

УДК 543.5

DOI: 10.15372/KhUR2022419

EDN: CVRBYW

Исследование хроматографического поведения метаболитов из плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола

Н. В. БАСОВ¹, А. Д. РОГАЧЕВ^{1,2}, Ю. С. СОТНИКОВА^{1,2,3}, Ю. В. ПАТРУШЕВ^{1,3}, А. Г. ПОКРОВСКИЙ¹

¹Новосибирский государственный университет,
Новосибирск (Россия)

E-mail: nikita.v.basov@gmail.com

²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,
Новосибирск (Россия)

³Институт катализа СО РАН,
Новосибирск (Россия)

Аннотация

Изучено хроматографическое поведение ряда метаболитов плазмы крови человека при анализе методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием монолитной хроматографической колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и буфер на основе карбоната аммония и аммиака (рН 9.8). Эксперимент проводили в двух хроматографических режимах: обращенно-фазовом и гидрофильном. Метаболиты, выбранные для анализа, позволяют однозначно продемонстрировать поведение как полярных молекул, так и гидрофобных или амфифильных молекул липидного ряда при каждом из используемых режимов хроматографирования. Обнаружено, что при смене режима хроматографирования происходит инверсия очередности выхода групп метаболитов, имеющих вариативность в химическом строении и гидрофильности. Показано, что данная колонка с монолитным сорбентом может быть использована для скрининга метаболитов в режимах как обращенно-фазовой, так и гидрофильной хроматографии, а применение двух режимов хроматографирования при метаболомном скрининге с использованием монолитной колонки на основе 1-винил-1,2,4-триазола является взаимно дополняющим и может способствовать увеличению охвата метаболитов из различных метаболических путей.

Ключевые слова: 1-винил-1,2,4-триазол, монолитные колонки, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, хроматография гидрофильных взаимодействий, обращенно-фазовая хроматография, метаболомика

ВВЕДЕНИЕ

Метаболомный скрининг или анализ широкого ряда метаболитов, содержащихся в биологических образцах, является перспективным подходом к изучению биохимических процессов, протекающих в живых организмах. Метабономика сформировалась как наука, основанная

на оценке низкомолекулярных (до ~1000 Да) метаболитов различными инструментальными методами. Молекулярный фенотип организма можно охарактеризовать определенным содержанием метаболитов, а отклонение их концентраций от нормы может указать на развитие патологических процессов, причем на ранних стадиях, когда манифестация клинических при-

знаков заболевания еще не происходит. Кроме того, метаболомные базы данных, такие как KEGG [1] или HMDB [2], позволяют устанавливать связь между метаболитами и метаболическими путями, нарушение работы которых приводит к наблюдаемой картине изменения содержания метаболитов. Все это способствует развитию не только диагностических методов, но и новых подходов к лечению заболеваний.

Количество метаболитов, циркулирующих в крови человека, составляет несколько тысяч [3], а их концентрации варьируются в широком диапазоне значений. По этой причине не существует универсального способа детекции абсолютно всех метаболитов одновременно [4]. Тем не менее, развитие инструментальных методов, особенно высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрией (МС), позволило существенно расширить круг определяемых веществ, а использование масс-спектрометров высокого разрешения значительно повысило надежность их идентификации.

Разнообразие метаболома обусловлено различием в строении метаболитов и наличием в их составе различных функциональных групп и заместителей. Это обуславливает существенные различия физико-химических свойств метаболитов, циркулирующих в крови. Так, например, аминокислоты хорошо растворимы в воде, тогда как конъюгаты холестерина нерастворимы и транспортируются только в виде комплексов с белками [5]. Все это затрудняет или делает невозможным одновременный анализ веществ за одно хроматографическое разделение.

Поскольку для более надежной идентификации и количественного анализа метаболитов необходимо хроматографическое разделение, возникает необходимость в обеспечении удерживания веществ на колонке, а также детектирования их с помощью масс-спектрометрического анализатора. Совместное элюирование компонентов смеси может приводить к взаимному подавлению их ионизации электрораспылением, в результате чего уменьшается интенсивность аналитического сигнала или наблюдается его полное отсутствие.

Основными хроматографическими методами, использующимися для разделения и анализа метаболитов, в настоящее время являются хроматография гидрофильных взаимодействий, или гидрофильная хроматография (ГФХ), и обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) [6, 7]. При этом для ГФХ применяются хроматографические колонки с полярным сорбентом, обеспечи-

вающим разделение полярных метаболитов, тогда как в условиях ОФХ полярные метаболиты, как правило, не удерживаются сорбентом и элюируются в мертвом объеме. Анализ образцов в условиях ОФХ широко используется для скрининга сложных липидов [8, 9], тогда как полярные метаболиты, такие как глюкоза, метаболиты пентозофосфатного пути и метаболиты цикла трикарбоновых кислот – ди- и трикарбоновые кислоты – с трудом анализируются в режиме ОФХ из-за плохого хроматографического удерживания и ионизации [7].

Иной концепцией для расширения диапазона анализируемых веществ является применение смешанного механизма удерживания. В отличие от обращенно-фазовой, гидрофильной или ионообменной хроматографии, в которых гидрофобное, гидрофильное и ионообменное взаимодействие соответственно вносят основной вклад в удерживание аналитов, режим хроматографии смешанных взаимодействий использует комбинацию из двух или более этих режимов. Данный вид хроматографии становится все более популярным в фармацевтике и биофармацевтике благодаря своей уникальной селективности по отношению к полярным и заряженным соединениям [10].

Анализ полярных метаболитов в условиях ГФХ с масс-спектрометрической детекцией наиболее эффективен в условиях применения элюента с высокой основностью. Это позволяет не только снять заряды с функциональных групп сорбента, но и перевести аналиты в единую заряженную форму без уменьшения их способности к ионизации в режиме электрораспыления. В то же время, применение таких элюентов будет приводить к разрушению силикагелевой основы сорбентов по причине ее гидролиза в щелочной среде. Данное противоречие можно решить, применяя колонки с сорбентом на органической полимерной основе. Так, в работе [11] авторами был предложен протокол для одновременного скрининга более 600 метаболитов плазмы крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием в качестве подвижной фазы А буферного раствора карбоната аммония и аммиака с pH 9.8. Анализ проводили на колонке с органическим сорбентом, имеющим аминопропильные функциональные группы.

Ранее нами был разработан подход к получению хроматографических колонок с монолитными органическими сорбентами различной функциональности [12]. Было показано, что полученные колонки с сорбентом на основе стирола,

дивинилбензола и 1-винил-1,2,4-триазола способны удерживать вещества как по гидрофильному, так и по обращенно-фазовому механизму. Преимущества таких колонок заключаются в их низкой стоимости, простоте получения и возможности регулирования их свойств. Варьируя состав смеси мономеров, содержание и вид модификатора, придающего сорбенту полярность, можно получать монолитные колонки с заданными свойствами.

Цель данной работы – исследование возможности применения такой колонки для анализа ряда метаболитов плазмы крови, имеющих различную природу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

Для анализа использовали ацетонитрил (квалификация “х. ч.”, КРИОХРОМ, Россия). Очищенную воду готовили с помощью УФ-системы Direct-Q 3 (Millipore SAS, Франция). Элюент А готовили в соответствии с протоколом, описанным в [11]: к 904 мл очищенной воды добавляли раствор 40 мл 0.5 М карбоната аммония, далее приливали 50 мл ацетонитрила, затем раствор доводили 25 % раствором аммиака до установления pH 9.8.

Для обработки внутренней поверхности стеклянных трубок использовали 3-(триметоксисилил)пропилметакрилат (ТМСПМ). Для синтеза монолитных сорбентов применяли: стирол (99 %), дивинилбензол (80 %, смесь изомеров), 1-винил-1,2,4-триазол (99 %), 1-метил-2-пирролидон (99 %), пероксид бензоила (75 %), Pluronic 10R5 (бифункциональный блок-сополимер полипропиленгликоль–полиэтиленгликоль–полипропиленгликоль) в качестве порообразователя. Все реактивы производства Sigma-Aldrich, Германия.

Приготовление колонок

Монолитный материал синтезировали в трубках из свинцового стекла С87-2 с внутренним диаметром 2 мм. Для того, чтобы обеспечить ковалентное связывание дивинилбензол-стирольного монолита с внутренней стенкой стеклянной трубки, ее поверхность предварительно обрабатывали ТМСПМ, как это описано в [13]. Готовили полимеризационную смесь, состоящую из сомономеров стирол/дивинилбензол/1-винил-1,2,4-триазол в объемном соотношении 10 : 50 : 40

соответственно. Общий объем мономеров составлял 2 мл, объем порообразователя Pluronic 10R5 – 3 мл. В качестве инициатора полимеризации выступал пероксид бензоила, содержание которого составляло 1 % от суммарной массы мономеров. Предварительно обработанную стеклянную трубку заполняли полимеризационной смесью и запаивали оба конца. Далее трубку помещали в воздушный термостат на 4 ч при температуре 80 °С. После этого трубку с образовавшимся монолитом охлаждали и обрезали концы для получения колонки длиной 60 мм.

Колонку устанавливали в хроматограф при помощи стандартных фитингов. Для удаления порообразующего растворителя и остатков полимеризационной смеси колонку промывали ацетонитрилом объемом 1 мл со скоростью 0.01 мл/мин, далее скорость постепенно увеличивали до 0.1 мл/мин. Общий объем ацетонитрила для промывки колонки составлял 20 мл. После этого колонка была готова к работе.

Пробоподготовка

Все образцы обрабатывали одновременно в соответствии с протоколом, описанным в работе [11]. К 100 мкл плазмы крови прибавляли 400 мкл охлажденной смеси метанола и ацетонитрила в равных объемах. Образцы встряхивали на шейкере, затем центрифугировали при 4 °С и 16000g в течение 15 мин. Супернатант переносили в вials и анализировали.

Методики анализа

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Хроматографическое разделение проводили с использованием хроматографа LC-20AD Prominence (Shimadzu, Япония), оснащенного автодозатором SIL-20AC (Shimadzu, Япония), термостатированным при 10 °С. Объем пробы составлял 10 мкл. Подвижные фазы состояли из буфера для ВЭЖХ А (раствор 20 mM карбоната аммония в воде, доведенный 25 % водным раствором аммиака до pH 9.8, и 5 об. % ацетонитрила) и элюента ВЭЖХ Б (100 % ацетонитрил).

Гидрофильная хроматография. Скорость потока при анализе составляла 300 мкл/мин. Градиент элюирования был следующим: от 0 до 2 мин содержание подвижной фазы Б составило 98 %; от 2 до 6 мин содержание элюента Б уменьшалось с 98 до 0 % и поддерживалось при 0 % до 11 мин.

Обращенно-фазовая хроматография. Скорость потока при анализе составляла 250 мкл/мин. Градиент элюирования ВЭЖХ был следующим: от 0 до 2 мин содержание подвижной фазы Б составило 0 %; от 2 до 7 мин содержание элюента Б увеличилось с 0 до 10 %; от 7 до 10 мин содержание элюента Б увеличилось с 10 до 90 %; от 10 до 12 мин содержание элюента Б увеличилось с 90 % до 98 % и поддерживалось при 98 % до 16 мин.

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрическую детекцию метаболитов проводили в режиме MRM (multiple reaction monitoring, мониторинг множественных реакций) в виде положительных ионов с использованием масс-спектрометра API 6500 QTRAP (AB SCIEX, США), оснащенного источником ионизации электрораспылением. Основные масс-спектрометрические параметры: напряжение ионного распыления (IS) – 5500 В; температура газа-осушителя – 475 °С, газ в ячейке соударений (CAD) – средний, давление газа 1, газа 2 и газовой завесы – 33, 33 и 30 фунт/дюйм² (22.75, 22.75 и 20.68 Н/см²) соответственно. Потенциал декластеризации (DP) составлял 91 В, потенциал входа (EP) – 10 В, потенциал на выходе из ячейки соударений (CXP) – 9 В. Время сканирования перехода MRM – 5 мс. Переходы ионов-предшественников и фрагментных ионов, названия метаболитов, время пребывания и соответствующие энергии столкновений были адаптированы из [11]. Управление устройством и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При смешивании стирола, дивинилбензола и третьего сополимера-модификатора, а также инициатора полимеризации и последующем нагревании полученной смеси происходит образование полимера, ковалентно связанного с поверхностными силанольными группами стеклянной трубки и представляющего собой в массе трехмерную сетчатую структуру. В данной работе были приготовлены монолитные колонки с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола в качестве модифицирующего компонента, обеспечивающего полярные свойства сорбента. Варьируя его содержание в смеси, можно регулировать полярность получающегося монолитного сорбента и, тем самым, хроматографические свойства колонок. Хроматогра-

фические и текстурные характеристики колонок с данным типом сорбентов были изучены и описаны в [12, 14]. Также нами было показано, что колонки такого типа могут работать как в режиме ОФХ, так и ГФХ. В случае ОФХ для лучшего разделения веществ и обеспечения правильной формы пика элюирование проводится плавным увеличением содержания органического компонента. При этом вещества, имеющие гидрофильную природу и хорошо растворимые в воде, как правило, не удерживаются сорбентом и выходят в мертвом объеме колонки.

Использование масс-спектрометрической детекции при анализе метаболитов и/или ксенобиотиков в биологических образцах имеет ряд преимуществ перед ультрафиолетовой (УФ) детекцией. Так, для надежной идентификации соединения при определении с помощью метода ВЭЖХ-УФ необходимо добиться отделения его пика на хроматограмме от пиков остальных компонентов образца, тогда как режим детектирования множественных реакций (MRM) позволяет не только надежно идентифицировать вещество, но и проводить его количественный анализ в смеси, даже если аналит элюируется вместе с остальными компонентами. В то же время при использовании ионизации в режиме электрораспыления аналитический сигнал зависит от биологической матрицы, которая влияет на степень ионизации вещества вплоть до его полного подавления. Особенно это заметно при анализе биологических образцов, содержащих фосфолипиды, приводящие к снижению ионизации [15, 16]. По этой причине для увеличения сигнала желательно либо проводить очистку от компонентов биологической матрицы, либо добиваться их удовлетворительного хроматографического разделения.

Для исследования возможности использования данной колонки для метаболомного анализа плазмы крови были выбраны следующие группы соединений: аминокислоты и ацилкарнитины, заряженные в высокоосновной среде, а также липиды (церамиды, фосфатидилхолины и фосфатидилинозитолы). Были проанализированы хроматограммы, полученные методом ВЭЖХ-МС/МС, 36 различных аминокислот, 41 ацилкарнитина, 18 церамидов, 19 фосфатидилхолинов и 9 фосфатидилиназитолов*. На рис. 1 представлены структурные формулы исследуемых классов соединений в общем виде.

* Полный список метаболитов и параметры их детекции в режиме MRM авторы могут прислать по запросу.

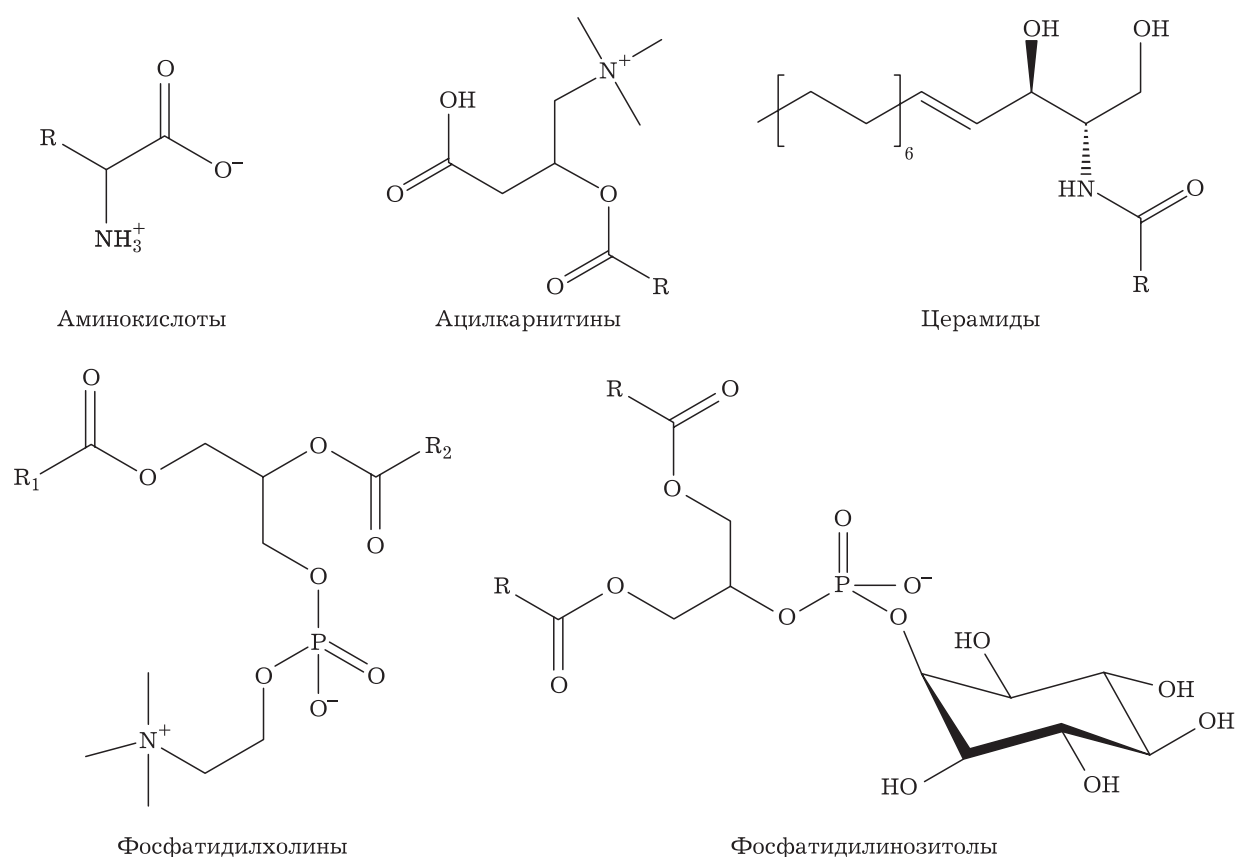


Рис. 1. Структурные формулы исследованных метаболитов.

Анализ выбранных метаболитов в образце плазмы крови показал, что по своим хроматографическим свойствам их можно разделить на несколько групп. Так, некоторые метаболиты удерживались сорбентом и имели хроматографический пик в условиях ГФХ, а в условиях ОФХ не давали сигнала либо выходили в мертвом объеме. Часть веществ давали аналитический сигнал в обоих режимах хроматографии, но при этом элюировались в мертвом объеме в условиях ГФХ и удерживались сорбентом в условиях ОФХ. Примеры хроматограмм, иллюстрирующих описанное поведение метаболитов, приведены на рис. 2.

Аминокислоты — органические соединения, содержащие как минимум одну аминогруппу и как минимум одну карбоксильную группу. Аминокислоты при элюировании чистым элюентом А — водным раствором карбоната аммония, доведенным аммиаком до pH 9.8, — элюируются в виде карбоксилата, т. е. депротонированы по карбоксильной группе. Таким образом, аминокислоты при любом режиме хроматографирования должны элюироваться при высокой доле

элюента А. Исследованные в нашей работе аминокислоты (36 соединений) проявлялись в виде хроматографического пика в условиях ГФХ, при этом 31 соединение имело время удерживания от 5 до 6 мин, а оставшиеся 5 метаболитов элюировались в мертвом объеме колонки (см. рис. 2, б). При смене режима элюирования на ОФХ хроматографический пик наблюдался у 26 аминокислот из 36, однако все они элюировались в мертвом объеме. Отсутствие сигнала у остальных 10 метаболитов данного класса (например, глицина, см. рис. 2, а), наиболее вероятно, обусловлено подавлением ионизации. Наблюдаемое хроматографическое поведение аминокислот указывает на то, что их взаимодействие с монолитной колонкой на основе винилтриазола происходит по механизму только гидрофильного взаимодействия, а при элюировании в обращенно-фазовом режиме аминокислоты, содержащиеся в образце, не удерживаются и элюируются в мертвом объеме.

Церамиды являются подклассом липидов — производных сфингозина и жирных кислот. Они выполняют не только строительную функцию, участвуя в формировании клеточных мем-

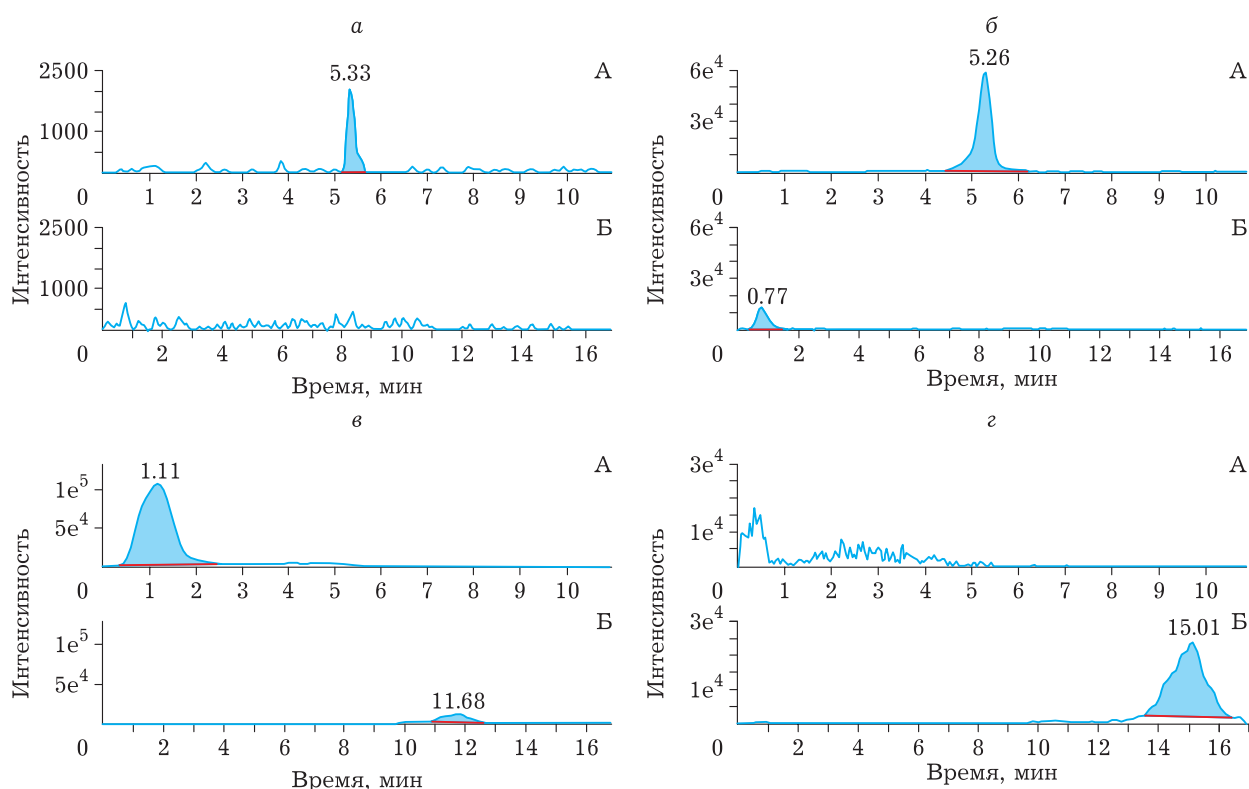


Рис. 2. Характеристические хроматограммы метаболитов в режиме гидрофильной (А) и обращено-фазовой хроматографии (Б): а – глицин; б – аланин; в – фосфатидилхолин (32:2); г – церамид (18:1/24:0).

бран, но также могут принимать участие в дифференциации и пролиферации клеток и апоптозе [17, 18]. В нашей работе было проанализировано 17 метаболитов данного класса и отмечено, что все эти соединения элюируются чистым органическим элюентом Б, а их ионизация существенно зависит от наличия гидроксильной группы в заместителе R. Так, при анализе в режиме ОФХ церамидов, имеющих в качестве заместителей остатки незамещенных жирных кислот, на хроматограммах наблюдался уширенный пик со временем удерживания 14–15 мин (рис. 2, г). При этом для метаболитов, являющихся производными гидроксильированных жирных кислот, не наблюдалось пиков на хроматограммах в обоих режимах элюирования. Такое поведение может указывать на следующее: либо происходит необратимая адсорбция веществ данного класса на колонке, либо их содержание в исследованном образце было мало. Исключение составил церамид 18:1/24:0-ОН, для которого наблюдался пик со временем удерживания 14.7 мин.

Из исследованных в данной работе ацилкарнитин (41 метаболит), имеющих разную длину цепи жирнокислотного заместителя, все ве-

щества детектировались при анализе в режиме ГФХ, однако при этом часть из них не удерживались и не проявлялись на хроматограмме в виде пика в режиме ОФХ. К таким метаболитам относятся ацилкарнитины с длиной цепи менее C_{10} , а также ацилкарнитины с большей длиной цепи, но при этом имеющие гидроксильную группу в качестве заместителя по ацильной группе. В отличие от этих метаболитов, ацилкарнитины с заместителем C_{10} – C_{18} , в том числе ненасыщенные, но не имеющие гидроксильных групп, удерживались сорбентом при анализе в режиме ОФХ.

В ходе анализа фосфатидилхолинов были получены однотипные результаты: все исследованные метаболиты данной группы элюировались в мертвом объеме в режиме ГФХ, тогда как при анализе в условиях ОФХ их время удерживания составляло 11–12 мин. Родственные им по структуре фосфатидилинозитолы проявлялись в виде пиков на хроматограммах только при использовании режима ГФХ с близкими значениями времен удерживания (около 5 мин). При этом пиков веществ на хроматограммах, полученных в режиме ОФХ, не наблюдалось.

По полученным результатам времен удерживания метаболитов в разных режимах ана-

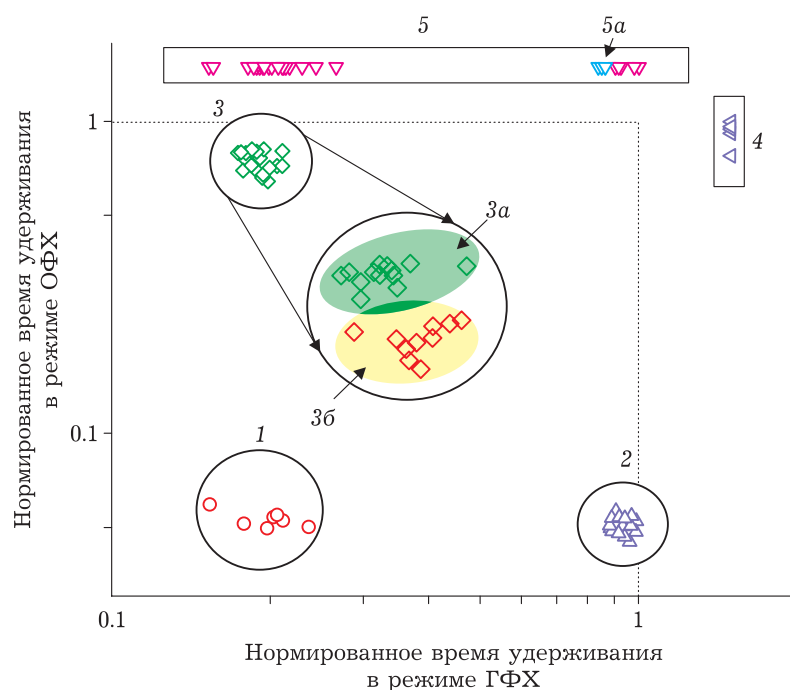


Рис. 3. Распределение метаболитов по временам удерживания в режиме обращенно-фазовой (ОФХ) и гидрофильной хроматографии (ГФХ): 1 – ацилкарнитины $R < C_{10}$; 2 – аминокислоты; 3а – фосфатидилхолины; 3б – ацилкарнитины с $R \geq C_{10}$; 4 – соединения, удерживающиеся в режиме ОФХ и не удерживающиеся в режиме ГФХ (церамиды); 5 – соединения, удерживающиеся в режиме ГФХ и не удерживающиеся в режиме ОФХ; 5а – фосфатидилинозитолы.

лиза была построена диаграмма, отражающая поведение метаболитов в условиях ОФХ и ГФХ (рис. 3). Данная диаграмма построена в координатах нормированных времен удерживания в двух режимах соответственно. Так, кластер 1 образован главным образом ацилкарнитинами с короткой углеродной цепью, не удерживающимися на колонке ни в режиме ГФХ, ни в режиме ОФХ. Аминокислоты образовали кластер 2, а длинноцепочечные ацилкарнитины и фосфатидилхолины как метаболиты, удерживающиеся сорбентом в режиме ОФХ и выходящие в мертвом объеме колонки, – кластер 3.

Кластеры 4 и 5 соответствуют метаболитам, для которых наблюдался пик на хроматограмме в одном режиме и не наблюдался в другом. При этом первый из них состоит только из церамидов, а второй можно разделить на две подгруппы: метаболиты, не удерживающиеся в режиме ГФХ, но при этом не проявляющиеся в виде пика в режиме ОФХ.

Изученное хроматографическое поведение метаболитов указывает на перспективу применения монолитных колонок с полярным сорбентом в метаболомном анализе и других областях.

Разработка методов метаболомного анализа с использованием таких колонок станет целью наших дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе было изучено хроматографическое поведение и особенности ионизации ряда метаболитов плазмы крови человека при проведении анализа на монолитной колонке, модифицированной 1-винил-1,2,4-триазолом. Показано, что применение двух режимов элюирования без смены элюентов при использовании данной колонки позволяет расширить круг определяемых метаболитов, а два хроматографических режима взаимно дополняют друг друга: когда при ГФХ метаболит не определяется, существует возможность его обнаружения при повторном анализе образца в режиме ОФХ и наоборот. Это позволяет проводить более точный поиск метаболитов как потенциальных биомаркеров, если есть подозрение, что они присутствуют среди исследуемого класса или подкласса веществ.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 22-23-01068.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.genome.jp/kegg/> (дата обращения: 20.05.2022).
- 2 Human Metabolome Database [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://hmdb.ca/> (дата обращения: 20.05.2022).
- 3 Serum Metabolome Database [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://serummetabolome.ca/> (дата обращения: 20.05.2022).
- 4 Gika H., Virgiliou C., Theodoridis G., Plumb R. S., Wilson I. D. Untargeted LC/MS-based metabolic phenotyping (metabonomics/metabolomics): The state of the art // *J. Chromatogr. B*. 2019. Vol. 1117. P. 136–147.
- 5 Wüstner D., Solanko K. How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes*. 2015. Vol. 1848, No. 9. P. 1908–1926.
- 6 Tang D. Q., Zou L., Yin X. X., Ong C. N. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS // *Mass Spectrom. Rev.* 2016. Vol. 35, No. 5. P. 574–600.
- 7 Wang S., Blair I. A., Mesaros C. Analytical methods for mass spectrometry-based metabolomics studies / *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research*. A. G. Woods, C. C. Darie (Eds.). Cham: Springer International Publishing, 2019. Vol. 1140. P. 635–647.
- 8 Cajka T., Fiehn O. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014. Vol. 61. P. 192–206.
- 9 Harrieder E. M., Kretschmer F., Böcker S., Witting M. Current state-of-the-art of separation methods used in LC-MS based metabolomics and lipidomics // *J. Chromatogr. B*. 2022. Vol. 1188. Art. 123069.
- 10 Zhang K., Liu X. Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. Vol. 128. P. 73–88.
- 11 Li K., Naviaux J. C., Bright A. T., Wang L., Naviaux R. K. A robust, single-injection method for targeted, broad-spectrum plasma metabolomics // *Metabolomics*. 2017. Vol. 13, No. 10. Art. 122.
- 12 Патрушев Ю. В., Сотникова Ю. С., Сидельников В. Н. Монолитная колонка с сорбентом на основе 1-винил-1,2,4-триазола для гидрофильной ВЭЖХ // *Физикохимия поверхности и защита материалов*. 2020. Т. 56, № 1. С. 53–57.
- 13 Patrushev Y., Yudina Y., Sidelnikov V. Monolithic rod columns for HPLC based on divinylbenzene-styrene copolymer with 1-vinylimidazole and 4-vinylpyridine // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2018. Vol. 41, No. 8. P. 458–466.
- 14 Patrushev Y., Sotnikova Y., Sidelnikov V. Dead volume determination of the HPLC monolithic rod columns with organic sorbents // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2019. Vol. 42, No. 17–18. P. 575–581.
- 15 Carmical J., Brown S. The impact of phospholipids and phospholipid removal on bioanalytical method performance // *Biomed. Chromatogr.* 2016. Vol. 30, No. 5. P. 710–720.
- 16 Ismaiel O. A., Halquist M. S., Elmamly M. Y., Shalaby A., Thomas Karnes H. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations // *J. Chromatogr. B*. 2008. Vol. 875, No. 2. P. 333–343.
- 17 Sheridan M., Ogretmen B. The role of ceramide metabolism and signaling in the regulation of mitophagy and cancer therapy // *Cancers*. 2021. Vol. 13, No. 10. Art. 2475.
- 18 Liu Y. Y., Gupta V., Patwardhan G. A., Bhinge K., Zhao Y., Bao J., Mehendale H., Cabot M. C., Li Y. T., Jazwinski S. M. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and β -catenin signaling // *Mol. Cancer*. 2010. Vol. 9, No. 1. Art. 145.