

Ikuspegi analitikoak metabolomikan eta lipidomikan: teknologiak, erronkak eta etorkizuneko perspektibak

(Analytical approaches in metabolomics and lipidomics: technologies, challenges, and future perspectives)

Irene Calzado^{1,2*}, Manu Araolaza^{1,2}, Mikel Albizuri^{1,2}, Iraia Muñoa-Hoyos^{2,3}, Nerea Subirán^{1,2}

¹ Fisiologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia)

² Biobizkaia, Bizkaiko Osasun Ikerketa Institutua (48903 Barakaldo, Bizkaia)

³ Erizaintza I Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU, 48940 Leioa, Bizkaia)

LABURPENA: Zientzia omikoek ikerketa biomedikoa eraldatu dute, sistema biologikoen karakterizazio integrala ahalbidetzen dutelako geneen, RNAen, proteinen eta metabolitoen analisi koordinatuaren bidez. Zientzia horien artean, metabolomika eta lipidomika sistema biologikoak aztertzeko funtsezko tresna gisa finkatu dira, prozesu fisiologiko eta patologikoetan inplikaturako metabolitoak eta lipidoak modu globalean karakterizatzea ahalbidetzen baitute. Haien garapena estuki lotuta egon da teknika analitikoetan egindako aurrerapenekin, hala nola erresonantzia magnetiko nuklearrean (NMR) eta masa espektrometrian (MS), eremu horietan erabiltzen diren plataforma nagusiak baitira. NMRak erreproduzigarritasun handia eta analisi ez-suntsitzalea eskaintzen duen bitartean, MSak sentikortasun handia eskaintzen du; kontzentrazio oso txikiak detektatzeko gaitasuna baitu. Normalean, MSa banaketa teknikekin konbinatzen da, hala nola kromatografia likidoarekin (LC-MS), gas kromatografiarekin (GC-MS) edo elektroforesi kapilarrarekin (CE-MS). Horrek detektatu ahal diren metabolitoen kopurua eta haien identifikazioa hobetzen du. Era berean, injekzio zuzenean oinarritutako estrategiek, hala nola DI-MSak eta FIA-MSak, errendimendu handiko analisi azkarrak ahalbidetzen dituzte, nahiz eta mugak dituzten alde aurretik banaketa pausu bat ez egitearen ondorioz. Teknologia horiei esker, bereizi egin daitezke alde batetik sistema baten ikuspegi globala edota biomarkatzaileen aurkikuntzara bideratuak dauden estrategia ez-bideratuak, eta bestetik, konposatu espezifikoaren kuantifikazioan zentratutako estrategia bideratuak. Etorkizuneko hobekuntza

1

***Harremanetan jartzeko/ Corresponding author:** Irene Calzado, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Sarriena auzoa, z/g (48091 Leioa-Euskal Herria).  <https://orcid.org/0000-0002-1787-6792>, irune.calzado@ehu.eus

Nola aipatu / How to cite: Calzado, Irene; Araolaza, Manu; Albizuri, Mikel; Muñoa-Hoyos, Iraia; Subirán, Nerea(2026). “Ikuspegi analitikoak metabolomikan eta lipidomikan: teknologiak, erronkak eta etorkizuneko perspektibak”, Ekaia, 50, xx-xx. (<https://doi.org/10.1387/ekaia.28501>)

Jasoa: apirilak 10, 2026; Onartua: uztailak 25, 2026

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © 2026 UPV/EHU



Obra Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

teknologikoez teknika horien sentsibilitatea, sendotasuna eta errendimendu handiko gaitasuna areagotzea espero da, eta horrek, azterketa klinikoetan erabili ahal izango diren biomarkatzaile berriak identifikatzea eta baliozkotzea erraztu dezake.

GAKO-HITZAK: Biomarkatzaileak, Lipidomika, Masa Espektrometria, Metabolomika, Erresonantzia Magnetiko Nuklearra.

ABSTRACT: *Omics sciences have transformed biomedical research by enabling the comprehensive characterization of biological systems through the coordinated analysis of genes, RNA, proteins, and metabolites. Among these sciences, metabolomics and lipidomics have become established as fundamental tools for the study of biological systems, enabling the global characterization of metabolites and lipids involved in physiological and pathological processes. Their development has been closely linked to advances in analytical techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), the main platforms used in these fields. While NMR offers high reproducibility and non-destructive analysis, MS stands out for its high sensitivity and its ability to detect compounds at very low concentrations. MS is typically combined with separation techniques such as liquid chromatography (LC-MS), gas chromatography (GC-MS), or capillary electrophoresis (CE-MS). This improves both the number of detectable metabolites and their identification. In addition, direct-injection strategies such as DI-MS and FIA-MS enable rapid, high-throughput analyses, although they present limitations due to the absence of a prior separation step. These technologies allow the distinction between untargeted approaches, aimed at obtaining a global overview of a system or biomarker discovery, and targeted approaches focused on the quantification of specific compounds. Future technological advancements are expected to enhance sensitivity, robustness, and high-throughput capabilities, facilitating the identification and validation of new biomarkers in clinical studies.*

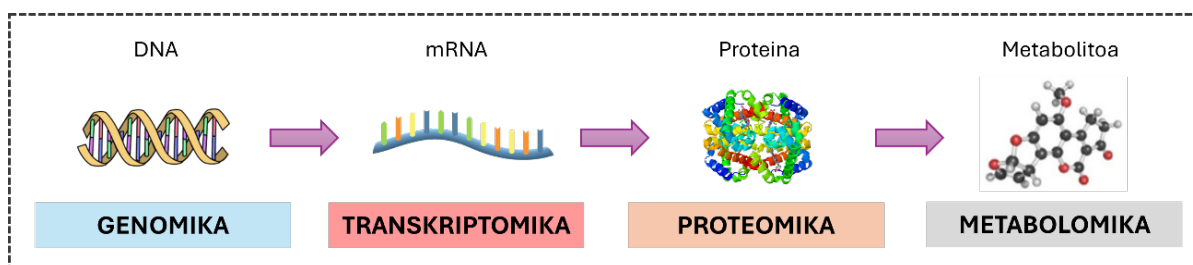
KEYWORDS: Biomarkers, Lipidomics, Mass Spectrometry, Metabolomics, Nuclear Magnetic Resonance.

1. SARRERA

1.1. Zientzia omikoak

Azken urteotan zientzia omikoek izan duten garapen handiak, zelulen, ehunen eta organismoen osaera molekular konplexua modu zehatzago batean aztertzea ahalbidetu dio komunitate zientifikoari [1]. Diziplina hauen artean genomika, transkriptomika, proteomika eta metabolomika bezalako arloak topa ditzakegu, eta horiek geneen, RNAen, proteinen eta metabolitoen analisi handi eta koordinatuak ahalbidetu dituzte, hurrenez hurren. Zientzia omiko horiek prozesu biologikoen ikuspegi globala eskaintzen dute testuinguru fisiologiko eta patologikotan [2,3].

Genomikak eta transkriptomikak informazio genetikoa eta haren adierazpen potentziala ebaluatzen dute. Proteomikak geneen produktu funtzionalak aztertzen ditu, hau da, proteinak. Metabolomika, berriz, metabolitoak aztertzean zentratzen da, eta hori, jarduera zelularraren azken isla da (1. Irudia) [4]. Metabolomikak duen indargune nagusietako bat bere sentikortasun altua da. Sistema fenotipoarekiko hurbiltasun biologiko estua duenez, alterazio genetiko edo proteomiko txikiak funtsezko aldaketak eragin ditzakete metabolito mailan [5].



1. irudia. Zientzia omikoen oinarri diren konposatuak.

1.2. Metabolomika eta lipidomikaren bilakaera historikoa

Metabolomika sistema biologikoetan (zeluletan, ehunetan edo organismo osoetan) eta beste sistema konplexuetan (elikagaiak edo ingurumen-laginak) dauden metabolitoen (edo metabolomaren) multzoa sistemikoki aztertzen duen diziplina da. Metabolitoen barruan pisu molekular txikiko hainbat talde bereizten dira: lipidoak, aminoazidoak, peptidoak, azido nukleikoak, azido organikoak, bitaminak, tiolak eta karbohidratoak, besteak beste [6]. Pisu molekular txikiko konposatu horiek erreakzio metabolikoen produktu eta bitartekariak dira, eta zuzenean islatzen dute organismo batek une jakin batean duen egoera biokimikoa [6–8]. Metabolomak organismoak berak sortutako konposatu endogenoak zein exogenoak biltzen ditu, ingurutik edo dietatik datozenak, eta horrek genetikaren eta ingurune faktoreen arteko interakzioa aztertzea ahalbidetzen du [9].

Azken mendeetan metabolitoen inguruan burututako aurkikuntza eta karakterizazioa funtsezkoa izan da biokimikan. Metabolismoaren inguruko lehenengo xehetasunen ezagutza 1930eko hamarkadatik aurrera gertatu zen, teknologia analitiko aurreratu eta sentikorren garapenekin batera. Teknologia horien barruan erresonantzia magnetiko nuklearra (NMR) eta masa-espektrometria (MS) sartzen dira [10]. NMR teknika, Isidor Rabik deskribatu zuen lehen aldiz 1938an [11]. Geroago, 1946an, Blochek eta Purcellek NMRari buruzko lehen lan esperimentalak argitaratu zituzten, eta lan horiek analisi molekularrean aplikatzeko lehendabiziko oinarriak ezarri zituzten [12,13]. Masa-espektrometria, berriz, 1934an erabili zen lehen aldiz molekula organikoak aztertzeko helburuarekin [14]. Izan ere, gaur egun ezagutzen dugun eta masa-espektrometrian oinarritzen den metabolomika, 1959. urtean garatu zen gas-kromatografiarekin batera akoplatu zenean (GC-MS), edota 1974. urtean likido-kromatografiarekin akoplatu zenean (LC-MS) [15]. Hala ere, metabolomikan (eta proteomikan) lortu izan den aurrerapen handiena *electrospray* bidezko ionizazioarekin (ESI) eskuratu zen 1989an [16]. Handik gutxira, LC-ESI-MSan oinarritutako eta bideratu gabeko metabolomikaren lehen ikerketak egin ziren matrize biologikoak karakterizatzeko, eta berehala agerian geratu zen teknika horren potentzial handia [17,18].

"Metabolomika" terminoa, berez, 2000ko hamarkadaren hasieran sortu zen, analisi-teknologiek aldi berean milaka metabolito detektatzeko aukera ematen hasi zirenean [19]. Ordutik, diziplina honek jarduera zelularren profil edo aztarna metaboliko adierazgarriak sortzea ahalbidetu du, eta horrek, konposatu-mota ugari aldi berean aztertzeiko gaitasuna eskaini digu [20]. Metabolomikaren esparruan, lipidomika azpidiziplina garrantzitsu gisa agertu da, eta haren helburua lipidoak aztertzea da. Lipidoak funtsezko metabolitoak dira, uretan disolbaezinak dira, eta kontrara, polarrak ez diren disolbatzaile organikoetan disolbagarriak dira [21]. Horri esker, lipidoek ezinbesteko funtzioak betetzen dituzte egitura zelularretan, energiaren biltegitratzean eta seinaleztapen zelularrean esaterako, eta horrek ikerketa eremu interesgarrian bilakatu du lipidomika [22]. Lipidomika, 2003an sartu zen formalki metabolomikaren barnean, eta oso azkar hazi da metabolismo lipidikoa aztertzeiko funtsezko tresna gisa [23]. Lipidoek egitura eta funtzio zelularrean parte hartzeaz gain, prozesu patologikoetan ere parte hartzen dute [24], obesitatea, arteriosklerosia eta diabetesa bezalako gaixotasunekin hertsiki lotuta baitaude, besteak beste [25–27]. Markus Wenkek, esaterako, lipidomika proteomikarekin eta metabolomikarekin integratzearen garrantzia azpimarratu zuen 2005ean, gaixotasun konplexuak hobeto ulertzeko erraminta gisa [28]. Gaur egun, lipidomika eta metabolomika asko erabiltzen dira gaixotasunen biomarkatzaile berriak identifikatzeko, edota metabolismoaren alterazioen azpian dauden mekanismo molekularrak aztertzeiko [29,30]. Gainera, beste diziplina omikoeekin integratzea funtsezkoa izaten ari da gaixotasunei lotutako prozesu biologikoak eta mekanismo molekularrak modu osoago batean ulertzeko edota medikuntza pertsonalizatuaren esparruan estrategia diagnostiko eta terapeutiko berriak garatzeko.

2. DETEKZIO-TEKNIKAK METABOLOMIKAN ETA LIPIDOMIKAN

Metabolomika eta lipidomika diziplinarreko esparruak dira, kimika analitikoa, teknologia instrumental aurreratuak eta datuak aztertzeiko tresna sofistikuak biltzen baititu [6]. Bi estrategia nagusiren bidez landu daiteke: analisi ez-bideratua (*untargeted*) eta analisi bideratua (*targeted*). Bideratu gabeko ikuspegiak metabolito asko aldi berean detektatzea ahalbidetzen du, egoera metabolikoaren ikuspegi globala emateko eta biomarkatzaile berriak aurkitzea errazteko [31,32]. Aitzitik, analisi bideratua metabolito ezagunen multzo zehatz batean zentratzen da, eta horien kuantifikazio zehatza barne estandarrak eta kalibrazio kurbak erabiliz egiten da. Hori bereziki erabilgarria da metabolito espezifikoak baliozkotzeko [33,34].

Metabolomaren dibertsitate kimiko handiak (polaritatean, tamainan, egituran eta egonkortasunean, besteak beste) ezinezkoa egiten du metabolito guztiak aldi berean plataforma analitiko

bakar baten bidez aztertzea. Horregatik, ikuspuntu osagarriak beharrezkoak dira karakterizazio aberasgarriago eta osoago bat lortzeko, teknika bakoitzak bere muga eta abantaila espezifikoak baititu [35–38]. Alderdi horretan, gehien erabiltzen diren teknikak NMRA eta MSa dira. MS teknika, oro har, banaketa tekniketara akoplatuta erabiltzen da (eraginkortasun handiko likido kromatografia (HPLC), eraginkortasun ultra handiko likido kromatografia (UHPLC), GCa edo elektroforesi kapilarra (CE)), baina zuzeneko injekzioekin ere erabil daiteke (DI-MS edo injekzio bidezko fluxu-analisia (FIA-MS)) (1. taula). Banaketa-teknikek aukera ematen dute laginetan dauden metabolitoak detektatu aurretik bereiztu ahal izateko, interferentziak murriztuz eta haien identifikazioa eta kuantifikazioa hobetuz. Aldiz, injekzio zuzeneko teknikak profil metabolikoaren edo metabolitoen analisi azkarra egin nahi denean erabiltzen dira, ez baitute alde aurreko bereizketa-etaparik. Hala ere, teknika hauek gaitasun txikiagoa dute antzeko masak edo isomeroak dituzten konposatuak bereizteko.

1. taula. Protoiaren erresonantzia magnetiko nuklearra ($^1\text{H-NMR}$), fosforo-31-ren erresonantzia magnetiko nuklearra ($^{31}\text{P-NMR}$), masa espektrometriari akoplatutako eraginkortasun handiko likido kromatografia (HPLC-MS), masa espektrometriari akoplatutako eraginkortasun ultra handiko likido kromatografia (UHPLC-MS), masa espektrometriari akoplatutako gas kromatografia (GC-MS), masa espektrometriari akoplatutako elektroforesi kapilarra (CE-MS), injekzio zuzeneko masa espektrometria (DI-MS) eta masa espektrometriari akoplatutako injekzio bidezko fluxu analisia (FIA-MS) teknika analitikoen konparazioa lipidomikan eta metabolomikan.

Teknika								
	NMR		MS					
	¹ H-NMR	³¹ P-NMR	HPLC-MS	UHPLC-MS	GC-MS	CE-MS	DI-MS	FIA-MS
Sentikortasuna	-	-	++	+++	+++	+	++	++
Erreproduzigarritasuna	Altua		NMR baino baxuagoa					
Bereizmena	Baxua	Ertaina	Altua				Baxua	
Kuantifikazioa	Bai, baina ez hain eraginkorra kontzentrazio txikietan		Bai, barne estandarrekin					
Laginaren prestaketa	Baxua (teknika ez-suntsitzaillea)		Ertaina	Ertaina	Altua (deribatizazioa)	Ertaina	Baxua	Baxua
Injekzio-bolumena	100-600 µL		10 µL	1-10 µL	1-2 µL	1-20 nL	1-10 µL	1-10 µL
Metabolito-tartea	Polarrak eta erdi-polarrak	Konposatu fosforilatuak	RPLC: erdi-polarrak eta apolarrak HILIC: polarrak		Konposatu hegazkorak	Polarrak eta ionikoak	Polarrak eta apolarrak	
Metabolitoen identifikazioa	Erraza		Zaila (ez dago datu-base bateraturik)		Erraza (liburutegi espektralak)	Zaila (ez dago datu-base bateraturik)		

2.1. Erresonantzia Magnetiko Nuklearra (NMR)

NMRa teknika espektroskopikoa da, eta nukleo atomikoen eta kanpoko eremu magnetiko baten arteko interakzioan oinarritzen da. Horri esker, metabolitoen egiturak identifikatu eta kuantifikatu daitezke [39,40]. Metodologia hori konposatu mota ugari detektatzeko eta kuantifikatzeko erabili daiteke, eta horren detekzio-muga mikromolar edo nanomolar mailakoa da [41]. Bere abantaila nagusien artean honakoak nabarmentzen dira: izaera ez-suntsitzailea, erreproduzigarritasun handia eta laginen prestaketa minimoa (1. taula) [42,43]. Gainera, NMRak metabolitoen egitura molekularrari eta ingurune kimikoari buruzko informazio zehatza azkar eta modu erreproduzigarrian lortzeko aukera ematen du, eta horretarako behar den analisi-denbora nahiko laburra da [44–47]. Hala ere, teknika horrek duen muga nagusia haren sentikortasun txikia da (1. taula), eta horrek zaildu egiten du kontzentrazio txikietan dauden metabolitoak detektatzea seinale ugariagoen bidez estalita gera daitezkeelako [48,49]. Bestalde, ohikoenak diren dimentsio bakarreko esperimenduak (1D-NMR), metabolitoen egituren antzekotasunak eta makromolekulen presentziak seinaleen gainjarpena eragin dezakete. Arazo hori konpontzeko bi dimentsioko teknikak (2D-NMR) erabil daitezke, non nahasketa konplexuek duten konposatuen bereizmena eta identifikazioa hobetzen den. Hala ere, horrek sentikortasuna eta errendimendu analitikoa murriztea dakar [50].

NMRaren barruan, ^1H -NMR teknika da gehien erabiltzen dena. Hidrogenoa oso atomo ugaria da molekula biologikoetan, eta, horri esker, metabolito mota ugari detektatu daitezke aldi berean [51]. Teknika hori analisi bideratu zein ez-bideratuetan burutu daiteke, baina analitoen kontzentrazio erlatiboki altuak eskatzen ditu (1. taula) [52]. Gero eta gehiago erabiltzen ari den beste modalitate bat ^{31}P -NMRa da, fosforodun konposatuak detektatzen dituen teknika (1. taula). Teknika hori bereziki baliagarria da metabolismo energetikoan eta seinaleztapen zelularrean inplikaturako metabolito fosforilatuak aztertzeko, hala nola ATPa, ADPa, AMPa, fosfokreatina, karbohidrato fosforilatuak eta nukleotidoak [53]. Lipidomikaren esparruan, ^{31}P -NMRak fosfolipido mota desberdinak aztertzeko eta kuantifikatzeko aukera eskaintzen du [54]. Bere abantaila nagusietako bat espektroan interferentzia esanguratsurik ez egotea da, fosforo nukleoak bakarrik detektatzen baititu, eta horrek interpretazioa sinplifikatzen du [53]. Hala ere, beste NMR modalitate batzuek bezala, sentikortasun-mugak ditu eta lagin-kontzentrazio handi samarrak behar ditu (1. taula) [51].

Muga horiek izan arren, NMRa asko erabili izan da hainbat testuinguru biomedikotan metabolitoak aztertzeko. Adibidez, alzheimerra edo prostatako minbizia bezalako gaixotasunei buruzko ikerketan erabili izan da, baita aminoazidoak, nukleotidoak, bitaminak, tiolak, karbohidratoak eta

peptidoak karakterizatzeko ere [55,56]. Konkretuki, Jung eta lankideek NMRA erabili zuten, garuneko infartuak dituzten pazienteen plasman eta gernuan patroi metabolikoen alterazioak ikertzeko, baita iktusari lotutako biomarkatzaile metabolikoak identifikatzeko ere [57]. Iktusa zuten pazienteen plasman laktato, pirubato, glikolato eta formiato kantitate handiagoak, eta glutamina eta metanol kantitate txikiagoak hauteman zituzten. Gernuan, berriz, zitrato, hipurato eta glizina maila txikiak topatu zituzten. Identifikatu zituzten biomarkatzaile horiek glukolisi anaerobioarekin eta azido folikoaren urritasunarekin lotu ziren.

2.2. Masa-Espektrometria (MS)

MSa metabolomikan eta lipidomikan gehien erabiltzen den teknika da, sentsibiltate eta detekzio-tarte handia duelako eta metabolitoen mailetan aldaketa txikiak identifikatzeko gaitasuna duelako [58,59]. Konposatuak kontzentrazio oso baxuetan analizatzeko aukera ematen du, pikomolar mailetara iristen da, eta ondorioz, lagin-bolumen txikiak behar izaten ditu NMRren aldean [60,61]. Gainera, NMRA baino bereizmen handiagoa eskaintzen du, eta horrek masa diferentzia oso txikiak dituzten konposatuak bereiztea ahalbidetzen du (1. taula) [62]. NMRan ez bezala, MSak metabolitoen detektagarritasunerako duen gaitasuna, neurri handi batean, duen ionizazio-eraginkortasunaren mende dago, eta, ondorioz, matrizearen konposizioaren eragina izan dezake [62].

Oro har, MSa bidezko analisiak aurretiazko banaketa etapa batekin konbinatzen dira, hala nola likido-kromatografia (HPLC/UHPLC), GCa edo CEa. Horrek murrizketa ionikoa minimizatzen du, eta metabolitoen identifikazioa hobetzen du masa/karga erlazioaren (m/z) arabera. Murrizketa ionikoa fenomeno bat da non oso hurbil eluitzen diren konposatuek ionizatzeko lehiatzen baitira, eta haien ionizazio-eraginkortasuna murrizten baita. Ondorioz, seinalea murrizten da, eta horrek eragina izaten du detekzioan eta kuantifikazioan [63]. Bestalde, injekzio zuzena ere erabil daiteke (DI edo FIA), baina matrize biologiko konplexuetan aurretiko banaketa kromatografikoa gomendagarria izaten da [6,62]. Ikuspegi instrumentaletik, masa-espektrometro guztiek ionizazio-iturri bat eta masa-analizatzaile bat dituzte oinarritzat [64].

2.2.1. Ionizazio-iturria

Ionizazioa funtsezko urratsa da masa espektrometrian, analitoa ioi bihurtzeaz arduratzen baita [40]. Ionizatu ondoren, ioiak eremu elektriko edo magnetikoetatik masa-analizatzaileara garraiatzen dira. GC-MSaren kasuan, inpaktu elektronikoa (EI) da ionizazio-iturri ohikoena [44]. Bestalde, LC-MSan oinarritutako metabolomikan, presio atmosferikoko ionizazio kimikoa (APCI), presio atmosferikoko

fotoionizazioa (APPI), matrizez lagundutako desortzioa/ionizazioa (MALDI) eta *electrospray* bidezko ionizazioa (ESI) dira gehien erabiltzen diren ionizazio-iturriak [65]. ESIa lipidomikan eta metabolomikan gehien erabiltzen den ionizazio-iturria da, zatiketa handirik gabe metabolito mota ugari eraginkortasunez ionizatzeko aukera ematen baitu [22]. ESIa modu positiboan (ESI+) zein negatiboan (ESI-) erabili daiteke. Modu horiek teknikaren ahalmen analitikoa zabaltzen dute, konposatuen azterketa errazten baitute protoiak onartzeko edo galtzeko gaitasunaren arabera [66]. ESIa bereziki egokia da konposatu polarrak analizatzeko, eta APCIa eta APPIa egokiagoak dira konposatu apolarretarako. APCIa analitoak gas-faseko erreakzio kimikoen bidez ionizatzen dira, eta APPIa, berriz, erradiazio ultramorea erabiltzen da ioiak sortzeko. APCIa konposatu-mota gehiago detektatzeko gai da, eta APPIa sentikortasun handiagoa du konposatu apolarrekiko [67,68]. MALDIa, aldiz, molekula txikien (< 1000 Da) analisi azkar eta sentikorrerako tresna erabilgarri gisa finkatu da, lagin kantitate txikia behar baita eta gatz eta tanpoiekiko tolerantzia ona baitu [69].

2.2.2. Masa-Analizatzailea

Masa-analizatzaileei dagokienez, bereizmen txikiko eta handiko sistemak daude. Bereizmen handiko analizatzaileak, hala nola Q-TOF eta Orbitrap, funtsezkoak dira ikerketa ez-bideratuetan. Masa-desberdintasun txikiak dituzten konposatuak bereizteko aukera ematen dute eta zehaztasun handia dute masen determinazioan, metabolito ezezagunak identifikatzea erraztuz [70–72]. Q-TOFak kuadrupolo bat, talka-zelda bat eta hegaldi-denborako hodi bat (TOF) konbinatzen ditu, eta likido-kromatografiari akoplatuta erabili ohi da [63]. Kuadrupoloak ioi espezifikoak hautatzen ditu eta talka-zeldak haien fragmentazioa ahalbidetzen du. Ondoren, TOF analizatzaileak ioiak hegaldi-denboraren arabera bereizten ditu, edo beste modu batera esanda, haien m/z erlazioaren arabera. Orbitrap teknikak, berriz, eremu elektriko oszilatzaile batean biltegiratzen ditu ioiak, eta MS/MSa moduan jardun dezake, espektro osoak (full scan) masa zehaztasun handiarekin konbinatuz [62]. Ikerketa bideratuetan, kuadrupolo hirukoitza analizatzailea (QqQ) da lehentasunezko aukera nagusia, batez ere erreakzio anizkoitzen monitorizazio moduan (MRM), sentsibitate-, selektibitate- eta kuantifikazio-gaitasun zehatzak dituelako [73]. Diseinu horretan, lehen koadrupoloak ioi-aitzindaria hautatzen du, bigarrenak talka-zelda gisa jarduten du fragmentazioa eragiteko, eta hirugarrenak ioi-produktu espezifikoak hautatzen ditu [61].

2.2.3. Banaketa kromatografikoa erabiltzen duten teknikak

2.2.3.1. LC-MS

LC-MSa metabolomikan eta lipidomikan gehien erabiltzen den plataforma da. Ez du deribatizaziorik behar, eta hainbat egitura kimikoetako zein polaritate desberdinetako metabolitoak aztertzeke aukera ematen du [36,74]. LCaren barruan, modu osagarrian erabiltzen diren banaketa modu desberdinak daude. Alde batetik, alderantzizko fasedun kromatografia (RP) dago. Hori gehien erabiltzen den modalitatea da, eta polaritate ertain eta baxuko konposatuetarako aproposa da (1. taula). Banaketa kromatografikoa analitoen eta fase geldikorraren arteko interakzio hidrofobikoetan oinarritzen da eta ESia bezalako ionizazio-iturriekin bateratuz funtsezko tresna da ikerketa kliniko eta biomedikoetan [75–77]. Konposatu oso polarrak determinatzeko, berriz, interakzio hidrofilikodun kromatografia (HILIC) erabiltzen da (1. taula) [45]. Modalitate horretan, fase geldikor polarra eta disolbatzaile organikoetan aberatsa den fase mugikorak erabiltzen dira. Normalean, gradiente moduan lan egiten da; hau da, fase mugikorra gero eta akuosoagoa bihurtzen da (RPLCaren alderantzizkoa) [72].

Sistema instrumentalei dagokienez, eraginkortasun handiko likido kromatografia HPLCak asko erabili izan da MSarekin konbinatuta [6]. Hala ere, eraginkortasun ultra handiko likido kromatografiak UHPLCak edo UPLCak aurrerapen esanguratsuak ekarri dituzte aurreko teknikarekin alderatuz. UHPLC-MSak bereizmen eta sentsibiltate handiagoak eta analisi-denbora laburragoak eskaintzen ditu ohiko HPLCekin alderatuta (1. taula), nahiz eta lan-karga handiagoak ekarri [78]. Edonola ere, UHPLC-MSak metabolito gehiago detektatzea ahalbidetzen du, batez ere izaera polarrekoak, eta hori bereziki garrantzitsua da metabolito primario asko determinatzeko garaian [6]. Horregatik, UHPLC-MSa metabolomika eta lipidomikan etorkizun-handiko teknikatzat jotzen da [79–84].

UHPLCak, besteak beste, haurtzaroko pneumonia larria [85], diabetesa [86,87] eta Alzheimerra [88] aztertzeke erabili da, baita nutrizio arloko ikerketetan ere [89]. Zhou eta lankideek lipidomika ikerketa bat publikatu zuten non prostatako kantzerra zuten pazienteen plasman diagnostiko-potentziala zuten 35 lipido identifikatu baitzituzten. Lipido horien artean, diskriminatzeko gaitasun handia zuten 12 biomarkatzaile indibidual zeuden [90]. Minbizia zuten paziente horiek, oro har, lisofosfatidilkolina- (LPC), fosfatidilkolina- (PC), esfingomielina- (SM) eta eter fosfatidilkolina-maila (PCE) altuak zituzten, baina azido fosfatidikoaren (PA) mailak baxuak ziren. Gainera, biomarkatzaile guzti horiek fosfokolina talde bat duten lipidoak dira, eta horrek agerian uzten du molekula horiek prostatako minbiziaren garapenean duten garrantzia.

2.2.3.2. GC-MS

Masa-espektrometriara akoplatutako gas kromatografia (GC-MSa analisi metabolikoetarako erabili zen lehen tekniketako bat izan zen hainbat ikerketa-esparrutan, eta oraindik ere asko erabiltzen

da ikerketa ez-bideratuetan, bereziki metabolito hidrofiliaren azterketarako [91–94]. GC-MSan, ionizazio-iturri ohikoena inpaktu elektronikoa (EI) da, eta ionizazio “gogortzat” hartzen da LC-MSan erabilitakoekin alderatzen badugu [62]. Zatiketa zabalagoa eragiten duen arren, erreproduzigarritasun handia aurkeztun duen erreminta da. Izan ere, lortutako espektroak estandarizatutako espektroen datu-baseekin erraz alderatzeko aukera ematen baitu (1. taula) [97]. GC-MSan konposatuak hegazkorak eta termikoki egonkorak izan behar dira teknika honekin aztertu ahal izateko. Hala ere, metabolito askok ez dituzte baldintza horiek betetzen, eta normalean deribatizazio-etapa kimiko bat behar izaten da. Prozesu horretan, analitoen talde funtzionalak kimikoki aldatzen dira, deribatu espezifikoak sartuz eta metabolitoen hegazkortasuna zein egonkortasun termikoa handituz [93]. Prozesu horrek gas-fasean bereizteko deribatu egokiagoak sortzea dakar eta prozedura analitikoari konplexutasuna gehitzen dio (1. taula) [92].

Ma eta lankideek estrogenoen eskasiak eragindako obesitatedun arratoi-eredu batean metabolito endogenoen alterazioak aztertu zituzten, eta biomarkatzaile posibleak identifikatu zituzten GC-MS bidezko ikuspegi metabolomiko baten bidez [98]. Ikerketa horretan identifikatutako biomarkatzaileek ikuspegi orokor bat eman zuten aldatuta zeuden bide metaboliko ezberdinak identifikatuz: glukosaren metabolismoa, lipidoen metabolismoa eta aminoazidoen metabolismoa, besteak beste.

2.2.3.3. CE-MS

Masa-espektrometriari akoplatutako elektroforesi kapilarra (CE-MS), LC-MSa edo GC-MSa ez bezala, ez dago hain zabaldua metabolomikan eta lipidomikan [99,100]. Plataforma edo erreminta honek, batez ere, lagin biologikoetan dauden konposatu ioniko edo oso polarrei buruzko informazioa ematen du; hala nola ioi ez-organikoak, azido organikoak, aminoazidoak, nukleotidoak, nukleosidoak, bitamina hidrosolugarriak, tiolak, karbohidratoak eta peptidoak [101].

Banaketa elektroforetikoa konposatuen masa/karga erlazioan oinarritzen da, kapilar batean aplikatutako eremu elektriko baten eraginpean [102]. Bere abantaila nagusien artean, analisi-denbora laburrak, laginaren prestaketa minimoa, kapilar sinpleen erabilera eta disolbatzaile organiko eta erreaktiboaren kontsumo baxua nabarmentzen dira [103]. Gainera, lagin-bolumen oso txikiak behar ditu, 1 eta 20 nL bitarteko injekzioak, besteak beste, eta hori bereziki interesgarria da lagin-kantitate mugatuak daudenean [6]. Hala ere, CE-MSak bere erabilera murriztu duten zenbait muga ditu. Horietan nabarmenena, erramintak aurkeztu duen sentikortasun baxua da, baina hori kapilarrean sartutako lagin-bolumen txikiarekin dago erlazionatuta (1. taula) [104,105]. Era berean, CE ionizazio-iturriarekin

akoplatzea teknikoki oso konplexua da (oro har, ESI); fluxu-emari oso txikiak dira (nL/min tartean) eta kontaktu-elektriko egokia mantentzea beharrezko pausua baita [104].

CE-MS erabiliz, Sato eta lankideek, landareen hostotzan oinarritzko 56 metabolito-mailen aldaketa dinamikoak aztertu zituzten ordubeteko tarteetan, 24 ordutan zehar [106]. Adenina nukleosidoak eta nikotinamida koentzimak fosforilazio eta desfosforilazio prozesuen bidez erregulatuta zeudela ikusi zuten. Teknika honek, sistema biologikoetan osagaien arteko eskala handiko interakzioak ulertzea errazten du.

2.2.4. Banaketa kromatografikorik gabeko teknikak

2.2.4.1. DI-MS

Injekzio zuzeneko masa espektrometrian DI-MSan lagina zuzenean ionizazio iturrian sartzen da eta horrek aukera ematen du analisi azkarra egiteko eta metabolito asko aldi berean detektatzeko [107]. Gainera, sentsibiltate handia, erreproduzigarritasun ona eta prestaketa-denbora laburrak eskaintzen ditu (1. taula) [108]. DI-MSan gehien erabiltzen diren ionizazio-iturriak ESia eta MALDIa dira [108]. Era berean, irudi-teknologiak masa-espektrometriarekin (MS imaging) konbinatuz gero, ehunetako metabolito eta lipidoen banaketari buruzko informazio espaziala lor daiteke. Modu horretan, molekulek ehunaren barruan duten kokapenari buruzko informazio espaziala lortzen da, eta hori prozesu biologikoak aztertze oso baliagarria da [109–114]. Hala ere, aldeztatik ez banatzeak muga handiak dakartza. Lagin biologiko konplexuak zuzenean sartzeak matrize-efektuak eragin ditzake eta horrek ionizazioaren eraginkortasunari eragin diezaioke, hala nola murrizketa edo indartze ionikoaren bidez. Beraz, horrek emaitzen zehaztasunean eta erreproduzigarritasunean eragin dezake [115]. Horrez gain, lipidomikan bereziki garrantzitsua den isomeroen diskriminazioa erronka esanguratsua da DI-MSan, masa bereko konposatuak ez baitira behar bezala bereizten [108].

Furse eta lankideek, esaterako, DI-MSa erabili zuten amek eta haien haurrek eradoskitzean partekatzen duten esnearen bidez ezartzen den plasma-lotura aztertze [116]. Egileek frogatu zuten amaren plasmaren konposizio lipidikoa hauraren plasmarekin lotzen dela amaren esnearen bidez. Horrez gain, esnean triglizerido eta fosfolipido jakin batzuen eta hazkuntzarekin lotutako biomarkatzaile lipidikoen arteko loturak identifikatu zituzten. Lanak zuzeneko injekzioaren lipidomikak biomarkatzaileak aurkitzeko eta nutrizio goiztiarra aztertze duen potentziala nabarmentzen du, errendimendu handiko tresna azkarra baita.

2.2.4.2. FIA-MS

FIA-MSa zuzeneko injekzioan oinarritzen diren estrategien artean beste aukera bat da. Teknika honetan lagina etengabeko fluxua aurkezten duen fase mugikor batean sartzen da eta horren bidez, masa-espektrometrorantz garraiatzen da [117]. Errendimendu analitiko handieneko teknika da eta bereziki interesgarria da lagin serie handien analisisa behar duten ikerketetarako [118]. Hala ere, FIA-MSak ere bere mugak ditu alde zaurgarriak banaketa faltaren ondorioz. Matrize-efektuek erreproduzigarritasuna eta zehaztasun kuantitatiboa arriskuan jar ditzakete, eta erretentzio denborarik ez egoteak metabolitoen identifikazioaren espezifikotasuna murrizten du, batez ere bideratu gabeko ikerketetan (1. taula) [118]. Horregatik, estrategia hau konposatu espezifikoaren analisi bideratuetan erabili ohi da [118].

Alzheimerrari buruzko ikerketa batean, zehazki, ikertzaileek FIA-MS/MS teknika erabili zuten fosfolipidoen osaketa aztertzeko, *post mortem* pazienteen garuneko hainbat eskualdetan eta eredu murino transgeniko batean [119]. Metodo horren bidez, gantz-azidoen profilak eta horien saturazio-mailak ebaluatu zituzten, eta aldaketa espezifikoak identifikatu zituzten Alzheimerra duten pazienteen garunehunetan. Alzheimerra zuten burmuinetan espezie lipidiko gehienek aldaketa esanguratsurik izan ez bazuten ere, espezie espezifiko batzuk nabarmen murriztuta zeudela erakutsi zuten emaitzek. Lipido horiek hautagai garrantzitsuak izan litezke dietaren eta patologiarekin arteko erlazioari buruz aurrerantzean egin daitezkeen ikerketetarako. Oro har, lanak FIA-MS/MSa ehun kantitate txikiaren analisi erdi-kuantitatiboetarako aplikagarria dela erakusten du, eta patologiarik lotutako alterazio lipidikoen karakterizazioa ahalbidetzen du.

3. ONDORIOAK

Metabolomika eta lipidomika sistema biologiko konplexuen azterketa integralerako funtsezko tresna gisa finkatu dira, organismoaren egoera funtzionala zuzenean islatzeko duten gaitasunari esker. Masa-espektrometria (MS), bereziki LCa edo GCa bezalako bereizketa tekniketara akoplatua, sentikortasun eta aldakortasun handiagatik nabarmentzen da, eta ikerketa metabolomiko eta lipidomiko gehienetan aukera nagusia da. Bestalde, erresonantzia magnetiko nuklearrak (NMR), sentikortasun txikiagoa izan arren, funtsezko tresna izaten jarraitzen du, erreproduzigarritasun handia eta izaera ez-suntsitzailea duelako.

Metabolomaren konplexutasun altua dela eta, plataforma anitzeko ikuspegiak dira lagin biologikoak aztertzeko estrategiarik egokiena, metabolito polarak eta apolarak modu osagarrian detektatzeko aukera ematen baitute. Ikerketa ez-bideratuetan, bereizmen handiko masa-espektrometria

teknikak hobesten dira, ionizazio modu positiboak zein negatiboak erabiliz (ESI+ eta ESI-), metabolitoen detekzioa maximizatzeko. Bestalde, egitura berriak identifikatu behar direnean, NMRA da emaitza sendoak lortzeko erreferentziazko teknika, nahiz eta kostua handiagoa izan.

4. ETORKIZUNeko ERRONKAK

Hurrengo urteetan, aurrerapen esanguratsuak espero dira teknologia horietan: CE-MSaren interfazeen optimizazioa, GC-MSan deribatizazio denboren murrizketa, laginak prestatzeko metodo azkarrago eta eraginkorragoen garapena, zutabe kromatografikoen kimika berrien txertaketa, MSa detektagailuen sentsibilitatearen hobekuntza eta metabolitoak identifikatzeko datu-baseen aberastea, besteak beste. Hobekuntza-multzo horiek biomarkatzaile berrien aurkikuntza eta haien baliozkotzerako irizpide zorrotzagoen garapena erraztuko du. Ondorioz, emaitza fidagarriagoak eta erreproduzigarriagoak lortuko dira, eta horrek positibo eta negatibo faltsuen agerpena minimizatzea ekarriko du. Horrenbestez, aurrerapen horiek metabolomika eta lipidomikaren aplikazio sendoago eta zabalago bat bultzatuko dute, bai ikerketa biomedikoan bai praktika klinikoan, eta bide berean medikuntza pertsonalizatuaren garapenean ekarpen esanguratsuak ahalbidetuko ditu.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] SMITH, R., MATHIS, A. D., VENTURA, D., PRINCE, J. T. 2014. <<Proteomics, lipidomics, metabolomics: a mass spectrometry tutorial from a computer scientist's point of view>>. *BMC Bioinformatics*, **15**, S9.
- [2] RIVERA, R., GARRIDO, N. Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction. Elsevier 2019, pp. 277–285.
- [3] SILVESTRI, E., LOMBARDI, A., DE LANGE, P., GLINNI, D., SENESE, R., CIOFFI, F., LANNI, A., GOGLIA, F., MORENO, M. 2011. <<Studies of Complex Biological Systems with Applications to Molecular Medicine: The Need to Integrate Transcriptomic and Proteomic Approaches>>. *BioMed Research International*, **2011**.
- [4] SALEK, R., EMERY, L., BEISKEN, S. 2014. <<Metabolomics: an introduction>>. *European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)*.
- [5] KIM, K., ARONOV, P., ZAKHARKIN, S. O., ANDERSON, D., PERROUD, B., THOMPSON, I. M., WEISS, R. H. 2009. <<Urine Metabolomics Analysis for Kidney Cancer Detection and Biomarker Discovery>>. *Molecular & Cellular Proteomics*, **8**, 558–570.
- [6] ZHANG, A., SUN, H., WANG, P., HAN, Y., WANG, X. 2012. <<Modern analytical techniques in metabolomics analysis>>. *The Analyst*, **137**, 293–300.

- [7] WISHART, D. S., FEUNANG, Y. D., MARCU, A., GUO, A. C., LIANG, K., VÁZQUEZ-FRESNO, R., SAJED, T., JOHNSON, D., LI, C., KARU, N., SAYEEDA, Z., LO, E., ASSEMPOUR, N., BERJANSKII, M., SINGHAL, S., ARNDT, D., LIANG, Y., BADRAN, H., GRANT, J., SERRA-CAYUELA, A., LIU, Y., MANDAL, R., NEVEU, V., PON, A., KNOX, C., WILSON, M., MANACH, C., SCALBERT, A. 2018. <<HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018>>. *Nucleic Acids Research*, **46**, D608–D617.
- [8] PATTI, G. J., YANES, O., SIUZDAK, G. 2012. <<Metabolomics: the apogee of the omics trilogy>>. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13**, 263–269.
- [9] HOLMES, E., LOO, R. L., STAMLER, J., BICTASH, M., YAP, I. K. S., CHAN, Q., EBBELS, T., DE IORIO, M., BROWN, I. J., VESELKOV, K. A., DAVIGLUS, M. L., KESTELOOT, H., UESHIMA, H., ZHAO, L., NICHOLSON, J. K., ELLIOTT, P. 2008. <<Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure>>. *Nature*, **453**, 396–400.
- [10] GIERA, M., YANES, O., SIUZDAK, G. 2022. <<Metabolite discovery: Biochemistry’s scientific driver>>. *Cell Metabolism*, **34**, 21–34.
- [11] RABI, I. I., ZACHARIAS, J. R., MILLMAN, S., KUSCH, P. 1938. <<A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment>>. *Physical Review*, **53**, 318–318.
- [12] PURCELL, E. M., TORREY, H. C., POUND, R. V. 1946. <<Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid>>. *Physical Review*, **69**, 37–38.
- [13] BLOCH, F., HANSEN, W. W., PACKARD, M. 1946. <<The Nuclear Induction Experiment>>. *Physical Review*, **70**, 474–485.
- [14] CONRAD, R. 1934. <<Decomposition of hexane, cyclohexane and benzene in the positive ray tube>>. *Transactions of the Faraday Society*, **30**, 215.
- [15] ARPINO, P., BALDWIN, M. A., McLAFFERTY, F. W. 1974. <<Liquid chromatography-mass spectrometry. II—continuous monitoring>>. *Biological Mass Spectrometry*, **1**, 80–82.
- [16] FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F., WHITEHOUSE, C. M. 1989. <<Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules>>. *Science*, **246**, 64–71.
- [17] CRAVATT, B. F., PROSPERO-GARCIA, O., SIUZDAK, G., GILULA, N. B., HENRIKSEN, S. J., BOGER, D. L., LERNER, R. A. 1995. <<Chemical Characterization of a Family of Brain Lipids That Induce Sleep>>. *Science*, **268**, 1506–1509.
- [18] LERNER, R. A., SIUZDAK, G., PROSPERO-GARCIA, O., HENRIKSEN, S. J., BOGER, D. L., CRAVATT, B. F. 1994. <<Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep-deprived cats.>>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 9505–9508.
- [19] FIEHN, O. 2002. <<Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes>>. *Plant Molecular Biology*, **48**, 155–171.
- [20] GOWDA, G. N., ZHANG, S., GU, H., ASIAGO, V., SHANAIAH, N., RAFTERY, D. 2008. <<Metabolomics-based methods for early disease diagnostics>>. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **8**, 617–633.

- [21] FAHY, E., SUBRAMANIAM, S., BROWN, H. A., GLASS, C. K., MERRILL, A. H., MURPHY, R. C., RAETZ, C. R. H., RUSSELL, D. W., SEYAMA, Y., SHAW, W., SHIMIZU, T., SPENER, F., VAN MEER, G., VANNIEUWENHZE, M. S., WHITE, S. H., WITZTUM, J. L., DENNIS, E. A. 2005. <<A comprehensive classification system for lipids>>. *Journal of Lipid Research*, **46**, 839–861.
- [22] BRÜGGER, B. 2014. <<Lipidomics: Analysis of the Lipid Composition of Cells and Subcellular Organelles by Electrospray Ionization Mass Spectrometry>>. *Annual Review of Biochemistry*, **83**, 79–98.
- [23] HAN, X., GROSS, R. W. 2003. <<Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics>>. *Journal of Lipid Research*, **44**, 1071–1079.
- [24] HARKEWICZ, R., DENNIS, E. A. 2011. <<Applications of Mass Spectrometry to Lipids and Membranes>>. *Annual Review of Biochemistry*, **80**, 301–325.
- [25] BELORIBI-DJEFAFLIA, S., VASSEUR, S., GUILLAUMOND, F. 2016. <<Lipid metabolic reprogramming in cancer cells>>. *Oncogenesis*, **5**, e189–e189.
- [26] MUSUNURU, K., KATHIRESAN, S. 2016. <<Surprises From Genetic Analyses of Lipid Risk Factors for Atherosclerosis>>. *Circulation Research*, **118**, 579–585.
- [27] MUSUNURU, K., KATHIRESAN, S. 2019. <<Genetics of Common, Complex Coronary Artery Disease>>. *Cell*, **177**, 132–145.
- [28] WENK, M. R. 2005. <<The emerging field of lipidomics>>. *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**, 594–610.
- [29] WALTHER, T. C., FARESE, R. V. 2012. <<Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism>>. *Annual Review of Biochemistry*, **81**, 687–714.
- [30] VAN MEER, G., VOELKER, D. R., FEIGENSON, G. W. 2008. <<Membrane lipids: where they are and how they behave>>. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**, 112–124.
- [31] ALONSO, A., MARSAL, S., JULIÀ, A. 2015. <<Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015>>. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **3**.
- [32] COMMISSO, M., STRAZZER, P., TOFFALI, K., STOCCHERO, M., GUZZO, F. 2013. <<Untargeted metabolomics: an emerging approach to determine the composition of herbal products>>. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **4**, e201301007.
- [33] FIEHN, O. 2001. <<Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks>>. *Comparative and Functional Genomics*, **2**, 155–168.
- [34] ROBERTS, L. D., SOUZA, A. L., GERSZTEN, R. E., CLISH, C. B. 2012. <<Targeted Metabolomics>>. *Current Protocols in Molecular Biology*, **98**.
- [35] DUNN, W. B., BROADHURST, D., BEGLEY, P., ZELENÁ, E., FRANCIS-MCINTYRE, S., ANDERSON, N., BROWN, M., KNOWLES, J. D., HALSALL, A., HASELDEN, J. N., NICHOLLS, A. W., WILSON, I. D., KELL, D. B., GOODACRE, R. 2011. <<Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and

plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry>>. *Nature Protocols*, **6**, 1060–1083.

[36] KIM, S. J., KIM, S. H., KIM, J. H., HWANG, S., YOO, H. J. 2016. <<Understanding Metabolomics in Biomedical Research>>. *Endocrinology and Metabolism*, **31**, 7.

[37] LENZ, E. M., WILSON, I. D. 2007. <<Analytical Strategies in Metabonomics>>. *Journal of Proteome Research*, **6**, 443–458.

[38] BEISKEN, S., EIDEN, M., SALEK, R. M. 2015. <<Getting the right answers: understanding metabolomics challenges>>. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **15**, 97–109.

[39] BECKONERT, O., KEUN, H. C., EBBELS, T. M. D., BUNDY, J., HOLMES, E., LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K. 2007. <<Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts>>. *Nature Protocols*, **2**, 2692–2703.

[40] AGIN, A., HEINTZ, D., RUHLAND, E., CHAO DE LA BARCA, J. M., ZUMSTEG, J., MOAL, V., GAUCHEZ, A. S., NAMER, I. J. 2016. <<Metabolomics – an overview. From basic principles to potential biomarkers (part 1)>>. *Médecine Nucléaire*, **40**, 4–10.

[41] PUIG-CASTELLVÍ, F., ALFONSO, I., TAULER, R. 2017. <<Untargeted assignment and automatic integration of ¹H NMR metabolomic datasets using a multivariate curve resolution approach>>. *Analytica Chimica Acta*, **964**, 55–66.

[42] PAN, Z., RAFTERY, D. 2007. <<Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics>>. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387**, 525–527.

[43] LI, L., HAO, X., CHEN, H., WANG, L., CHEN, A., SONG, X., HU, Z., SU, Y., LIN, H., FAN, P. 2020. <<Metabolomic characterization of semen from asthenozoospermic patients using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry>>. *Biomedical Chromatography*, **34**.

[44] HOFFMANN, E. DE., STROOBANT, VINCENT. 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. J. Wiley.

[45] GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R., SAYAGO, A., FERNÁNDEZ-RECAMALES, Á. 2017. <<Metabolomics in Alzheimer's disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology>>. *Journal of Chromatography B*, **1071**, 75–92.

[46] MURGIA, F., MURONI, A., PULIGHEDDU, M., POLIZZI, L., BARBERINI, L., OROFINO, G., SOLLA, P., PODDIGHE, S., DEL CARRATORE, F., GRIFFIN, J. L., ATZORI, L., MARROSU, F. 2017. <<Metabolomics As a Tool for the Characterization of Drug-Resistant Epilepsy>>. *Frontiers in Neurology*, **8**.

[47] LANE, A. N., FAN, T. W.-M. 2017. <<NMR-based Stable Isotope Resolved Metabolomics in systems biochemistry>>. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **628**, 123–131.

[48] EBBELS, T. M. D., LINDON, J. C., COEN, M. 2011. <<Processing and Modeling of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Metabolic Profiles>>. *Methods in Molecular Biology*, **708**, 365–388.

- [49] KOHLER, I., VERHOEVEN, A., DERKS, R. J., GIERA, M. 2016. <<Analytical Pitfalls and Challenges in Clinical Metabolomics>>. *Bioanalysis*, **8**, 1509–1532.
- [50] KIM, H. K., CHOI, Y. H., VERPOORTE, R. 2011. <<NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?>>. *Trends in Biotechnology*, **29**, 267–275.
- [51] EMWAS, A.-H., ROY, R., MCKAY, R. T., TENORI, L., SACCENTI, E., GOWDA, G. A. N., RAFTERY, D., ALAHMARI, F., JAREMKO, L., JAREMKO, M., WISHART, D. S. 2019. <<NMR Spectroscopy for Metabolomics Research>>. *Metabolites*, **9**, 123.
- [52] MAHER, A. D., LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K. 2009. <<¹ H NMR-Based Metabonomics for Investigating Diabetes>>. *Future Medicinal Chemistry*, **1**, 737–747.
- [53] BHINDERWALA, F., EVANS, P., JONES, K., LAWS, B. R., SMITH, T. G., MORTON, M., POWERS, R. 2020. <<Phosphorus NMR and Its Application to Metabolomics>>. *Analytical Chemistry*, **92**, 9536–9545.
- [54] GOUILLEUX, B., CHRISTENSEN, N. V., MALMOS, K. G., VOSEGAARD, T. 2019. <<Analytical Evaluation of Low-Field ³¹P NMR Spectroscopy for Lipid Analysis>>. *Analytical Chemistry*, **91**, 3035–3042.
- [55] BARBA, I., FERNANDEZ-MONTESINOS, R., GARCIA-DORADO, D., POZO, D. 2008. <<Alzheimer's disease beyond the genomic era: nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy-based metabolomics>>. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **12**, 1477–1485.
- [56] JORDAN, K. W., CHENG, L. L. 2007. <<NMR-based metabolomics approach to target biomarkers for human prostate cancer>>. *Expert Review of Proteomics*, **4**, 389–400.
- [57] JUNG, J. Y., LEE, H.-S., KANG, D.-G., KIM, N. S., CHA, M. H., BANG, O.-S., RYU, D. H., HWANG, G.-S. 2011. <<¹H-NMR-Based Metabolomics Study of Cerebral Infarction>>. *Stroke*, **42**, 1282–1288.
- [58] WANT, E. J., CRAVATT, B. F., SIUZDAK, G. 2005. <<The Expanding Role of Mass Spectrometry in Metabolite Profiling and Characterization>>. *ChemBioChem*, **6**, 1941–1951.
- [59] PAIVA, C., AMARAL, A., RODRIGUEZ, M., CANYELLAS, N., CORREIG, X., BALLESCÀ, J. L., RAMALHO-SANTOS, J., OLIVA, R. 2015. <<Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)>>. *Andrology*, **3**, 496–505.
- [60] MARSHALL, D. D., POWERS, R. 2017. <<Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics>>. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **100**, 1–16.
- [61] JACOB, M., MALKAWI, A., ALBAST, N., AL BOUGHA, S., LOPATA, A., DASOUKI, M., ABDEL RAHMAN, A. M. 2018. <<A targeted metabolomics approach for clinical diagnosis of inborn errors of metabolism>>. *Analytica Chimica Acta*, **1025**, 141–153.
- [62] SEGERS, K., DECLERCK, S., MANGELINGS, D., HEYDEN, Y. VANDER, EECKHAUT, A. VAN. 2019. <<Analytical Techniques for Metabolomic Studies: A Review>>. *Bioanalysis*, **11**, 2297–2318.

- [63] GRIFFITHS, W. J., WANG, Y. 2009. <<Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics>>. *Chemical Society Reviews*, **38**, 1882.
- [64] GROSS, J. H. 2011. *Mass Spectrometry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [65] TARR, M. A., ZHU, J., COLE, R. B. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley 2000.
- [66] HO, C. S., LAM, C. W. K., CHAN, M. H. M., CHEUNG, R. C. K., LAW, L. K., LIT, L. C. W., NG, K. F., SUEN, M. W. M., TAI, H. L. 2003. <<Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications>>. *The Clinical biochemist. Reviews*, **24**, 3–12.
- [67] FARWANAH, H., KOLTER, T., SANDHOFF, K. 2011. <<Mass spectrometric analysis of neutral sphingolipids: Methods, applications, and limitations>>. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1811**, 854–860.
- [68] TAKÁTS, Z., WISEMAN, J. M., COOKS, R. G. 2005. <<Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology>>. *Journal of Mass Spectrometry*, **40**, 1261–1275.
- [69] VAN KAMPEN, J. J. A., BURGERS, P. C., DE GROOT, R., GRUTERS, R. A., LUIDER, T. M. 2011. <<Biomedical application of MALDI mass spectrometry for small-molecule analysis>>. *Mass Spectrometry Reviews*, **30**, 101–120.
- [70] LEE, J. W., JI, S.-H., CHOI, B.-R., CHOI, D. J., LEE, Y.-G., KIM, H.-G., KIM, G.-S., KIM, K., LEE, Y.-H., BAEK, N.-I., LEE, D. Y. 2018. <<UPLC-QTOF/MS-Based Metabolomics Applied for the Quality Evaluation of Four Processed Panax ginseng Products>>. *Molecules*, **23**, 2062.
- [71] SCHWAIGER-HABER, M., STANCLIFFE, E., ARENDS, V., THYAGARAJAN, B., SINDELAR, M., PATTI, G. J. 2021. <<A Workflow to Perform Targeted Metabolomics at the Untargeted Scale on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer>>. *ACS Measurement Science Au*, **1**, 35–45.
- [72] LA BARBERA, G., CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., MONTONE, C. M., PIOVESANA, S., SAMPERI, R., ZENEZINI CHIOZZI, R., LAGANA, A. 2017. <<Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages>>. *Food Research International*, **100**, 28–52.
- [73] THEODORIDIS, G., GIKA, H. G., WILSON, I. D. 2011. <<Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies>>. *Mass Spectrometry Reviews*, **30**, 884–906.
- [74] METZ, T. O., ZHANG, Q., PAGE, J. S., SHEN, Y., CALLISTER, S. J., JACOBS, J. M., SMITH, R. D. 2007. <<Future of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Metabolic Profiling and Metabolomic Studies for Biomarker Discovery>>. *Biomarkers in Medicine*, **1**, 159–185.
- [75] MAJORS, R. E. 2009. <<Highlights of HPLC 2009>>. *LCGC North America*, **27**, 796–815.
- [76] SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J. W. 2009. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley.

- [77] WANT, E. J., WILSON, I. D., GIKA, H., THEODORIDIS, G., PLUMB, R. S., SHOCKCOR, J., HOLMES, E., NICHOLSON, J. K. 2010. <<Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC–MS>>. *Nature Protocols*, **5**, 1005–1018.
- [78] JOHNSON, C. H., KARLSSON, E., SARDA, S., IDDON, L., IQBAL, M., MENG, X., HARDING, J. R., STACHULSKI, A. V., NICHOLSON, J. K., WILSON, I. D., LINDON, J. C. 2010. <<Integrated HPLC-MS and 1H-NMR spectroscopic studies on acyl migration reaction kinetics of model drug ester glucuronides>>. *Xenobiotica*, **40**, 9–23.
- [79] CUYKX, M., CLAES, L., RODRIGUES, R. M., VANHAECKE, T., COVACI, A. 2018. <<Metabolomics profiling of steatosis progression in HepaRG ® cells using sodium valproate>>. *Toxicology Letters*, **286**, 22–30.
- [80] JORE, C., LOUP, B., GARCIA, P., PARIS, A.-C., POPOT, M.-A., AUDRAN, M., BONNAIRE, Y., VARLET-MARIE, E., BAILLY-CHOURIBERRY, L. 2017. <<Liquid chromatography – high resolution mass spectrometry-based metabolomic approach for the detection of Continuous Erythropoiesis Receptor Activator effects in horse doping control>>. *Journal of Chromatography A*, **1521**, 90–99.
- [81] NASSAR, A. F., WU, T., NASSAR, S. F., WISNEWSKI, A. V. 2017. <<UPLC–MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research>>. *Drug Discovery Today*, **22**, 463–470.
- [82] LIAO, H.-W., LIN, S.-W., LIN, Y.-T., LEE, C.-H., KUO, C.-H. 2018. <<Identification of potential sphingomyelin markers for the estimation of hematocrit in dried blood spots via a lipidomic strategy>>. *Analytica Chimica Acta*, **1003**, 34–41.
- [83] ACUNHA, T., GARCÍA-CAÑAS, V., VALDÉS, A., CIFUENTES, A., SIMÓ, C. 2018. <<Metabolomics study of early metabolic changes in hepatic HepaRG cells in response to rosemary diterpenes exposure>>. *Analytica Chimica Acta*, **1037**, 140–151.
- [84] PFERSCHY-WENZIG, E.-M., KOSKINEN, K., MOISSEL-EICHINGER, C., BAUER, R. 2017. <<A Combined LC-MS Metabolomics- and 16S rRNA Sequencing Platform to Assess Interactions between Herbal Medicinal Products and Human Gut Bacteria in Vitro: a Pilot Study on Willow Bark Extract>>. *Frontiers in Pharmacology*, **8**.
- [85] LAIAKIS, E. C., MORRIS, G. A. J., FORNACE, A. J., HOWIE, S. R. C. 2010. <<Metabolomic Analysis in Severe Childhood Pneumonia in The Gambia, West Africa: Findings from a Pilot Study>>. *PLoS ONE*, **5**, e12655.
- [86] PARK, S., SADANALA, K. C., KIM, E.-K. 2015. <<A Metabolomic Approach to Understanding the Metabolic Link between Obesity and Diabetes.>>. *Molecules and cells*, **38**, 587–96.
- [87] GU, Y., ZHANG, Y., SHI, X., LI, X., HONG, J., CHEN, J., GU, W., LU, X., XU, G., NING, G. 2010. <<Effect of traditional Chinese medicine berberine on type 2 diabetes based on comprehensive metabonomics>>. *Talanta*, **81**, 766–772.

- [88] LI, N., LIU, W., LI, W., LI, S., CHEN, X., BI, K., HE, P. 2010. <<Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry>>. *Clinical Biochemistry*, **43**, 992–997.
- [89] LEGIDO-QUIGLEY, C., STELLA, C., PEREZ-JIMENEZ, F., LOPEZ-MIRANDA, J., ORDOVAS, J., POWELL, J., VAN-DER-OUDEA, F., WARE, L., LINDON, J. C., NICHOLSON, J. K., HOLMES, E. 2010. <<Liquid chromatography–mass spectrometry methods for urinary biomarker detection in metabonomic studies with application to nutritional studies>>. *Biomedical Chromatography*, **24**, 737–743.
- [90] ZHOU, X., MAO, J., AI, J., DENG, Y., ROTH, M. R., POUND, C., HENEGAR, J., WELTI, R., BIGLER, S. A. 2012. <<Identification of Plasma Lipid Biomarkers for Prostate Cancer by Lipidomics and Bioinformatics>>. *PLoS ONE*, **7**, e48889.
- [91] PAULING, L., ROBINSON, A. B., TERANISHI, R., CARY, P. 1971. <<Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography>>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **68**, 2374–2376.
- [92] FIEHN, O. 2016. <<Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling>>. *Current Protocols in Molecular Biology*, **114**.
- [93] TAKEO, E., SASANO, R., SHIMMA, S., BAMBA, T., FUKUSAKI, E. 2017. <<Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography–mass-spectrometry-based metabolomics>>. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **124**, 700–706.
- [94] TSUGAWA, H., BAMBA, T., SHINOHARA, M., NISHIUMI, S., YOSHIDA, M., FUKUSAKI, E. 2011. <<Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis>>. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**, 292–298.
- [95] LAI, Z., FIEHN, O. 2018. <<Mass spectral fragmentation of trimethylsilylated small molecules>>. *Mass Spectrometry Reviews*, **37**, 245–257.
- [96] FERNÁNDEZ-OCHOA, Á., LEYVA-JIMÉNEZ, F. J., DE LA LUZ CÁDIZ-GURREA, M., PIMENTEL-MORAL, S., SEGURA-CARRETERO, A. 2021. <<The Role of High-Resolution Analytical Techniques in the Development of Functional Foods>>. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 3220.
- [97] BEALE, D. J., PINU, F. R., KOUREMENOS, K. A., POOJARY, M. M., NARAYANA, V. K., BOUGHTON, B. A., KANOJIA, K., DAYALAN, S., JONES, O. A. H., DIAS, D. A. 2018. <<Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research>>. *Metabolomics*, **14**, 152.
- [98] MA, B., ZHANG, Q., WANG, G., A, J., WU, D., LIU, Y., CAO, B., LIU, L., HU, Y., WANG, Y., ZHENG, Y. 2011. <<GC-TOF/MS-based metabolomic profiling of estrogen deficiency-induced obesity in ovariectomized rats>>. *Acta Pharmacologica Sinica*, **32**, 270–278.
- [99] NAZ, S., GARCIA, A., RUSAK, M., BARBAS, C. 2013. <<Method development and validation for rat serum fingerprinting with CE–MS: application to ventilator-induced-lung-injury study>>. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**, 4849–4858.

- [100] ZHANG, W., HANKEMEIER, T., RAMAUTAR, R. 2017. <<Next-generation capillary electrophoresis–mass spectrometry approaches in metabolomics>>. *Current Opinion in Biotechnology*, **43**, 1–7.
- [101] GARCIA, A., NAZ, S., BARBAS, C. 2014. <<Metabolite Fingerprinting by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry>>. *Methods in Molecular Biology*, **1198**, 107–123.
- [102] RAMAUTAR, R., SOMSEN, G. W., DE JONG, G. J. 2009. <<CE-MS in metabolomics>>. *Electrophoresis*, **30**, 276–291.
- [103] BRITZ-MCKIBBIN, P. Metabolic Profiling. Humana Press, Richland, WA, USA 2011, pp. 229–246.
- [104] NGUYEN, T. T. T. N., PETERSEN, N. J., RAND, K. D. 2016. <<A simple sheathless CE-MS interface with a sub-micrometer electrical contact fracture for sensitive analysis of peptide and protein samples>>. *Analytica Chimica Acta*, **936**, 157–167.
- [105] ZHANG, W., GULED, F., HANKEMEIER, T., RAMAUTAR, R. 2019. <<Utility of sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for metabolic profiling of limited sample amounts>>. *Journal of Chromatography B*, **1105**, 10–14.
- [106] SATO, S., ARITA, M., SOGA, T., NISHIOKA, T., TOMITA, M. 2008. <<Time-resolved metabolomics reveals metabolic modulation in rice foliage>>. *BMC Systems Biology*, **2**, 51.
- [107] SOUTHAM, A. D., WEBER, R. J. M., ENGEL, J., JONES, M. R., VIANI, M. R. 2017. <<A complete workflow for high-resolution spectral-stitching nanoelectrospray direct-infusion mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics>>. *Nature Protocols*, **12**, 310–328.
- [108] LI, M., YANG, L., BAI, Y., LIU, H. 2014. <<Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications>>. *Analytical Chemistry*, **86**, 161–175.
- [109] GILMORE, I. S., HEILES, S., PIETERSE, C. L. 2019. <<Metabolic Imaging at the Single-Cell Scale: Recent Advances in Mass Spectrometry Imaging>>. *Annual Review of Analytical Chemistry*, **12**, 201–224.
- [110] SCHÖBER, Y., GUENTHER, S., SPENGLER, B., RÖMPP, A. 2012. <<Single Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging>>. *Analytical Chemistry*, **84**, 6293–6297.
- [111] YANG, B., PATTERSON, N. H., TSUI, T., CAPRIOLI, R. M., NORRIS, J. L. 2018. <<Single-Cell Mass Spectrometry Reveals Changes in Lipid and Metabolite Expression in RAW 264.7 Cells upon Lipopolysaccharide Stimulation>>. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **29**, 1012–1020.
- [112] ZAVALIN, A., TODD, E. M., RAWHOUSER, P. D., YANG, J., NORRIS, J. L., CAPRIOLI, R. M. 2012. <<Direct imaging of single cells and tissue at sub-cellular spatial resolution using transmission geometry MALDI MS>>. *Journal of Mass Spectrometry*, **47**, 1473–1481.

- [113] BOGGIO, K. J., OBASUYI, E., SUGINO, K., NELSON, S. B., AGAR, N. Y., AGAR, J. N. 2011. <<Recent advances in single-cell MALDI mass spectrometry imaging and potential clinical impact>>. *Expert Review of Proteomics*, **8**, 591–604.
- [114] KOMPAUER, M., HEILES, S., SPENGLER, B. 2017. <<Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- μ m lateral resolution>>. *Nature Methods*, **14**, 90–96.
- [115] GALLART-AYALA, H., TEAV, T., IVANISEVIC, J. 2020. <<Metabolomics meets lipidomics: Assessing the small molecule component of metabolism>>. *BioEssays*, **42**.
- [116] FURSE, S., BILLING, G., SNOWDEN, S. G., SMITH, J., GOLDBERG, G., KOULMAN, A. 2019. <<Relationship between the lipid composition of maternal plasma and infant plasma through breast milk>>. *Metabolomics*, **15**, 129.
- [117] FUHRER, T., HEER, D., BEGEMANN, B., ZAMBONI, N. 2011. <<High-Throughput, Accurate Mass Metabolome Profiling of Cellular Extracts by Flow Injection–Time-of-Flight Mass Spectrometry>>. *Analytical Chemistry*, **83**, 7074–7080.
- [118] HAN, X., GROSS, R. W. 2005. <<Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples>>. *Mass Spectrometry Reviews*, **24**, 367–412.
- [119] GRIMM, M. O. W., GRÖSGEN, S., RIEMENSCHNEIDER, M., TANILA, H., GRIMM, H. S., HARTMANN, T. 2011. <<From brain to food: Analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin–plasmalogens derivatives in Alzheimer’s disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry>>. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 7713–7722.