



**Universidad**  
Zaragoza



## Trabajo Fin de Grado

Determinación de glicerofosfolípidos y esfingolípidos en muestras de interés biológico mediante Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia acoplada a Espectrometría de Masas

Determination of glycerophospholipids and sphingolipids in samples of biological interest by High Performance Thin-Layer Chromatography coupled to Mass Spectrometry

Autor/es

**Jaime Carlos Peñalosa Dominguez**

Directores

Vicente Luis Cebolla Burillo  
Carmen Jarne Lardiés  
Jesús Vela Rodrigo

Instituto de Carboquímica  
Departamento de Química Analítica  
Curso 2019/2020



# INDICE

1.-RESUMEN .....	3
2.-INTRODUCCIÓN .....	4
2.1.-LIPIDOS EN MUESTRAS COMPLEJAS BIOLÓGICAS.....	4
2.2.- TÉCNICAS USADAS PARA LA DETERMINACION LIPIDÓMICA .....	6
2.2.1.- CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS).....	6
2.2.2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS).....	6
3.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA (HPTLC) APLICADA AL ANÁLISIS DE ESFINGOLÍPIDOS (SL) Y FOSFOLIPIDOS (PL).....	7
3.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRA Y APLICACIÓN EN LA PLACA.....	8
3.2.-DESARROLLO CROMATOGRÁFICO.....	9
3.3.-DETECCION POR DENSITOMETRIA .....	11
4.- ACOPLAMIENTO HTPLC-MS PARA EL ANÁLISIS DE SL Y PL .....	11
4.1.- TÉCNICAS DE DESORCIÓN SOBRE LA PLACA.....	12
4.1.1.- DESORCION E IONIZACION LASER ASISTIDA POR MATRIZ (MALDI) ....	12
4.1.2.- TÉCNICAS BASADAS EN LA EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA DE LA BANDA CROMATOGRÁFICA .....	15
5.- CONCLUSIONES .....	17
6.-BIBLIOGRAFÍA .....	19
ANEXO 1 .....	25
ANEXO 2.....	30

## **1.-RESUMEN**

En esta Memoria se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica acerca del análisis de esfingolípidos (SL) y fosfolípidos (PL) en muestras biológicas complejas mediante Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (HPTLC)-densitometría acoplada directamente a Espectrometría de Masas, técnica que ha experimentado un desarrollo experimental importante en la última década.

Tras una introducción general a los lípidos estudiados y a las técnicas cromatográficas acopladas a MS (LC y GC), se han revisado los métodos de separación HPTLC de los SL y PL, las técnicas de densitometría de barrido (UV, Vis, FL) para su detección, y las técnicas de acoplamiento a MS utilizando ionización a presión atmosférica. Estas últimas, pueden dividirse fundamentalmente en técnicas basadas en la extracción-elución automatizada de la o las bandas separadas en la placa cromatográfica, con posterior identificación estructural mediante ESI-MS, MS/MS y en técnicas de desorción-ionización sobre la placa e ionización MALDI o DESI.

Cuando existen patrones adecuados, la densitometría permite la determinación cuantitativa de lípidos individuales, y la determinación semicuantitativa de las clases y subclases de SL y PL cuyos componentes pueden identificarse estructuralmente por MS. Esto se ha usado para obtener perfiles de SL y PL relacionados con el metabolismo celular, o para monitorizar el transporte de PL a través de membranas.

Muchos de estos problemas se habían realizado experimentalmente utilizando procedimientos manuales de rascado y aislamiento de la banda HPTLC para su caracterización. Estos requerían mucho tiempo, daban lugar a errores experimentales y eran ineficaces a la hora de procesar un alto número de muestras. A pesar del uso cada vez más frecuente de HPTLC-densitometría-MS por su rapidez y selectividad, las posibilidades de acoplamiento no se han explorado en profundidad.

## **ABSTRACT**

A bibliographic review of the analysis of sphingolipids (SL) and phospholipids (PL) in complex biological samples by High Efficiency Thin Layer Chromatography (HPTLC) Densitometry directly coupled to Mass Spectrometry has been carried out in this Report. It has undergone significant experimental development in the last decade.

After a general introduction to the lipids and to the chromatographic techniques coupled to MS (LC and GC), the HPTLC separation methods of the SL and PL the scanning densitometry techniques (UV, Vis, FL) for their detection, and MS coupling techniques using ionization at atmospheric pressure have been reviewed. These can be classified into techniques based on the automated extraction-elution of the separated band, with subsequent structural identification using ESI-MS, MS / MS and on desorption-ionization techniques on the plate and MALDI or DESI ionization.

If we have the suitable standards, densitometry allows the quantitative and the semiquantitative determination of individual lipids and the determination of different classes and subclasses of SL and PL, whose components can be structurally identified by MS. This has been used to obtain SL and PL profiles related to cellular metabolism, or to monitor the PL transport through membranes. Many of these problems had been carried out using manual scratching and isolation procedures of the HPTLC band for their characterization. These were time consuming, led to experimental errors, and were ineffective in processing a high number of samples. Despite the increasing use of HPTLC-densitometry-MS for its speed and selectivity, the coupling possibilities have not been fully explored.

## 2.-INTRODUCCIÓN

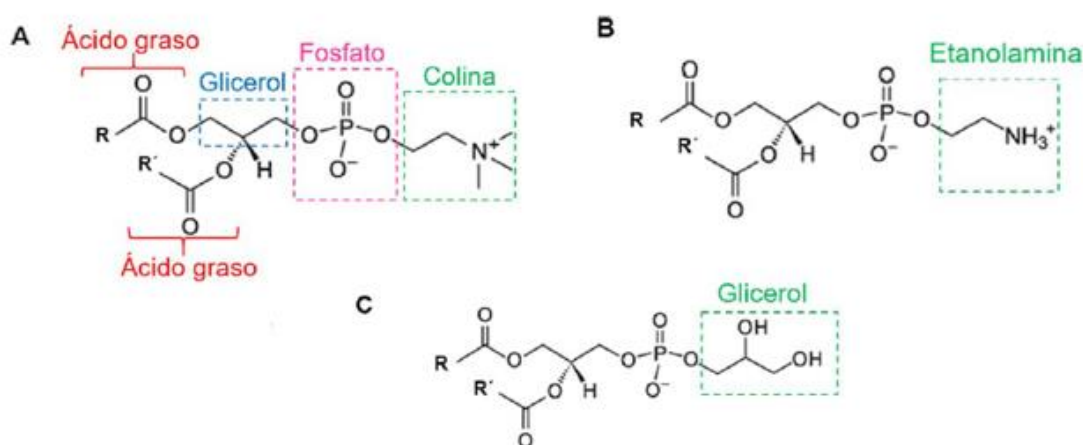
### 2.1.-LÍPIDOS EN MUESTRAS COMPLEJAS BIOLÓGICAS

Los lípidos pueden definirse de manera general como moléculas anfifílicas, con partes hidrofóbicas e hidrofílicas. Sus propiedades principales son que constituyen uno de los principales componentes estructurales de la célula, representan una fuente de energía importante para ella e intervienen en multitud de procesos de señalización metabólica y regulación celular. La disciplina que trata de su análisis se denomina lipidómica, haciendo referencia al estudio a gran escala de la identificación de las especies y el estudio de las reacciones que implican lípidos en sistemas biológicos. Es decir, que incluye la identificación y cuantificación de las miles de especies moleculares de lípidos celulares. Algunos autores estiman unas  $10^5$  especies, que pueden agruparse en categorías y en una centena de clases [1]. Otros oscilan entre proponer unas decenas de miles o millones de especies [2,3].

La agrupación de los lípidos en clases se realiza en función de su grupo de cabeza polar y cada clase consta de numerosas especies moleculares que contienen ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y número de insaturaciones.

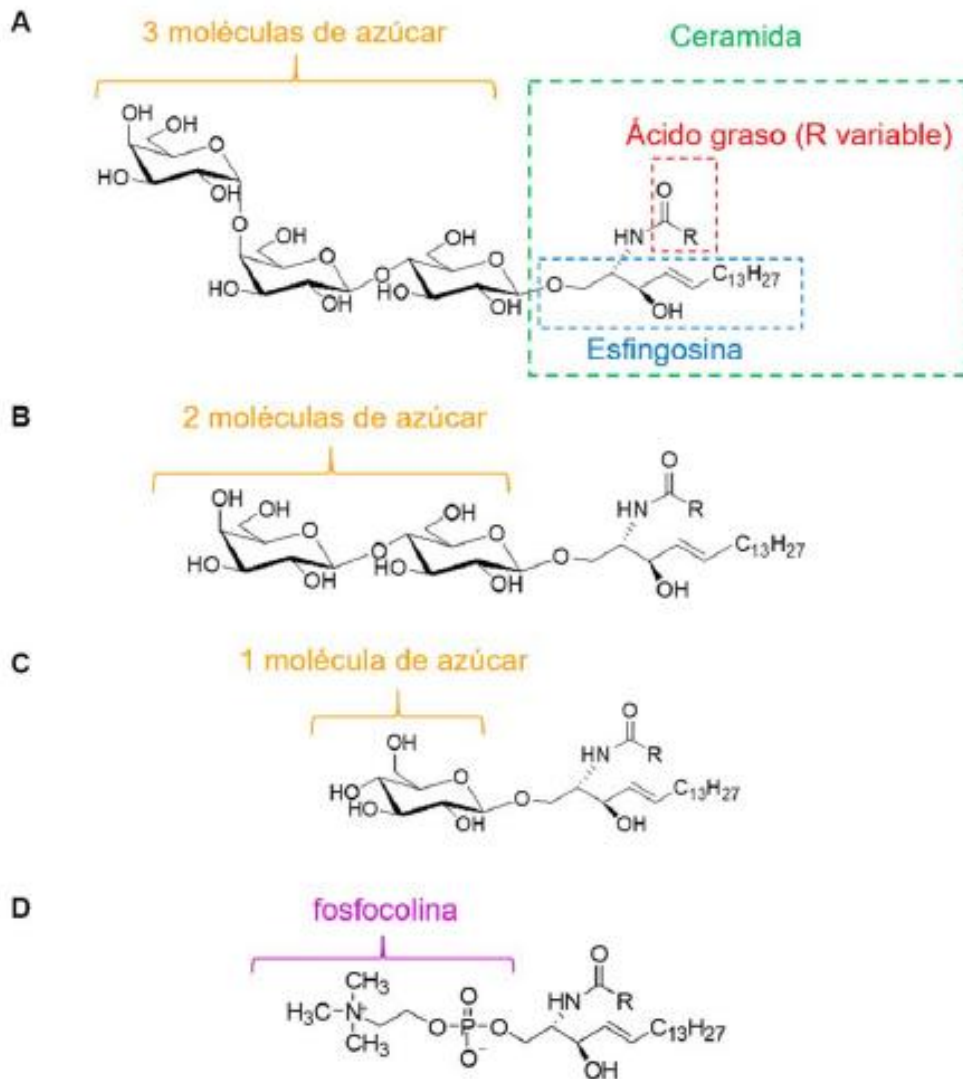
En esta revisión bibliográfica se pretende estudiar la reciente aportación de la Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia (HPTLC) acoplada a la Espectrometría de Masas (MS) a la determinación de dos categorías de lípidos: fosfolípidos y esfingolípidos, cada uno con diversas clases y subclases.

La categoría de fosfolípidos (o glicerofosfolípidos) se define por la presencia de al menos un grupo fosfato esterificado a uno de los grupos hidroxilo del glicerol. Sus clases más conocidas son las fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilgliceroles (PG), fosfatidilserinas (PS) y los ácidos fosfatídicos (PA). De entre las subclases, la más común es la fosfatidil- (-O-CO-CH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>) aunque se pueden encontrar, dependiendo de las muestras, plasmanil- (-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R<sub>1</sub>) y plasménil- (-O-CH=CH-R<sub>1</sub>), entre otras posibilidades. (**Figura 1**)



**Figura 1** Estructura básicas de los glicerofosfolípidos. Molécula de glicerol, unida a dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El grupo fosfato que une por enlace fosfodiéster a otras moléculas A) Fosfatidilcolina (PC), B) Fosfatidiletanolamina (PE), C) Fosfatidilglicerol (PG).

Los esfingolípidos contienen ceramida como estructura central, la cual está formada por la unión de una base esfingoide (en humanos suele ser la esfingosina) con un ácido graso mediante un enlace amida (N-acil-esfingosina). Como en otras categorías, existe una gran variabilidad en las clases (SL neutros: globotriaosilceramidas (Gb<sub>3</sub>), lactosilceramidas (LacCer), glucosilceramidas (GluCer), esfingomielinas (SM); SL ácidos: sulfátidas, gangliósidos, etc...). Por poseer un grupo fosfato, las SM suelen ser consideradas también fosfolípidos. (**Figura 2**)



**Figura 2** Estructura básica de los esfingolípidos. Molécula de ceramida y un grupo unido en su alcohol primario. A) Globotriaosilceramida (Gb<sub>3</sub>) B) Lactosilceramida (LacCer) C) Glucosilceramida (GluCer) D) Esfingomielina (SM)

La HPTLC, ya en su versión anterior (TLC), ha sido y es una técnica muy popular para el análisis de lípidos. De hecho, en su libro Lipidomics, Han [4] asegura que el término lipidoma apareció por primera vez en la literatura en 2001 precisamente en un artículo sobre TLC, titulado: “Non-destructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: Suitable methods for “lipidome” analysis” [5]

## **2.2.- TECNICAS USADAS PARA LA DETERMINACION LIPIDÓMICA**

Los avances en Espectrometría de Masas (MS) por ionización a presión atmosférica o ionización suave, han impulsado la investigación lipidómica y, en general, la del análisis de lípidos en matrices biológicas. No hay un único esquema basado en MS que permita detectar el lipidoma completo debido a la diversidad de las estructuras moleculares existentes y a la ausencia de patrones de calibración para todos los lípidos desconocidos [6]. El análisis suele ser finalmente abordado mediante una combinación de diferentes aproximaciones experimentales. Dependiendo de la técnica y la instrumentación se pueden obtener diferentes tipos y niveles de información sobre la estructura molecular de los metabolitos, con diversos grados de sensibilidad y selectividad.

Aunque la totalidad del extracto lipídico puede ser sometida a MS por infusión directa, se suele emplear una etapa previa de separación cromatográfica para minimizar los problemas debidos al efecto de supresión iónica [3]. La Cromatografía de Gases (GC) se ha acoplado a MS desde hace tiempo, aunque, sin duda, la plataforma más utilizada es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en columna-MS.

### **2.2.1.- CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)**

La técnica de GC-MS involucra procesos térmicos y, gracias a la utilización de columnas capilares, es muy eficaz para la separación molecular de analitos de bajo peso molecular susceptibles de volatilizarse sin sufrir descomposición térmica. En el caso del análisis de lípidos, se requiere una etapa de derivatización para aumentar su volatilidad, como, por ejemplo, la formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos, o el uso de reactivos tales como la N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida. Este proceso suele ser tedioso, experimentalmente incierto, y puede producir artefactos. A pesar de esta posibilidad, sin embargo, GC-MS es una técnica poco usada para el análisis de PL y SL. Resultados recientes muestran que el calentamiento a temperaturas elevadas tiene efectos sobre un número alto de bioanalitos e incluso producen cambios en el perfil del cromatograma. Esto sucede, por ejemplo, en el caso de fosfolípidos como PC [7].

### **2.2.2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS)**

Es el enfoque analítico más popular para el análisis de lípidos puesto que combina una de las más eficientes separaciones (LC) con una tecnología de detección muy sensible (ESI-MS). Es adecuada para lípidos y suele ser usada en general para analizar compuestos no volátiles, polares y térmicamente inestables.

La separación en columna proporciona la dimensión de tiempo de elución para la identificación de las especies de lípidos individuales. Las columnas utilizadas son de tipo HPLC y, más recientemente, de UPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) que, con un menor tamaño de partícula del relleno y una mejora en el empaquetamiento, permiten separaciones más eficaces en una columna de menor tamaño [8]. En cuanto a la fase estacionaria, la más utilizada es la columna de fase reversa (C8, C18) que permite una separación cuasi individual de las

especies moleculares de SL y PL en función de las longitudes de cadena de sus ácidos grasos, y número y posición de los dobles enlaces. Un ejemplo de aplicación al análisis de Gb<sub>3</sub>, un glicosfingolípido, puede encontrarse en la bibliografía [9].

El segundo factor a considerar es el acoplamiento LC-MS. La ionización ESI-MS, que es considerada la “estándar” en LC, permite evaporar continuamente el disolvente que constituye la fase móvil usada en la separación. Conforme el eluato fluye de la columna cromatográfica, es transformado en moléculas gaseosas ionizadas.

A pesar de que LC-MS es una de las técnicas más resolutivas, se han puesto de manifiesto varios problemas asociados al análisis de lípidos [4]:

- Para resolver especies moleculares individuales con columnas de fase reversa, se suelen usar gradientes de elución. Los cambios de composición del gradiente con el tiempo pueden afectar a la eficiencia de la ionización de las especies eluidas. Por ello, pueden existir diferentes factores de respuesta para lípidos estructuralmente similares dentro de una determinada clase. Esto es importante a la hora de cuantificar las especies ya que se necesitarían sistemas de detección que aseguraran factores de respuesta similares para lípidos de una misma clase.
- Esto se agrava con que los gradientes utilizados en fase reversa se suelen iniciar con fases móviles acuosas, lo cual produce problemas de solubilidad dependiendo de las especies. Esto puede inducir problemas de agregación y eficiencias de ionización diferenciales. Ciertos lípidos pueden ser no eluidos y permanecer en la columna.
- Asimismo, otros autores [10], han puesto de manifiesto que los sistemas LC-MS procesan una cantidad enorme de datos y obtienen toda la información en un experimento único e individual. Una vez que el experimento comienza, no puede ser detenido, con lo cual se acumulan cantidad de datos que pueden no ser necesarios. Esto conlleva alto coste en tiempo y disolvente.

Algunos de estos problemas pueden ser parcialmente resueltos y enfocados de otro modo, empleando HPTLC-MS, como se describe en esta Memoria.

### **3.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ALTA EFICACIA (HPTLC) APLICADA AL ANALISIS DE ESFINGOLÍPIDOS (SL) Y FOSFOLIPIDOS (PL)**

HPTLC, la versión modular y automatizada de la Cromatografía de Capa Fina (TLC), es una técnica caracterizada por obtener separaciones bastante eficientes de una forma rápida, simple y utilizando pequeñas cantidades tanto de muestra como de disolvente. A diferencia de HPLC, la técnica es capaz de procesar un gran número de muestras por placa, siempre y cuando sus componentes no sean volátiles, utilizando una gran variedad de disolventes. Otra ventaja es que la placa es desechable al finalizar el experimento evitando de esta forma cualquier efecto memoria.

Una de las principales ventajas de la HPTLC es que todos los componentes de la muestra se encuentran, tras la migración cromatográfica, físicamente sobre la placa y pueden ser detectados, a diferencia de las técnicas de columna que pueden retener analitos por adsorciones irreversibles.

La tecnología HPTLC ha experimentado un enorme crecimiento en la última década desarrollándose instrumentos automatizados para cada una de las etapas: aplicación de muestra, desarrollo cromatográfico y detección. Estas se pueden llevar a cabo utilizando una gran variedad



de instrumentación, que será elegida en función del grado de sofisticación que el análisis requiera. A continuación, se comentarán los aspectos más importantes dentro de cada una de las etapas para el análisis de PL y SL.

### 3.1.- PREPARACIÓN DE MUESTRA Y APLICACIÓN EN LA PLACA

Dependiendo de la complejidad de la muestra, se debe llevar a cabo un tratamiento para aislar el o los analitos de interés, para evitar interferencias. Este es el caso de las muestras de origen biológico. En ellas se pueden encontrar una gran variedad de diferentes moléculas entre las destacan las proteínas, los glúcidos y los lípidos, que serán los compuestos de interés. En nuestro caso, las proteínas se suelen separar por centrifugación.

Anteriormente, el procedimiento de extracción de los lípidos de cualquier matriz biológica era muy largo, tedioso e implicaba pérdidas de analitos. No fue hasta mediados del siglo XX cuando un científico español, J. Folch, descubrió un nuevo método de extracción lipídica rápida y con un porcentaje de recuperación muy alto. El método Folch, llamado así en honor a este, se basa en la utilización de una mezcla 2:1 (v/v) de Cloroformo:Metanol con un lavado posterior con agua. Actualmente, este método se sigue utilizando ampliamente, aunque con algunas variaciones de disolventes y composiciones dependiendo del tipo de lípido que se desee estudiar (véase, por ejemplo, el método Bligh-Dyer [11]). Una vez obtenido el extracto lipídico es necesario, en nuestro caso, separar SL y PL. Un ejemplo de ello es descrito en [12], en el cual se pretendía analizar glicoesfingolípidos de un cultivo celular de C2C12. Para ello se lavaron las células con PBS, se liofilizaron y se sometieron a varias extracciones con Cloroformo/Metanol/Agua 20:10:1 (v/v) con el fin de extraer los lípidos de la célula. Tras ello y con el fin de eliminar los glicerofosfolípidos, se sometió a la muestra a un tratamiento alcalino basado en cloroformo e hidróxido de sodio en metanol, dejándolo incubarse a 37°C durante 1 hora.

Se puede aplicar la muestra sobre la placa cromatográfica con ayuda de varios tipos de aplicadores, manuales, semi-automáticos y automáticos, . De entre todos ellos cabe destacar un el ATS 4 o Automatic TLC Sampler 4. Este instrumento es un aplicador de muestras automático capaz de depositar muestras líquidas con formas y tamaños diferentes (puntos, bandas o rectángulos) en placas de hasta 20 x 20 cm, mediante spray-on o nebulización .Las muestras son nebulizadas sobre la placa a densidad constante, obteniendo bandas, puntos o rectángulos de forma rápida y homogénea. Una ventaja de este sistema de aplicación es que permite la deposición sucesiva de muestra sobre la misma coordenada de la placa, permitiendo una mejora de la sensibilidad de análisis. Esto se denomina “overspotting” y es muy práctico para el dopaje de la muestra, por ejemplo, con patrones (**Figura 3**)



*Figura 3 CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4)*

### **3.2.-DESARROLLO CROMATOGRÁFICO**

Al material adsorbente de la placa cromatográfica donde se separan las diferentes muestras se le denomina fase estacionaria, que en HPTLC está en forma de placas de diversos tamaños. Actualmente existe una gran variedad de placas cromatográficas basadas en silica gel sin modificar o modificada, celulosa, alúmina, siendo las placas de silica gel sin modificar las más utilizadas en el análisis en capa fina. Pueden incluir algún indicador de fluorescencia.

Las placas con silica gel como material adsorbente, que puede estar soportado sobre diferentes materiales (aluminio, cristal, plástico...), tienen características polares, por lo que las hace idóneas para separaciones de mezclas de compuestos polares. Un ejemplo de ello son nuestros analitos, los esfingolípidos y los fosfolípidos [13]. Además, en algunos artículos se ha informado acerca de placas cromatográficas LiChrospher [14]. Estas placas están basadas en partículas esféricas de silica gel de un tamaño de 7  $\mu\text{m}$ , similar a los rellenos de las columnas de HPLC, que mejoran la separación y la sensibilidad del análisis cromatográfico. En el campo de los lípidos, las placas más usadas son las de silica gel. En algunos casos se ha usado silica gel modificada con fase reversa (C8, C18). Otras posibilidades basadas en la silica gel modificada (NH<sub>2</sub>, ciano, diol) han sido muy poco usadas en este tipo de separación.

Tras la aplicación de la muestra sobre la placa cromatográfica se procede al desarrollo cromatográfico, con el que se procura obtener separaciones óptimas de los diferentes componentes de la muestra de interés. Para ello se utilizan una serie de disolventes (la fase móvil), elegidos en función de las características de la muestra depositada en la placa cromatográfica (la fase estacionaria). En el caso de usar placas de silica gel y disolventes de fase normal, se obtiene una separación de los lípidos en clases, agrupadas las especies por sus grupos polares de cabeza.

La fase móvil puede estar formada por un único disolvente o una mezcla de varios, constante a lo largo de la elución (isocrática). La elución puede realizarse también usando una secuencia de disolventes (o mezclas), llamándose elución secuencial. También puede llevarse a cabo usando un gradiente de varias etapas en el que los disolventes usados varían en su proporción. También, se suele llevar a cabo, para separar PL, separaciones bidimensionales en las que la elución se realiza con dos sistemas diferentes de disolventes (fase normal/fase reversa), girando la placa 90° entre la primera y la segunda separación. [15, 16]

El ANEXO 1 recopila en forma de Tabla los principales trabajos sobre PL y SL encontrados en la bibliografía, con detalle del tipo de muestra analizada, clases y subclases separadas, fases móviles y eluciones empleadas.

Para llevar a cabo este desarrollo cromatográfico existen una gran variedad de cubetas manuales y automatizadas. Habitualmente, en TLC se han utilizado las cubetas manuales verticales y horizontales, con las que se obtenían buenas separaciones, pero bajas reproducibilidades. En HPTLC, las cámaras cromatográficas más usadas son las automáticas y entre ellas destacan dos, ADC2 y AMD2. ADC 2, del inglés Automatic Developing Chamber 2, es un dispositivo de desarrollo cromatográfico secuencial o isocrático, automático e independiente de los efectos ambientales capaz de obtener resultados fiables y reproducibles, en el que se puede controlar de forma remota la actividad y el preacondicionamiento de la placa, la saturación de la cámara, la distancia de desarrollo y el secado final. AMD 2, del inglés Automated Multiple Development, al igual que ADC 2, es un dispositivo de desarrollo cromatográfico automatizado controlado por ordenador e independiente de las condiciones ambientales que permite la elución en gradiente por etapas sobre distancias de separación crecientes, por lo que es capaz de resolver separaciones de muestras que contienen sustancias neutras, hidrofílicas y lipófilas en una sola serie. Permite llevar a cabo separaciones con diferente número de etapas tan cortas como 1 o 2 mm, en los que la composición de la fase móvil varía en cada etapa. Además, este gradiente en etapas junto a la posibilidad de repetir las etapas para refocalizar las bandas, hace que las separaciones sean más eficaces y los picos separados, más finos. Estas propiedades, junto con el alto grado de reproducibilidad, hacen de esta técnica una de las más usadas en el análisis lipídico. [2,11,17]



**Figura 4** CAMAG Automatic Device Chamber 2 (ADC 2) [Izq] y CAMAG Automatic Multiple Development 2 (AMD 2) [Dcha]

### **3.3.-DETECCION POR DENSITOMETRIA**

La técnica por excelencia más usada para la detección en HPTLC es la Densitometría, la cual consiste en la localización de las diferentes bandas cromatográficas tras su previa separación midiendo la cantidad de radiación que interacciona con los componentes de la banda. Es la técnica central entre la separación HPTLC y el acoplamiento con MS. Los modos densitométricos más utilizados son la Ultravioleta (UV) y la Fluorescencia. La radiación UV es frecuentemente utilizada para la detección de lípidos insaturados a una longitud de onda de 190 nm. Los lípidos saturados no responden en UV. Lógicamente, los lípidos no suelen ser fluorescentes, a menos que se les marque con un fluoróforo, o bien se induzca la fluorescencia, bien por derivación, o bien mediante inducción de fluorescencia mediante interacciones débiles, como es el caso de la primulina (2-[2-(4-aminofenil)-1,3-benzotiazol-6-il]-6-metil-1,3-benzotiazol-7-sulfonato de sodio) [18,19]. Esta crea interacciones no específicas entre el analito y el fluoróforo, produciéndose un aumento de su fluorescencia intrínseca en presencia de una cadena hidrocarbonada larga, como las de los ácidos grasos. La primulina permite también la detección de lípidos saturados y no interfiere con el uso de las técnicas de MS [20,21]. Además, la respuesta del sistema depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada, pudiéndose usar para el análisis cuantitativo

El orcinol (5-metilbenzeno-1,3-diol), permite la detección selectiva de glico-lípidos, como los GSL. Se basa en la deshidratación del correspondiente carbohidrato a furfural, y su reacción con orcinol en medio sulfúrico para producir un complejo coloreado, detectable en el visible a 550 nm [22]. La primulina y el orcinol pueden usarse para realizar el análisis semi-cuantitativo de una clase de lípidos, usando un patrón adecuado. Se han empleado la calibración con patrón externo y la adición de patrón, por ejemplo, para la determinación de la clase de SM en plasma humano, usando como patrón SM d:18:1;16:0 y densitometría usando primulina [20]

Otro método usado a menudo en la detección lipídica es la inmunotinción, que utiliza uno o varios anticuerpos dirigidos a los SL separados sobre la placa. Un ejemplo de ello se expuso en el artículo [23], que más tarde será comentado.

También se pueden usar como método de detección de lípidos reactivos que provoquen una oxidación u otra reacción, normalmente a cierta temperatura, que provoque carbonización, aromatización o formación de complejos coloreados, tales como el ácido sulfúrico o la combinación de acetato o sulfato de cobre con ácido fosfórico [24,25]. Estos son métodos destructivos. A menudo se han empleado para análisis semi-cuantitativo aunque hay que considerar los resultados con precaución ya que la estequiometría de la formación de esos complejos no es muy conocida y, por tanto, es difícil optimizar las condiciones de detección en cada caso.

En el ANEXO 1 puede encontrarse las referencias bibliográficas de las técnicas de revelado densitométrico usadas en el análisis de PL y SL, así como el tipo de análisis publicado (cualitativo/semi-cuantitativo).

### **4.- ACOPLAMIENTO HTPLC-MS PARA EL ANALISIS DE SL Y PL**

En el Anexo 1 también se detalla si el posterior acoplamiento a MS se ha realizado online o bien se procedió al raspado de la placa. Este método, tedioso y susceptible de errores experimentales,

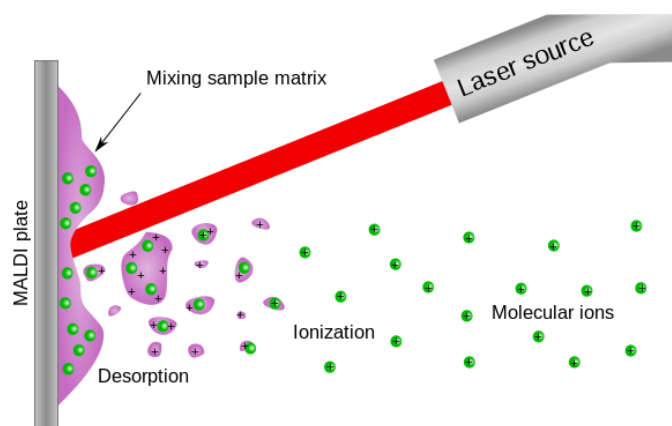
se va sustituyendo por las técnicas de acoplamiento directo que se explican en este apartado de la Memoria.

#### 4.1.- TÉCNICAS DE DESORCIÓN SOBRE LA PLACA

Una vez detectadas las bandas de interés tras el desarrollo cromatográfico, se procede a la desorción directamente desde la placa para la ionización y posterior análisis mediante MS de su contenido. En ocasiones es necesaria la utilización de algún tipo de tratamiento previo a la desorción, como la adición de un disolvente, para el correcto funcionamiento de la técnica. Existen una gran variedad de técnicas de ionización basadas en la desorción, entre las que cabe destacar MALDI y DESI, ya que, como se describirá a continuación, han sido muy utilizadas para la determinación de fosfolípidos y esfingolípidos.

##### 4.1.1.- DESORCIÓN E IONIZACIÓN LASER ASISTIDA POR MATRIZ (MALDI)

La técnica de ionización de MALDI se basa en la absorción de la energía, que proporciona un láser, por parte de una matriz, la cual recubre la placa donde se encuentran los analitos. Esta energía se utiliza para la generación de los diferentes iones (**Figura 5**). En el análisis de lípidos MALDI es frecuentemente combinado con un analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF). La combinación de MALDI-TOF con HPTLC, y el análisis de PL y glucolípidos por HPTLC-MALDI han sido analizadas en [26] y [27].



**Figura 5** Esquema de funcionamiento de MALDI

Es necesaria una cuidadosa selección de la matriz para superar los efectos de la supresión iónica. Las placas son a menudo rociadas o sumergidas en cantidades relativamente grandes de matrices orgánicas que generalmente las cubren siguiendo una secuencia de múltiples pasos de deposición. La matriz más usada en MALDI es ácido 2,5-dihidroxibenzoico [12]. Debido a la presencia de una matriz, la fragmentación en MALDI suele ser más compleja que en ESI.

De acuerdo con Schiller et al. [28,29] la dificultad para obtener información cuantitativa de MALDI está relacionada con la actual configuración del equipo MALDI, ya que la distribución de los analitos no es homogénea a lo largo de la banda. Por lo tanto, el espectro de masas producido depende de la posición de la zona de irradiación del láser, que es significativamente más pequeña que la banda de TLC. Por ello, en todos los trabajos revisados aquí, hemos observado

que la intensidad relativa de cada especie de lípido identificado es normalizada con respecto de la intensidad total de todas las especies de lípidos encontrados en cada muestra. Por ello los espectros obtenidos tras usar MALDI deben ser interpretados como comparativos en lugar de cuantitativos [30]

#### 4.1.1.1.- ESFINGOLÍPIDOS

Glucoesfingolípidos como GluCer, LacCer, Gb<sub>3</sub>, Gb<sub>4</sub> y otras estructuras más complejas fueron identificadas por HPTLC-MALDI en riñones de ratón (GalGb<sub>4</sub> y otras globo-SL), bazo (Gg<sub>4</sub>Cer) e intestino delgado (en concreto, Gg<sub>4</sub>Cer con ceramidas que contienen 4-hidroxisfinganina y ácidos grasos  $\alpha$ -hidroxilados), usando placas de silica gel en paralelo con orcinol, primulina e inmunodetección [31].

Se obtuvieron perfiles de SL y GSL a partir de músculos esqueléticos, tejido cerebral, y mioblastos de ratones, así como de suero humano con HPTLC-MALDI MS/MS con el fin de crear una base de datos de moléculas que proporciona información en investigaciones preclínicas [32]. Igualmente, se obtuvieron perfiles de GSL para la búsqueda de marcadores específicos para la diferenciación de células madre mesenquimatosas de médula ósea humana frente a osteoblastos ([33] por combinación de HPTLC-radiodensitometria-MALDI usando <sup>3</sup>H-gangliosidos marcados en la esfingosina).

Ante el problema de la eliminación previa de PL para el análisis de GSL en extractos de lípidos, Kozuel et al. desarrolló un método células humanas monocíticas THP-1 propagadas in vitro. Este combina la desintegración enzimática en placa de PL, tratando el extracto de lípidos con fosfolipasa C, junto con un posterior desarrollo cromatográfico y una detección mediante inmunotinción de los GSLs individuales con una mezcla de varios anticuerpos anti-GSL. [23] El pretratamiento de esta muestra proporcionó una mejora en la sensibilidad de detección de GSLs y permitió su análisis estructural directo desde la placa por MALDI MS y MS/MS

#### 4.1.1.2.- FOSFOLÍPIDOS

HPTLC-MALDI-MS fue usado para analizar PL, así como triglicéridos (TG) en yema de huevo rica en ácido linoleico conjugado con respecto a los huevos de pollo control [13]. Dos especies moleculares de LPC (liso-PC), 1 de SM, 17 de PC, 19 de TG y 9 de PE fueron identificadas.

Se ha destacado en la bibliografía el corto tiempo de “screening” necesario para el análisis de las principales clases de PL y la presentación en forma cartográfica de las especies individuales de PL por MALDI a partir de materiales biológicos [34]. Asimismo, PG, PC, PE, PI, liso-PE (LPE) y SM fueron identificados en *Pseudomonas fluorescens* arrastradas por el aire desde nubes de polvo [35]. El resultado de los perfiles del lipidoma bacteriano mostró la inesperada presencia de PC.

En otros trabajos también se usa MALDI para obtener perfiles comparativos. La concentración de liso-PC (LPC) fue mayor tras un tratamiento de 24 horas con un fármaco tras un xenoinjerto de adenocarcinoma colorrectal en ratones[36].

Otro trabajo describió la composición de PL en el esperma de abejas durante el almacenamiento en la abeja reina [11].

Se obtuvieron perfiles comparativos de PE, PS y colesterol en el líquido sinovial, demostrando que estas especies varían en las diferentes etapas de inflamación producidas por los implantes de articulación de rodilla basados en polietileno [37].

El lipidoma de la arquea marina *Pyrococcus furiosus* se estudió a partir de extractos de lípidos utilizando MALDI, o bien en disolución o directamente en la placa cromatográfica [38]. Además, los resultados sugieren que las cardiolipinas están extendidas en la arquea.

#### 4.1.2.- DESORCIÓN IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (DESI)

Otro tipo de métodos de ionización ambiental MS que se han aplicado a HPTLC de lípidos, es DESI, un método de “spray”, en el cual la ionización es simultánea con la extracción [39]. Un ESI asistido neumáticamente es dirigido a la superficie de la placa. La corriente de gas que golpea la superficie es una mezcla de disolventes. Las gotas cargadas impactan en la placa HPTLC facilitando la disolución de los analitos y generando gotas secundarias que se dispersan por la superficie de la placa bajo un gas nebulizador por un mecanismo ESI que permite una ionización suave con la mínima preparación de muestra. (Figura 6)

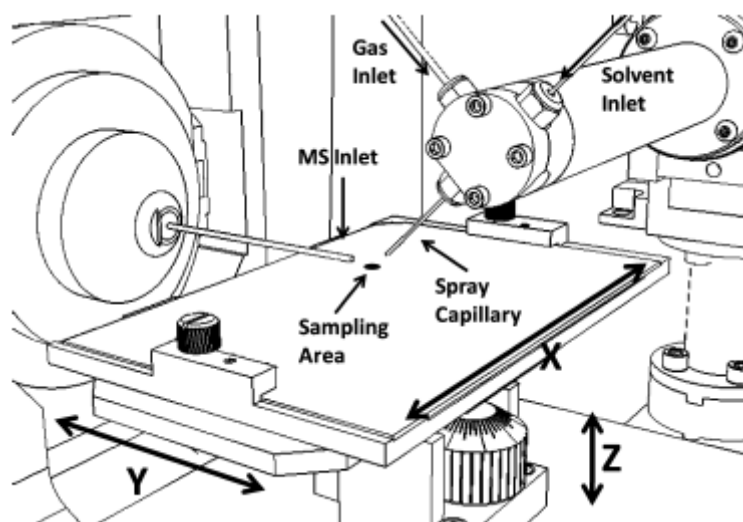


Figura 6 Esquema de funcionamiento de DESI

HPTLC-SD-DESI-MS ha aportado un enfoque sencillo pero potente acerca de la elucidación estructural detallada del lipidoma del cristalino humano. Esta técnica permitió detectar glicolípidos menores, (1% de todos los lípidos del cristalino aproximadamente), que no pudieron ser identificados por infusión directa del extracto de lípidos a MS debido a los efectos de supresión iónica de esa técnica [21]. HPTLC-SD (primulina)-DESI-MS, MS/MS permitió la detección de 30 especies de 11 clases de SL en el cristalino humano, incluyendo sulfatidas, dihidrosulfatidas, lactosil y dihidrolactosil ceramida sulfatos, incluidas nuevas especies de ácido fosfatídico unido a éter. Hay que mencionar que solo se ha detectado LacCer con esfinganina mediante esta técnica, mientras que en el caso de otras clases de GSL solo se detectaron análogos de esfingosina. Todo esto se logró a pesar de la limitada resolución de los experimentos de DESI, ya que los lípidos solo pueden separarse en una pequeña distancia porque la fuente de DESI tiene una distancia máxima móvil de 35,8 mm. Es decir, la separación previa de HPTLC redujo la complejidad del espectro de masas y por tanto se logró una detallada identificación de los SL citados por DESI-MS, reduciendo los efectos de supresión iónica en comparación con la MS por infusión directa.

En otro trabajo, diversos SL fueron directamente identificados desde rodajas de tejido cerebral de rata por HPTLC-DESI-MS, MS/MS incluso con una separación cromatográfica incompleta [40].

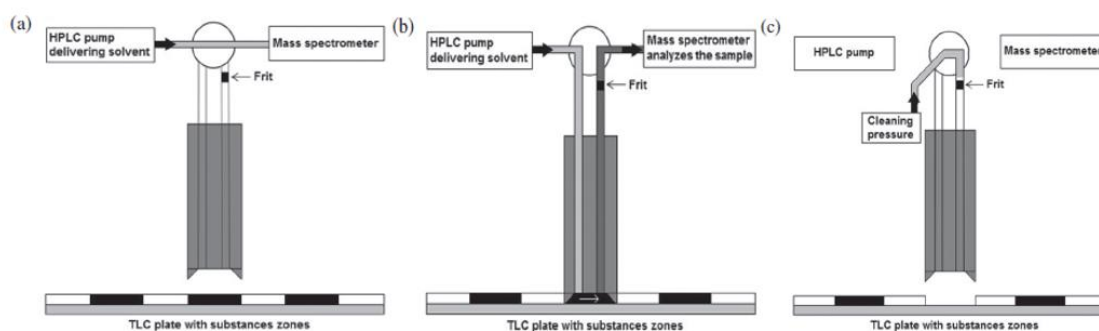
No se requieren separaciones óptimas en la placa dada la alta sensibilidad, especificidad y resolución espacial de la DESI-MS. De esta forma, se han identificado gangliósidos complejos en modo negativo. DESI-MS/MS reveló la presencia de los dos isómeros GD1a y GD1b utilizando orcinol para poder observarlos por densitometría en el visible.

DESI-MS fue también aplicada con éxito en el análisis directo de PL de cerebro porcino. Estos extractos fueron separados en dos dimensiones sobre placas HPTLC de silica gel [41]. Se obtuvieron imágenes moleculares DESI-MS de bandas parcialmente separadas, pero sin resolver completamente. Ocho clases de PL, conteniendo más de cincuenta especies, fueron detectadas en el modo de ionización negativo. Aunque no hay una separación completa, la especificidad y selectividad conseguida por la detección MS y MS/MS permite la resolución de bandas superpuestas. La impregnación de los lípidos en la placa de HPTLC con primulina permite la visualización de las bandas mediante fluorescencia. De esta forma, el experimento de DESI se puede realizar en modo de muestreo puntual, posicionando el espray en la banda que se desea investigar.

#### 4.1.2.- TÉCNICAS BASADAS EN LA EXTRACCIÓN AUTOMATIZADA DE LA BANDA CROMATOGRÁFICA

Tras la separación de la muestra en la placa, la eliminación de la fase móvil y la detección de las bandas separadas, los lípidos son localizados en la placa cromatográfica mediante el densitómetro, y son extraídos automáticamente con un disolvente apropiado (usando una bomba de HPLC) y transferidos directamente hasta el equipo MS mediante una interfaz modular TLC-MS. Recientemente se ha publicado una revisión de sus aplicaciones generales [42]

La interfaz funciona de la siguiente manera: una cabeza de extracción (oval o circular, de 4x2 o 2x2 mm) se posiciona justo encima de la banda que se desea analizar. Se bombea disolvente a través de un capilar de entrada a la cabeza de elución, disolviendo y extrayendo la banda. La silica gel es filtrada y el eluato obtenido es dirigido mediante otro capilar hacia el espectrómetro de masas. La operación se completa en menos de un minuto. Usando esta interfaz, la transferencia de la zona de interés desde el cromatograma de HPTLC hasta MS se puede realizar de forma automática, evitando el rascado y haciendo posible la identificación directa de las especies de lípidos de forma rápida y reproducible (**Figura 7**). La interfaz debe extraer un porcentaje representativo de la muestra (80%) para que se pueda considerar un análisis cuantitativo. Para ello, la banda cromatográfica separada ha de ser tan estrecha como sea posible.



**Figura 7** Procedimiento de desorción mediante pistón ovalado de fuerza controlada; (a) posición bypass; (b) posición de elución; (c) posición de limpieza con aire presurizado



Una ventaja de esta interfaz es su independencia con respecto al espectrómetro de masas utilizado, ya que cualquier equipo MS se puede conectar a dicha interfaz. También se pueden conectar otros tipos de sistemas de detección, ya sea directamente o mediante extracción off line en viales. A diferencia de las técnicas basadas en la desorción, la interfaz no permite un escaneo continuo a lo largo de la calle de la placa. Sin embargo, permite un acceso directo y bajo demanda a las zonas de seleccionadas en la placa.

Las técnicas de ionización más utilizadas para el análisis lipídico han sido ESI y APCI.

#### **4.1.2.1.- ESFINGOLÍPIDOS**

En el caso de los SL neutros la ionización ESI usada suele ser en modo positivo y los iones obtenidos suelen ser  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H+2Na]^+$ . Para el análisis de sulfátidas o gangliósidos, la ionización suele ser en modo negativo.

Varios métodos de desarrollo para SL están basados en AMD. En dos de ellos [43,44], tras el desarrollo cromatográfico, los analitos fueron detectados a 450 nm tras su carbonización con sulfato de cobre/ácido fosfórico. En otro [20] se usó primulina para inducir fluorescencia o placa sin impregnar y UV a 190 nm. En todos los casos, se usaron dos placas gemelas sometidas a las mismas condiciones cromatográficas para el acoplamiento HPTLC-MS con la interfaz.

Se separaron diez subclases de CER, Chol y FFA fueron separados en placas LiChrospher HPTLC de silica gel usando un gradiente AMD de 11 etapas de elución basadas en mezclas de diferente composición de cloroformo, acetona y metanol agua, con un pre-acondicionamiento de la placa con ácido acético [44]. Las diferentes subclases de ceramidas (CER) forman parte de las láminas lipídicas del stratum corneum, jugando un papel importante como barrera en la piel de los mamíferos. Estas moléculas están formadas por una base esfingoide, entre las que se pueden incluir esfingosina (S), fitoesfingosina (P), 6-hidroxisofingosina (H) o dihidrosfingosina (dS), y cadenas de acilos grasos, que pueden ser no hidroxiladas (N),  $\alpha$ -hidroxiladas (A),  $\omega$ -hidroxiladas (O). Este último tipo puede estar esterificado a un ácido graso (E). Las ceramidas analizadas incluyen: AH, AP, NH, EOH / AS, AdS, NP, OS, EOP, NS / NdS, EOS. AS fue elegido como patrón externo para el análisis semicuantitativo CER por densitometría.

La combinación de un análisis SD semicuantitativo de una clase de lípidos por densitometría usando patrones representativos, y su perfil ESI-MS permite llevar a cabo un análisis semicuantitativo de cada una de las especies moleculares. De este modo, se ha llevado a cabo un análisis semicuantitativo de SM usando una placa de HPTLC de silica gel por densitometría (UV a 190 nm), utilizando SM (d18:1/16:0) como patrón, utilizando el método de adición estándar [20]. A partir de los perfiles ESI-MS de SM, se puede hacer una normalización de las especies iónicas en el perfil ESI-MS, ya que el solvente de la interfaz fue eliminado antes del análisis MS[112]. De esta forma, el espectro obtenido de ESI-MS es un perfil representativo de las especies moleculares individuales para una clase de lípidos concreta, ya que, en la ionización ESI, los factores respuesta en MS son similares para especies moleculares que pertenecen a una misma clase. Es la cabeza polar de cada clase la que define la respuesta de ESI para los lípidos, y la longitud de la cadena alifática no la modifica sustancialmente [45].

En los experimentos HPTLC-MS, a diferencia de LC-MS, la fase móvil (ya sea un gradiente o una mezcla de disolventes) es evaporada antes de la detección, y los picos son extraídos y enviados al equipo MS a través de la interfaz. El solvente utilizado en la elución es un solvente

puro o tiene una composición constante obteniendo, de esta manera, eficiencias de ionización similares para los lípidos individuales dentro de una clase de lípidos concreta separada en la placa de sílica gel. Esto permite realizar una semicuantificación de cada especie de SM. Además, la información proporcionada por los perfiles ESI-MS puede servir para ayudar a mejorar la selección previa de los estándares representativos necesitados para SQ. Esta retroalimentación es útil para mejorar los análisis semicuantitativos [46].

#### 4.1.2.2.- FOSFOLÍPIDOS

Con respecto a PL, los espectros HPTLC-ESI(+)-MS de PC y CL ionizan como  $[M+Na]^+$  y  $[M-2H+3Na]^+$  respectivamente, y las correspondientes especies moleculares pueden ser identificadas por MS/MS[11]. Sin embargo, PE permite preferentemente la ionización negativa. Asimismo, los espectros ESI(-)-MS y MS/MS de CL fueron también obtenidos como  $[M-2H]^{-2}$ , así como el de las demás especies de PE y PG, como  $[M-H]^{-}$  y  $[M]^{-}$ , respectivamente. Los mismos iones fueron obtenidos para PL separados a partir de extractos bacterianos. En otro trabajo, [47] Krüger et al. publicaron que PC y PE ionizados se obtuvieron en modo positivo  $[M+Na]^+$  y  $[M+2Na-H]^+$ .

Se usó la interfaz ESI-MS para caracterizar lecitinas (PC y PE) de soja y girasoles, materias primas usadas para la producción de chocolate [47]. El uso de SD-interfaz-ESI-MS permitió obtener la comparación de las trazas de lecitinas. La primulina fue usada para conseguir la semicuantificación de PC y PE por fluorescencia SD, usando como patrones externos PC34:1 y PE34:1 respectivamente. También se realizó una calibración independiente usando ESI(+)-MS. Los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) de los siete PL se estudiaron para las tres técnicas de detección empleadas, obteniendo unos LOD medios que oscilaron entre 8 y 40 mg / kg para HPTLC-FLD, 10 a 280 mg / kg para HPTLC-ESI(+)-MS, y de 15 a 310 mg / kg para HPTLC-FLD-ESI(+)-MS, después de la impregnación con primulina. Se usó un cuadrupolo sencillo como analizador de MS.

En otro trabajo se identificaron especies moleculares de PC, PE, PG unidas a proteínas de membrana en bacterias fotosintéticas purpuras. Esto se logró a pesar de que la resolución cromatográfica no fue completa [17]. Los PL unidos a MP tienen influencia en la actividad de la proteína, y, en general, en la cristalización de éstas para el aislamiento de MP. Así, las membranas fotosintéticas de *Rhodobaca (Rbc.) bogoriensis*, *Rhodobacter (Rb.) blasticus*, y *Rhodospirillum (R.) rubrum* fueron extraídas usando un detergente especial, dodecil  $\beta$ -maltosido (DDM). Los extractos fueron purificados adicionalmente para obtener un complejo Proteína-Detergente-Lípido. Tras ello se aplicó, sobre placa de sílica gel, un gradiente AMD de 7 etapas con una mezcla de disolventes Metanol:Agua:Acetato de etilo (con preacondicionamiento de placa con ácido acético) para la separación. Las bandas fueron detectadas a 190 nm por SD y video-SD (UV a 366 nm). Se seleccionaron y se transfirieron directamente vía interfaz a ESI-MS las respectivas zonas correspondientes basándose en las distancias de migración de los patrones.

## 5.- CONCLUSIONES

La Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia acoplada a la Espectrometría de Masas (HPTLC-MS) permite la separación de lípidos en clases y subclases, su determinación y la identificación estructural de las diferentes especies moleculares. a partir de muestras complejas de origen biológico. Este trabajo se ha centrado en su aplicación al análisis de fosfolípidos y esfingolípidos. Tras la separación, la densitometría permite tanto la determinación cuantitativa de PL y SL

individuales, como la semi-cuantificación de sus subclases, en ambos casos si existen los patrones adecuados. Tras ello, el acoplamiento con MS permite el reconocimiento estructural individual de estas especies moleculares, diferenciadas en la longitud de cadena y en el número de insaturaciones de sus ácidos grasos, basándose en las relaciones  $m/z$  obtenidas.

Como se puede observar en algunos ejemplos de la bibliografía, HPTLC reduce la complejidad de los espectros de masas obtenidos respecto a la introducción directa de la muestra en un equipo MS, reduciendo así la supresión iónica. Gracias a esto se han podido identificar especies moleculares de SL que no habían sido detectadas por ninguna otra técnica.

El acoplamiento automatizado permite el tratamiento de un alto número de muestras en un periodo de tiempo corto, minimizando los errores experimentales que se obtenían por rascado de la placa y su posterior aislamiento tras la filtración y eliminación del disolvente en rotavapor. Este acoplamiento es llevado a cabo mediante la selección de las bandas de interés vía interfaz basada en la extracción automatizada e ionización ESI, o mediante el barrido de las calles de la placa utilizando técnicas de desorción/ionización como MALDI o DESI.

Actualmente, la técnica HPTLC-SD-MS se encuentra en un estado de desarrollo y perfeccionamiento, pudiendo tener un papel especial y complementario a otras técnicas cromatográficas acopladas a MS.

## 6.-BIBLIOGRAFÍA

- [1] Wenk MR. Lipidomics: New Tools and Applications. *Cell*, 2010. 143(6): p. 888-895. DOI: 10.1016/j.cell.2010.11.033.
- [2] Yang K, Cheng H, Gross RW, and Han XL. Automated lipid identification and quantification by multidimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(11): p. 4356-4368. DOI: 10.1021/ac900241u.
- [3] Han XL and Jiang XT. A review of lipidomic technologies applicable to sphingolipidomics and their relevant applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009. 111(1): p. 39-52. DOI: 10.1002/ejlt.200800117.
- [4] Han X. *Lipidomics: Comprehensive mass spectrometry of lipids*. Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 2016.
- [5] Kishimoto, K., Urade, R., Ogawa, T. and Moriyama, T. Nondestructive Quantification of Neutral Lipids by Thin-Layer Chromatography and Laser-Fluorescent Scanning: Suitable Methods for "Lipidome" Analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 281, 657–662. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4404.
- [6] Merrill AH and Sullards MC. Opinion article on lipidomics: Inherent challenges of lipidomic analysis of sphingolipids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2017. 1862(8): p. 774-776. DOI: 10.1016/j.bbalip.2017.01.009.
- [7] Fang ML, Ivanisevic J, Benton HP, Johnson CH, Patti GJ, Hoang LT, et al. Thermal degradation of small molecules: A global metabolomic investigation. *Analytical Chemistry*, 2015. 87(21): p. 10935-10941. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03003.
- [8] Rainville PD, Stumpf CL, Shockcor JP, Plumb RS, and Nicholson JK. Novel application of reversed-phase UPLC-oeTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics. *Journal of Proteome Research*, 2007. 6(2): p. 552-558. DOI: 10.1021/pr060611b.
- [9] Manwaring, V.; Boutin, M.; Auray-Blais, C. A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 9039–9048. DOI: 10.1021/ac401542k.
- [10] Morlock G and Schwack W. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010. 29(10): p. 1157-1171.
- [11] Wegener, J.; Zschoernig, K.; Onischke, K.; Fuchs, B.; Schiller, J.; Mueller, K. Conservation of Honey Bee (*Apis mellifera*) Sperm Phospholipids during Storage in the Bee Queen. A TLC/MALDI-TOF MS Study. *Experimental Gerontology* 2013, 48, 213-222. DOI: 10.1016/j.exger.2012.12.009.
- [12] Torretta, E.; Vasso, M.; Fania, C.; Capitano, D.; Bergante, S.; Piccoli, M.; Tettamanti, G.; Anastasia, L.; Gelfi, C. Application of Direct HPTLC-MALDI for the Qualitative and Quantitative profiling of Neutral and Acidic Glycosphingolipids: The Case of NEU3 Overexpressing C2C12 Murine Myoblasts. *Electrophoresis* 2014, 35, 1319-1328. DOI 10.1002/elps.201300474.

- [13] Shinn, S.; Liyanage, R.; Lay, J.; Proctor, A. Improved Fatty Acid Analysis of Conjugated Linoleic Acid Rich Egg Yolk Triacylglycerols and Phospholipid Species. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6608-6615. DOI: 10.1021/jf501100y.
- [14] Oellig, C.; Link, K.; Schwack, W. Characterization of E 472 Food Emulsifiers by High-Performance Thin-Layer Chromatography with Fluorescence Detection and Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**, in press. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.460874
- [15] Zhang, Y.; Baycin-Hizal, D.; Kumar, A.; Priola, J.; Bahri, M.; Heffner, K.M.; Wang, M.; Han, X.; Bowen, M.A.; Betenbaugh, M.J. High-Throughput Lipidomic and Transcriptomic Analysis to Compare SP2/0, CHO, and HEK-293 Mammalian Cell Lines. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 1477-1485. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02984.
- [16] Helmy, F.; Morris, A. A Comparative Study of the Lipid Composition of the Brain of Chicken and Rat During Myelination. A chromatographic and densitometric analysis *J. Planar Chromatogr.- Mod. TLC* **2011**, *24*, 325-330. DOI: 10.1556/JPC.24.2011.4.10.
- [17] Lapieza, M.P.; Jungas, C.; Savirón, M.; Jarne, C.; Membrado, L.; Vela, J.; Orduna, J.; Garriga, R.; Galbán, J.; Cebolla, V.L. HPTLC Coupled to ESI-Tandem MS for Identifying Phospholipids Associated to Membrane Proteins in Photosynthetic Purple Bacteria. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **2019**, *42*, 1-8. DOI: 10.1080/10826076.2018.1561465.
- [18] Alves, E.; Melo, T.; Simoes, C.; Faustino, M.A.F.; Tome, J.P.C.; Neves, M.G.P.M.S.; Cavaleiro, J.A.S.; Cunha, A.; Gomes, P.; Domingues, P.; Domingues, M.R.M.; Almeida, A. Photodynamic Oxidation of *Staphylococcus warneri* Membrane Phospholipids: New Insights Based on Lipidomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1607-1618. DOI: 10.1002/rcm.6614.
- [19] Sicard, R.; Landgraf, R. High-Performance Chromatographic Separation of Cerebrosides. In *Lipidomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2017*, Ed. by Bhattacharya, S.K., **2017**, vol. 1609, ch 7, 57-63. DOI 10.1007/978-1-4939-6996-8\_7.
- [20] Domínguez, A.; Jarne, C.; Cebolla, V.L.; Galbán, J.; Savirón, M.; Orduna, J.; Membrado, L.; Lapieza, M.P.; Romero, E.; Sanz-Vicente, I.; de Marcos, S.; Garriga, R. A Hyphenated Technique Based on High-Performance Thin Layer Chromatography for Determining Neutral Sphingolipids: A Proof of Concept. *Chromatography* **2015**, *2*, 167-187. DOI: 10.3390/chromatography2020167.
- [21] Seng J.A.; Ellis, S.R.; Hughes, J.R.; Maccarone, A.T.; Truscott, R.J.W.; Blanksby, S.J.; Mitchell, T.W. Characterisation of Sphingolipids in the Human Lens by Thin Layer Chromatography-Desorption Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 1285-1291. DOI: 10.1016/j.bbailip.2014.05.006.
- [22] Müthing, J.; Ziehr, H. Enhanced thin-layer chromatographic separation of GM1b-type gangliosides by automated multiple development. *J. Chromatogr. B* **1996**, *687*, 357. DOI: 10.1016/S0378-4347(96)00258-7
- [23] Kouzel, I.U.; Pirkel, A.; Pohlentz, G.; Soltwisch, J.; Dreisewerd, K.; Karch, H.; Muething, J. Progress in Detection and Structural Characterization of Glycosphingolipids in Crude Lipid Extracts by Enzymatic Phospholipid Disintegration Combined with Thin-Layer Chromatography Immunodetection and IR-MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1215-1222. DOI: 10.1021/ac4035696.

- [24] Neubert, R.H.H.; Bayrak, O.; Steinbach, S.; Sonnenberger, S.; Dobner, B. Development and Validation of Analytical Methods for the Detection and Quantification of a Novel Dimeric Ceramide in Stratum Corneum and Other Layers of the Skin. *Chromatographia* 2016, 79, 1615-1624. DOI: 10.1007/s10337-016-3187-9.
- [25] Reisberg, M.; Arnold, N.; Bisrat, D.; Asres, K.; Neubert, R.H.H.; Dräger, B. Quantification of Glycosylceramides in Plants by Automated Multiple Development–High-Performance Thin-Layer Chromatography. *J. Planar Chromatogr.- Mod. TLC* 2017, 30, 460-466. DOI: 10.1556/1006.2017.30.6.1.
- [26] Fuchs, B.; Süß, R.; Nimptsch, A.; Schiller, J. MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State. *Chromatographia* 2009, 69, S95-S105. DOI: 10.1365/s10337-008-0661-z.
- [27] Fuchs, B. Analysis of Phospholipids and Glycolipids by Thin-Layer Chromatography Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2012, 1259, 62–73. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.068.
- [28] Schiller, J. The Simple Beauty of TLC-MALDI-MS. *The Analytical Scientist*, <https://theanalyticalscientist.com/issues/1115/the-simple-beauty-of-tlc-maldi-ms/>
- [29] Schiller, J.; Fuchs, B.; Suss, R.; Popkova, Y.; Griesinger, H.; Matheis, K.; Oberle, M.; Schulz, M. TLC/MALDI MS for the analysis of lipids. In: *Planar Chromatography-Mass Spectrometry*, Ed. by Kowalska, T.; Sajewicz, M.; Sherma, J. *Chromatographic Science Series* 2016, 110, 213-232. DOI: 10.1201/b19090\_13.
- [30] Singhto, N.; Vinaiphath, A.; Thongboonkerd, V. Discrimination of urinary exosomes from microvesicles by lipidomics using thin layer liquid chromatography (TLC) coupled with MALDI-TOF mass spectrometry. *Sci. Reports* 2019, 9, 13834. DOI: 10.1038/s41598-019-50195-z.
- [31] Suzuki, A.; Miyazaki, M.; Matsuda, J.; Yoneshige, A. High-Performance Thin-Layer Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Neutral Glycosphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1811, 861–874. DOI: 10.1016/j.bbailip.2011.06.018.
- [32] Torretta, E.; Fania, C.; Vasso, M.; Gelfi, C. HPTLC-MALDI MS for (Glyco)Sphingolipid Multiplexing in Tissues and Blood: A Promising Strategy for Biomarker Discovery and Clinical Applications. *Electrophoresis* 2016, 37, 2036-2049. DOI 10.1002/elps.201600094.
- [33] Bergante, S.; Torretta, E.; Creo, P.; Sessarego, N.; Papini, N.; Piccoli, M.; Fania, C.; Cirillo, F.; Conforti, E.; Ghiroldi, A.; Tringali, C.; Venerando, B.; Ibatici, A.; Gelfi, C.; Tettamanti, G.; Anastasia, L. Gangliosides as a Potential New Class of Stem Cell Markers: The Case of GD1a in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *J. Lipid Res.* 2014, 55, 549-560. DOI 10.1194/jlr.M046672.
- [34] Kondakova, T. ; Merlet Machour, N. ; Duclairoir Poc, C. HPTLC-MALDI TOF MS Imaging Analysis of Phospholipids., In *Lipidomics, Neuromethods* 2017, Ed. by Wood, P., vol. 125, ch 12, 163-173. Humana Press, Springer 2017, New York. DOI:10.1007/978-1-4939-6946-3\_12.

- [35] Kondakova, T.; Merlet-Machour, N.; Chapelle, M.; Preterre, D.; Dionnet, F.; Feuilloley, M.; Orange, N.; Duclairoir Poc, C. A New Study of the Bacterial Lipidome: HPTLC-MALDI-TOF Imaging Enlightening the Presence of Phosphatidylcholine in Airborne *Pseudomonas fluorescens* MFAF76a. *Research in Microbiology* 2015, 166, 1-8. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.11.003.
- [36] Batubara, A.; Carolan, V.A.; Clench, M.R.; Loadman, P.M.; Sutton, C.; Shnyder, S.D. Thin-Layer Chromatography/Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging for the Analysis of Phospholipids in LS174T Colorectal Adenocarcinoma Xenografts Treated with the Vascular Disrupting Agent DMXAA. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2015, 29, 1288-96. DOI: 10.1002/rcm.7223.
- [37] Frohlich, S.M.; Archodoulaki, V-M.; Allmaier, G.; Marchetti-Deschmann, M. MALDI-TOF Mass Spectrometry Imaging Reveals Molecular Level Changes in Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene Joint Implants in Correlation with Lipid Adsorption. *Anal. Chem.* 2014, 86, 9723-9732. DOI: 10.1021/ac5025232.
- [38] Lobasso, S.; Lopalco, P.; Angelini, R.; Vitale, R.; Huber, H.; Muller, V.; Corcelli, A. Coupled TLC and MALDI-TOF/MS Analyses of the Lipid Extract of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea* 2012, 2012957852. DOI: 10.1155/2012/957852.
- [39] Ellis, S.R.; Brown, S.H.; in het Panhuis, M.; Blanksby, S.J.; Mitchell, T.W. Surface Analysis of Lipids by Mass Spectrometry: More than Just Imaging. *Progress in Lipid Research* 2013, 52, 329-353. DOI: 10.1016/j.plipres.2013.04.005
- [40] Wiseman, J.M.; Li, Jessica, B. Elution, Partial Separation, and Identification of Lipids Directly from Tissue Slices on Planar Chromatography Media by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, 82, 8866-8874. DOI: 10.1021/ac1016453.
- [41] Paglia, G.; Ifa, D.R.; Wu, C.; Corso, G.; Cooks, R.G. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Lipids after Two-Dimensional High-Performance Thin-Layer Chromatography Partial Separation. *Anal. Chem.* 2010, 82, 1744-1750. DOI: 10.1021/ac902325j.
- [42] Sherma, J.; Rabel, F. Review of Advances in Planar Chromatography-Mass Spectrometry Published in the Period 2015–2019, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 2020, DOI: 10.1080/10826076.2020.1725561
- [43] Kabrodt, K.; Lüttich, J.; Dittler, I.; Schellenberg, I. Improved HPTLC Separation of Lipids using Automated Multiple Development (AMD) and Identification with the TLC-MS-Interface. Presented at the HPTLC 2011- International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Basel, Switzerland, July 2011, Proceedings, p. 63.
- [44] Jamin, E.L.; Jacques, C.; Jourdes, L.; Tabet, J-C.; Borotra, N. ; Bessou-Touya, S.; Debrauwer, L. ; Duplan, H. Identification of Lipids of the Stratum Corneum by High Performance Thin Layer Chromatography and Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2019, 25, 278-290. DOI: 10.1177/1469066718815380.
- [45] Han, X. *Lipidomics. Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*, John Wiley & Sons, 2016, Hoboken, NJ, ch. 2, p 27-28. DOI: 10.1002/9781119085263.ch1

- [46] Cebolla, V.L.; Membrado, L.; Vela, J.; Jarne, C.; Lapieza, M.P. HPTLC of lipid-based mixtures in different matrices: combination of densitometry and mass spectrometry for obtaining qualitative and quantitative sample information. Presented at the HPTLC Asia 2018, Bangkok, November 19, 2018.
- [47] Krüger, S.; Buermann, L.; Morlock, G.E. Comparison and Characterization of Soybean and Sunflower Lecithins used for Chocolate Production by High-Performance Thin-Layer Chromatography with Fluorescence Detection and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 2893-2901. DOI: 10.1021/jf506332f.
- [48] Parchem, K.; Kusznierevich, B.; Chmiel, T.; Maciołek, P.; Bartoszek, A. Profiling and Qualitative Assessment of Enzymatically and Thermally Oxidized Egg Yolk Phospholipids using a Two-Step High-Performance Liquid Chromatography Protocol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2019, DOI 10.1002/aocs.12218.
- [49] Lobasso, S.; Tanzarella, P.; Vergara, D.; Maffia, M.; Cocco, T.; Corcelli, A. Lipid Profiling of Parkin-Mutant Human Skin Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 2017, 232, 3540-3551. DOI: 10.1002/jcp.25815.
- [50] Popkova, Y.; Meusel, A.; Breitfeld, J.; Schleinitz, D.; Hirrlinger, J.; Dannenberger, D.; Kovacs, P.; Schiller, J. Nutrition-Dependent Changes of Mouse Adipose Tissue Compositions Monitored by NMR, MS, and Chromatographic Methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 5113-5123. DOI: 10.1007/s00216-015-8551-3.
- [51] Lopalco, P.; Stahl, J.; Annese, C.; Averhoff, B.; Corcelli, A. Identification of Unique Cardiolipin and Monolysocardiolipin Species in *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1-12. DOI: 10.1038/s41598-017-03214-w.
- [52] Harris, S.P.; Fujiwara, N.; Mealey, R.H.; Alperin, D.C.; Naka, T.; Goda, R.; Hines, S.A. Identification of *Rhodococcus equi* Lipids Recognized by Host Cytotoxic T Lymphocytes. *Microbiology* 2010, 156, 1836-1847. DOI: 10.1099/mic.0.035915-0.
- [53] Teuber, K.; Riemer, T.; Schiller, J. Thin-Layer Chromatography Combined with MALDI-TOF-MS and <sup>31</sup>P-NMR to Study Possible Selective Bindings of Phospholipids to Silica Gel. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 398, 2833-2842. DOI 10.1007/s00216-010-4064-2.
- [54] AhYoung, A.P.; Egea, P.F. Determining the Lipid-Binding Specificity of SMP Domains: An ERMES Subunit as a Case Study. In: *Intracellular Lipid Transport. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology* 1949, Ed. by Drin, G. Humana Press, New York, 2019, ch 16, 213-235. DOI: 10.1007/978-1-4939-9136-5\_16.
- [55] Pinault, M.; Guimaraes, C.; Dumas, J.F.; Servais, S.; Chevalier, S.; Besson, P.; Goupille, C. A 1D High Performance Thin Layer Chromatography. Method Validated to Quantify Phospholipids Including Cardiolipin and Monolysocardiolipin from Biological Samples. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2019, 1900240. DOI: 10.1002/ejlt.201900240.
- [56] Abbes, I.; Rihouey, C.; Hardouin, J.; Jouenne, T.; De, E.; Alexandre, S. Identification by Mass Spectrometry of Glucosaminylphosphatidylglycerol, a Phosphatidylglycerol Derivative, Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018, 32, 2113-2121. DOI: 10.1002/rcm.8277.



- [57] Höglinger, D. Bi- and Trifunctional Lipids for Visualization of Sphingolipid Dynamics within the Cell. In: *Intracellular Lipid Transport. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 1949*, Ed. by Drin, G. Humana Press, New York, 2019, ch 8, 95-103. DOI: 10.1007/978-1-4939-9136-5\_8.
- [58] Nomoto, Y.; Itaya, K.; Watanabe, T.; Yamashita, T.; Okazaki, T.; Tokudome, Y. Epidermal Permeability Barrier Function and Sphingolipid Content in the Skin of Sphingomyelin Synthase 2 Deficient Mice. *Experimental Dermatology* 2018, 27, 827-832. DOI: 10.1111/exd.13497.
- [59] Kamimiya, H.; Suzuki, Y.; Mathew, A.; Kabayama, K.; Kojima, H.; Kushi, Y. Simple and Rapid Removal of the Interference in Gangliosides Extracted from HPTLC Spot on MALDI-TOF MS Analysis. *Anal. Methods* 2013, 5, 6617-6621. DOI: 10.1039/c3ay41011k.
- [60] Ruh, H.; Sandhoff, R.; Meyer, B.; Gretz, N.; Hopf, C. Quantitative Characterization of Tissue Globotetraosylceramides in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease by Primadrop Sample Preparation and Indirect High-Performance Thin Layer Chromatography-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass Spectrometry with Automated Data Acquisition. *Anal. Chem.* 2013, 85, 6233-6240. DOI: 10.1021/ac400931u.
- [61] Backman, A.P.E.; Halin, J.; Kjellberg, M.A.; Mattjus, P. Indirect Lipid Transfer Protein Activity Measurements Using Quantification of Glycosphingolipid Production. In: *Intracellular Lipid Transport. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology 1949*. Ed. by Drin, G. Humana Press, New York, 2019, ch 9, 105-114. DOI: 10.1007/978-1-4939-9136-5\_9.
- [62] Jarne, C.; Savirón, M.; Lapieza, M.P.; Membrado, L.; Orduna, J.; Galbán, J.; Garriga, R.; Morlock, G.E.; Cebolla, V.L. High-Performance Thin-Layer Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Identifying Neutral Lipids and Sphingolipids in Complex Samples. *J. AOAC Int.* 2018, 101, 1993-2000. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0329.
- [63] Park, H.; Zhou, Y.; Costello, C.E. Direct Analysis of Sialylated or Sulfated Glycosphingolipids and Other Polar and Neutral Lipids using TLC-MS Interfaces *J. Lipid Res.* 2014, 55, 773-781. DOI: 10.1194/jlr.D046128.
- [64] Al-Daghri, N.M.; Torretta, E.; Barbacini, P.; Asare, H.; Ricci, C.; Capitano, D.; Guerini, F.R.; Sabico, S.B.; Alokail, M.S.; Clerici, M.; Gelfi, C. Sphingolipid Serum Profiling in Vitamin D Deficient and Dyslipidemic Obese Dimorphic Adults. *Sci. Rep.* 2019, 9, 16664. DOI: 10.1038/s41598-019-53122-4.

**ANEXO 1**

<b>MUESTRAS ORIGINALES</b>	<b>SUBCLASES DE PL Y SL SEPARADAS</b>	<b>REVELADORES DENSITOMÉTRICOS</b>	<b>DESARROLLO CROMATOGRÁFICO</b>	<b>TIPO DE ANALISIS Y REFERENCIA</b>
Yema de huevo oxidada enzimática y térmicamente	PE, PC-hidroperóxidos	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; Azul de Molibdeno	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:acetone:Agua (35:25:4:14:2)	Cualitativo [48]
Fibroblastos dérmicos	PL, gangliósidos	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Primulina; Azul de Molibdeno	Isocrático a) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:Agua (85:15:10:3.5) o b) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua:NH <sub>4</sub> OH 25% (120:75:6:2).	Semicuantitativo, rascado (MALDI). Sin detalles de los estándares. [49]
Lecitinas de girasol y soja en chocolate	PC, PE	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua:Amoniaco (25%) (30:17:2:1)	Semicuantitativo, patrón externo. Acoplado a la interfaz ESI-MS y MALDI [47]
Cepas de <i>Carlbergensis S. pastorianus syn.</i>	PG, CL, LPG, PC, PA, hidro- e dihidroperoxi CL	Primulina	Isocrático. Placas activadas con ácido bórico 2.3% en etanol. CHCl <sub>3</sub> :EtOH:Agua:Trietilamina (30:35:7:35)	Rascado, análisis con MS [18]
Líneas celulares de mamíferos (SP2/O, CHO, HEK)	Lípidos polares (PL, SL)	2,7-diclorofluoresceína	Separación bidimensional 1) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (71:25:2.5); 2) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:Agua (76:9:12:2) Isocrático: n-hexano:diel eter:AcH (80:20:1.5) para separación de lípidos apolares.	Cualitativo [15]
Tejido adiposo de ratón	PL, TG (Interferencias de PC)	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :EtOH:Agua:Trietilamina (35:35:7:35)	Comparativo. Rascado de MALDI [50]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CL, Monoliso-CL	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Azul de Molibdeno ninhidrina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:Agua (85:15:10:3.5)	Cualitativo. Rascado [51]
Yema de huevo rica en ácido linoleico conjugado y huevos de control	PL, NL, FA	Primulina	Isocráticos CHCl <sub>3</sub> :EtOH:Agua:Trietilamina (5:5:1:5)	Rascado para MALDI [13]
Proteínas de membrana y extractos de bacteria fotosintética púrpura	PC, PE, CL, PG	UV 190 nm	Secuencial, 7 etapas en gradiente por AMD basadas en MeOH:Agua:Acetato de Etilo, con precondicionamiento con AcH 1N	Acoplamiento con la interfaz ESI-MS [17]
Cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en nubes de polvo de aire	Subclases de PL	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua:Trietilamina (35:35:7:35)	Acoplamiento con MALDI [35]

Xenoinjertos de adenocarcinoma colorrectal LS174T tratados con un agente disruptor vascular	Subclases de PL	Amido Black 10B	Secuencial, 2 etapas 1) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua:AcH (30:15:2:4) (hasta la mitad de la placa); 2) Acetona:Acetonitrilo:CHCl <sub>3</sub> (5:4:2) (hasta el borde superior de la placa)	Acoplamiento con MALDI [36]
Esperma de abeja reina	PL	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :EtOH:Agua:Trietilamina (30:35:7:35)	Semicuantitativo con patrón externo Acoplamiento con MALDI [11]
Cambios en líquido sinovial por implantes de rodilla de UHMWPE	PL, Chol	Primulina	Secuencial, 2 etapas 1) Acetato de metilo:1-Propanol:CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Disolución acuosa saturada de KCl (25:25:25:10:0.25) (66 % de la placa) para separar glicolípidos de PL 2) Tolueno:Dietil eter:EtOH:AcH (60:40:1:0.05) para separación de lípidos neutros.	Rascado (MALDI) [37]
Antígeno de <i>Rhodococcus equi</i> soluble tratado con bacterias y proteasas	Trehalosa 6-monomicolato (TMM), trehalosa 6,9-dimicolato(TDM), CL	Iodo	Secuencia, 3 etapas 1) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Acetona:AcH (90:10:6:1); 2) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Acetona: AcH (80:20:6:1); 3) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (90:10:1) [40]	Rascado y purificación [52]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Difitanilglicerol, PI, PG, lípidos de arqueol, CL	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Agua; primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:90% AcH (65:4:35)	Rascado (MALDI) [38]
Extracto de yema de huevo	PL	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :EtOH:Agua:Trietilamina (30:35:7:35)	Rascado (31P- NMR) [53]
Proteína Mdm 12 purificada de bacterias y levaduras	PG, PE, PC, PI	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Secuencial, 2 etapas 1) DCM:Acetato de etilo:Acetona (80:16:4); 2) CHCl <sub>3</sub> :Acetona:Isopropanol:Acetato de etilo:EtOH:MeOH:Agua:AcH (30:6:6:6:16:28:6:2), en ambos casos eluyendo la placa completa.	Descriptivo (Estructura biológica) [54]
Células tumorales mamarias, mitocondrias de hepatocitos	Perfil de PL	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :EtOH:Trietilamina:Agua (3:3.5:3.5:0.7) hasta 70 mm	Semicuantitativo de PL con patrones externos [55]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PL, glucosaminil-PG	Iodo	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:Agua (85:22:5:10:4)	Rascado (ESI-MS) [56]
Células intactas en placas de pocillos	SL, Esfingosina	Derivatización previa de lípidos	Isocrático a) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua:AcH (65:25:4:1) b) Acetato de etilo:Ciclohexano(1:1)	Cualitativo [57]

Piel homogeneizada	SM, Cer, Glu-Cer	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Isocrático Separación de SM: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:Agua (50:30:8:4). Separación de CER: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH (190:9:1). Separación secuencial 3 etapas de Glu-Cer : 1) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (40:10:1); 2) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH (47:2:0.5); 3) Hexano:Dietil eter:AcH (65:35:1).	Semicuantitativo con patrón externo [58]
Stratum Corneum y otras capas de la piel	Dímero de Ceramida (dCer)	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Secuencial, 18 etapas en gradiente por AMD basadas en EtOH: CHCl <sub>3</sub> :n-hexano:Acetona:Acetato de etilo.	Cuantitativo usando dCer como patrón [23]
Stratum Corneum	Perfiles de Cer, NL	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Secuencial, 8 etapas en gradientes por AMD basadas en CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Tolueno:n-hexano.	Semicuantitativo con calibración externa Acoplamiento con MS vía interfaz [43]
Semillas de diferentes especies de plantas	Glicosil-Cer	CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Secuencial, 18 etapas en gradiente por AMD basadas en n-hexano: CHCl <sub>3</sub> :Acetato de etilo:MeOH	Semicuantitativo con calibración externa. Rascado preparativo [24]
Extracto de lípidos	Gangliosidos and glicosil-inositol fosfor-Cer	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH: Solución acuosa 0,2 % CaCl <sub>2</sub> (50:40:10)	Rascado preparativo [59]
Enfermedad renal poliquística de rata	Gb <sub>4</sub>	Primulina	Isocrático a) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% CaCl <sub>2</sub> (50:35:8). Para separar los estándares SM, Gb <sub>4</sub> Cer y Gb <sub>3</sub> Cer y los extractos de lípidos b) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% CaCl <sub>2</sub> (60:35:8) o c) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% CaCl <sub>2</sub> (2:50:35:8)	Cualitativo/Comparativo. Rascado MALDI [61]
<i>A. fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>S. apiospermum</i>	Glu-Cer, Glc-Cer	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Hidróxido de amonio 2 M (50:10:1) [59]	Rascado [19]
Células de cultivo	Esfinganina, Esfingosina, Cer	Orcinol; CuSO <sub>4</sub> -H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; Radiodensitometria	Isocráticos. Separación de GSL: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Acetona:AcH:Agua (10:2:4:2:1). Separación de globósidos: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% CaCl <sub>2</sub> (45:55:10). Separación de PL: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:AcH:Agua (50:30:8:3). [29]	Cuantitativo [61]
Células monocíticas THP-1 humanas cultivadas in vitro	Eliminación de PL antes del análisis de SL	Orcinol; Inmunotinción	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (120:70:17)con 2 mM [61]	Acoplamiento con MALDI [33]

Plasma humano de individuos sano y con la enfermedad de Fabry	SM, Gb3	UV 190nm; Primulina	Secuencial, 7 etapas en gradiente por AMD basadas en MeOH:DCM	Cualitativo. Acoplamiento con ESI-MS/MS vía interfaz [62]
Plasma humano de individuos sanos y con la enfermedad de Fabry	SM, Gb3	Primulina	Secuencial, 2 etapas en gradiente por AMD basado en MeOH:DCM	Semicuantitativo con adición estándar. Acoplamiento con APCI-MS vía interfaz [20]
Extracto cerebral bovino	GSL ácidos	No densitometría	Isocrático GSL ácidos: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% CaCl <sub>2</sub> (55:45:10)	Comparativo. Acoplamiento vía interfaz con LESA [63]
Músculo esquelético, tejidos cerebrales y suero	Perfiles de (G)SL	Amido black 10B	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (55:20:3) o CHCl <sub>3</sub> :MeOH (50:3,5) para la fase orgánica. Separación de gangliósidos: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% de CaCl <sub>2</sub> (60:40:9).	Cualitativo. Acoplamiento con MALDI [31]
Mioblastos de ratón	GSL	No densitometría	Isocrático a) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Solución acuosa 0,2% de CaCl <sub>2</sub> (60:40:9) para fase acuosa gangliósidos. b) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (110:40:6) para GSLs neutros de la fase orgánica [56]	Comparativo. Acoplamiento con MALDI [12]
Riñón, bazo e intestino delgado de ratón	SL	Orcinol; Primulina; Inmunotinción	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (60:35:8 o 65:25:4)	Acoplamiento con MALDI. Placas paralelas [30]
Cerebro de pollo y ratón	Galactosil-digliceridos, monohexósidos de ceramida de ácido graso normal e hidroxilo, SM, PC, PE1 y PE2	Tionina; Reacciones PAS	4 Isocráticos (a) 1-propanol:Acetato de etilo: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (50:50:50:21:18) para PL; (b) CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:2), PL en el origen, los glucolípidos migran; (c) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (140:49:5.5) para resolución de PE1 y PE2; (d) CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (65:30:4) en placas de alúmina para resolución de PC y SM. 2D: 1) 1-propanol:Acetato de etilo: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (50:50:50:21:18). Paso intermedio de hidrólisis (1% HCl) (para romper enlaces alquenal éter); 2) n-hexano:Dietileter (4:1) seguido de la reacción con el reactivo Schiff Leucofúscin.	Comparativo [16]

Cristalino humano	SL	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (75:25:2,5)	Identificación detallada por DESI-MS [21]
Láminas finas de tejido cerebral de ratón descongelado	Especies gangliósidos complejos y sulfoglico-SL	Orcinol	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH: Hidróxido de amonio 2,5 N (60:40:9) por 10 min	Identificación detallada por DESI-MS [40]
Sueros de sujetos de peso normal normolipidémico (NW), de peso dislipidémico deficiente en vitamina D (vitDNW) y obesos dislipidémicos deficientes en vitamina D (vitDO)	Perfiles SL	Primulina	Isocrático CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Agua (55:20:3)	Semicuantitativo [64]

## ANEXO 2

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre completo</b>
<b>ADC-2</b>	Cámara de desarrollo automático 2
<b>AMD-2</b>	Desarrollo múltiple automatizado 2
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica
<b>ATS-4</b>	Inyector automático de muestra TLC 4
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de calcio
<b>CER</b>	Ceramida
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>Chol</b>	Colesterol
<b>CL</b>	Cardiolipin
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de cobre (II)
<b>dCer</b>	Dímero de ceramida
<b>DDM</b>	Dodecil β-malosato
<b>DESI</b>	Desorción Ionización por Electrospray
<b>ESI</b>	Ionización por Electrospray
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FA</b>	Ácidos grasos
<b>FLD</b>	Fluorescencia
<b>GalCer</b>	α-Galactosilceramida
<b>Gb3</b>	Globotriaosilceramidas
<b>Gb4</b>	Globotetraosilceramidas
<b>GC</b>	Cromatografía de Gases
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
<b>GD1</b>	Disialogangliósido
<b>GluCer</b>	Glucosilceramidas
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
<b>HPTLC</b>	Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficacia
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>LacCer</b>	Lactosilceramida
<b>LC</b>	Cromatografía Líquida
<b>LC-MS</b>	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>LPC</b>	Lisofosfatidilcolina
<b>LPE</b>	Lisofosfatidiletanolamina
<b>LPG</b>	Lisofosfatidilglicerol
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	Espectroscopia de masas
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de Masas en tándem dos etapas

<b>NL</b>	Lípidos neutros
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PG</b>	Fosfatidilglicerol
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PL</b>	Fosfolípidos
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>SD</b>	Densitometría de barrido
<b>SL</b>	Esfingolípidos
<b>SM</b>	Esfingomielina
<b>TDM</b>	Trehalosa 6,9-dimicolato
<b>TG</b>	Triglicérido
<b>TLC</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>TMM</b>	Trehalosa 6-monomicolato
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento
<b>UV</b>	Ultravioleta