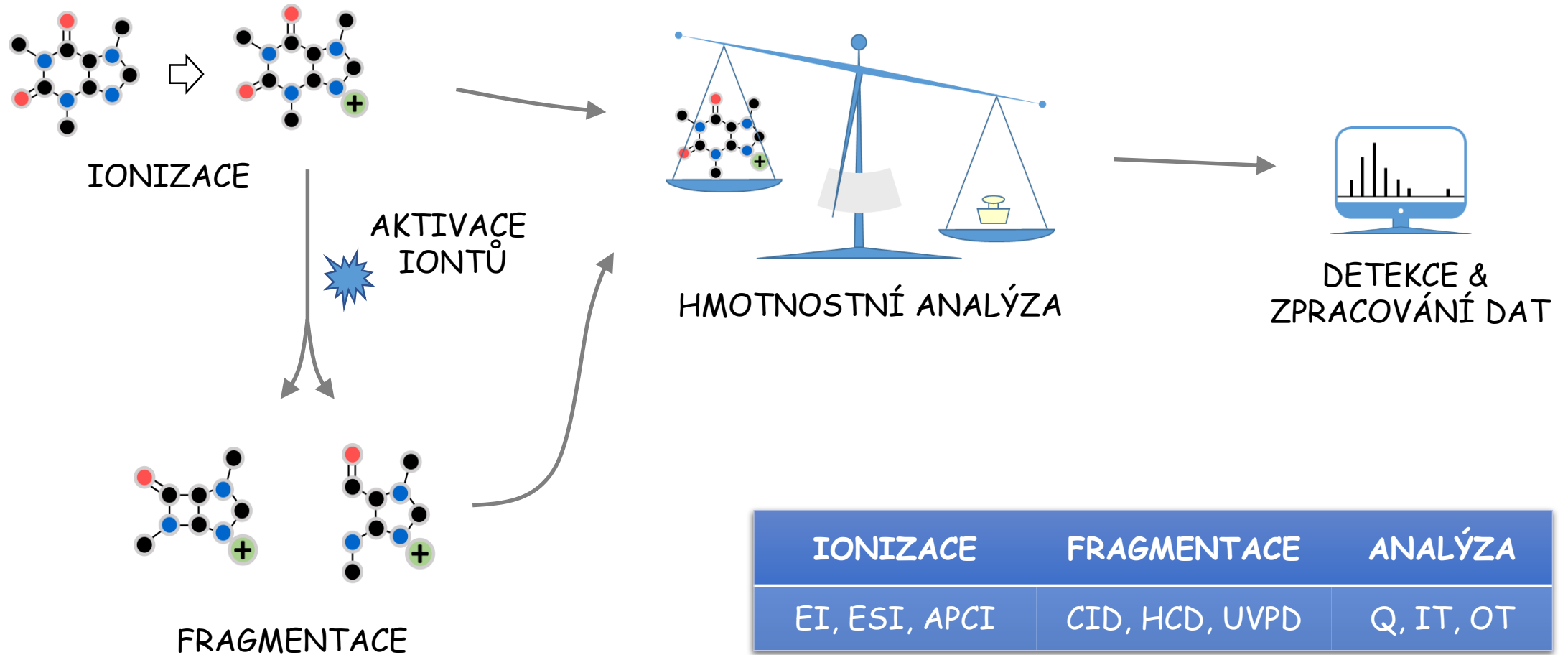
Pozice větvení alifatického řetězce

Absolutní konfigurace v místě větvení (*R* vs. *S*)

Pozice násobných vazeb v řetězci

Geometrie na dvojně vazbě (*Z* vs. *E*)

Hmotnostní spektrometrie



Co lze zjistit o struktuře lipidů ze spekter?

Relativně snadno:

- molekulovou hmotnost, sumární vzorec
- určení lipidové třídy v případě známých lipidů (identifikace polární hlavičky)
- délky a stupně nenasycení jednotlivých alifatických řetězců

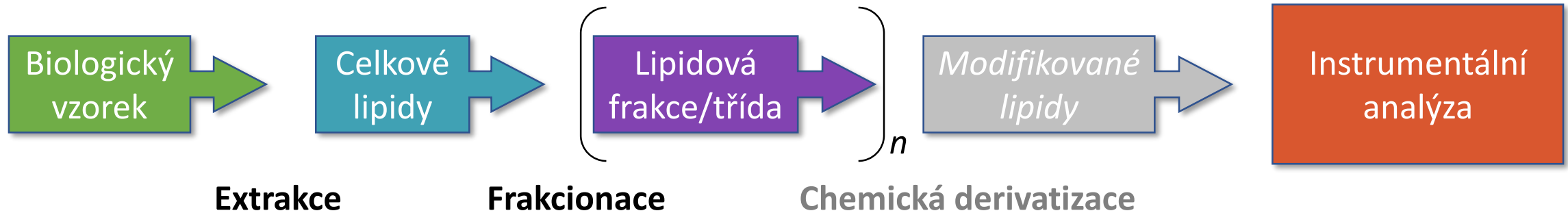


Složitě nebo vůbec:

- strukturu polární hlavičky v případě nových lipidových tříd
- polohy alifatických řetězců na polární hlavičce (glycerolu)
- polohy větvení, násobných vazeb a dalších funkčních skupin v alifatických řetězcích
- geometrii na dvojných vazbách
- absolutní konfiguraci na chirálních uhlících



Příprava vzorku ke strukturní analýze



*Extrakce rozpouštědly
(kapalina/kapalina)*

- Folchova metoda
- Bligh-Dyerova metoda
- Extrakce MTBE

*Chromatografické
dělení směsí lipidů*

- TLC
- Kolonová LC
- HPLC

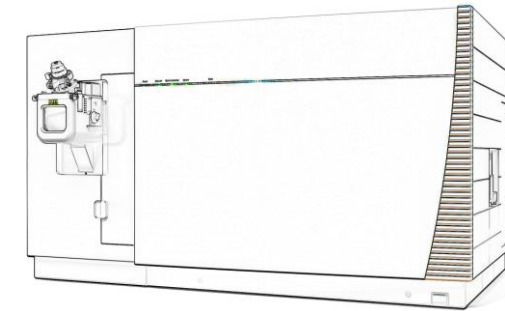
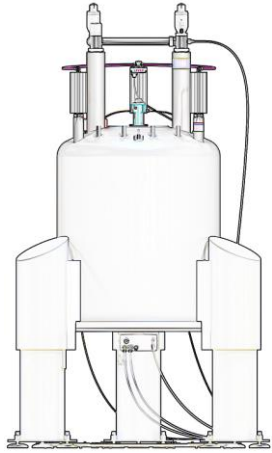
*Případná chemická
derivatizace*

- Hydrolýza
- Modifikace
funkčních skupin

*Strukturní analýza
lipidů*

- Přímá (MS, MSⁿ)
- GC-MS
- LC-MS

MS vs. NMR ve strukturní analýze



NMR

Velmi podrobná - přímé informace o propojení atomů, stereochemii a konformaci

Nižší

Problematická - překrývání signálů u komplexních vzorků

Strukturní informace

Citlivost

Analýza směsí

MS

Limitovaná - určení molekulové hmotnosti a elementárního složení, strukturní informace na základě fragmentací iontů

Velmi vysoká

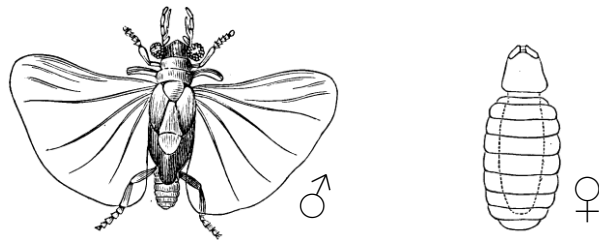
Snadná - spojení s chromatografií, vysoká separační účinnost MS

Kapitola 1.

Identifikace feromonu
řasníka

Řasníci (Strepsiptera)

- málo prozkoumaní paraziti hmyzu (např. včely, vosy, rybenky...)
- bezkřídle samičky trvale přichyceny v hostiteli, okřídlení samečci žijí jen několik hodin
- dospělá samice produkuje malé (1/4 mm) larvičky, které dokáží skákat pomocí zadečkových štětů
- řasníci mění chování hostitele: parazitované včely vylétají na jaře dříve než zdravé, páření řasníka během několika málo dní brzy na jaře
- samička vydává silný feromonový signál

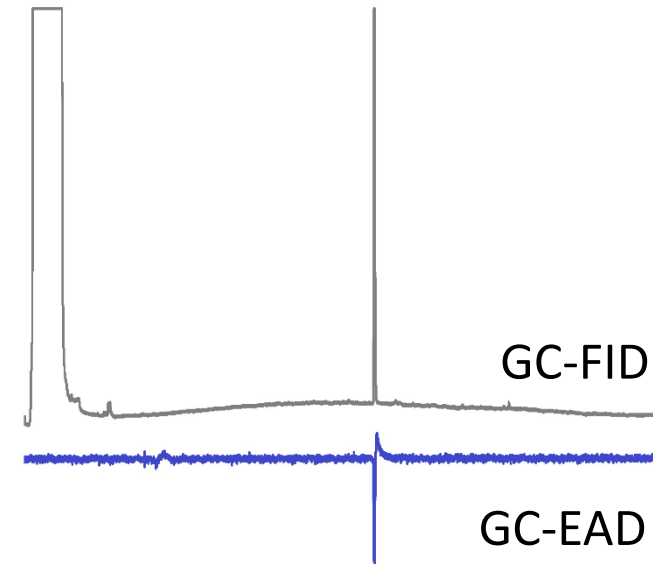
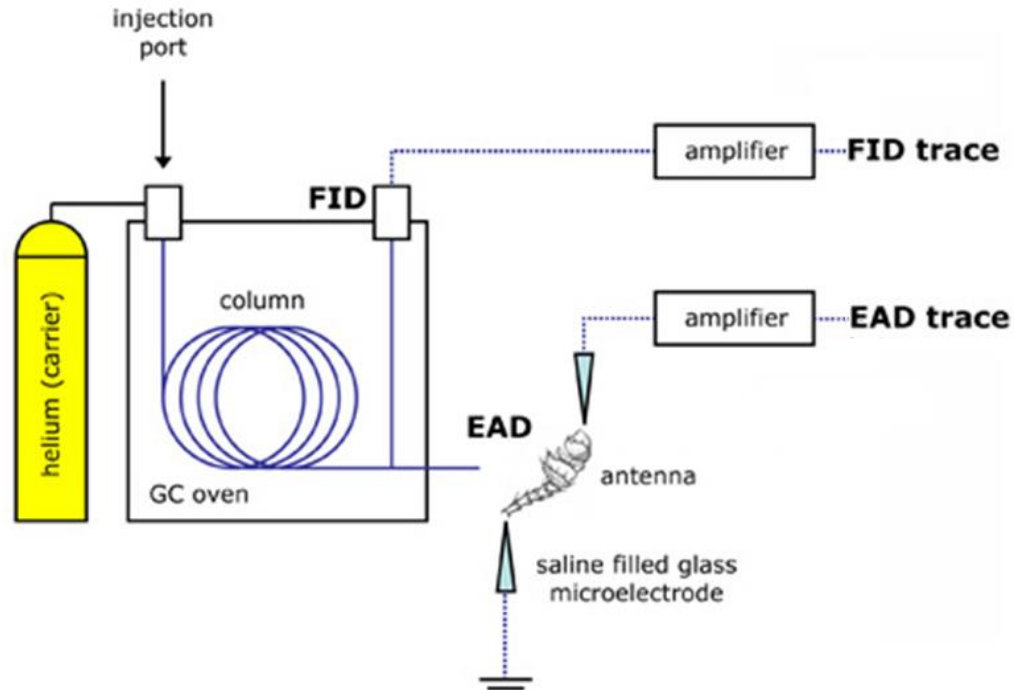


Páření *Stylops muelleri* na včele pískorypce potulné →
(*Andrena vaga*)



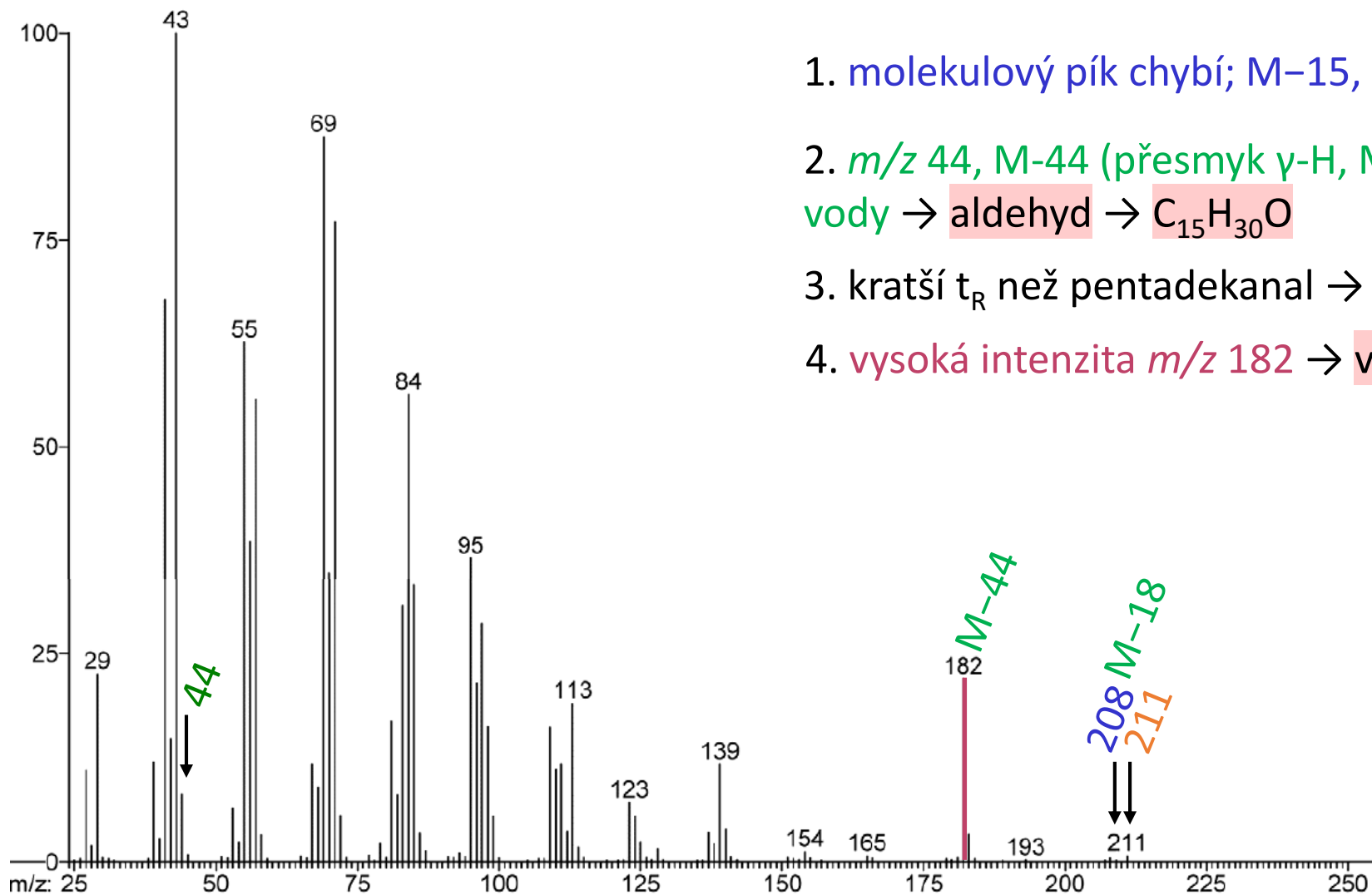
Identifikace feromonu *S. muelleri*

Elektroantenografie: měření signálu z hmyzího tykadla do mozku. Na tykadlo připojené k elektrodovému systému se přivádí separované látky z GC kolony.



- hlavní komponenta v extraktu samice byla jediná aktivní látka = feromon

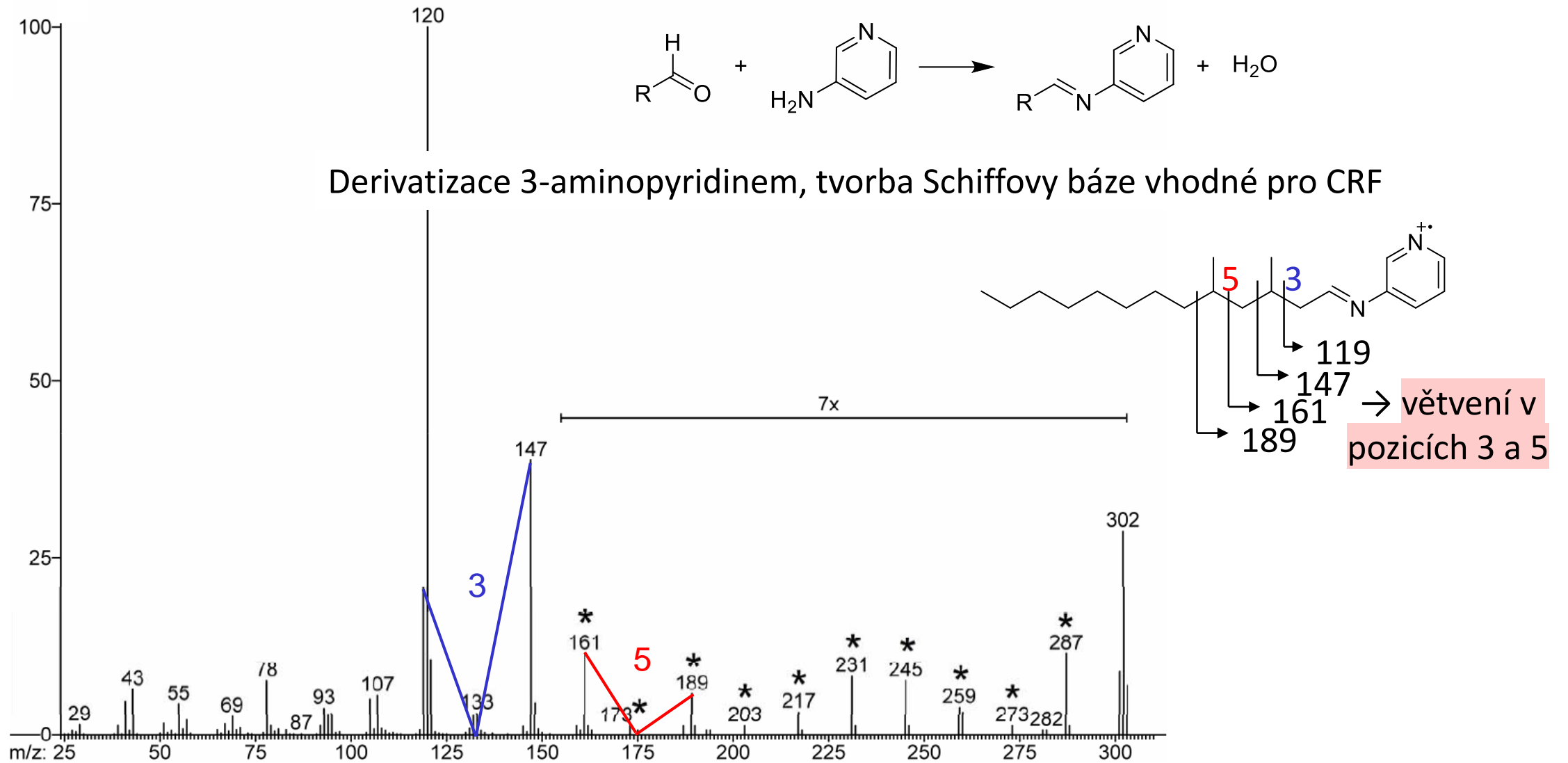
Identifikace feromonu *S. muelleri*



1. molekulový pík chybí; M-15, M-18 → M=226
2. m/z 44, M-44 (přesmyk γ -H, McLafferty), ztráta vody → aldehyd → $C_{15}H_{30}O$
3. kratší t_R než pentadekanal → větvení řetězce
4. vysoká intenzita m/z 182 → větvení v poloze 3

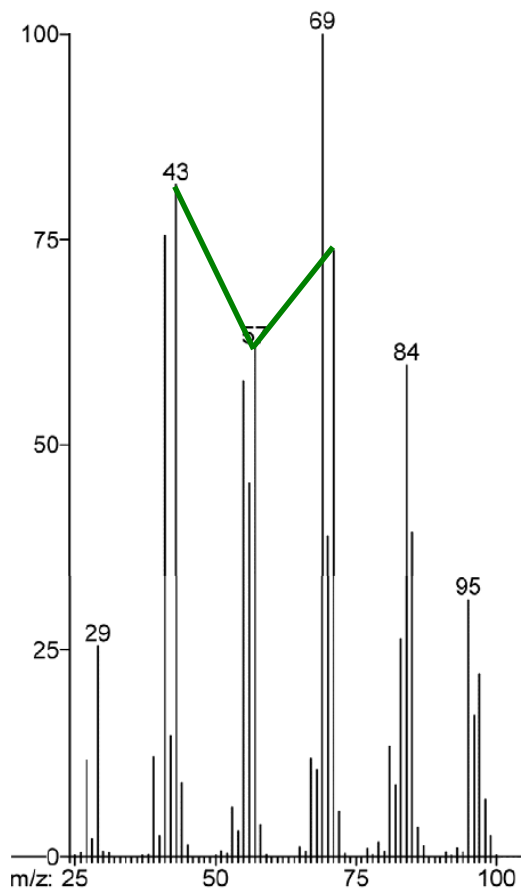
EI spektrum

Identifikace feromonu *S. muelleri*

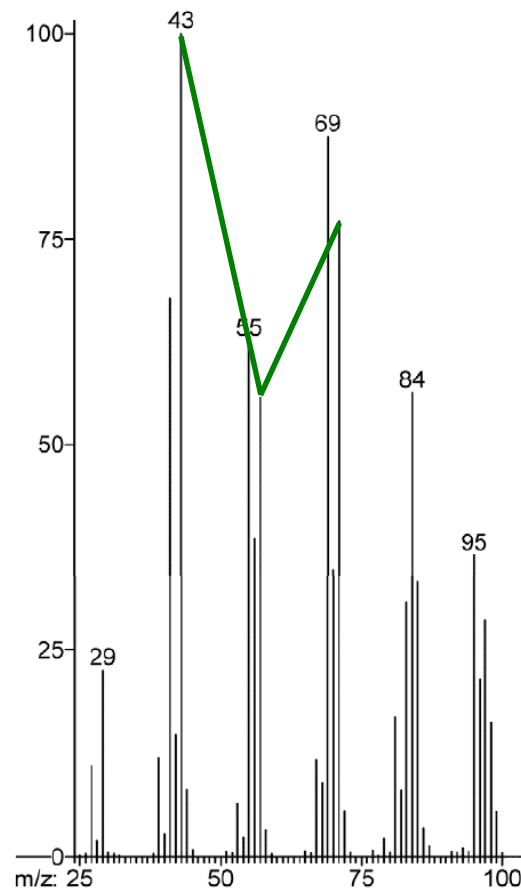


Identifikace feromonu *S. muelleri*

Porovnání intenzit fragmentů alkylové série C_nH_{2n+1}



3,5-dimethyltridekanal



feromon

relativně nižší intenzita m/z 57 u
feromonu → možné větvení na n-4 uhlíku

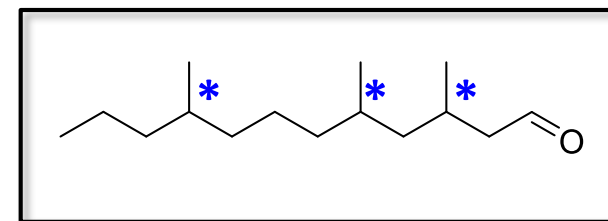


syntéza

3,5,9-tridemethyldodekanalu



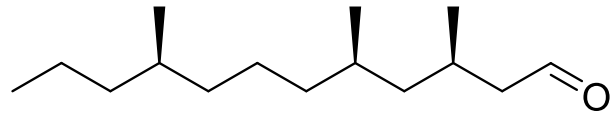
retenční časy shodné



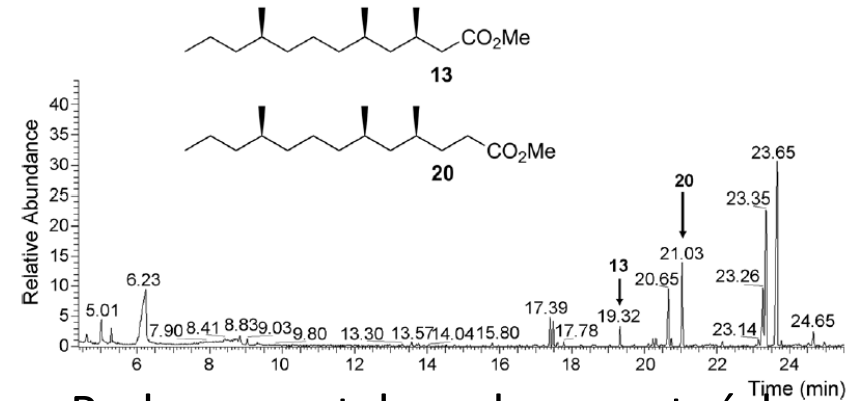
3 chirální centra !

Identifikace feromonu *S. muelleri*

Stylopsal



(3*R*,5*R*,9*R*)-trimethyldodekanal



Prekurzory stylopsalu v mastných kyselinách tukového tělesa řasníka



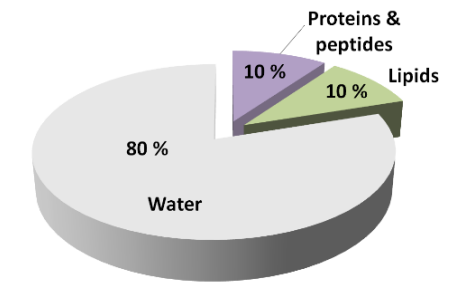
Lapač se 140 μg stylopsalu

Kapitola II.

Identifikace nové lipidové třídy v
novorozeneckém mázku

Novorozenecký mázek

- bílá sýrovitá hmota, pokrývající kůži plodu během posledního trimestru těhotenství a obvykle i kůži novorozence
- směs odloučených buněk peridermu a sekretu mazových žláz



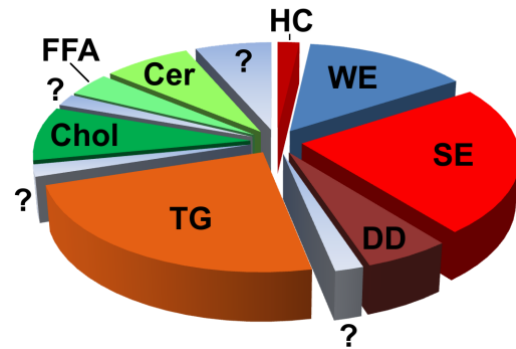
Funkce:

- ochrana kůže před macerací v plodové vodě
- usnadnění postnatální adaptaci kůže (ochrana před vysycháním a infekcemi)

Vlastnosti: antimikrobiální, antioxidační a hydratační vlastnosti, hojivé účinky

Potenciální využití: ochrana kůže nedonošených dětí, léčba popálenin, kožních chorob, bércových vředů

Lipidy novorozeneckého mázku



Výzkum:

- podrobná charakterizace lipidomu novorozeneckého mázku a jeho vztahu k předčasným porodům

→ lepší pochopení vývoje lidského plodu

→ syntetická náhražky pro léčebné účely

Lipidy kůže a mázku se významně liší od lipidů ostatních orgánů a tkání

Složitost (complexity): mimořádně velký počet lipidových tříd a molekulových druhů

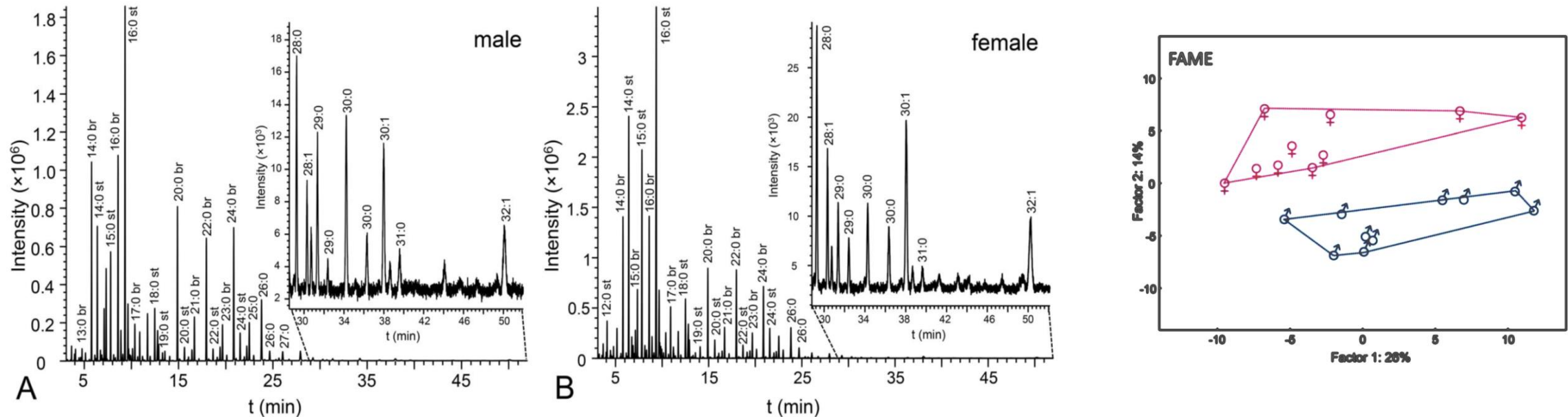
Zvrácenost (perversity): lipidy s lichým počtem uhlíků v řetězcích, dvojně vazby v neobvyklých polohách, extrémně dlouhé alifatické řetězce, velké množství volných (neesterifikovaných) mastných kyselin

Odlišné složení mázku u chlapců a dívek



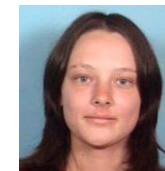
Radka Míková

GC-MS mastných kyselin (FAMES) z celkového lipidového extraktu

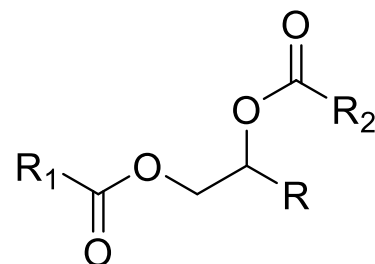


Statisticky významné rozdíly v zastoupení neutrálních lipidů a unikátní FAMES u chlapců a dívek odráží rozdíly v činnosti mazových žláz, která je řízena hormonálně

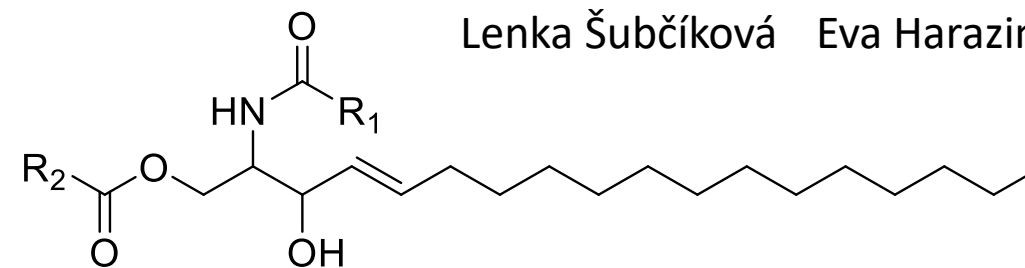
Příklady lipidů v mázku



Lenka Šubčíková Eva Harazim



Diestery 1,2-diolů

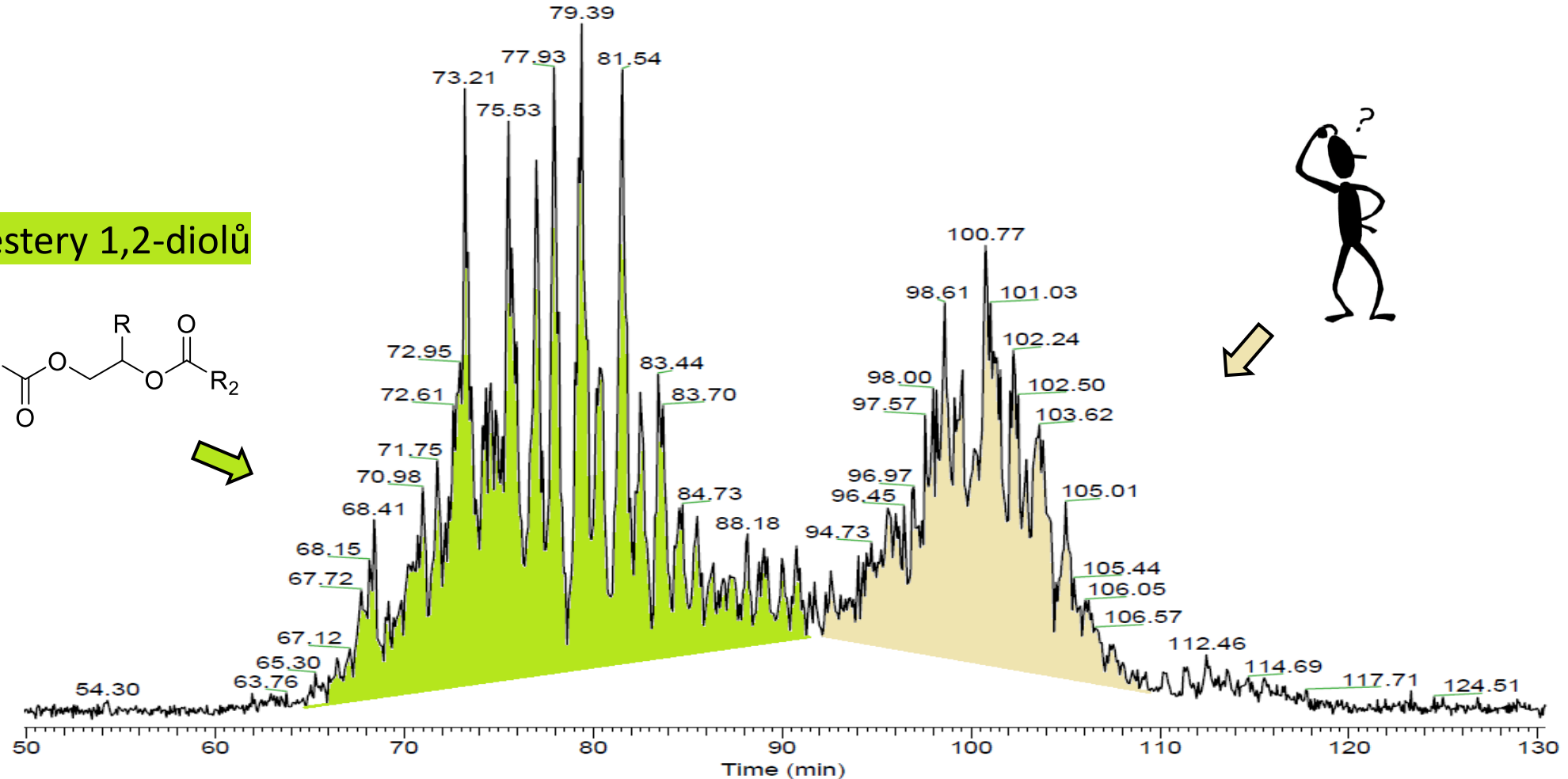
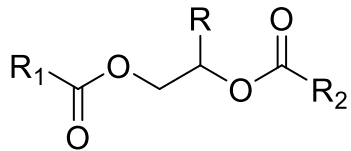


Nehydroxylované 1-O-acylceramidy

Identifikace třídy:	<i>T. Nikkari, 1974</i>	<i>E. Harazim et al., 2018</i>
Podrobná analýza:	<i>L. Šubčíková et al., 2015</i>	<i>E. Harazim et al., 2018</i>
Počet identifikovaných:	2250	972 (> 2300 detegováno)
Délky acylů:	R1, R2 = C8-C32	R1 = C12-C39, R2 = C11-C38
Délky alkoholů/báze:	R = 8-34	Sfingoidní báze C16-C24
Příklad:	22:0//16:0_18:1 (Alc//FA_FA)	24:0;d18:1;26:0 (estFA; Sfing; amidFA)

Neznámé lipidy v novorozeneckém mázku

diestery 1,2-diolů



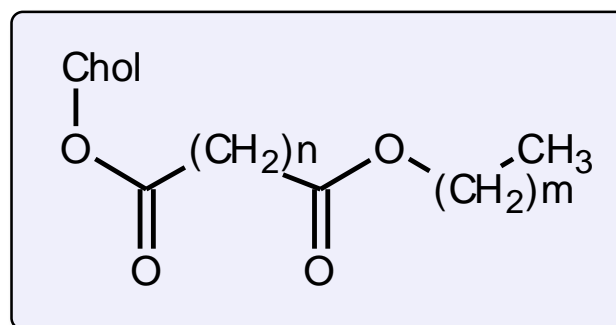
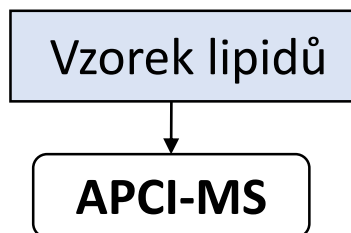
NARP-HPLC: Nova-Pak C18, gradient ethylacetát/acetonitril

Neznámé lipidy v novorozeneckém mázku



Aneta Vavrušová

POSTUP STRUKTURNÍ ANALÝZY:

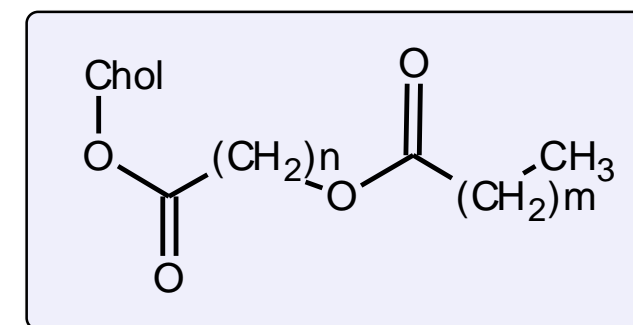


cholesterol

dikarboxylová kyselina

alifatický alkohol

nebo



cholesterol

mastná hydroxykyselina

mastná kyselina

Zjištění:

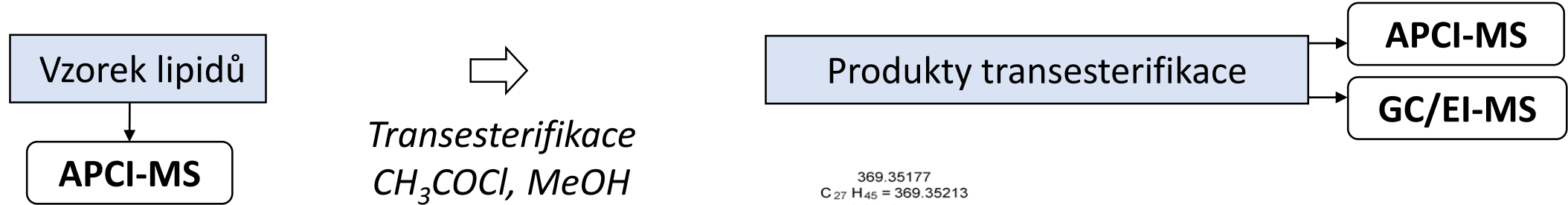
m/z 1000-1400; počet kyslíků **4**;

RDBE 6.5-9.5; ztráta **368 Da** ($C_{27}H_{44}$)

→ pravděpodobně diester obsahující cholesterol

Neznámé lipidy v novorozeneckém mázku

POSTUP STRUKTURNÍ ANALÝZY:



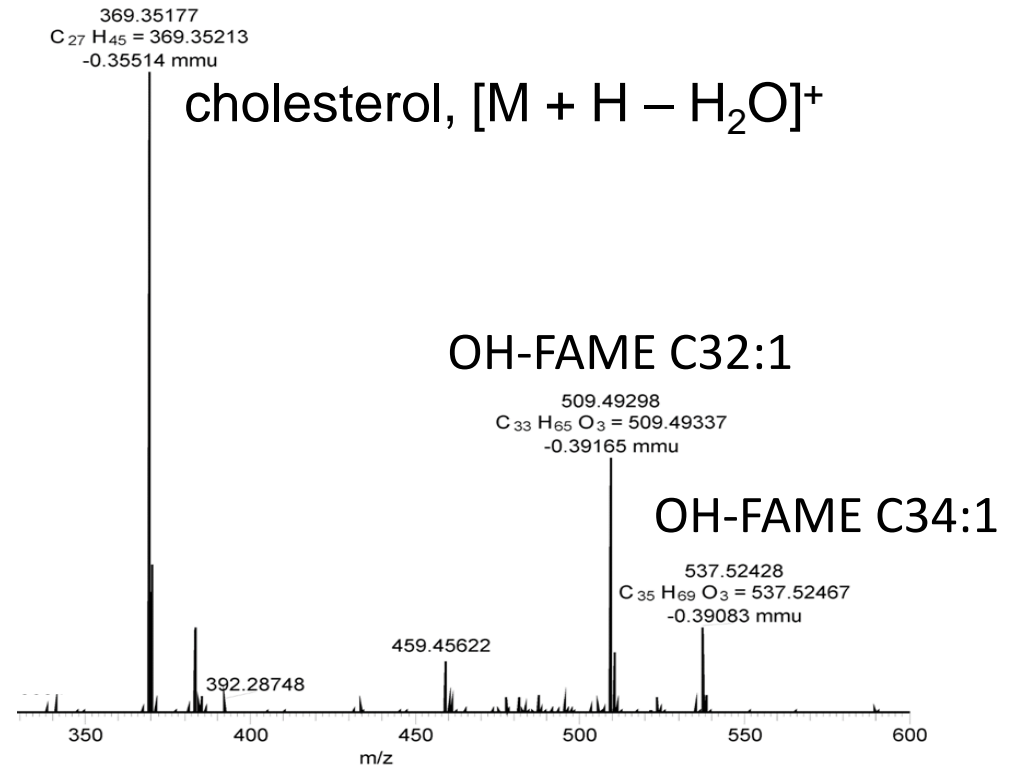
Zjištění:

cholesterol

mastná hydroxykyselina

mastná kyselina

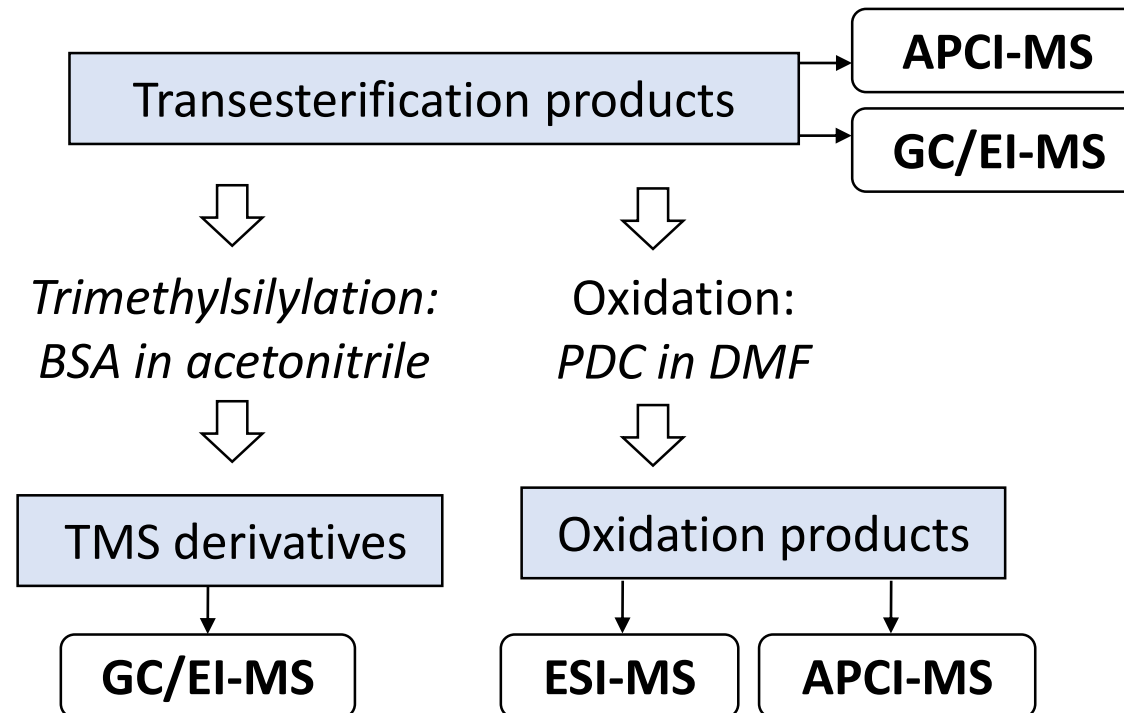
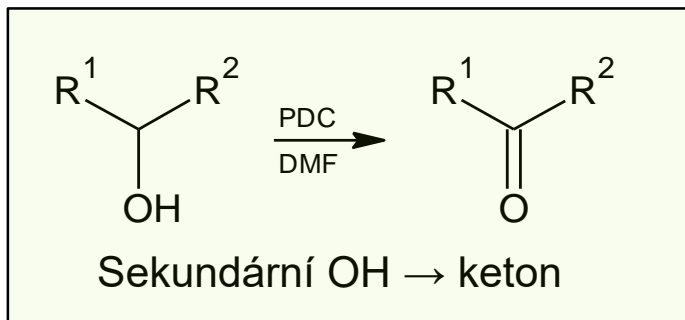
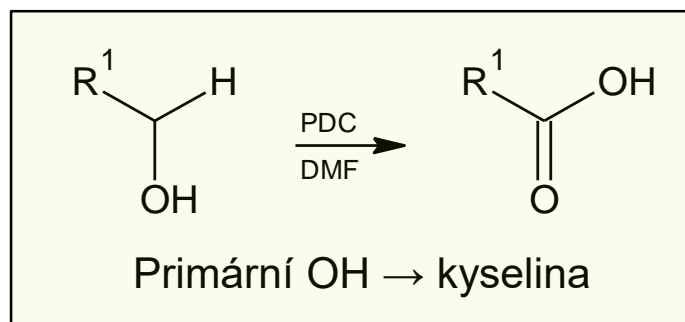
Jaká je poloha hydroxyskupiny ?



Neznámé lipidy v novorozeneckém mázku

POSTUP STRUKTURNÍ ANALÝZY:

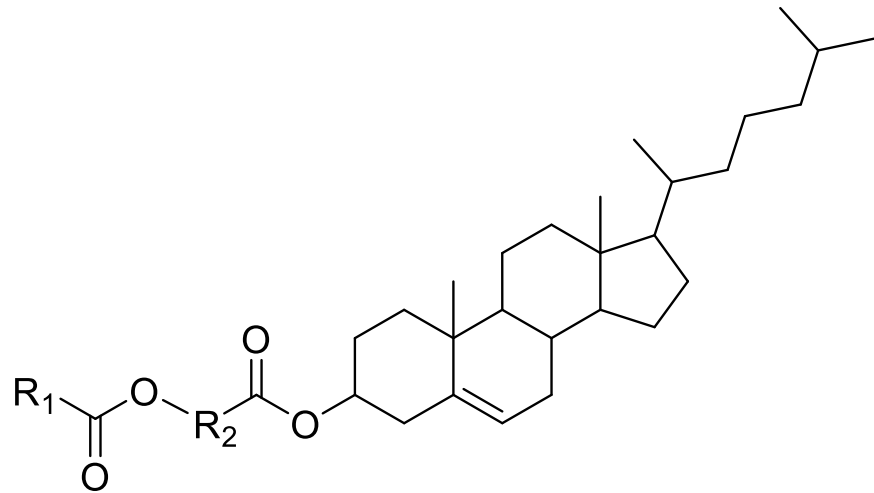
Oxidace alkoholů pyridinium dichromátem v DMF



Zjištění:

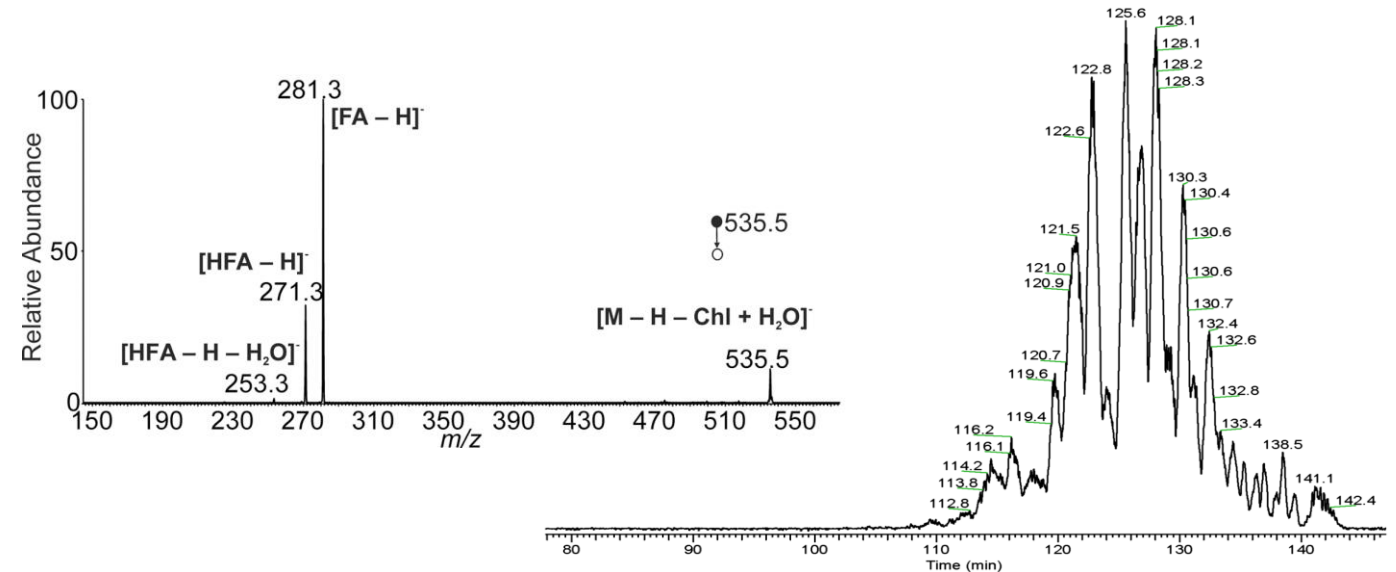
APCI-MS: 4 kyslíky v produktech: primární hydroxyly
GC-MS: ω-hydroxy mastné kyseliny

Neznámé lipidy v novorozeneckém mázku



Cholesteryl estery
 ω -(O-acyl)-hydroxymastných kyselin

PODROBNÁ HPLC-MS² ANALÝZA:



NARP-HPLC: Nova-Pak C18, gradient ethylacetát/acetonitril
MS: APCI MS² (CID), negativní mód, 500 °C

Identifikováno **295** diesterů (**32** ω -OHFA , **34** FA); ω -OHFA: **C24 - C38**, FA: **C12 - C28**, dvojné vazby v ω -OHFA: ***n*-7** a ***n*-9**; *nejvíce zastoupené* **15:0/32:1-Chl**, **14:0/32:1-Chl** (R1/R2-Chl)

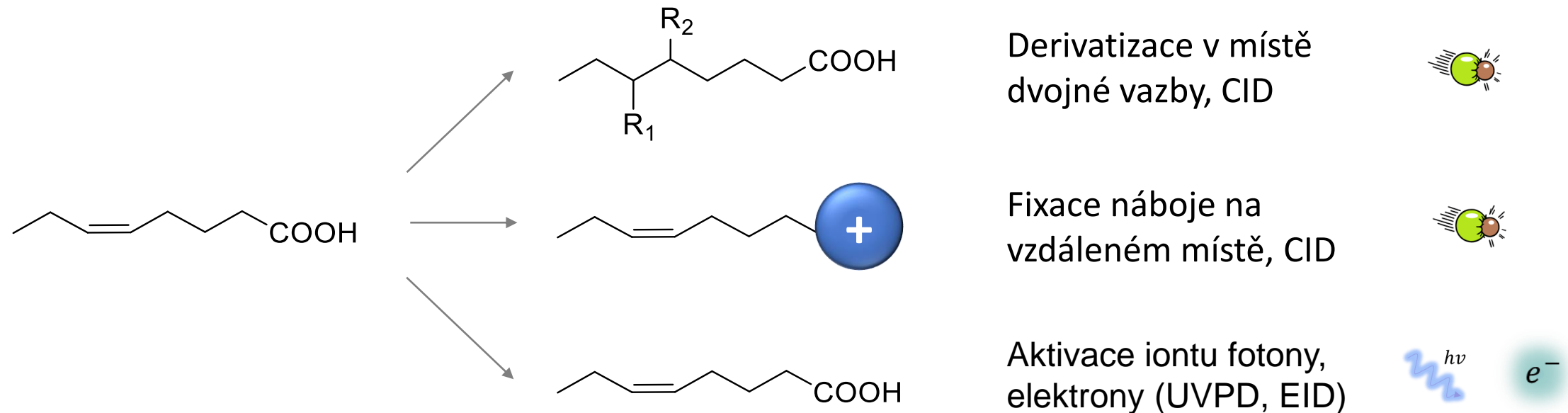
Kapitola III.

Určování poloh dvojné vazby -
methylpyrrolinové deriváty

Hmotnostní spektra a polohy dvojných vazeb

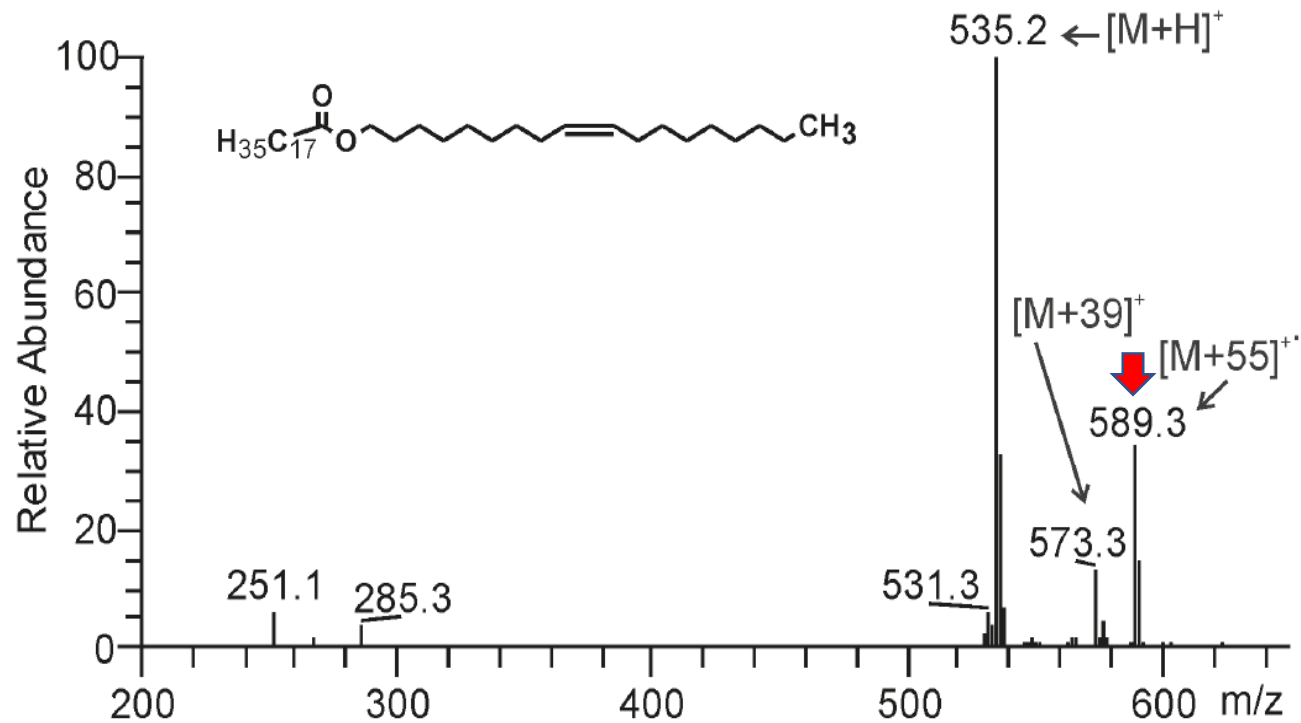
Hmotnostní spektra lipidů obvykle neposkytují informace o poloze dvojně vazby v řetězci

- silná tendence iontů nenasycených sloučenin k izomerizacím (elektronová ionizace)
- přednostní fragmentace v místě nejslabších vazeb (kolizně indukovaná disociace)

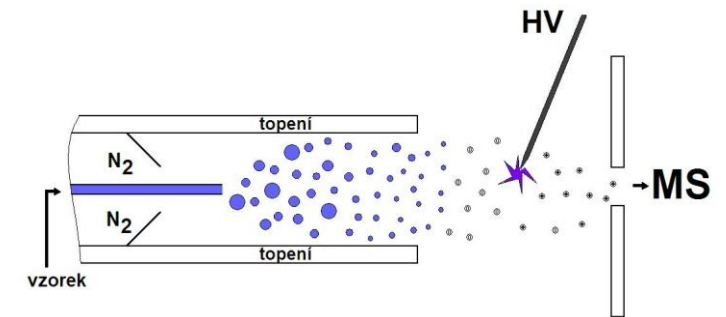


Tvorba methylpyrrolinových derivátů

APCI spektrum oleylstearátu



Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)



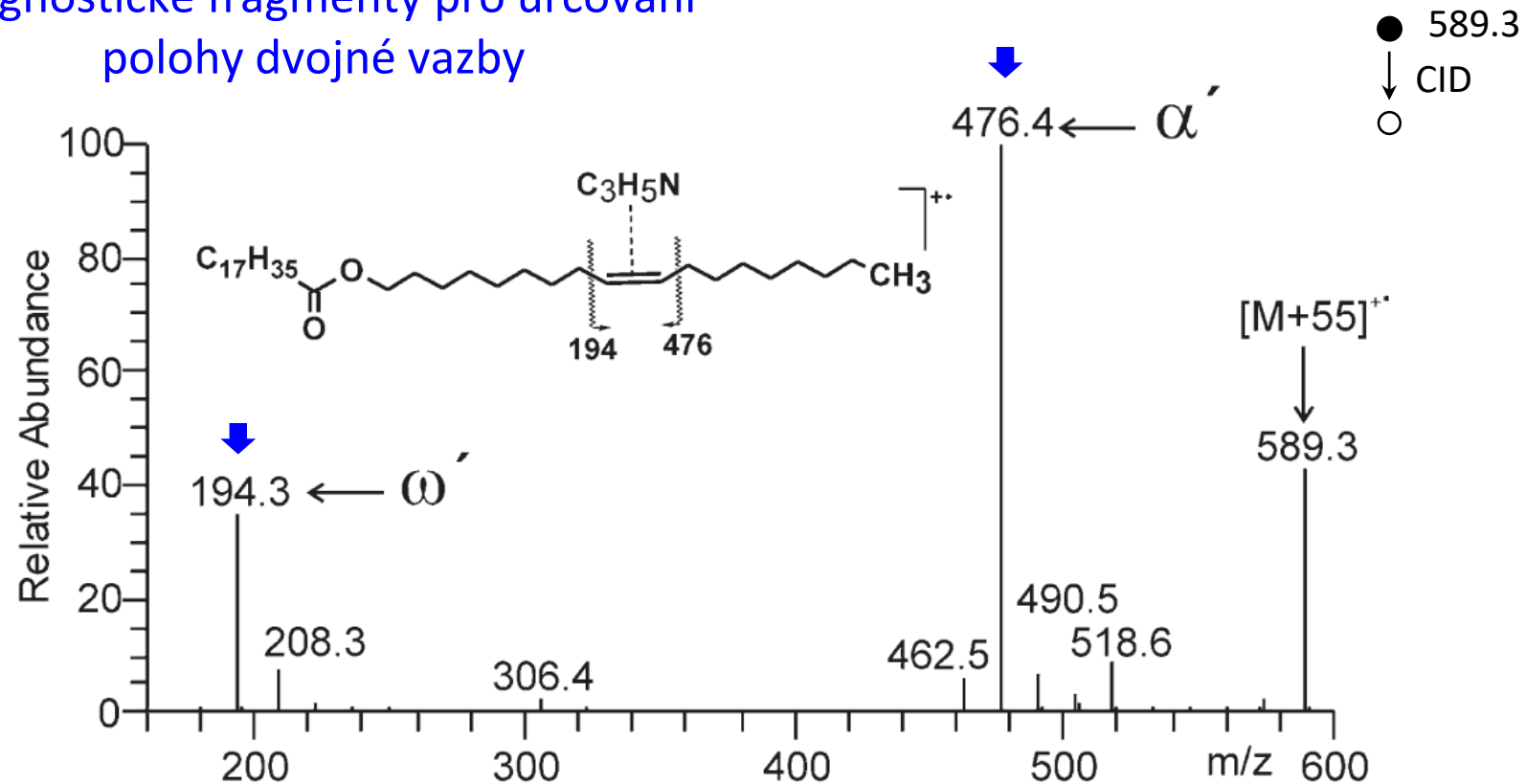
V přítomnosti acetonitrilu jsou v APCI spektrech nenasycených lipidů pozorovány adukty $[M + 55]^+$

Fragmentace methylpyrrolinových derivátů



MS/MS iontu $[M + 55]^{+\bullet}$

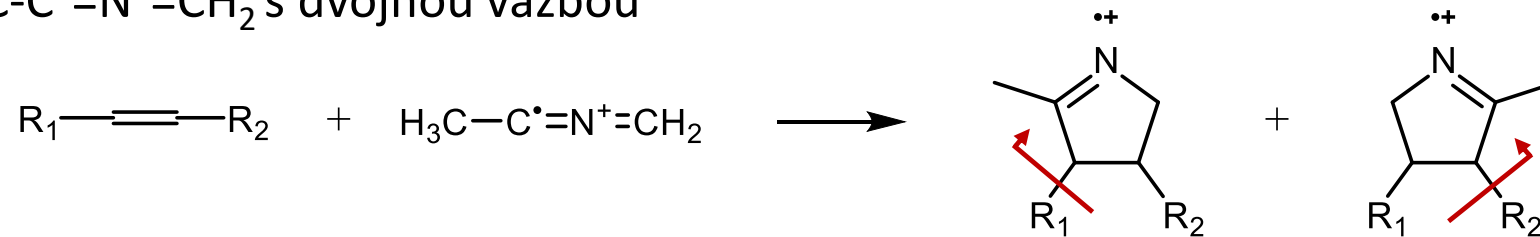
Diagnostické fragmenty pro určování
polohy dvojné vazby



Methylpyrrolinové deriváty

1. Tvorba reakčního iontu $\text{H}_3\text{C}-\text{C}^\bullet=\text{N}^+=\text{CH}_2$ (m/z 55) v APCI zdroji

2. Reakce $\text{H}_3\text{C}-\text{C}^\bullet=\text{N}^+=\text{CH}_2$ s dvojnou vazbou



3. Fragmentace methylpyrrolinových derivátů: otevření kruhu (α -štěpení), ztráta alkylového radikálu \rightarrow vznik dvou diagnostických fragmentů

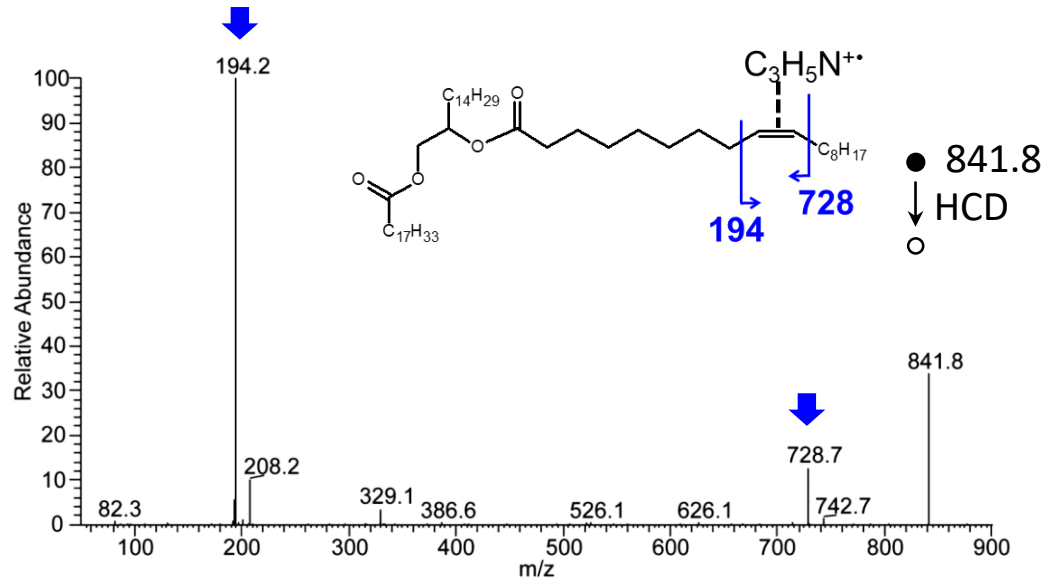
Jednoduchost experimentu: jediným požadavkem je přítomnost acetonitrilu v iontovém zdroji (mobilní fáze obsahující acetonitril)

Využití methylpyrrolinových derivátů

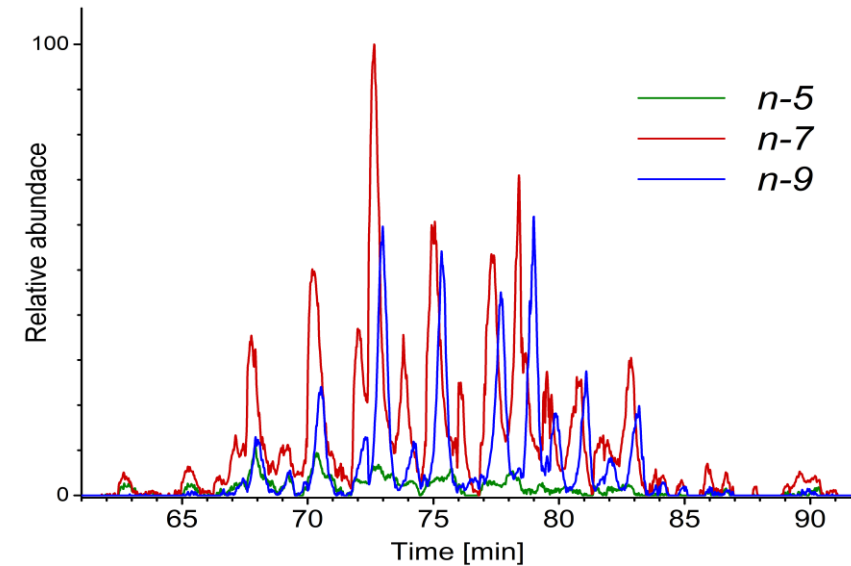


Lenka Šubčíková

Diestery 1,2-diolů v novorozeneckém mázku



Identifikace: 16:0//18:1n-9/18:1n-9



Chromatogram rekonstruovaný pro ionty určující polohu dvojné vazby

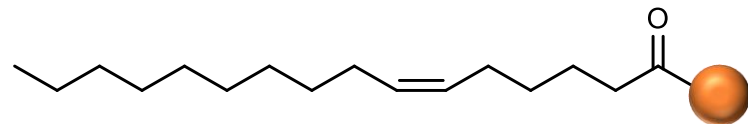
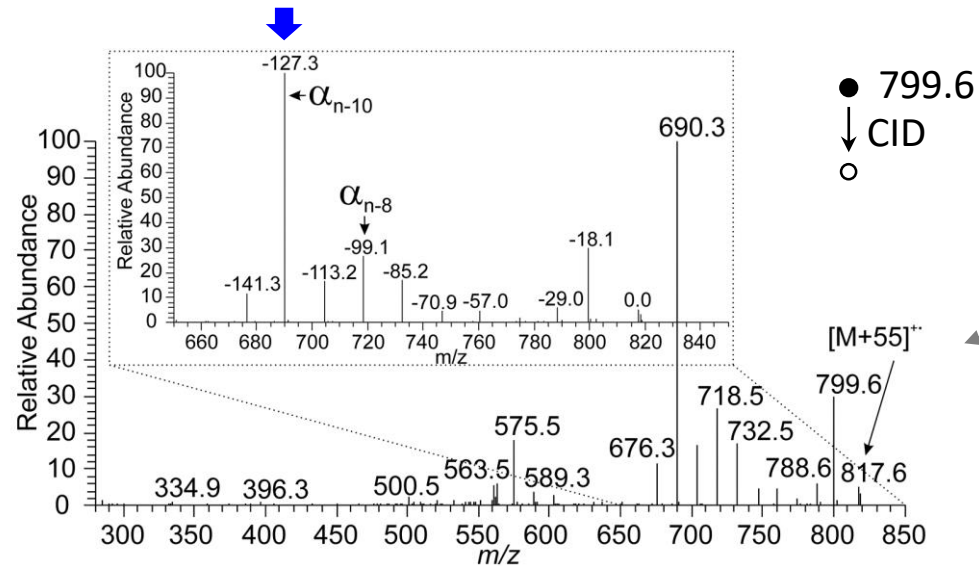
HPLC-APCI MS²: Nova-Pak C18 (300+150 mm×3.9 mm; 4 μm; Waters), gradient acetonitril – ethylacetát, DDA

Využití methylpyrrolinových derivátů



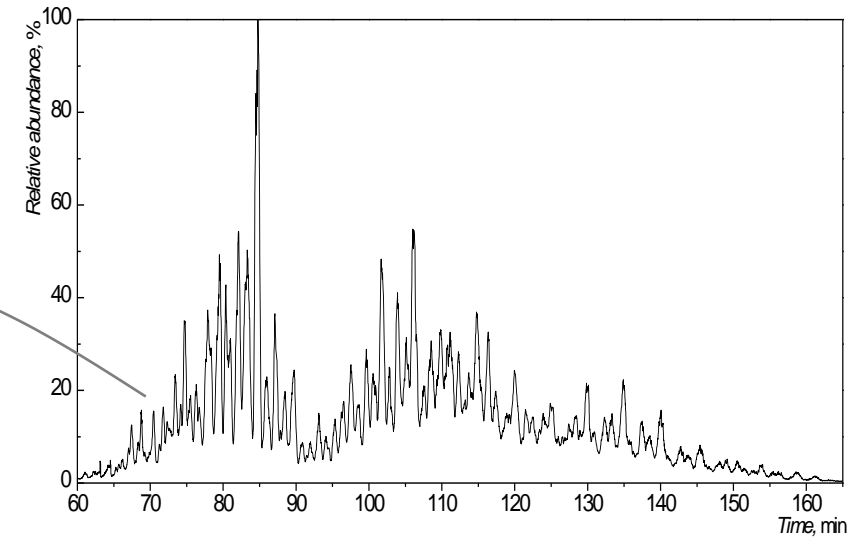
Eva Harazim

Triacylglyceroly v novorozeneckém mázku



kyselina sapienová (cis-6-hexadecenová)

t_R 70.0 min



Chromatogram TG v mázku;
tisíce molekulových druhů

HPLC-APCI MS²: Nova-Pak C18 (300+150 mm×3.9 mm; 4 μm; Waters), gradient acetonitril – 2-propanol, DDA

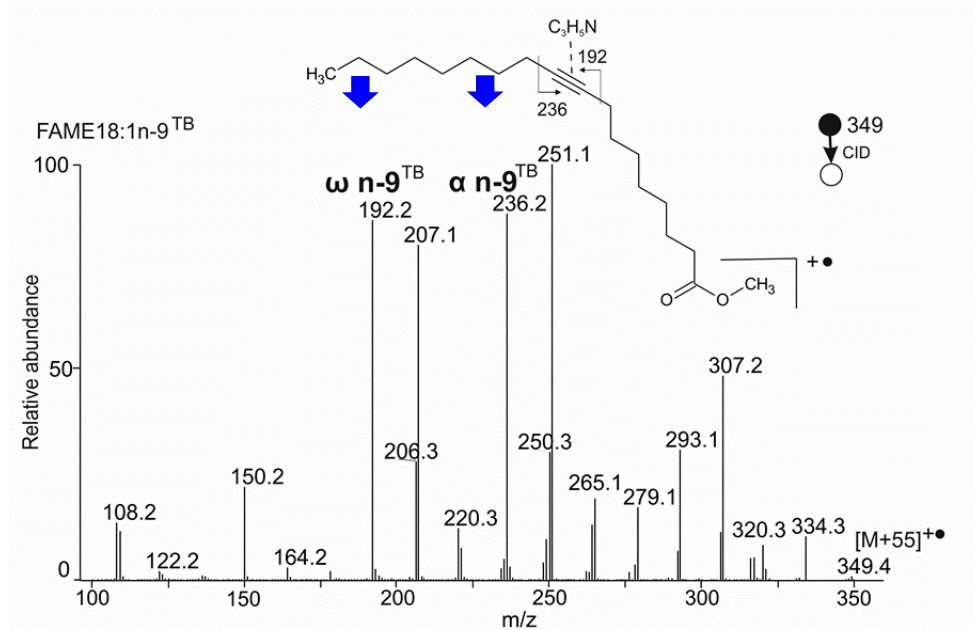
Využití methylpyrrolinových derivátů



Petra Horká

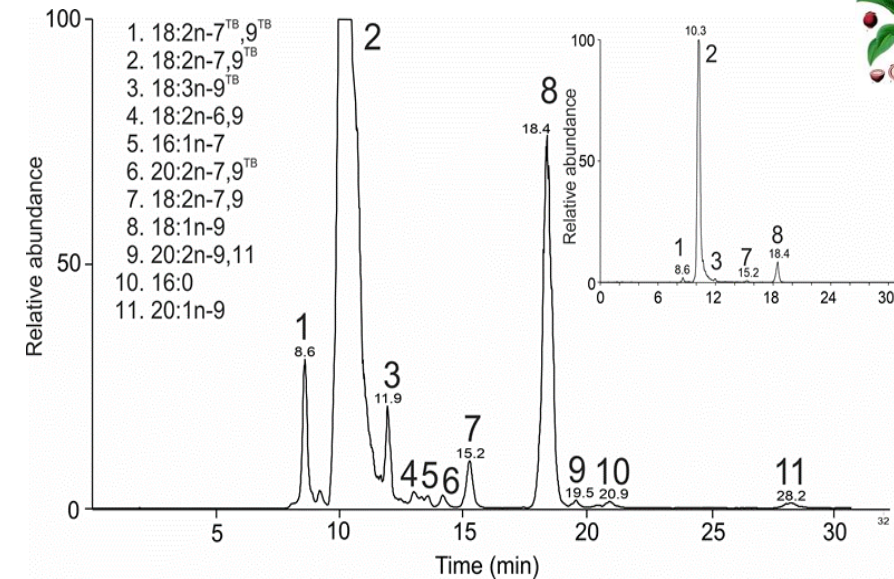
Trojná vazba a neobvyklá uspořádání násobných vazeb ve FAMES

Trojná vazba: abundantní satelitní píky +15 Da
(u dvojně vazby +14 Da)



Methyl ester kyseliny stearolové (9-oktadecinové)

Chromatogram FAMES ze semen santalovníku *Santalum album*



HPLC-APCI MS/MS: Develosil RP-Aqueous C30
(250 x 4.6 mm, 5 μm; mobilní fáze acetonitril)

Využití methylpyrrolinových derivátů

Koncept MBR (multiple bond region):

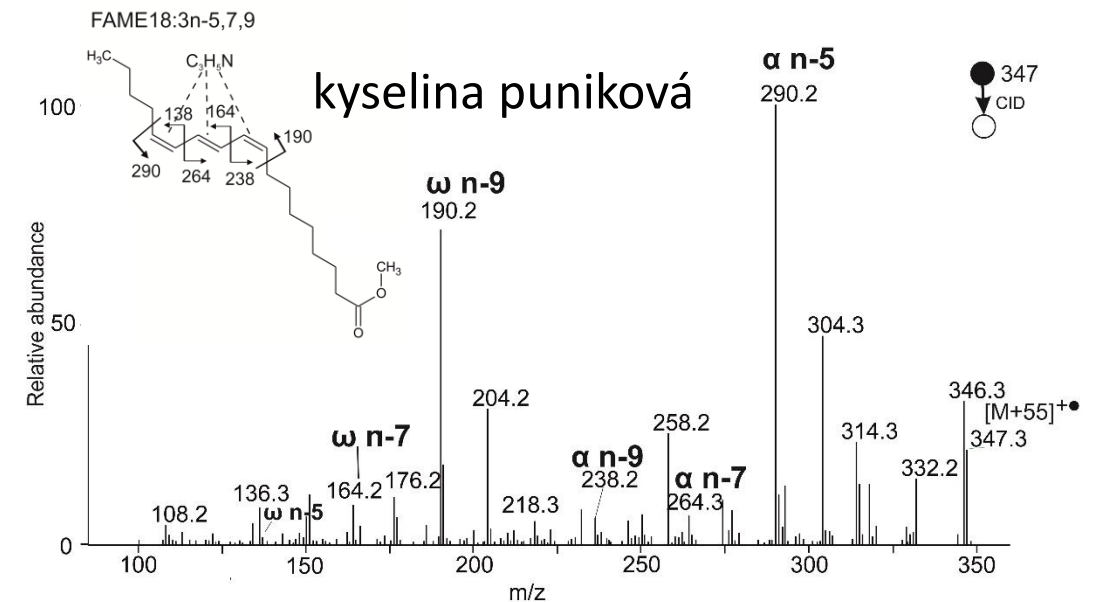
- nejvíce abundantní fragmenty ve spektru odpovídají štěpení před první a za poslední násobnou vazbou
- hmotnost polynenasycené části se liší v závislosti na uspořádání vazeb

$$MBR = m/z(\alpha) + m/z(\omega) - m/z([M + 55]^{+\bullet})$$

MBR	Uspořádání
79	-C≡C-
81	-CH=CH-
93	-CH=C=CH-
103	-C≡C-C≡C-
107	-CH=CH-CH=CH-
121	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-
133	-CH=CH-CH=CH-CH=CH-

MBR:

190 + 290 – 347 = 133;
tři konjugované dvojné



Kapitola IV.

UVPD esterových lipidů

Fotodisociace UV zářením (UVPD)

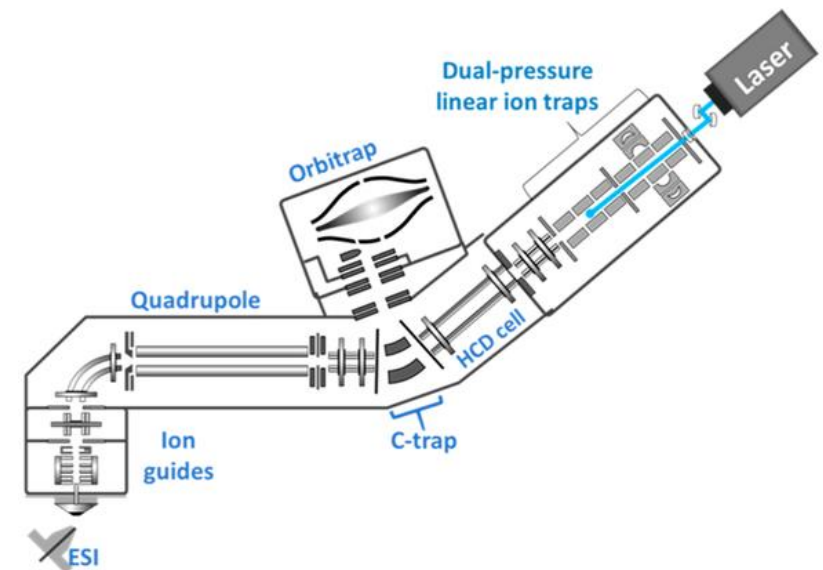


Dvě fragmentační cesty po absorpci fotonu:

- 1/ excitace do vyššího elektronového stavu, *rychlá fragmentace* bez redistribuce energie (přímá štěpení vazeb)
- 2/ excitace do vyššího elektronového stavu, *redistribuce energie* do vibračních módů (fragmentace podobná CID)

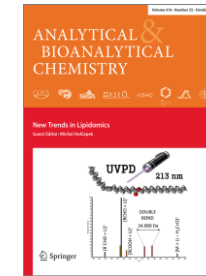
Orbitrap Lumos Fusion (Thermo):

- UVPD v iontové pasti (nízkotlaká část duální pasti)
- Nd:YAG laser, 213 nm



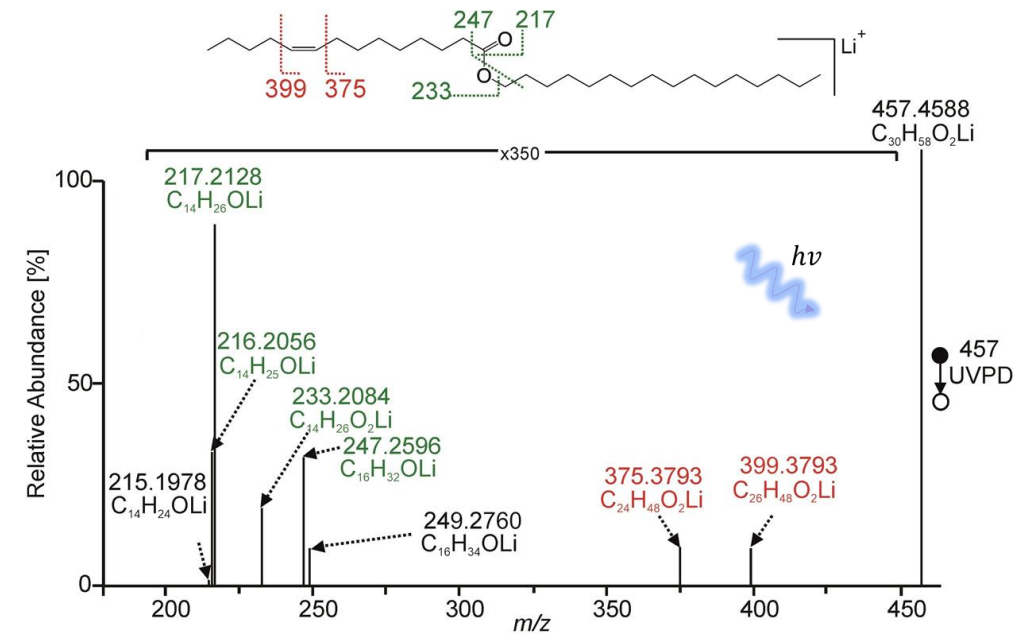
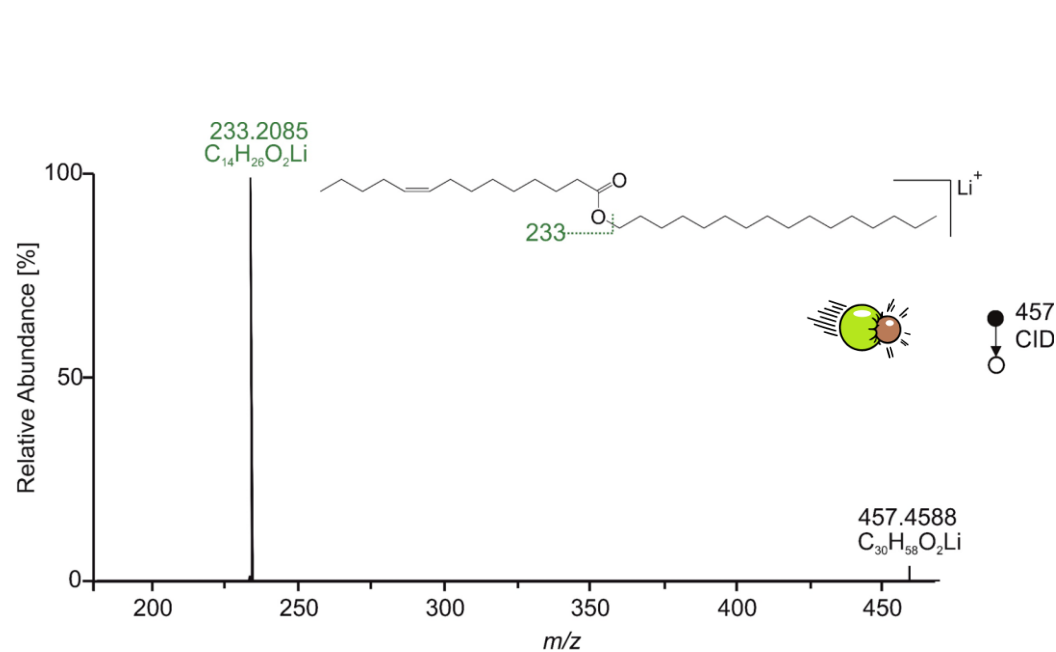
UVPD vs. CID voskových esterů

Fragmentační studie lithných aduktů voskových esterů, přímé zavádění vzorků



Barbora Kloudová

Palmityl myristoleát WE(16:0/14:1(9Z))

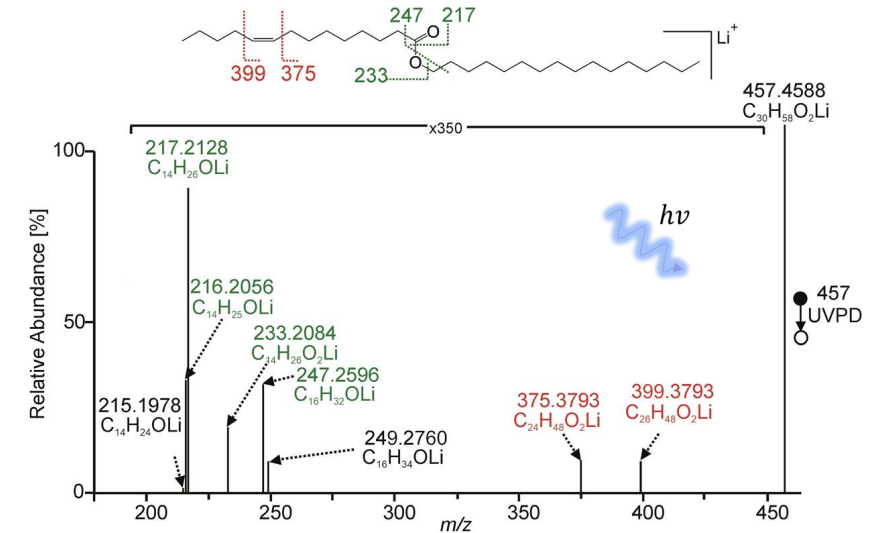
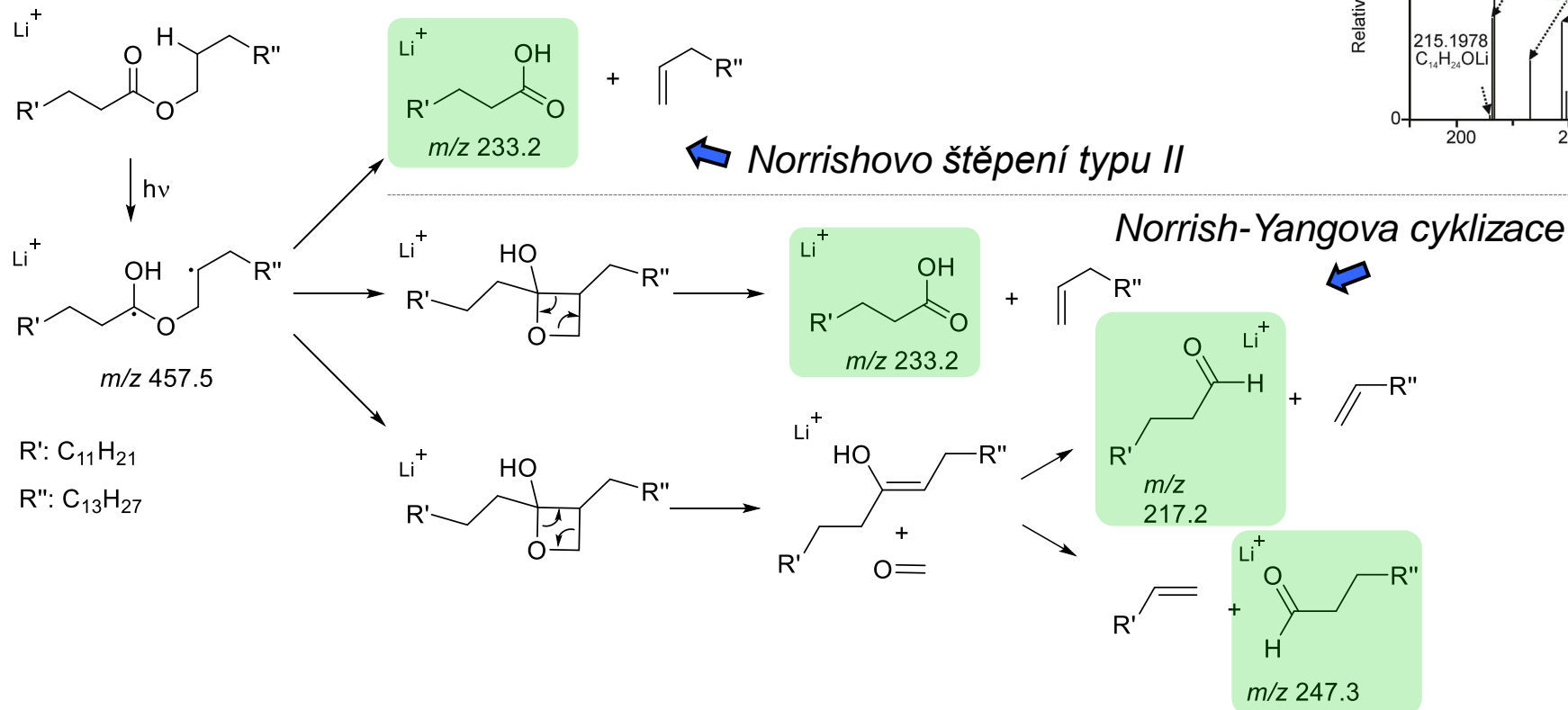


Neutrální ztráta alkenu z alkoholového řetězce

Fragmenty odrážející fotochemické reakce na esterové skupině a dvojně vazbě

Fotofragmentace na esterové vazbě

Norrishovy reakce probíhají na ketonech a aldehydech. Zahrnují fotochemické štěpení (typ I) nebo fotochemickou intramolekulární abstrakci γ -vodíku (typ II)

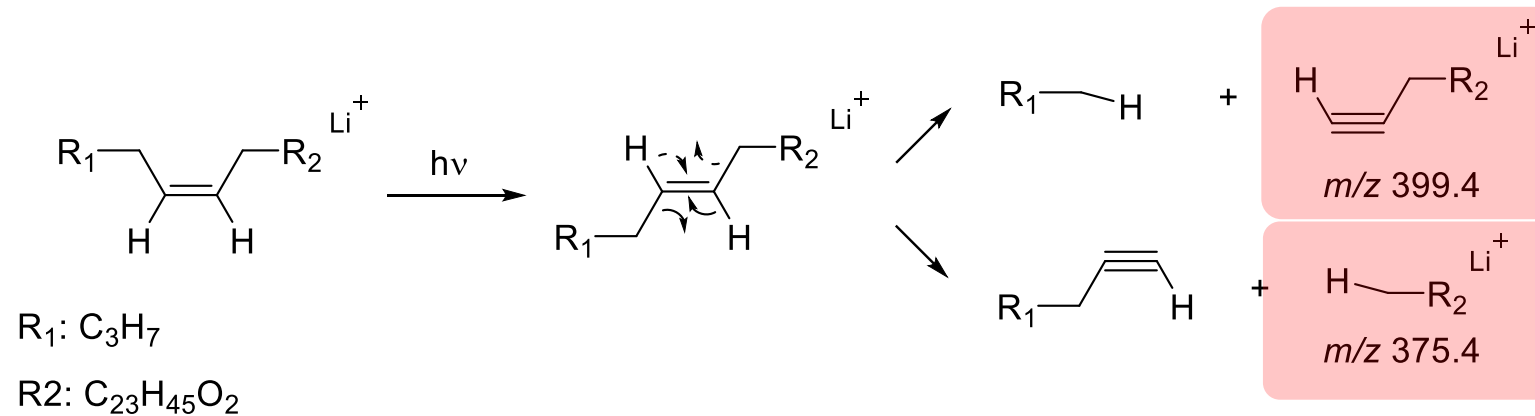
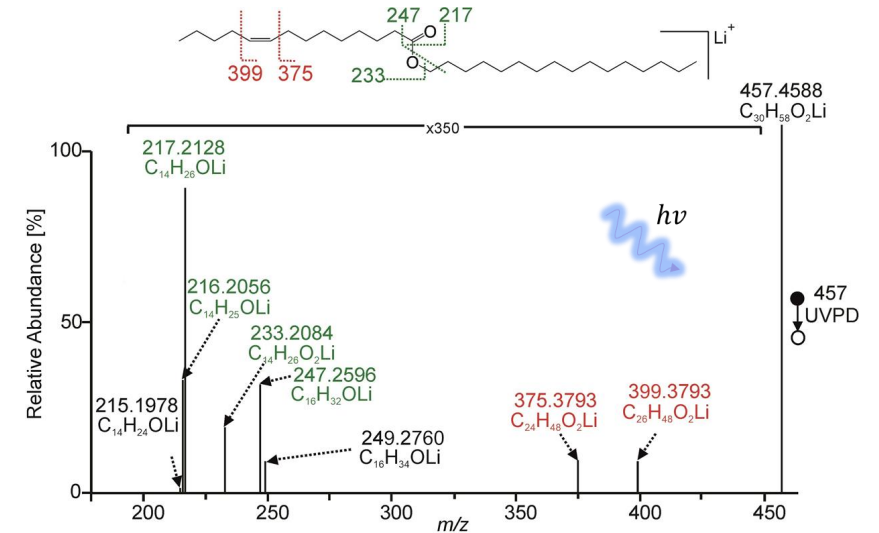


Norrish, R. G. W., and Bamford, C. H.,
Nature. 140 (1937): 195–6
Yang, N. C., and Ding-Djung H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958): 2913–2914
Kloudová et al., *Anal Bioanal Chem* (2024).
<https://doi.org/10.1007/s00216-024-05434-2>

Fotofragmentace na dvojně vazbě

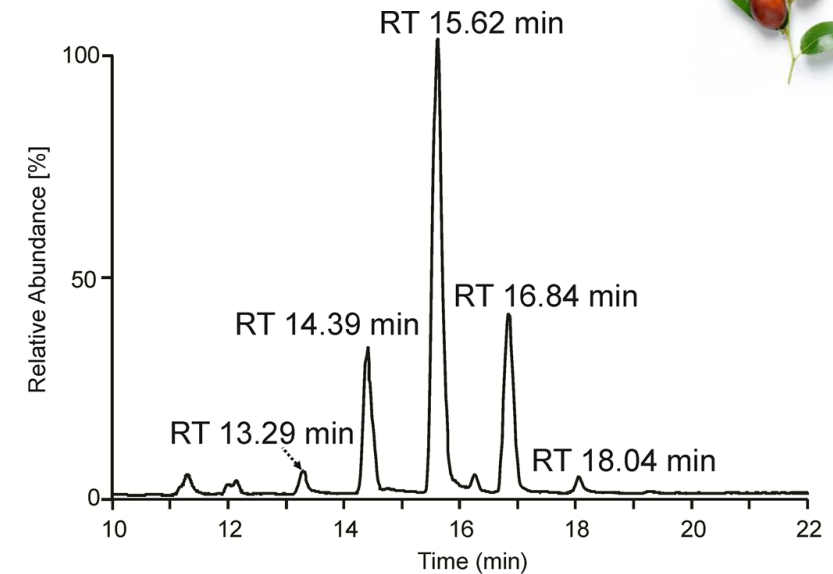
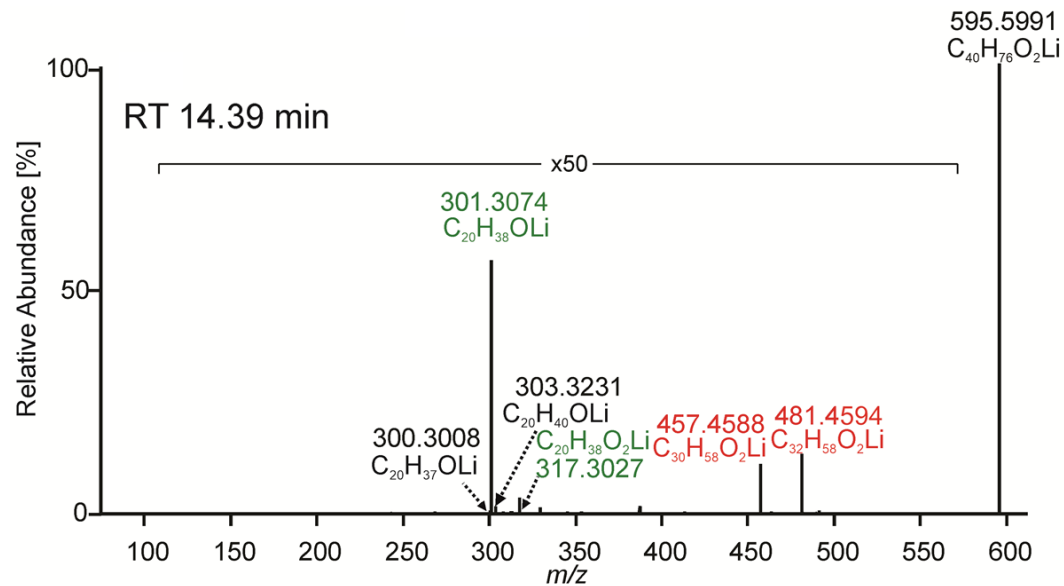
Fragmentace (1,2-eliminace) na dvojně vazbě, fragmenty určují polohu dvojně vazby

$$\Delta m/z = 24.0000$$



Využití fotofragmentace

HPLC-MS² UVPD jojobového oleje



RT (min)	Identification
13.29	20:1(n-9)/18:1(n-9)
14.39	20:1(n-9)/20:1(n-9)
15.62	22:1(n-9)/20:1(n-9)
16.84	24:1(n-9)/20:1(n-9)
18.06	22:1(n-9)/24:1(n-9)

HPLC-ESI MS² UVPD: Acquity BEH C18 (Waters, 2.1 x 50 mm, 1.7 μm), 45 °C, gradient H₂O/CH₃CN/2-propanol, 180 μl/min, postkolonově HCOOLi (0.5 mmol/l, 10 μl/min)

Shrnutí

- ✓ **Hmotnostní spektrometrie - skvělý nástroj pro strukturní charakterizaci lipidů**
 - určení struktury polární hlavičky i alifatických řetězců
 - vysoká citlivost, analýzy komplexních směsí (ve spojení s chromatografií)
 - různé typy vzorků

- ✓ **Využití nových typů reakcí pro derivatizaci molekul a iontů**
 - určování poloh dvojných a trojných vazeb pomocí reakcí iontů acetonitrilu v APCI

- ✓ **Využití netradičních způsobů aktivace iontů**
 - určování struktury esterových lipidů pomocí UVPD₂₁₃

PODĚKOVÁNÍ



Vladimír Vrkoslav

Lukáš Cudlman, Tereza Čmelíková (Vavrušová), Eva Háková (Harazim), Martina Háková, Petra Horká, Aneta Kalužíková, Radka Míková, Lenka Šubčíková

Miloš Buděšínský, Michal Hoskovec, Ullrich Jahn, Pavel Jiroš, Blanka Kalinová, Roman Lagoutte, Aleš Machara, Petr Šebesta, Jan Šobotník, Soňa Vašíčková



Jakub Straka



Antonín Doležal, Richard Plavka



Miroslav Polášek



Ondřej Kuda



P506/10/1466
P206/12/0750
203/09/0139



10119
348721
650520
1182216



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