

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический
центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России»

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

На правах рукописи



Гладчук Алексей Сергеевич

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ФОРМИРОВАНИЯ
САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ РЕГУЛЯРНЫХ МОНОСЛОЕВ ЛЕНГМЮРА НА
ПОВЕРХНОСТИ ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКИ ДЛЯ АНАЛИЗА АМФИФИЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ МАЛДИ-МС

1.3.2 «Приборы и методы экспериментальной физики»

1.4.2. «Аналитическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научные руководители:

к.х.н., Подольская Екатерина Петровна

д.х.н., доцент Суходолов Николай Геннадьевич

Санкт-Петербург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 МАЛДИ масс-спектрометрия	11
1.2 Механизмы образования ионов при ионизации методом МАЛДИ	13
1.2.1 Модель «ионов счастливыхчиков»	13
1.2.2 Модель термической ионизации	14
1.2.3 Модель комбинированной физической и химической динамики	15
1.3 Современные подходы к анализу амфифильных соединений с использованием масс-спектрометрии	20
1.3.1 Анализ свободных жирных кислот	20
1.3.2 Анализ полипренолов	24
1.4 Монослои Ленгмюра	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1 Материалы	30
2.1.1 Реактивы	30
2.1.2 Биологический материал	30
2.2 Исследование электрокинетического потенциала	31
2.3 Получение монослоев на основе монокарбоксилатов бария в чашке Петри по технологии Ленгмюра	33
2.3 Синтез поликристаллического стеарата бария	33
2.4 Формирование пленок Ленгмюра-Блоджетт стеарата бария	34
2.5 Получение коллапсированных пленок стеариновой кислоты и ее солей в ванне Ленгмюра	34
2.6 Измерение угла смачивания	35
2.7 Световая микроскопия	35
2.8 Спектроскопия комбинационного рассеяния	36
2.9 Инфракрасная спектроскопия	36
2.10 Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия	37
2.11 Атомно-силовая микроскопия	37
2.12 МАЛДИ масс-спектрометрический анализ	37

2.13	Получение монослоев на основе монокарбоксилатов бария на МАЛДИ мишени .	38
2.14	Оптимизация концентрации матрицы при формировании монослоев на МАЛДИ мишени	38
2.15	Формирование монослоев монокарбоксилатов бария на МАЛДИ мишени в присутствии органической матрицы	39
2.16	Определение СЖК в экстрактах из биологических образцов различной природы	39
2.17	Определение СЖК методом ГХ-МС в экстрактах водорослей <i>Fucus vesiculosus</i> ...	40
2.18	Анализ профилей СЖК в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом ртути .	41
2.19	Определение СЖК в составе агробактерий <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> RCAM1026 и <i>Sinorhizobium meliloti</i> RCAM1021	41
2.20	Определение полипренолов методом МАЛДИ-МС с использованием технологии Ленгмюра.....	42
2.21	Экстракция полипренолов из сухих листьев гинкго билоба.....	43
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1	Классическая технология Ленгмюра формирования монослоев для анализа насыщенных СЖК методом МАЛДИ-МС	44
3.2	Самоорганизация бариевой соли стеариновой кислоты на полусферической поверхности водной субфазы	49
3.3	Анализ СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени	60
3.3.1	Определение оптимальной концентрации матрицы для осуществления эффективного МАЛДИ-МС анализа	62
3.3.2	Определение чувствительности и параметров линейности методики анализа СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени	63
3.3.3	Исследование влияния изотопного распределения бария на проведение полуколичественной оценки содержания СЖК в образце	65
3.3.4	Исследование сходимости результатов, полученных с использованием методики анализа СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени.....	68
3.3.5	Сравнение результатов, получаемых с помощью МАЛДИ-МС и ГХ-МС.....	70
3.3.6	Исследование профилей СЖК в биологических образцах различной природы..	71

3.3.7 Профилирование СЖК в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом ртути	82
3.3.8 Оптимизация методики анализа СЖК для проведения МАЛДИ-МС анализа в режиме автоматической регистрации спектров	83
3.3.9 Профилирование СЖК в агробактериях <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> RCAM1026 и <i>Sinorhizobium meliloti</i> RCAM1021	86
3.4 Исследование механизма образования ионов при МАЛДИ-МС анализе полипренолов в виде моноалкоголятов бария	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	105
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ	107
БЛАГОДАРНОСТИ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	109
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	128
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) является хорошо зарекомендовавшим себя методом для чувствительного, высокопроизводительного и экономически эффективного определения широкого спектра аналитов, относящихся к большеразмерным молекулам и молекулярным комплексам. При этом анализ низкомолекулярных соединений затруднен, так как при классическом МАЛДИ-МС анализе в масс-спектре в диапазоне низких значений m/z ($m/z < 1000$) преобладают сигналы низкомолекулярных матричных ионов. Следовательно, наиболее серьезной проблемой для МАЛДИ-МС при непосредственном анализе низкомолекулярных соединений являются помехи в масс-спектре, создаваемые сигналами матрицы. Одним из подходов, позволяющих нивелировать интерференцию матричных сигналов в диапазоне низких значений m/z , является дериватизация аналитов. С одной стороны дериватизация позволяет «переместить» сигнал аналита в область более высоких масс, а с другой – избирательное введение в состав нейтральной молекулы хорошо ионизируемых групп позволяет значительно повысить чувствительность и селективность анализа. Этот подход очень актуален при определении амфифильных соединений, имеющих низкую способность к ионизации, таких как длинноцепочечные спирты и жирные карбоновые кислоты. Такой анализ востребован как для контроля качества пищевых продуктов, лекарственных средств и биологически активных добавок, так и в медицине, в том числе при диагностике заболеваний. Так было показано, что введение в состав молекулы атомов металлов, например, бария, который обладает свойствами матрицы, в ряде случаев позволяет повысить выход ионов амфифильных соединений в виде их солей при ионизации в том числе и под воздействием лазера. Зачастую, дериватизация является достаточно долгим и трудоемким процессом пробоподготовки, а реакция введения функциональной группы редко проходит полностью. В то же время, известно, что технология Ленгмюра, позволяет проводить реакцию солеобразования с образованием самоорганизующихся регулярных монослоев карбоксилатов металлов количественно. Однако при использовании такого подхода в аналитических целях потребуются специальная установка для получения монослоев, перенос монослоя в пробирку и подбор условий его растворения. И только затем

становится возможным нанесение образца на мишень с целью дальнейшего МАЛДИ-МС анализа.

Следует отметить, что в последние годы все чаще предлагается формат МАЛДИ-МС анализа на основе проведения одного или нескольких этапов пробоподготовки непосредственно на поверхности МАЛДИ мишени, который получил название «лаборатория на мишени» и позволяет сократить время эксперимента, снизить затраты на реактивы и уменьшить количество требуемого образца. Проведение дериватизации амфифильных соединений на поверхности мишени при формировании самоорганизующихся монослоев Ленгмюра бариевых солей амфифильных соединений с их последующим коллапсированием и разрушением может позволить значительно повысить выход ионов при МАЛДИ-МС анализе этого класса соединений. Соответственно, поиск решения, позволяющего проводить реакцию образования солей амфифильных соединений непосредственно на МАЛДИ мишени, является весьма актуальным.

Цель и задачи работы

Целью работы являлась разработка метода формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы для расширения возможностей анализа амфифильных соединений методом МАЛДИ-МС.

Для достижения поставленной цели следовало решить следующие задачи:

1. Выявить механизм формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей свободных жирных кислот, полученных по технологии Ленгмюра на плоской поверхности водной субфазы.
2. Исследовать возможность МАЛДИ-МС анализа бариевых солей амфифильных соединений в составе монослоя, полученного на плоской поверхности водной субфазы.
3. Разработать метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени при нанесении н-гексанового раствора аналита на каплю водной субфазы.
4. Исследовать механизм формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений путем изучения структуры и

состава пленок, сформированных на поверхности МАЛДИ мишени с использованием технологии Ленгмюра, адаптированной к полусферической поверхности водной субфазы.

5. Разработать методику МАЛДИ-МС анализа бариевых солей амфифильных соединений в монослоях, сформированных на поверхности МАЛДИ мишени, и оценить количественные характеристики методики определения свободных жирных кислот.

6. Исследовать механизм образования ионов при МАЛДИ-МС анализе монослоев бариевых солей амфифильных соединений на примере полипrenoлов.

7. Провести апробацию методики анализа амфифильных соединений с использованием биологических образцов различной природы.

Научная новизна

1. Разработан метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы.

2. Показано, что механизмом образования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений, полученных на поверхности МАЛДИ мишени, является самопроизвольное перемещение монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести, где происходит образование мультимолекулярных структур, аналогичных коллапсированным монослоям.

3. Установлено, что ионизация бариевых солей амфифильных соединений происходит за счет отщепления нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса с образованием иона $[M-H+Ba]^+$.

4. Доказано, что при нанесении н-гексанового раствора полипrenoлов на поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария, на границе раздела фаз образуются алкоголяты бария, которые детектируются методом МАЛДИ-МС.

5. Разработана оригинальная методика МАЛДИ-МС анализа амфифильных соединений в виде их бариевых солей в составе монослоев, формирующихся непосредственно на поверхности МАЛДИ мишени.

Практическая значимость

Предложенный метод формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений непосредственно на МАЛДИ мишени позволил увеличить чувствительность анализа амфифильных соединений методом

МАЛДИ-МС и сократить время пробоподготовки. Разработанная методика анализа свободных жирных кислот в виде их монокарбоксилатов бария была внедрена и используется в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России (акт № 1/22 от 14.11.2022) и в лаборатории раннего эмбриогенеза ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (акт № 1-22 от 24.11.2022) (Приложение А).

Полученные результаты могут быть использованы для скрининга амфифильных соединений в целях контроля качества лекарственных средств, биологически активных добавок и продуктов питания, а также в научно-исследовательских медицинских учреждениях для разработки новых методов диагностики заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Технология Ленгмюра, адаптированная к поверхности капли, позволяет при нанесении стеариновой кислоты в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы бария, формировать на поверхности МАЛДИ мишени мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев стеарата бария по механизму самопроизвольного перемещения монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести.

2. Нанесение смеси свободных жирных кислот в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы бария, приводит к формированию регулярного монослоя, состоящего из монокарбоксилатов бария, что позволяет проводить анализ свободных жирных кислот методом МАЛДИ-МС с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

3. Формирование структур на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений на МАЛДИ мишени позволяет проводить анализ амфифильных соединений, неспособных образовывать твердый монослой.

4. Образование бариевых солей полипренолов происходит на границе раздела фаз при нанесении н-гексанового раствора полипренолов на поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария.

5. Основным механизмом образования иона $[M-H+Ba]^+$ при МАЛДИ-МС анализе ненасыщенных спиртов является отщепление нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса.

Личный вклад

Экспериментальная работа, обработка и представление экспериментальных данных проводились лично автором диссертации. Автор диссертации принимал непосредственное участие в разработке аналитических методик, обсуждении полученных результатов и обосновании новых научных гипотез.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается корректностью применяемых для решения поставленных задач подходов; проведением комплексных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа; воспроизводимостью экспериментальных данных; использованием стандартных образцов известного состава при разработке аналитических подходов; соответствием результатов современному уровню знаний в исследуемой области науки, а также результатами практической апробации разработанных подходов и методик.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях: Международная научно-техническая конференция «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2018-2021 гг.); Республиканская конференция с международным участием, посвященная 110-летию со дня рождения В.А. Бандарина «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2019 г.); IX съезд общества физиологов растений России «Физиология растений - основа создания растений будущего» (Казань, 2019 г.); Республиканская конференция с международным участием, посвященная 80-летию со дня рождения Т.С. Морозкиной «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2020 г.); Республиканская конференция с международным участием, посвященная 75-летию со дня рождения Е.В. Барковского «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2021 г.); XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященная 125-летию со дня основания Томского политехнического университета (Томск, 2021 г.); Конференция «Липиды 2021» (Москва, 2021 г.); XXV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022 г.).

Публикации

По результатам работы опубликованы 5 статей (среди которых 4 статьи в журналах, входящих в базы данных Web of Science или Scopus, и 1 в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций).

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы и 3 приложений.

Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 47 рисунков и 12 таблиц. Библиографический список включает 156 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 МАЛДИ масс-спектрометрия

С момента открытия [1,2] матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) нашла самое широкое применение в различных областях наук о жизни, так как позволила осуществлять перевод термолабильных и нелетучих биомакромолекул в газовую фазу без значительной их деградации. Данный подход позволил проводить масс-спектрометрический анализ белков, пептидов, углеводов, липидов и других органических соединений. На сегодняшний день МАЛДИ масс-спектрометрия получила широкое распространение при молекулярной визуализации тканей [3], а также в протеомике [4], метаболомике [5], липидомике [6], клинической микробиологии [7] и паразитологии [8].

Метод МАЛДИ основан на воздействии импульсами лазерного излучения на матрицу, сокристаллизованную с молекулами аналита. Матрица представляет собой химическое соединение, которое способно возгоняться под воздействием лазера и захватывать с собой молекулы анализируемого вещества. Кроме того, матрица способствует ионизации анализируемого вещества. Вещество, используемое в качестве МАЛДИ матрицы, должно удовлетворять следующим критериям:

- обладать высоким коэффициентом поглощения на длине волны излучения используемого лазера;
- осуществлять ионизацию нейтральных молекул аналита;
- быть устойчивым в условиях высокого вакуума;
- обладать достаточной растворимостью в растворителях, используемых в процессе пробоподготовки.

Наиболее распространенными матрицами являются: 2,5-дигидроксibenзойная кислота (ДНВ) и α -циано-4-гидроксикоричная кислота (СНСА). В качестве лазеров наиболее широко используются N₂-лазеры (337 нм) и Nd:YAG лазеры (355 нм).

Упрощенная схема процесса образования положительно заряженных ионов в МАЛДИ масс-спектрометрии представлена на Рисунке 1. Образец (обычно представляет собой сокристаллы матрицы и аналита) облучается импульсным лазерным излучением, энергия которого преимущественно поглощается матрицей, при этом происходит испарение матрицы и переход интактных молекул аналита из конденсированного состояния в газовую фазу. Над поверхностью мишени образуется облако газа, которое

состоит преимущественно из нейтральных частиц. Вместе с тем, в нем присутствуют также и заряженные матричные частицы, которые образуются в ходе фотохимических реакций. Ионизацию на данном этапе принято называть первичной.

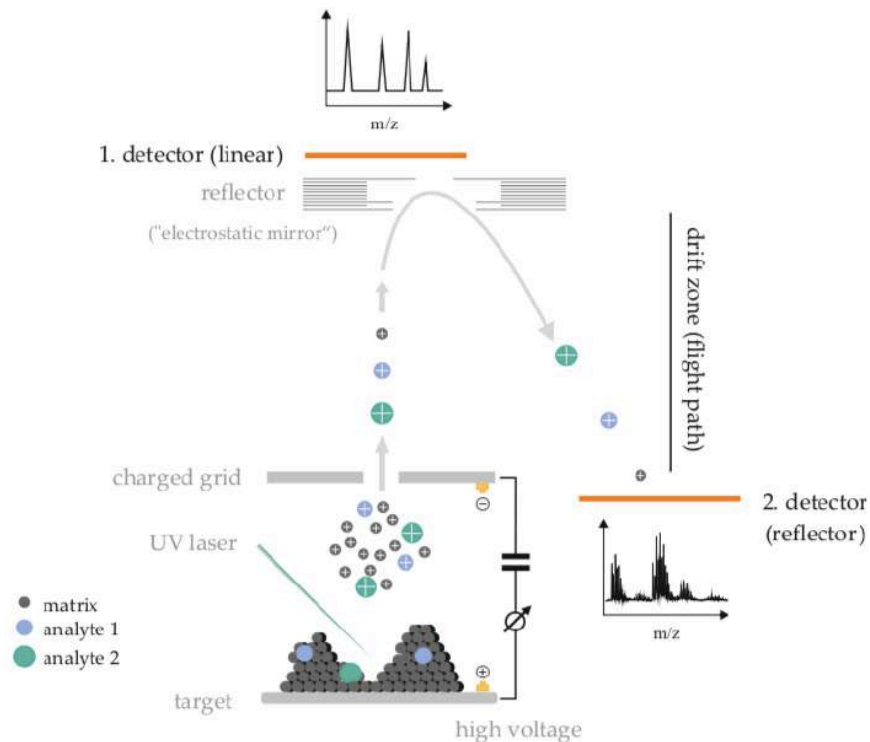


Рисунок 1 – Схема процесса анализа положительно заряженных ионов в масс-спектрометре с источником ионизации МАЛДИ и tandemным времяпролетным масс-анализатором [9]

В расширяющемся облаке происходят непрерывные ион-молекулярные реакции между заряженными матричными частицами и молекулами аналита, приводящих к ионизации последнего. Избыточная концентрация молекул матрицы по сравнению с аналитом (более 3 порядков) позволяет считать, что ионизация осуществляется в результате протонирования молекул анализируемого соединения возбужденными молекулами матрицы [10]. Ионизацию на данном этапе обычно называют вторичной. Наряду с образованием положительных ионов возможно образование и отрицательных ионов в результате отщепления H^+ или Na^+ от молекулы аналита или фрагментации в процессе ионизации. Также возможно формирование аддуктов, являющихся продуктом взаимодействия с катионами, которые могут присутствовать в образце случайным образом или быть добавленными намеренно. В результате при ионизации МАЛДИ образуются преимущественно однозарядные молекулярные ионы, что существенно упрощает интерпретацию получаемых масс-спектрометрических данных [11]. Следует

отметить, что до сих пор механизм образования ионов в МАЛДИ не является полностью изученным и, в связи с этим привлекает на протяжении нескольких десятилетий множество исследователей к изучению данной проблемы [12-14].

Ионизированные частицы затем ускоряются электрическим полем (около 20 кВ). После прохождения ряда заряженных пластин ионы свободно дрейфуют в бесполовом пространстве, где происходит их разделение по отношению массы к заряду (m/z): чем меньшим значением m/z характеризуется ион, тем быстрее он достигнет детектора [15]. При этом ионы с одинаковым значением m/z могут попадать в бесполовое пространство с разными значениями энергии, что будет приводить к уширению пика. Использование отражателя (рефлектрона) помогает компенсировать влияние начального разброса значений энергии на время полёта ионов при детектировании их на детекторе отражателя [16].

1.2 Механизмы образования ионов при ионизации методом МАЛДИ

Современные модели образования ионов в МАЛДИ принципиально согласуются в том, что процесс ионизации рассматривается как двухэтапный процесс. Первым этапом является первичное образование ионов или разделение. Затем следуют ионно-молекулярные реакции в струе МАЛДИ, приводящие к появлению вторичных ионов, которые впоследствии попадают в масс-анализатор.

Образование первичных ионов в МАЛДИ, которое протекает сразу после (или во время) лазерного импульса, остается наиболее противоречивым аспектом метода. Понимание процессов вторичной ионизации в МАЛДИ получило значительное развитие в последние годы. Признание того, что в факеле МАЛДИ достигается локальное равновесие, делает все более важным измерение газофазных термодинамических свойств матриц и аналитов, поскольку они оказывают существенное влияние на результирующий масс-спектр. Вторичные события менее спорны, поскольку термодинамика и кинетика ионно-молекулярных реакций может быть тщательно и достоверно изучена.

1.2.1 Модель «ионов счастличиков»

Одной из ранних моделей описания первичной ионизации является модель предварительно сформированных «ионов счастличиков», предложенная Karas и соавторами [11, 17]. Данная модель предполагает образование ионов аналита в растворе образца с последующим включением их в кристаллы матрица/образец с соответствующими противоионами, например, анионами трифторуксусной кислоты

(Рисунок 2). Под действием лазерного излучения происходит абляция кристаллов матрица/образец с высвобождением кластеров ионов аналита, противоионов и молекул матрицы. В газовой фазе во время процессов нейтрализации заряда между аналитом, противоионами и электронами образуются однозарядные ионы аналита (так называемые «ионы счастливики»). Однако высвобождение ионной пары аналит-противоион в процессе абляции не является эффективным, поскольку её суммарный заряд равен нулю. Разделение этих ионных пар не является тривиальным, так как они связаны сильным электростатическим притяжением. Кроме того, согласно данной модели, большинство ионов удерживаются в нейтральных кластерах. Хотя они, безусловно, деградируют и высвобождают некоторые ионы [18,19], результаты моделирования и экспериментов показывают, что матричные кластеры в основном остаются нетронутыми [20,21], поэтому высвобождается мало свободных ионов.

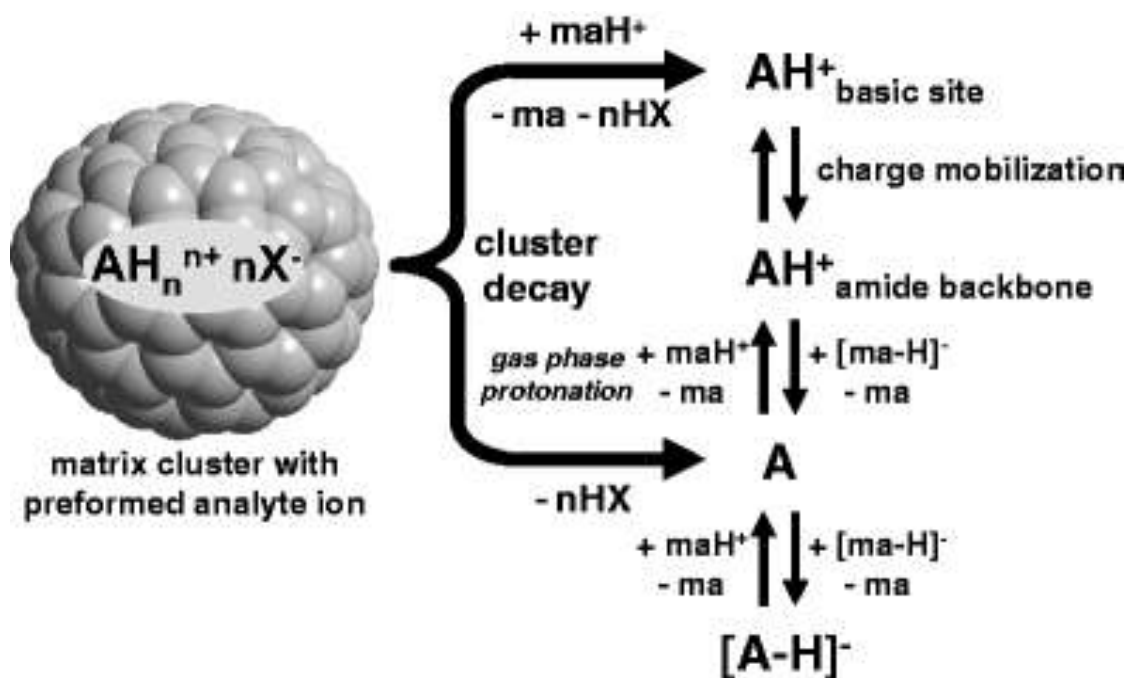


Рисунок 2 – Механизм формирования протонированных и депротонированных молекул аналита в рамках модели «ионов счастливики» (ma – матрица; A – аналит) [11]

1.2.2 Модель термической ионизации

Ионы могут быть получены из нейтральных молекул под воздействием тепла, например, путем эмиссии электронов из молекул, атомов и поверхностей. В конце 90-х годов было предложено, что в факеле МАЛДИ сама матрица может действовать как растворитель для облегчения разделения ионных пар. Поскольку большинство матричных соединений являются полярными молекулами, этот подход был назван

моделью полярной жидкости [22]. В данной модели горячая матричная жидкость (расплав) снижает энергетические требования для разделения зарядов путем сольватации зарождающихся ионов или ионных пар. Вместо 500-700 кДж/моль для разделения пар ионов матрицы (например, $2M \rightarrow M^+ \text{ и } M^-$, или $2M \rightarrow MH^+ + (M-H)^-$), требуемая энергия может быть снижена до 100-200 кДж/моль. Если эти реакции придут к равновесию в горячем факеле, это приведет к образованию достаточного количества ионов, чтобы их можно было легко зарегистрировать. Более детальное теоретическое исследование показало, что существуют фундаментальные причины, по которым эта модель вряд ли подходит для МАЛДИ [23]. Так, например, при температурах и давлениях, которые достигаются в раннем факеле, органические вещества имеют низкие диэлектрические константы. Это означает, что сольватация ионов практически пренебрежимо мала.

1.2.3 Модель комбинированной физической и химической динамики

На сегодняшний день наиболее исчерпывающей теорией ионизации в УФ-МАЛДИ является модель комбинированной физической и химической динамики (CPCD) [24]. На ранних этапах развития теории предполагалось, что первичная ионизация, связанная с образованием ионов матрицы, может осуществляться путем последовательного поглощения матрицей двух фотонов. Однако потенциалы ионизации (ПИ) почти всех распространенных МАЛДИ матриц [25], например, DNB (8,05 эВ или 777 кДж/моль), лежат выше уровней энергии, получаемых с помощью распространенных N_2 (337 нм, энергия 2 фотонов = 7,4 эВ) и Nd:YAG (355 нм, энергия 2 фотонов = 7 эВ) лазеров. Было установлено, что хотя в конденсированных кластерах ПИ DNB несколько снижается до 7,8 эВ (750 кДж/моль), энергии двух фотонов лазера все ещё недостаточно для её эффективной ионизации [26]. Таким образом, требуется три фотона для ионизации свободной DNB или кластеров DNB. Прямая многофотонная ионизация при использовании распространенных МАЛДИ лазеров малоэффективна. Тем не менее концентрирование энергии на одной молекуле возможно благодаря последовательному захвату двух экситонов как это представлено на Рисунке 3. Соответственно наличие мобильных экситонов с возможностью их объединения на одной молекуле обеспечивает механизм, с помощью которого энергия нескольких фотонов может храниться, транспортироваться и концентрироваться для образования ионов.

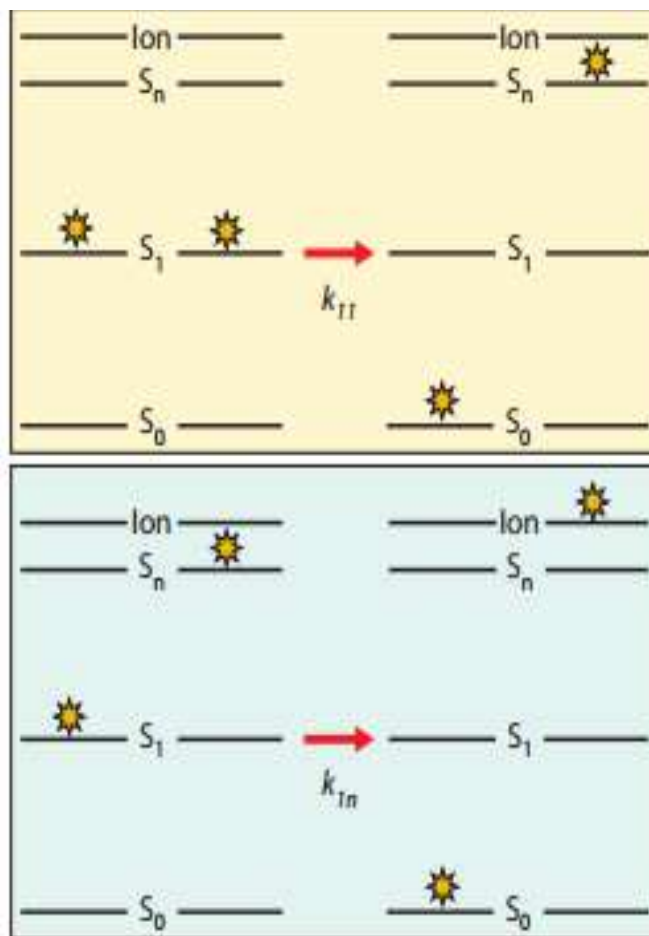


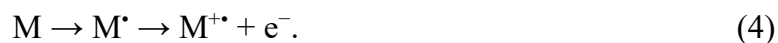
Рисунок 3 – Диаграмма состояний и переходов для первичной ионизации в модели CPCD. Показаны два последовательных захвата экситонов, которые занимают центральное место в CPCD. В обоих случаях полная энергия двух возбужденных соседних молекул матрицы перераспределяется из делокализованного в локализованное состояние [27]

В модели CPCD первичный процесс ионизации для матриц, таких как ДНВ, может быть описан следующим образом (1-3):



где, S_0 — основное электронное состояние, S_1 — первое электронное возбужденное состояние, а S_n — более высокое возбужденное состояние. Разница между энергией ионизации и конечной объединенной энергией составляет порядка 1 эВ.

Характерной особенностью модели CPCD, является то, что в процессе ионизации генерируются катион-радикалы M^+ , а не протонированные молекулы матрицы $[M+H]^+$ [28]:



Затем в результате захвата атомарного водорода из M^{+} генерируется $[M+H]^{+}$ [29].

Модель CPCD не описывает прямую ионизацию аналитов (или предварительно образованных ионов аналитов), однако не отвергает возможность прохождения данного процесса. Вторичные реакции включают перенос заряда между матрицей и аналитом в обеих полярностях, а также между аналитами.

Результаты измерения выхода ионов матрицы и аналита в зависимости от длины волны и плотности потока лазерного излучения для нескольких матриц, включая DHB и СНСА, представленные в работе [30], в значительной степени согласовывались с теоретическими значениями рассмотренных параметров, полученными с использованием модели CPCD. Пример сравнения экспериментальных и теоретических данных, полученных для СНСА, представлен на Рисунке 4.

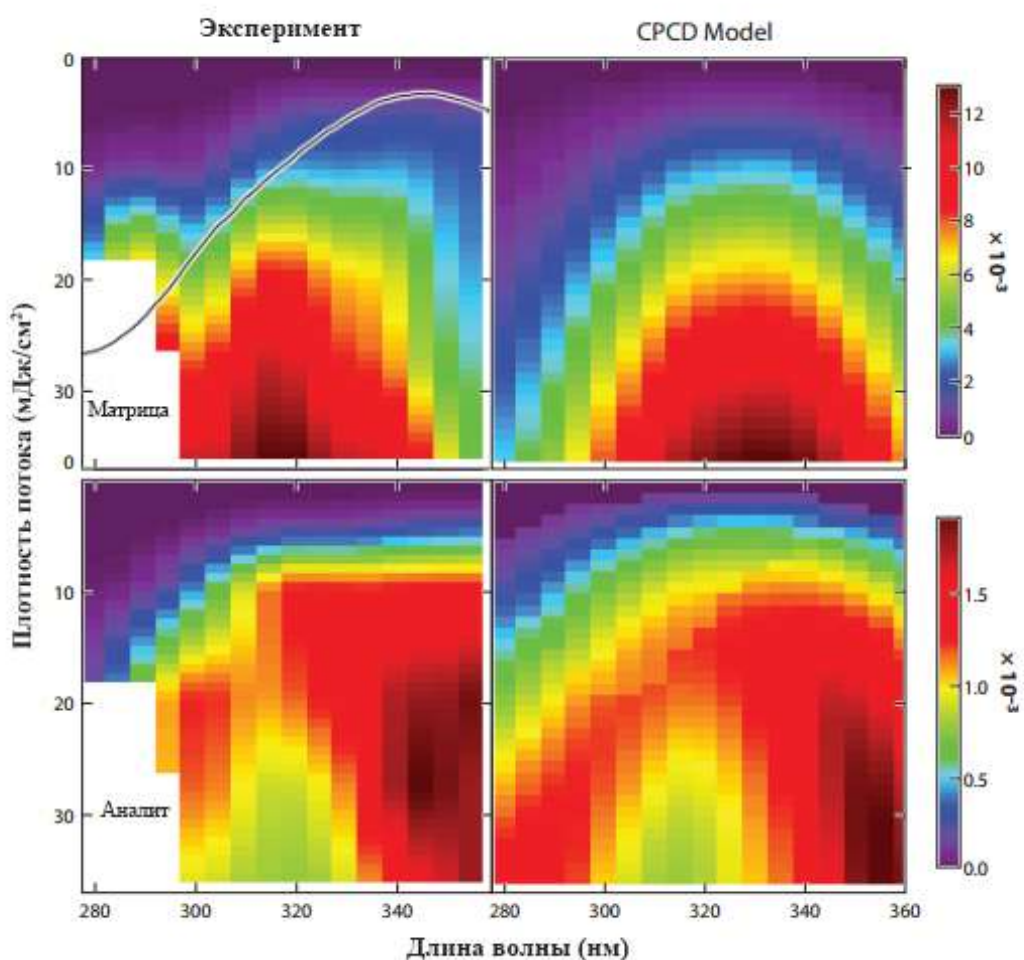


Рисунок 4 – Выходы ионов СНСА и аналита в зависимости от длины волны лазера и плотности потока энергии. На левых панелях показаны экспериментальные данные, правые демонстрируют соответствующие предсказания модели CPCD [30]. Кривая на верхней левой панели показывает спектр поглощения матрицы в твердом состоянии по данным [31]

В СНСА выходы аналита самые высокие на длинах волн, которые наименее эффективны для матрицы, тогда как область, где сигналы матрицы самые высокие, соответствует резкому падению выхода аналита. Значительные различия в спектрах матрицы и анализируемого вещества показывают, что они ионизируются по разным механизмам. Максимальный выход матрицы находится около 315 нм и при максимальной плотности потока. Здесь абляция происходит быстрее всего из-за сильного поглощения и большого избытка энергии каждого фотона над бесколебательным уровнем S_1 . Выход аналита в этой области снижен, поскольку вторичные реакции кинетически ограничены быстрым расширением факела. Более высокий выход ионов аналита обнаруживается при больших длинах волн, несмотря на более низкий выход ионов матрицы, отчасти потому, что для достижения той же плотности энергии требуется больше фотонов. Поскольку первичная ионизация зависит от плотности экситонов, ключевым параметром является число фотонов, а не плотность потока энергии.

Вариабельность МАЛДИ масс-спектров в зависимости от способов нанесения растворов образца и матрицы является существенным недостатком метода. Существенную роль может играть неоднородное распределение аналита в кристаллах матрицы [32].

Модель CPCD дает простое объяснение данному явлению, основанное на подвижности экситонов и их объединении. Оба процесса являются следствием межмолекулярных взаимодействий, которые, в свою очередь, зависят от молекулярной упаковки в твердом теле. Упаковка также отражается в макроскопической морфологии. Образцы, приготовленные по-разному, или даже кристаллы в одном образце могут иметь различную морфологию, что коррелирует с результирующим выходом ионов при ионизации МАЛДИ [33].

Генерация ионов в МАЛДИ имеет тенденцию к снижению при увеличении числа лазерных импульсов, направляемых в одну точку образца. Однако если абляция продолжается вплоть до несущей подложки, во многих случаях можно наблюдать значительное увеличение образования ионов. Сравнивая толстые и тонкие образцы, нанесенные на подложки из различных металлов, Knochenmuss и соавторы [34] предположили, что это увеличение является следствием взаимодействия возбужденных состояний матрицы с металлом (Рисунок 5). Ионизация двумя фотонами становится

возможной в последовательном двухстадийном процессе. Начальный этап объединения $S_1 + S_1$ приводит непосредственно к ионам, а последующий этап $S_1 + S_n$ опускается.

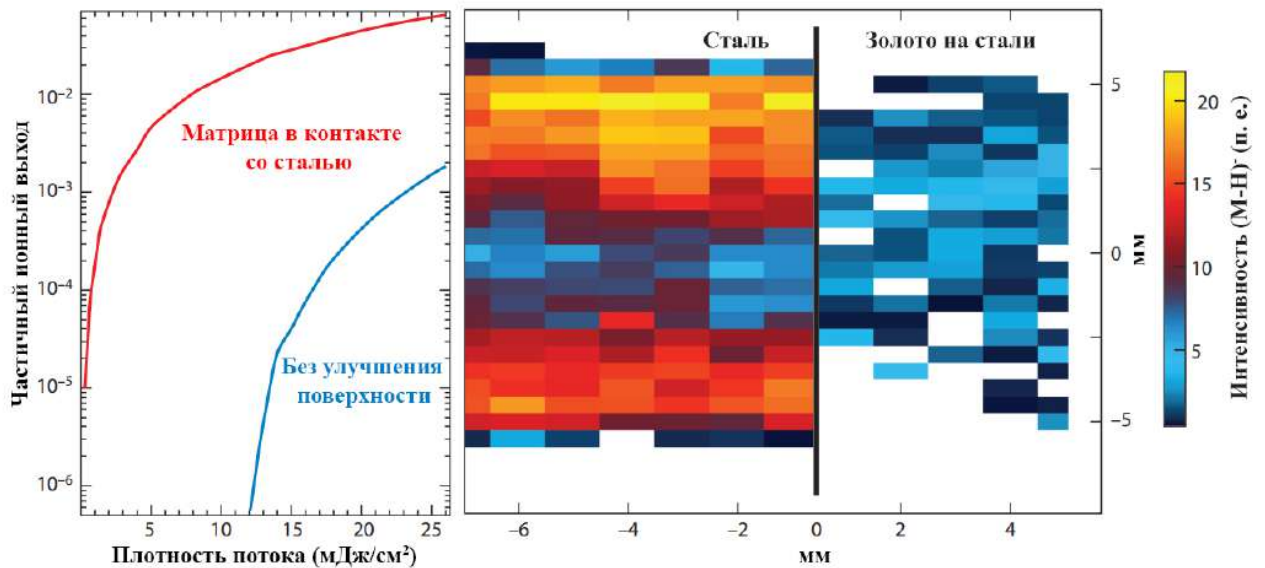


Рисунок 5 – (Правая панель) МАЛДИ изображение распыленной дорожки синапиновой кислоты (карта интенсивности $[M-N]^+$ иона). Дорожка имела ширину примерно 1 см и пересекала границу между стальной подложкой и областью, где сталь была покрыта золотом толщиной 40 нм. Улучшение является наибольшим на более тонких верхнем и нижнем краях дорожки. (Левая панель) Увеличение сигнала на стали согласуется с механизмом ионизации в возбужденном состоянии модели CPD, модифицированной для учета взаимодействия с металлической зоной проводимости

Выход ионов в МАЛДИ также зависит от фокуса лазера при постоянной плотности потока энергии [35]. Больше ионов генерируется большими пятнами, но относительный выход ниже (ионы/нейтралы). Эффект особенно заметен для небольших пятен.

В модели CPD факел представляет собой молекулярный пучок, испускаемый из облучаемого пятна. Это может быть почти идеальный пучок, поскольку толщина слоя, подвергнутого абляции, составляет всего несколько сотен нанометров, а диаметр обычно превышает 100 мкм. Плотность шлейфа на заданном расстоянии зависит от диаметра пятна. Бимолекулярные реакции, такие как объединение и нейтрализация, зависят от плотности шлейфа. Таким образом, выход ионов в МАЛДИ также зависит от диаметра облучаемого пятна.

1.3 Современные подходы к анализу амфифильных соединений с использованием масс-спектрометрии

1.3.1 Анализ свободных жирных кислот

Свободные жирные кислоты (СЖК) в организме служат важным источником энергии [36], а также могут выступать в роли сигнальных молекул в различных клеточных процессах, в частности секреции инсулина [37]. Однако содержание их внутри организма невелико, ввиду того что они являются детергентами, а повышение их концентрации может приводить к возникновению токсических эффектов [38]. Установлено, что изменения в метаболизме СЖК связаны с широким спектром заболеваний, среди которых диабет [39,40], ожирение [41,42], инсулинорезистентность [43] и метаболический синдром [44]. Это позволяет рассматривать СЖК как потенциальные биомаркеры при диагностике различных метаболических заболеваний [45,46]. Таким образом, количественное определение и анализ профилей СЖК имеют важное значение, так как помогают пролить свет на их биологические функции и свойства [47].

На сегодняшний день газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) является рутинным методом для количественного и качественного определения СЖК в различных биологических матрицах [48-50]. ГХ-МС отличается высокой чувствительностью и позволяет осуществлять разделение как изомеров по положению двойной связи [51], так и цис-/транс-изомеров [49]. Тем не менее, данный подход требует проведения предварительной дериватизации аналитов (чаще всего до метиловых или триметилсилиловых эфиров), с целью уменьшения их полярности и увеличения летучести [52]. Этот процесс существенно увеличивает продолжительность анализа, а также требует высокой квалификации исполнителя [53]. Более того, не исключен риск прохождения нежелательных побочных реакций в процессе дериватизации, например, окисления или изомеризации ненасыщенных СЖК [54].

В последние годы обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с ионизацией электрораспылением (ОФ-ВЭЖХ-ИЭР) и масс-спектрометрическим (МС) или tandemным масс-спектрометрическим (МС/МС) детектированием стала активно использоваться исследователями в качестве альтернативы ГХ-МС для анализа СЖК [55-57]. Главным преимуществом ОФ-ВЭЖХ-ИЭР-МС можно считать возможность анализа СЖК без предварительной дериватизации, что позволяет не только существенно упростить и ускорить пробоподготовку, но и

заметно расширить область применения, сохранив при этом высокие значения чувствительности и разрешения [58,59]. ВЭЖХ-МС(МС) методы неоднократно применялись для профилирования СЖК в различных биологических матрицах [60-62]. Также данные методы могут быть использованы при количественном определении широкого ряда СЖК в различных биологических жидкостях, как было показано Koletzko и соавторами в ряде работ [63-65].

В ходе ОФ-ВЭЖХ-ИЭР-МС анализа СЖК регистрируются чаще всего в виде отрицательно заряженных ионов, однако их способность ионизоваться невелика, что может в некоторых случаях ограничивать применимость метода. В связи с этим в ряде работ описаны протоколы пробоподготовки для ОФ-ВЭЖХ-ИЭР-МС, включающие этап дериватизации. Среди них необходимо отметить получение диметиламиноэтиловых эфиров [66], триметиламиноэтиловых эфиров иодидов [67] и пиколиламинов [68].

Разработаны также подходы, которые позволяют избежать необходимости в проведении дериватизации и улучшить неудовлетворительную в некоторых случаях фрагментацию СЖК при МС/МС анализе, путем добавления к вышедшему из колонки жидкостного хроматографа анализируемому веществу ионов металлов, таких как барий [69] или литий [70].

Несмотря на то, что ацильные остатки являются важными составляющими всех классов липидов и могут быть легко различимы по молекулярным массам, МАЛДИ-МС анализ СЖК является сложной аналитической задачей при использовании распространенных органических матриц. В частности, проблема заключается в перекрывании сигналов СЖК и сигналов матричного происхождения [71]. К тому же высокая интенсивность матричных сигналов может негативным образом влиять на чувствительность к СЖК. Происхождение большого числа матричных пиков связано с фотохимическими реакциями, происходящими с матрицей под воздействием лазерного излучения. В связи с этим, распространенные матрицы ДНВ и СНСА не являются оптимальными для анализа СЖК. До сих пор продолжается поиск новых соединений, которые могли бы выступать в роли эффективной МАЛДИ матрицы для анализа СЖК [9, 72].

На сегодняшний день исследователями разработано несколько подходов к решению данной проблемы. Одним из способов является использование в качестве матрицы мезо-тетракис(пентафлуорофенил)порфирина (МТПФ) [73]. МТПФ имеет

молярную массу 974,57 г/моль и не подвергается распаду в газовой фазе с образованием фрагментов с m/z менее 500. Таким образом, СЖК с молярной массой менее 350 г/моль могут быть детектированы в отсутствие перекрывания с матричными пиками, что было продемонстрировано для смеси СЖК, полученной из растительных масел, подвергнутых предварительно щелочному гидролизу [74]. Ввиду использования избытка ацетата натрия в качестве добавки к матрице в масс-спектре присутствовали исключительно Na^+ аддукты натриевых солей СЖК, что упростило интерпретацию полученных данных при отсутствии других аддуктов (H^+ и K^+). МТПП была также успешно использована для количественного анализа СЖК в плазме крови крыс методом МАЛДИ-МС [75]. Однако дальнейшее использование данной матрицы было ограничено низкой чувствительностью анализа (предел обнаружения СЖК составлял порядка единиц микрограмм), а также присутствием артефактов в масс-спектре, которые, по всей видимости, свидетельствовали об окислении ненасыщенных СЖК при использовании МТПП в качестве матрицы.

Ввиду кислотной природы СЖК можно ожидать, что данные соединения могут быть детектированы в виде депротонированных молекул ($[\text{M}-\text{H}]^-$) в режиме регистрации отрицательных ионов при использовании достаточно основной матрицы. Одним из соединений, обладающих достаточной основностью ($\text{pK}_a = 9,99$) и характеризующихся набором слабых фоновых сигналов в масс-спектре, является 9-аминоакридин (АА) [76]. Было показано, что при использовании АА предел обнаружения СЖК находится в диапазоне десятков фемтомоль, при этом линейный динамический диапазон метода составлял 2 порядка. Кроме того, было продемонстрировано, что люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), используемый обычно в качестве хемилюминисцентного индикатора, также может быть использован в качестве МАЛДИ матрицы при анализе СЖК в режиме регистрации отрицательных ионов [77].

Ещё одной перспективной матрицей для анализа СЖК методом МАЛДИ-МС является 1,8-бис(диметиламино)нафталин (ДМАН), супероснование с $\text{pK}_a = 12,21$. Данное соединение не имеет депротонированной формы, что обуславливает отсутствие фоновых матричных сигналов в режиме регистрации отрицательных ионов и позволяет обнаруживать СЖК в количествах, достигающих единиц пикомоль [78]. Однако ДМАН нестабилен в условиях высокого вакуума, что в свою очередь приводит к изменению масс-спектра во время пребывания мишени внутри источника ионизации вследствие

постоянного изменения соотношения аналит/матрица [79]. Были предприняты попытки улучшить стабильность ДМАН в условиях высокого вакуума путем введения дополнительных органических радикалов по аминогруппам, однако полученные соединения на сегодняшний момент не получили коммерческого распространения [80]. Кроме того, была предложена бинарная матрица АА/ДМАН и показана её эффективность при липидном профилировании Грам положительных и Грам отрицательных бактерий [81].

Впечатляющие результаты с точки зрения чувствительности анализа были получены при использовании в качестве матрицы N1,N4-добензилдинибензол-1,4-диамина: предел обнаружения составил 0,3 фмоль для индивидуальной СЖК [82]. Среди органических матриц, которые показали свою эффективность для анализа СЖК в режиме регистрации отрицательных ионов, следует также отметить N-(1-нафтил) этилендиамин дигидрохлорид, который был апробирован при исследовании содержания СЖК в плазме крови пациентов с гипергликемией [83].

Было установлено, что сложность обнаружения СЖК возрастает с увеличением количества двойных связей в составе кислоты. Подобная закономерность вызвана невысокой стабильностью в условиях высокого вакуума ($\sim 10^{-6}$ мбар) ненасыщенных СЖК, таких, как, например, арахидоновая (C20:4) и докозагексаеновая (C22:6). В работе [84] PirkI и соавторы обошли это препятствие путем проведения анализа СЖК в условиях среднего вакуума. Также это исследование примечательно тем, что не была применена стандартная МАЛДИ матрица, а СЖК десорбировались с крыльев *Drosophila melanogaster*. Ещё один пример использования в качестве МАЛДИ матрицы биологического объекта представлен в работе [85], в которой описано применение бионаноструктур, выделенных из микроводорослей, для анализа СЖК при минимальном числе фоновых сигналов.

Наряду с органическими матрицами для анализа СЖК также пытаются применять различные соединения, имеющие неорганическую природу. Одним из таких веществ является графит, который не создает значительного фона и поэтому может рассматриваться в качестве потенциальной матрицы для анализа СЖК [86]. Однако имеются свидетельства того, что использование графита приводит к загрязнению источника ионов масс-спектрометра, очистка которого занимает продолжительное время. В связи с этим предпринимались попытки синтезировать менее летучие соединения. Так,

например, авторы работы [87] продемонстрировали возможность использования нанопленок теллура для анализа СЖК, а Budumir и соавторы регистрировали депротонированные СЖК, применяя десорбцию/ионизацию на пористом кремнии [88]. В качестве МАЛДИ матриц, которые могут быть применены для анализа метаболитов, в частности СЖК, в последнее десятилетие также активно используются графен и оксид графена [89-91].

1.3.2 Анализ полипренолов

Полипренолы – это линейные изопреноидные спирты длиной от 5 до более 100 изопреновых единиц (Рисунок 6) [92]. Полипренолы в клетках присутствуют преимущественно в виде спиртов, а также соответствующих карбоксилатов или фосфатов. Полипренолы и их производные участвуют в биосинтезе полисахаридов и гликозилировании белков в фотосинтезирующих тканях растений, а также в синтезе пептидогликанов у бактерий [93,94]. Полипренолы и их фосфаты являются компонентами природных мембран прокариотических и эукариотических клеток, и могут быть преобразованы путем ферментативного катализа в долихолы и долихилфосфаты, которые участвуют в качестве ключевых носителей гликопротеинов в долихолфосфатном цикле [95,96]. Нарушения в данном цикле приводят к дисбалансу и дефициту гликопротеинов, участвующих в патогенезе многих заболеваний. Кроме того, профили полипренолов в фотосинтетических тканях растений проявляют отличия между видами, что позволяет рассматривать их как хемотаксономический маркер [97]. В литературе представлены обширные данные о ряде биологических активностей полипренолов и их производных, в том числе противовирусной, гепатопротекторной, иммуномодулирующей и противоопухолевой [98-100]. Соединения на основе полипренолов представляют собой перспективный класс биологически активных веществ и могут быть использованы для разработки новых лекарственных средств (например, Ропрен®) [101] или липосомных носителей лекарственных средств [102].

На сегодняшний день большинство подходов к количественному и качественному анализу полипренолов опираются на использование ОФ-ВЭЖХ. При использовании УФ-спектрофотометрического детектора на длине волны 210 нм и градиентного режима элюирования удается достигать хорошего разрешения между отдельными полипренол гомологами, а предел обнаружения при этом может составлять до 1 нг [103-106]. Среди других методов хроматографии для характеристики профиля полипренолов в

биологических образцах различного происхождения используются сверхкритическая жидкостная хроматография [107] и тонкослойная хроматография (ТСХ) [108,109]. Пределы обнаружения при использовании ТСХ обычно составляют 0,1-0,5 мкг для отдельного полипренол гомолога.

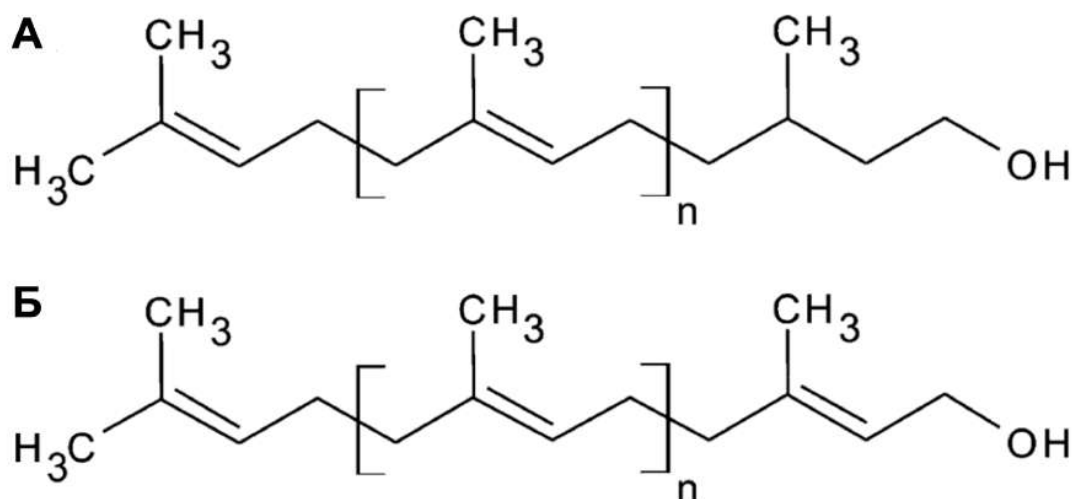


Рисунок 6 – Структура долихолов (А) и полипренолов (Б)

При использовании масс-спектрометрии с электронной ионизацией удается осуществлять анализ недериватизированных полипренолов, однако ввиду интенсивной фрагментации иона-предшественника в спектрах присутствует большое число сигналов ионов-продуктов, что затрудняет идентификацию молекулярного иона и характеризацию структуры анализируемых соединений [110]. Для повышения чувствительности анализа и качества регистрируемых масс-спектров используют предварительную дериватизацию с образованием трет-бутил-диметилсилиловых эфиров.

При использовании мягких методов ионизации, таких как бомбардировка быстрыми атомами [110,111] и полевая десорбция [112], масс-спектрометрический анализ недериватизированных полипренолов также затруднен. В данных условиях полипренолы не способны эффективно ионизироваться из-за их высокой гидрофобности, поэтому в масс-спектрах практически отсутствуют пики протонированных молекул, а сигналы в фрагментных масс-спектрах не дают практически никакой информации о структуре молекулы. Для увеличения полярности, а также способствования протонированию или депротонированию молекул используют предварительную дериватизацию до сульфатов, ацетатов или фосфатов [113].

При ионизации электрораспылением наблюдаются аналогичные затруднения при масс-спектрометрическом анализе полипrenoлов. Несмотря на возможность эффективного анализа производных полипrenoлов, процесс предварительной дериватизации зачастую является длительным и требует большого количества образца. Для преодоления данного затруднения рядом исследователей было предложено добавлять раствор солей ряда металлов (Li, Na, K) непосредственно в образец или непрерывно инжестировать его в источник при распылении образца, что приводило к образованию интенсивных сигналов соответствующих катионизированных молекул ($[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$), тандемный масс-спектрометрический анализ которых позволял получать серии структурно информативных ионов-продуктов [114-116]. При этом такой подход позволил добиться снижения предела обнаружения полипrenoлов до единиц пикограмм. В свою очередь Guan и Eichler продемонстрировали, что добавление ацетата аммония в состав подвижных фаз для ОФ-ВЭЖХ приводит к образованию аддуктов полипrenoлов с ацетат анионами ($[M+CH_3COO]^-$) и позволяет проводить масс-спектрометрический анализ в режиме регистрации отрицательных ионов [117]. В настоящее время ОФ-ВЭЖХ-ИЭР-МС является наиболее часто используемым методом для характеристики профиля и количественного определения полипrenoлов в биологических образцах различной природы [118,119].

Недавно Kania и соавторами было показано, что фотоионизация при атмосферном давлении (ФИАД) имеет ряд преимуществ перед ИЭР и является многообещающим подходом для качественного и количественного масс-спектрометрического анализа полипrenoлов [120]. ФИАД позволяет осуществлять эффективную ионизацию полипrenoлов как в режиме положительных ионов с образованием протонированных молекул с потерей молекулы воды ($[M+H-H_2O]^+$), так и в режиме отрицательных ионов с образованием ионов $[M+O_2]^-$ и $[M+Cl]^-$. При этом ФИАД позволяет проводить масс-спектрометрический анализ полипrenoлов не только из полярных растворителей (например, метанол), но и из неполярных (например, н-гексан), что в свою очередь делает возможным использованием нормально-фазовой ВЭЖХ для разделения смесей полиизопреноидных спиртов, выделенных из природных образцов. Предел обнаружения для отдельных полипренол гомологов, достигнутый с использованием ФИАД, составил 10 пг.

Несмотря на то, что МАЛДИ-МС является эффективным аналитическим методом для высокопроизводительного, быстрого и чувствительного скрининга липидов [6], на сегодняшний день опубликована только одна работа, посвященная применению данного метода для скрининга полипренолов [121], при этом чувствительность анализа в ней не оценивалась.

1.4 Монослой Ленгмюра

Возможность создания материалов, которые сочетают в себе свойства органических и неорганических веществ, и управления их структурой на нанометровом масштабе открывает простор для создания электрически, оптически или биологически активных материалов. Среди разработанных подходов к созданию подобных материалов значительный интерес представляет технология получения мономолекулярных слоев поверхностно-активных веществ (ПАВ) на поверхности водной субфазы. Полученные монослои обладают четко упорядоченной структурой и свойствами, которые определяются составом ПАВ и водной подложки. Такие мономолекулярные пленки принято называть ленгмюровскими, в честь Ирвинга Ленгмюра, внесшего значительный вклад в установление природы явлений, происходящих на границе раздела жидкость – газ [122]. Полученные по технологии Ленгмюра пленки могут быть затем перенесены на твердую подложку для формирования многослойных структур, состоящих из монослоев ПАВ и обладающих, в связи с этим, набором уникальных электрических, оптических и других свойств.

Для получения монослоев Ленгмюра необходимо, чтобы на поверхности воды вещество образовывало стабильные мономолекулярные слои. Данному условию удовлетворяют молекулы, которые имеют в своем составе полярную гидрофильную «голову» и углеводородный гидрофобный «хвост». Такие молекулы обычно называют амфифильными. Одним из распространенных примеров амфифильных соединений являются СЖК, имеющие в составе полярную карбоксильную группу и длинный углеводородный хвост. При контакте такой молекулы с водой карбоксильная группа будет диссоциировать и голова, таким образом, будет удерживаться в воде под действием кулоновского притяжения. Гидрофобный хвост при этом не будет вписываться в локальную структуру воды, что будет приводить к выталкиванию его наружу. Таким образом, гидрофобный эффект не предполагает наличия неких специальных сил отталкивания между молекулами воды и углеводов, а появляется скорее из-за

взаимного притяжения молекул воды, приводящего «к выдавливанию» углеводородного хвоста наружу. Нахождение молекул амфифильного вещества на границе раздела фаз в таком виде, приводит к изменению поверхностного натяжения, что позволяет отнести данные соединения к ПАВ. В результате на поверхности воды образуется монослой из молекул амфифильного вещества, углеводородные хвосты которого обращены в газовую фазу, а полярные головы находятся в жидкой фазе.

Свойства монослоя во многом зависят от типа используемого ПАВ. Анионоактивные ПАВ (например, СЖК) диссоциируют с образованием отрицательно заряженных частиц:



Смещения равновесия в данной реакции можно добиться за счет изменения рН, что будет приводить к сжатию или расширению монослоя за счёт электростатического отталкивания.

Вторым важнейшим фактором, влияющим на состав и устойчивость монослоя, является состав водной субфазы. Растворяя в воде соли различных металлов, можно химически модифицировать монослой. Так, анионоактивные ПАВ могут вступать в реакции с катионами металлов, находящимися в водной субфазе, например, по механизму:



Монослой ПАВ на водной субфазе сложно использовать для создания различных устройств на их основе. В связи с этим возникла необходимость переноса полученного монослоя с поверхности воды на твердую подложку. Среди ряда разработанных техник переноса монослоев на твердую подложку наиболее используемым является метод Ленгмюра-Блоджетт [123]. Многослойные структуры, получаемые в ходе переноса по методу Ленгмюра-Блоджетт, называются пленками Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ). При таком подходе монослой сжимают до конденсированного состояния, а затем твердая подложка опускается и поднимается в воду с постоянной скоростью. Меняя направление погружения подложки, можно получить три различных по характеристикам и типу поверхности (гидрофобная или гидрофильная) многослойных структуры. Благодаря методу Ленгмюра-Блоджетт можно получать пленки, имеющие толщину в несколько молекулярных слоев, с заданными свойствами.

Помимо СЖК устойчивые монослой на поверхности водной субфазы могут образовывать также фосфолипиды, жирные спирты, красители, а также широкий ряд

биологически активных веществ, таких как хлорофиллы, белки [124-129]. Многие соединения, сами не образующие монослоев, адсорбируются или легко встраиваются в структуру монослоев других соединений, в частности, СЖК.

Монослои Ленгмюра и ПЛБ находят самое широкое применение для решения задач в различных областях науки и техники:

- оптика [130-132];
- разработка новых биомедицинских материалов [133-135];
- молекулярная электроника [136-138].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы

Лауриновая кислота, тридекановая кислота, миристиновая кислота, пентадекановая кислота, пальмитолеиновая кислота, пальмитиновая кислота, олеиновая кислота, арахидоновая кислота, стеариновая кислота, гидроксид натрия, нитрат бария, ацетат бария, н-гексан (HPLC grade), ацетонитрил (HPLC grade), метанол (HPLC grade), плавиковая кислота, этанол (96%, об/об), трифторуксусная кислота (ТФУ, 99%, об/об), были приобретены у Merck (ООО ТД «Химмед», Санкт-Петербург, Россия). Хлороформ (хч), дихлорметан (хч), изопропиловый спирт (хч) были приобретены у ООО «Вектон» (Санкт-Петербург, Россия). 2,5-Дигидроксибензойная кислота (ДНВ) была куплена у Bruker Daltonics GmbH (Бремен, Германия). Полипренолы пихты сибирской (*Abies sibirica* L.) чистотой 90% были приобретены у ООО «Солагифт» (Томск, Россия). Деионизированную воду (удельное сопротивление 18 МОм·см) получали с помощью системы очистки воды Prodeion 10 VS-M (Витал Девелопмент, Санкт-Петербург, Россия).

2.1.2 Биологический материал

Образцы семян (n=3) и клубеньков (n=3) гороха посевного (*Pisum sativum* L), н-гексановые экстракты из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3 (n=3), а также экстракты из н-гексановых и водных лизатов клеток бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 (n=4) и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021 (n=4) были предоставлены сотрудниками кафедры биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета.

Образцы таллома фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus*, n=4), мягких тканей мидии (*Mytilus edulis*, n=4) и икры беломорской сельди (*Clupea pallasii marisalbi*, n=4) были собраны на Беломорской Биостанции Санкт-Петербургского Государственного Университета и предоставлены в замороженном виде В.В. Халаманом (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия). Свежие образцы дафний (*Daphnia magna*, n=4) были предоставлены Н.П. Подосиновичевой (ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия).

Образцы плазмы крови кроликов (*Oryctolagus cuniculus*), порода Советская шиншилла (n=4), а также плазмы крови крыс (n=14) из эксперимента по интоксикации

ацетатом ртути были предоставлены сотрудниками ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Образцы плазмы крови ($n=3$) и фолликулярной жидкости ($n=4$) человека были предоставлены сотрудниками ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О.Отта» (Санкт-Петербург, Россия).

2.2 Исследование электрокинетического потенциала

Для исследования были рассмотрены следующие модельные системы:

- Водная субфаза – дистиллированная вода, которая была подкислена соляной кислотой до $pH=3$; поверхностно-активное вещество (ПАВ) – раствор стеариновой кислоты в *n*-гексане с концентрацией 1 мг/мл.
- Водная субфаза – раствор $BaCl_2$ в концентрации 1 ммоль/л; ПАВ – раствор стеариновой кислоты в *n*-гексане концентрацией 1 мг/мл.

Получение монослоев и последующий их перенос на подложку с формированием ПЛБ осуществляли в ванной Ленгмюра-Блоджетт. Для этого на поверхность водной субфазы, очищенной от пыли, наносился по каплям раствор ПАВ в *n*-гексане, который после испарения растворителя образовывал нерастворимый в воде монослой на поверхности водной субфазы. Полученный монослой, находящийся между подвижным барьером и барьером весов Ленгмюра, сжимали до заданной величины поверхностного давления, отвечающей конденсированному состоянию монослоя, равной 20 мН/м. Подложки из кварцевого стекла (1, Рисунок 7), предназначенные для переноса на них монослоев, предварительно отмывались в горячей серной кислоте, тщательно промывались дистиллированной водой и после этого были обработаны диметилдихлорсиланом, чтобы сделать их поверхности гидрофобными. Подготовленная подложка закреплялась в погружающее устройство и осуществлялось её возвратно-поступательное движение в плоскости, перпендикулярной поверхности водной субфазы с монослоем, с постоянной скоростью и при постоянном значении поверхностного давления, равного 20 мН/м. Процесс останавливали, когда число монослоев в пленках Ленгмюра-Блоджетт достигало 21. Процесс повторяли для второй симметричной подложки.

Затем из двух подложек с нанесенными на них монослоями с помощью пленок из политетрафторэтилена (ПТФЭ) толщиной 20 мкм (5, Рисунок 7) формировался капилляр. С обеих сторон капилляр зажимался ПТФЭ фланцами (2, Рисунок 7), которые вставлялись

в шлифы стеклянных отводов (3, Рисунок 7). Во внешние шлифы ячейки на ПТФЭ пробках вставлялись сетчатые платиновые электроды, покрытые AgCl (4, Рисунок 7). Через верхние отводы в ячейку заливались растворы электролитов (водные растворы KCl или BaCl₂ в концентрации 1 ммоль/л), в которых определялся электрокинетический потенциал. Один из отводов соединялся с системой, с помощью которой осуществлялась подача давления. Подаваемое давление не превышало 60 мм.рт.ст., поскольку более высокие его значения приводили к отклонению от линейного вида зависимости потенциала от давления. Измерения проводились в воздушном термостате, который одновременно являлся защитным экраном от внешних электромагнитных помех. Для измерения токов и потенциалов течения использовались электрометры ИТН-7 и ЭМ-1. Строились зависимости потенциалов течения от приложенного давления, которые представляли собой прямые, проходящие через начало координат. Тангенсы углов наклона прямых применялись для расчета электрокинетического потенциала. Для исследования были выбраны следующие системы:

1. ПЛБ стеариновой кислоты; электролит – водный раствор KCl концентрацией 1 ммоль/л.
2. ПЛБ дистеарата бария; электролит – водный раствор BaCl₂ концентрацией 1 ммоль/л.
3. ПЛБ стеариновой кислоты; электролит – водный раствор BaCl₂ концентрацией 1 ммоль/л.

Электрокинетический (ζ) потенциал рассчитывали из соотношения Гельмгольца-Смолуховского с поправкой на поверхностную проводимость по формуле (7):

$$\zeta = \frac{\eta(\alpha_V + \alpha_S) U_S}{\varepsilon \varepsilon_0 P}, \quad (7)$$

где η – коэффициент динамической вязкости, равный 10^{-3} Н·сек/м²;

α_V – удельная электропроводность свободного раствора, См/м;

α_S – поверхностная проводимость, См/м;

ε – относительная диэлектрическая проницаемость раствора;

ε_0 – абсолютная диэлектрическая проницаемость вакуума, равна $8,85 \cdot 10^{-12}$ Ф/м;

U_S – потенциал течения, В;

P – приложенное давление, Па.

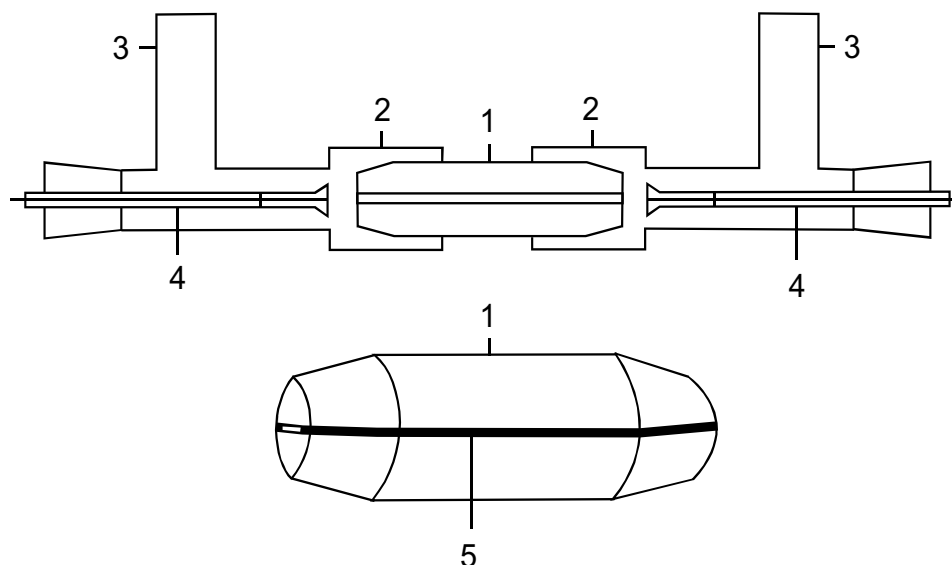


Рисунок 7 – Схема установки для измерения потенциала течения и поверхностной проводимости. 1 – две полуцилиндрические подложки из кварцевого стекла длиной 60 мм, радиусом 10 мм; 2 – ПТФЭ фланцы; 3 – стеклянные отводы; 4 – сетчатые электроды из AgCl с ПТФЭ пробками; 5 – две ПТФЭ пленки толщиной 20 мкм

2.3 Получение монослоев на основе монокарбоксилатов бария в чашке Петри по технологии Ленгмюра

Чашку Петри наполняли раствором ацетата бария с концентрацией 1 мг/мл таким образом, чтобы верхний мениск незначительно возвышался над краями чашки. На края чашки помещали два стальных уголка, выполняющих функцию подвижных барьеров. На поверхность водной фазы наносили 50 мкл раствора смеси насыщенных СЖК (лауриновой, тридекановой, миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой и стеариновой), растворенных в н-гексане, в концентрации 25 мкг/мл каждой кислоты. После формирования монослоя подвижные барьеры сдвигали друг к другу на расстояние 5 мм, сколлапсированный между ними монослой собирали шпателем, и после промывки деионизованной водой переносили в микропробирку. Монослой растворяли в 50 мкл 0,1% раствора ТФУ в ацетонитриле и анализировали методом МАЛДИ-МС с использованием в качестве МАЛДИ матрицы водного раствора ацетата бария с концентрацией 1 мг/мл.

2.3 Синтез поликристаллического стеарата бария

Навеску гидроокиси натрия массой 40 мг растворяли в 100 мл 95% этанола, получая раствор с концентрацией 10^{-2} моль/л. Навеску стеариновой кислоты массой 284 мг растворяли в 100 мл 96% этанола, получая раствор с концентрацией

10^{-2} моль/л. Навеску нитрата бария массой 261 мг растворяли в 100 мл дистиллированной воды, получая раствор с концентрацией 10^{-2} моль/л.

Этанольный раствор гидроксида натрия ($V = 50$ мл, $C = 10^{-2}$ моль/л) добавляли к этанольному раствору стеариновой кислоты ($V = 50$ мл, $C = 10^{-2}$ моль/л). Образовавшийся осадок стеарата натрия растворяли в 100 мл дистиллированной воды при температуре 75 °С. Затем 100 мл водного раствора нитрата бария ($C = 10^{-2}$ моль/л) добавляли к водному раствору стеарата натрия. Смесь перемешивали в течение часа. Образовавшийся осадок стеарата бария фильтровали на воронке Бюхнера с использованием фильтровальной бумаги (беззольная, синяя лента 589/3) и сушили в эксикаторе в течение трех дней.

2.4 Формирование пленок Ленгмюра-Блоджетт стеарата бария

Навеску нитрата бария массой 6,5 г растворяли в 5 л воды, получая раствор с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Полученный раствора разбавляли водой в 10 раз, получая раствор с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Навеску стеариновой кислоты массой 10 мг растворяли в 40 мл н-гексана, получая раствор с концентрацией 10^{-3} моль/л.

Ванну Ленгмюра объемом 3 л заполняли водным раствором нитрата бария ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Для образования монослоя на поверхность водной фазы наносили 250 мкл раствора стеариновой кислоты в н-гексане ($C = 10^{-3}$ моль/л) и ожидали испарения н-гексана с поверхности водной фазы. Полученный монослой переносили на кремниевую пластину методом Ленгмюра-Блоджетт. Предварительно очищенную кремниевую пластину обрабатывали плавиковой кислотой для достижения гидрофобности, а затем промывали водой, этанолом и н-гексаном. Перенос осуществляли при поверхностном давлении 28 мН/м и скорости движения подложки 5 см/мин. За один цикл погружения подложки осуществлялся перенос двух слоев на подложку. Всего на подложку было перенесено 32 слоя.

2.5 Получение коллапсированных пленок стеариновой кислоты и ее солей в ванне Ленгмюра

Коллапсированные пленки стеариновой кислоты и ее соли получали в ванне Ленгмюра с использованием подвижных барьеров. Для этого ванна заполнялась водной субфазой. Для получения коллапсированных пленок стеариновой кислоты в качестве водной среды использовалась дистиллированная вода. При получении пленок стеарата бария в качестве водной субфазы использовали водный раствор нитрата бария с

концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для образования монослоя на поверхность субфазы (дистиллированная вода или водный раствор нитрата бария) наносили 400 мкл раствора стеариновой кислоты в н-гексане ($C = 10^{-3}$ моль/л) и ожидали испарения н-гексана в течение 2 минут. Затем с помощью подвижных барьеров сжимали пленку стеарата бария или стеариновой кислоты, образовавшуюся на поверхности водной субфазы. Полученные коллапсированные пленки собирали шпателем, затем переносили в микропробирки и сушили в эксикаторе в течение одной недели.

2.6 Измерение угла смачивания

Для определения краевого угла использовали оптический тензиометр Theta Lite. Измерения проводились с частотой 2068 кадров в секунду, значения краевого угла рассчитывались автоматически на основе уравнения Юнга-Лапласа. Для гидрофобизации поверхности подложки чистое предметное стекло кипятили в хлороформе в течение 1,5 часов, затем стеклянную подложку оставляли в растворе хлороформа на 7 дней.

Навеску нитрата бария массой 10 мг растворяли в 10 мл воды, получая раствор с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л. В пробирку вносили 390 мкл воды, добавляли 10 мкл раствора нитрата бария с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л, перемешивали и получали раствор с концентрацией 10^{-4} моль/л. Навеску стеариновой кислоты массой 10 мг растворяли в 40 мл н-гексана, получая раствор с концентрацией 10^{-3} моль/л.

Аликвоту водного раствора нитрата бария ($C = 10^{-4}$ моль/л) объемом 50 мкл наносили на подготовленную гидрофобную пластину. После этого на поверхность водной субфазы наносили 50 мкл раствора стеариновой кислоты в н-гексане ($C = 10^{-3}$ моль/л). Краевой угол смачивания в системе субфаза-подложка-воздух измеряли трижды. В первый раз краевой угол смачивания измеряли перед добавлением капли раствора стеариновой кислоты. Второй раз краевой угол измеряли после добавления раствора стеариновой кислоты в момент испарения н-гексана, в третий раз - через пять секунд после второго измерения.

2.7 Световая микроскопия

Для изучения образования монослоев солей стеариновой кислоты на полусферической поверхности водной субфазы были проведены эксперименты с использованием поляризационного микроскопа Leica DM4500 P (Leica Microsystems, Германия). Навеску нитрата бария массой 10 мг растворяли в 10 мл воды, получая раствор с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Каплю (0,7 мкл) водного раствора нитрата бария

($C = 4 \cdot 10^{-3}$ моль/л) наносили на ячейку МАЛДИ мишени. После этого на поверхность водной субфазы наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °С раствора стеариновой кислоты в н-гексане. Изображения были получены с помощью зеркала под углом 45° при нанесении раствора стеариновой кислоты в н-гексане на каплю водной субфазы и последующем испарении летучего растворителя.

Для исследования морфологии пленок стеаратов бария, получаемых на поверхности ячейки МАЛДИ мишени, был использован стереомикроскоп SMZ 1500 с цифровой камерой Nikon DS-2MBWc (Nikon, Япония) и боковым освещением волоконно-оптическим бифуркационным осветителем C-FID с галогенной лампой 12 В-100 Вт.

Микрофотографии структур, сформированных на ячейках мишени, были получены после промывки ячеек дистиллированной водой. Среднюю интенсивность рассеянного освещения от материала сорбентов на поверхности ячейки мишени определяли на 8-битных (между 0 – 255) в градациях серого микрофотографиях с помощью программы Image J (НИН, США).

2.8 Спектроскопия комбинационного рассеяния

Анализ проводили с использованием спектрометра LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon GmbH, Германия). Спектральный диапазон: 4000-100 см^{-1} . Лазер - Ar^+ , рабочая длина волны: 514 нм. Следующие образцы были проанализированы с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния: коллапсированные пленки стеарата бария, перенесенные на стеклянную подложку; пленки Ленгмюра-Блоджетт стеарата бария на кремниевой подложке; пленки стеарата бария, полученные на капле водной субфазы. Для получения последнего образца 50 мкл водного раствора нитрата бария ($C = 10^{-3}$ моль/л) наносили на чистую стеклянную подложку, а затем на поверхность водной субфазы наносили 50 мкл раствора стеариновой кислоты в н-гексане ($C = 10^{-3}$ моль/л). После полного испарения н-гексана регистрировали спектры с пяти участков сформированных пленок.

2.9 Инфракрасная спектроскопия

Анализ проводили с использованием ИК-спектрометра IRAffinity-1 (Shimadzu, Япония). Спектральный диапазон: 4000-400 см^{-1} . Следующие образцы в форме таблеток с бромидом калия были проанализированы в стандартном режиме пропускания: порошкообразный стеарат бария; порошкообразная стеариновая кислота; коллапсированные пленки стеарата бария. Спектр для пленок стеарата бария, полученных

на капле водной субфазы, был получен в режиме нарушенного полного внутреннего отражения с гидрофобизированной стеклянной подложки, на которой формировался образец.

2.10 Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Структуры на основе стеарата бария исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским спектрометром Oxford X-Max 20 (Oxford Instruments, Великобритания). Из-за однослойной организации коллапсированных пленок исследование проводилось без проводящего покрытия при низких ускоряющих напряжениях (2 кВ), что позволило получить прямое изображение тонких слоев. Регистрация энергодисперсионных рентгеновских спектров проводилась при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе пучка 1 нА с выдержкой 120 секунд.

2.11 Атомно-силовая микроскопия

Снимки методом атомно-силовой микроскопии получали с помощью микроскопа diNanoscope V (VEECO, США), работающего в режиме tapping mode, с использованием зондов HA_NA (NT-MDT, Россия). Структуры на основе стеаратов бария или стеаратов лантана формировали на свежесколотой поверхности высокоориентированного пиролитического графита (НТ-МДТ, Россия). Полученные изображения обрабатывали в программе Nanoscope Analysis 1.2.

2.12 МАЛДИ масс-спектрометрический анализ

Анализ осуществляли с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия) на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ. Спектры регистрировали в диапазоне m/z 200 – 800 в режиме «рефлектрон» с детектированием положительных ионов при следующих настройках масс-спектрометра: напряжения 1 и 2 на источнике равны 20,1 и 18,0 кВ соответственно; напряжение на линзах 7,0 кВ; напряжение на рефлектроне 21,1 кВ; напряжение на рефлектроне 2 10,9 кВ, время задержки импульсной экстракции ионов 120 нс. Для одного спектра суммировалось 30000 актов облучения образца лазером при мощности лазера 90% и частоте облучения 2000 Гц. Регистрацию и интерпретацию масс-спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control 3.4 и Flex Analysis 3.4 (Bruker Daltonics GmbH,

Бремен, Германия). Тандемные масс-спектры получали в режиме LIFT_lowmass; напряжения 1 и 2 на источнике равны 7,5 и 6,8 кВ соответственно; напряжение на линзах 3,5 кВ; напряжения LIFT 1 и 2 равны 19,0 и 4,5 кВ, соответственно; окно селектора иона предшественника – 1 Да, время задержки импульсной экстракции ионов 90 нс.

Калибровку проводили по сигналам монозамещенных солей бария следующих 5 кислот: 2,5-дигидроксibenзойная (m/z 290,924), миристиновая (m/z 365,106), пальмитиновая (m/z 393,137), стеариновая (m/z 421,169), арахидоновая (m/z 441,138).

2.13 Получение монослоев на основе монокарбоксилатов бария на МАЛДИ мишени

Каплю водного раствора ацетата бария с концентрацией 1 мг/мл и объемом 0,6 мкл наносили на мишень (МТР 384 polished steel, Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия). Затем 0,6 мкл раствора смеси насыщенных жирных кислот (лауриновой, тридекановой, миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой и стеариновой), растворенных в н-гексане, с концентрацией 250 нг/мл каждой, аккуратно наносили сверху водной капли таким образом, чтобы наконечник дозатора касался поверхности водного раствора, но не проникал в него. Процедуру наслаивания органической фазы повторяли еще раз. После высыхания на образец наносили 2 мкл 90% водного ацетонитрила и высушивали.

2.14 Оптимизация концентрации матрицы при формировании монослоев на МАЛДИ мишени

Приготовили водный раствор ацетата бария в концентрации 1 мг/мл и водные растворы ДНВ в концентрациях 0,5, 2, и 10 мг/мл. В три микропробирки добавили по 100 мкл раствора ацетата бария (1 мг/мл), затем в одну из микропробирок добавили 100 мкл раствора ДНВ (0,5 мг/мл), во вторую – 100 мкл раствора ДНВ (2 мг/мл), в третью – 100 мкл раствора ДНВ (10 мг/мл). Таким образом, получили 3 водных раствора, содержащих ацетат бария в концентрации 0,5 мг/мл и ДНВ в концентрациях 0,25, 1 и 5 мг/мл. Полученные растворы, содержащие ацетат бария и ДНВ, наносили на 3 ячейки МАЛДИ мишени в объеме 0,6 мкл. Затем н-гексановый экстракт из таллома *Fucus vesiculosus* объемом 0,6 мкл наносили на каплю водной фазы аналогично тому, как описано в п. 2.13. На ячейки со сформированными монослоями наносили 2 мкл 90% водного ацетонитрила, высушивали при комнатной температуре.

2.15 Формирование монослоев монокарбоксилатов бария на МАЛДИ мишени в присутствии органической матрицы

В микропробирку добавили 100 мкл раствора ацетата бария (1 мг/мл), затем в микропробирку добавили 100 мкл раствора ДНВ (0,5 мг/мл). Полученный раствор в объеме 0,6 мкл наносили на ячейку МАЛДИ мишени. Затем образец, растворенный в н-гексане, объемом 0,6 мкл наносили на каплю водной фазы аналогично тому, как описано в п. 2.13. На ячейку со сформированными монослоями наносили 2 мкл 90% водного ацетонитрила, высушивали при комнатной температуре.

2.16 Определение СЖК в экстрактах из биологических образцов различной природы

Семена (20 семян, n=3) и клубеньки (примерно 200 мг, n=3) гороха *Pisum sativum* L были заморожены в жидком азоте и измельчены с помощью вибрационной мельницы Mixer Mill MM 400 с Ø 20 мм шариком из нержавеющей стали (Retsch, Хан, Германия) при частоте вибрации 30 Гц в течение 2 минут. Измельченный материал держали на сухом льду перед экстракцией СЖК. Замороженный размолотый материал массой 65 мг смешивали с 1 мл н-гексана и инкубировали в течение 1 часа при 20 °С при постоянном перемешивании с угловой скоростью 60 об/мин. Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 12045 g, супернатант объемом 0,8 мл переносили в чистые полипропиленовые пробирки для дальнейшего МАЛДИ-МС анализа.

Образец замороженных водорослей *Fucus vesiculosus* (1 г) помещали в сублимационную установку и лиофилизировали при 0,5 мбар в течение 6 часов. Высушенный образец нарезали на частицы размером 1-2 мм. К нарезанному материалу добавляли 10 мл н-гексана и инкубировали в закрытой виае при 20 °С в течение 24 часов при постоянном перемешивании (60 об/мин). Затем супернатант отделяли декантацией и переносили в полипропиленовую пробирку для дальнейшего МАЛДИ-МС анализа.

Образцы дафний (26 мг, n=4) были обсушены на фильтровальной бумаге и помещены в полипропиленовые пробирки. Ткани мидий *Mytilus edulis* (75 мг, n = 4) и икра беломорской сельди *Clupea pallasii marisalbi* (30 мг, n=4) были заморожены в жидком азоте и измельчены пестиком в ступке. К образцам добавили 2 мл дихлорметана, затем инкубировали при перемешивании с угловой скоростью 60 об/мин в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали в течение 5 минут при 12045 g, супернатант объемом 1 мл отбирали в чистую микропробирку, высушивали. Осадок

перерастворили в 2 мл н-гексана, полученный раствор использовали для дальнейшего МАЛДИ-МС анализа.

Образцы человеческой фолликулярной жидкости (n=4), человеческой (n=3) и кроличьей (n=4) плазмы крови объемом 200 мкл смешивали с 200 мкл н-гексана, инкубировали при перемешивании на мульти-ротаторе RS-60 (Biosan, Латвия) с угловой скоростью 60 об/мин в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали в течение 30 минут при 12045 g и отбирали органическую фазу в объеме 100 мкл в чистую микропробирку для дальнейшего МАЛДИ-МС анализа.

Полученные экстракты из биологических образцов наносили на мишень в соответствии с п. 2.15 и затем анализировали методом МАЛДИ-МС в соответствии с п. 2.12.

2.17 Определение СЖК методом ГХ-МС в экстрактах водорослей *Fucus vesiculosus*

Fucus vesiculosus нативный, свежзамороженный (1 г) заливали 5 мл смеси этанол/ацетон=1:2 и выдерживали при 20 °С в течение 1 суток. Экстракт отделяли и упаривали в токе азота при 40 °С. Полученный сухой материал растворяли в 2 мл хлороформа, фильтровали раствор через ватный фильтр и упаривали досуха в токе азота при 20 °С. К полученному остатку приливали 1 мл метанола, эфират трифторида бора 0,1 мл и нагревали при 50 °С в течение 5 минут, к реакционной смеси добавляли 5 мл воды и 3 мл смеси дихлорметан/н-гексан=1:5. Смесь встряхивали, отделяли органический экстракт и промывали его водой, после чего упаривали досуха в токе азота при 20 °С. Полученный остаток (около 4 мг) растворяли в 4 мл хлороформа. Разделение компонентов образца и их детектирование проводили с помощью газового хроматографа с масс-селективным детектором Agilent 7890A MSD 5977E (Agilent Technologies, США) в соответствии с условиями проведения ГХ-МС анализа, приведенными в Таблице 1.

Таблица 1 – Условия ГХ-МС анализа

Параметр	Значение
Колонка	HP-5-MS капиллярная колонка (30 м × 0,25 мм ID × 0,25 мкм, Agilent Technologies, США)
Газ-носитель	Гелий
Скорость газа-носителя	1 мл/мин
Температура испарителя	280°C
Температурная программа термостата колонки	25 мин при 105 °С подъем температуры со скоростью 7 град/мин до 280°C 15 мин при 280°C

Параметр	Значение
Объем вводимой пробы	1 мкл
Метод ионизации	Электронная ионизация
Энергия электронов	70 эВ
Диапазон m/z	50 – 550

2.18 Анализ профилей СЖК в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом ртути

Образцы плазмы крови крыс из контрольной (n=7) и опытной (животным вводили ацетат ртути в виде водного раствора перорально в дозе 4 мг/кг в течение 1 месяца) групп (n=7) объемом 200 мкл смешивали с 200 мкл н-гексана, инкубировали при перемешивании на мульти-ротаторе RS-60 (Biosan, Латвия) с угловой скоростью 60 об/мин в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали в течение 30 минут при 12045 g и отбирали органическую фазу в объеме 100 мкл в чистую микропробирку для последующего анализа. Образцы наносили на мишень в соответствии с пунктом 2.15 и затем анализировали методом МАЛДИ-МС в соответствии с пунктом 2.12.

Масс-спектры конвертировали в формат .mzXML с помощью программного обеспечения Flex Analysis 3.4. Затем файлы в формате .mzXML загружали в проект в программном обеспечении Progenesis MALDI 1.2 (Nonlinear Dynamics, Великобритания), где проводили предобработку (удаление шумов и артефактов, выравнивание, разметка сигналов) и статистическую обработку методом дисперсионного анализа (уровень значимости $p < 0,05$) масс-спектрометрических данных при следующих настройках в каждом из разделов: Pre-processing the spectra (Noise Filter – 2; Smooth Factor – 0,005; Segments – 200; Estimation points – 100), Alignment (Search Area – 5; Iterative cycles – 5), Peak Detection (Threshold – 2000; m/z: 350–550), Statistics measurement (Normalized Peak Height m/z 419,16).

2.19 Определение СЖК в составе агробактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021

Для анализа профилей СЖК в агробактериях сотрудниками кафедры биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета были предоставлены экстракты из н-гексановых и водных лизатов клеток бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 (n=4) и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021 (n=4). Каждый экстракт

наносили на три ячейки МАЛДИ мишени в соответствии с п. 2.15. В качестве водной субфазы выступал водный раствор ацетата бария и ДНВ с концентрацией каждого компонента 0,25 мг/мл. С каждой ячейки мишени регистрировали по три масс-спектра в автоматическом режиме с использованием функции AutoXecute (шаблон движения мишени при облучении ячейки лазером – random walk (complete sample); диаметр области, облучаемой лазером – 2 мм) при настройках прибора, указанных в п. 2.12.

Масс-спектры конвертировали в формат .mzXML с помощью программного обеспечения Flex Analysis 3.4. Затем файлы в формате .mzXML загружали в проект в программном обеспечении Progenesis MALDI 1.2, где проводили предобработку (удаление шумов и артефактов, выравнивание, разметка сигналов) и статистическую обработку методом дисперсионного анализа (уровень значимости $p < 0,05$) масс-спектрометрических данных при следующих настройках в каждом из разделов: Pre-processing the spectra (Noise Filter – 4; Background Top Hat filter – 60), Alignment (Search Area – 5; Iterative cycles – 5), Peak Detection (Threshold – 500; m/z: 360–550), Statistics measurement (Normalized Peak Height m/z 393,14; Normalized Peak Height m/z 419,16; Normalized Peak Height m/z 421,17; Total Ion Current). Данные, полученные по результатам нормализации, экспортировали в файлы формата .xlsx и загружали в онлайн-программу MetaboAnalyst 4.0, предназначенную для обработки метаболомных данных [139]. С помощью MetaboAnalyst 4.0 проводили иерархическую кластеризацию и анализ нормализованных данных методом главных компонент.

2.20 Определение полипrenoлов методом МАЛДИ-МС с использованием технологии Ленгмюра

Готовили стоковые растворы смеси полипrenoлов в н-гексане и изопропанол. Для этого 5 мг полипrenoлов *Abies sibirica* L. (90% масс./масс.) растворяли в 1 мл н-гексана или изопропанола. Затем стоковые растворы полипrenoлов *Abies sibirica* L. последовательно разбавляли н-гексаном или изопропанолом соответственно для получения растворов с концентрациями 1 мг/мл, 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 20 нг/мл, 5 нг/мл.

Растворы полипrenoлов в н-гексане наносили на ячейки МАЛДИ мишени в соответствии с п. 2.15, при этом в качестве водной субфазы выступал водный раствор ацетата бария и ДНВ с концентрацией каждого компонента 0,25 мг/мл. При использовании изопропанола в качестве растворителя процедура нанесения образца

отличалась незначительно. После нанесения 0,6 мкл водной субфазы на ячейку МАЛДИ мишени к ней добавляли 0,6 мкл смеси полипrenoлов в изопропанолe. Пятью секундами позже добавляли еще 0,6 мкл смеси полипrenoлов в изопропанолe. После испарения водно-органической смеси на ячейку наносили 2 мкл 90% водного ацетонитрила, высушивали при комнатной температуре.

МАЛДИ-МС анализ полипrenoлов осуществляли в соответствии с п. 2.12, при этом регистрацию масс-спектров осуществляли в диапазоне m/z 700-1700, а для внешней калибровки использовали калибровочную смесь пептидов Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия).

2.21 Экстракция полипrenoлов из сухих листьев гинкго билоба

К 100 мг измельченных листьев гинкго билоба добавляли 300 мкл смеси изопропанол/н-гексан=1/5, перемешивали с помощью перемешивающего устройства воктекс в течение 15-20 секунд. Далее к смоченной смеси приливали 250 мкл н-гексана. Образцы затем инкубировали при перемешивании с использованием мультиротатора RS-60 (Biosan, Латвия) с угловой скоростью 60 об/мин в течение 1 часа при комнатной температуре. По прошествии 1 часа пробы центрифугировали в течение 5 минут при 10000 об/мин, супернатант переносили в новые пробирки, разбавляли н-гексаном в 10 раз и использовали для дальнейшего анализа.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Классическая технология Ленгмюра формирования монослоев для анализа насыщенных СЖК методом МАЛДИ-МС

МАЛДИ-МС анализ СЖК является сложной аналитической задачей при использовании распространенных органических матриц ввиду перекрывания сигналов СЖК и сигналов матричных ионов. Введение в состав молекулы атома бария (получение соли ЖК) позволяет сдвинуть m/z аналита на 137 единиц в область более высоких значений m/z . Кроме того, барий обладает большим ионным радиусом, что определяет выраженный ионный характер связи в его соединениях и имеет характерное изотопное распределение [140], упрощающее идентификацию соединений, имеющих в своем составе этот элемент. Однако в связи с нерастворимостью ЖК в воде, получение бариевых солей затруднено. На примере стеариновой кислоты (HSt) неоднократно было показано, что реакция солеобразования СЖК может практически количественно проходить на границе раздела фаз при нанесении *n*-гексанового раствора HSt на поверхность водной субфазы, содержащей ионы металла. При этом на границе раздела фаз формируется нерастворимый в воде монослой, состоящий из стеаратов металла. Для успешного масс-спектрометрического анализа важно, чтобы на границе раздела фаз образовывались соли, содержащие только один остаток СЖК, иначе при нанесении раствора, содержащего смесь СЖК, интерпретация масс-спектров будет практически невозможна из-за присутствия сигналов смешанных солей. Поэтому важным было определить, сколько остатков СЖК способны связаться с ионом бария при нанесении насыщенного раствора HSt в *n*-гексане на водную подложку, содержащую ионы бария.

Для исследования процессов, протекающих между молекулами HSt и ионами бария, были проведены исследования электрокинетического (ζ -) потенциала монослоев методом потенциала течения в трех модельных системах «электролит/поверхность капилляра»: 1мМ KCl / пленки Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ) HSt (1), 1мМ BaCl₂ / ПЛБ дистеарата бария (2) и 1мМ BaCl₂ / ПЛБ HSt (3). Выбор ζ -потенциала для оценки различий между структурой монослоев обусловлен высокой чувствительностью данного параметра к составу поверхности. Для поверхности твердого тела, состоящей из молекул анионоактивных ПАВ (в данном случае – стеариновая кислота), увеличение рН раствора электролита приводит к увеличению числа диссоциированных молекул ПАВ. Таким образом, с увеличением рН раствора фонового электролита происходит увеличение

отрицательного заряда поверхности твердой фазы, что влечёт за собой изменение ζ -потенциала.

Для исследования были рассмотрены три модельных системы. В первой из них ПЛБ, состоящие из HSt, приводились в контакт с протекающим через капилляр раствором KCl. В данных условиях образования солей ЖК не происходило, и по мере увеличения pH электролита росло число диссоциированных карбоксильных групп на поверхности сформированных пленок, что выражалось в постоянном увеличении отрицательного значения ζ -потенциала (Рисунок 8, ромбы). В случае, когда через капилляр с нанесенными монослоями дистеарата бария, пропускали раствор BaCl₂, при pH > 5 на графике зависимости $\zeta=f(\text{pH})$ наблюдалось плато, что свидетельствует об отсутствии изменений в количестве диссоциированных групп (Рисунок 8, треугольники). Таким образом, поверхность, образованная молекулами дистеарата бария, была устойчива и практически не меняла своего состава в широком диапазоне значений pH электролита. Для третьей системы, когда ПЛБ HSt вступали в соприкосновение с раствором BaCl₂, результат был отличен от полученного для двух других систем (Рисунок 8, квадраты). По сравнению со структурами, образованными дистеаратом бария, значения ζ -потенциала были выше и выход на плато наблюдался при больших значениях pH электролита. Сравнение с монослоями HSt, контактировавшими с KCl, показывает, что хотя характер зависимости ζ от pH является одинаковым, абсолютные значения ζ были меньше для третьей системы, что говорит о взаимодействии части диссоциированных карбоксильных групп с ионами бария. Данные результаты позволяют предположить, что в результате межфазной реакции HSt с ионами бария в водной субфазе может происходить формирование монослоя, состоящего из моностеаратов бария, где вторая валентность занимает или кислотным остатком исходной соли бария, или гидроксильной группой. Соответственно, можно было ожидать, что при воздействии лазерного импульса будет происходить отщепление второго кислотного остатка с образованием иона моностеарата бария, что позволит значительно увеличить выход ионов по сравнению с HSt. Действительно, после нанесения насыщенного раствора HSt в н-гексане на водную субфазу, содержащую ацетат бария в концентрации 10⁻⁴ моль/л (эксперимент проводили в ванной Ленгмюра), сформированный монослой коллапсировали с помощью подвижных барьеров, переносили в микропробирку, растворяли в ацетонитриле и анализировали методом МАЛДИ-МС. В масс-спектре присутствовал сигнал, соответствующий

моностеарату бария, как по значению m/z 421,169, так и по изотопному распределению (Рисунок 9).

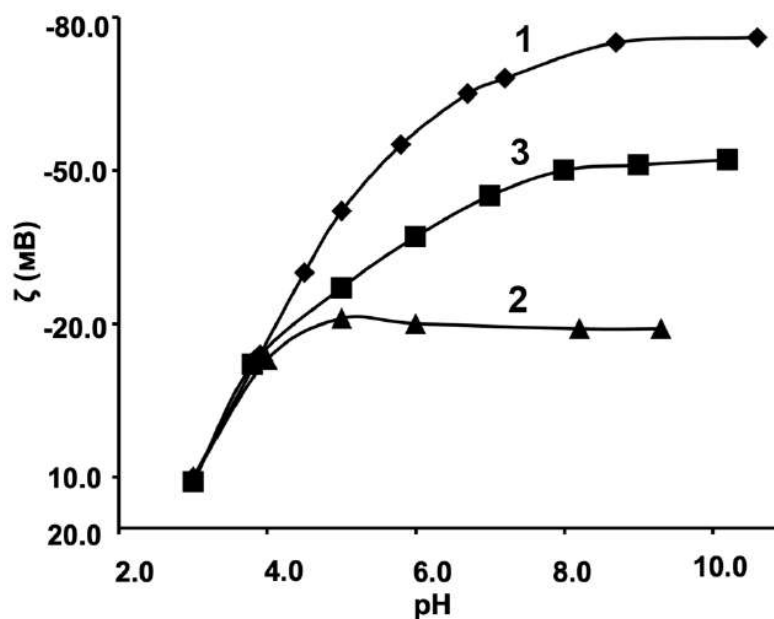


Рисунок 8 – Зависимость ζ -потенциала ПЛБ от pH электролита:

- 1 – ПЛБ HSt в 1мМ растворе KCl;
- 2 – ПЛБ дистеарата бария в 1мМ растворе BaCl₂;
- 3 – ПЛБ HSt в 1мМ растворе BaCl₂

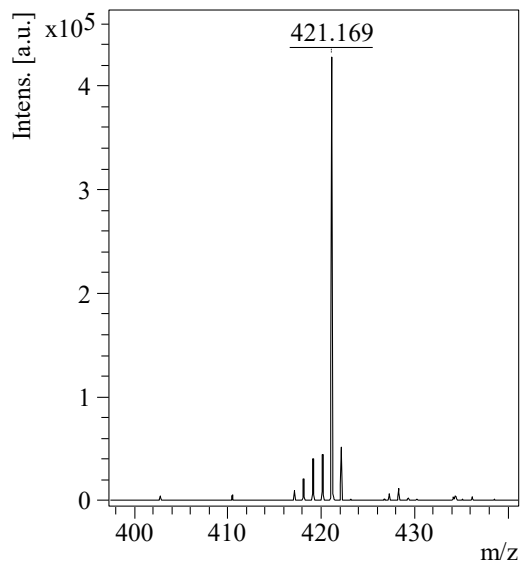


Рисунок 9 – Фрагмент МАЛДИ масс-спектра монослоя, полученного после нанесения насыщенного раствора HSt в н-гексане на поверхность водного раствора ацетата бария и растворения его в ацетонитриле

На следующем этапе было проведено исследование монослоя, состоящего из смеси шести СЖК: лауриновая (C12:0), тридекановая (C13:0), миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты

(Таблица 2). Монослои получали в чашке Петри, заполненной водным раствором ацетата бария ($C=1$ мг/мл) таким образом, чтобы верхний мениск незначительно выступал за пределы краев чашки (Рисунок 10А). Для формирования монослоя на поверхность водной фазы (Рисунок 10Б) наносили раствор смеси стандартов шести СЖК, растворенных в н-гексане (концентрация 25 мкг/мл каждой). Образованный монослой коллапсировали с помощью подвижных барьеров, собирали металлическим шпателем и переносили в микропробирку (Рисунок 10В-Г). Затем монослой растворяли в ацетонитриле с 0,1% ТФУ и анализировали методом МАЛДИ-МС с использованием в качестве МАЛДИ матрицы водного раствора ацетата бария с концентрацией 1 мг/мл.

Таблица 2 – Состав смеси стандартов СЖК

№	Стандарт СЖК	Обозначение	m/z [M-H+Ba] ⁺	Элементный состав
1	Лауриновая кислота	C12:0	337,075	C ₁₂ H ₂₃ O ₂ Ba ⁺
2	Тридекановая кислота	C13:0	351,091	C ₁₃ H ₂₅ O ₂ Ba ⁺
3	Миристиновая кислота	C14:0	365,106	C ₁₄ H ₂₇ O ₂ Ba ⁺
4	Пентадекановая кислота	C15:0	379,122	C ₁₅ H ₂₉ O ₂ Ba ⁺
5	Пальмитиновая кислота	C16:0	393,138	C ₁₆ H ₃₁ O ₂ Ba ⁺
6	Стеариновая кислота	C18:0	421,169	C ₁₈ H ₃₅ O ₂ Ba ⁺

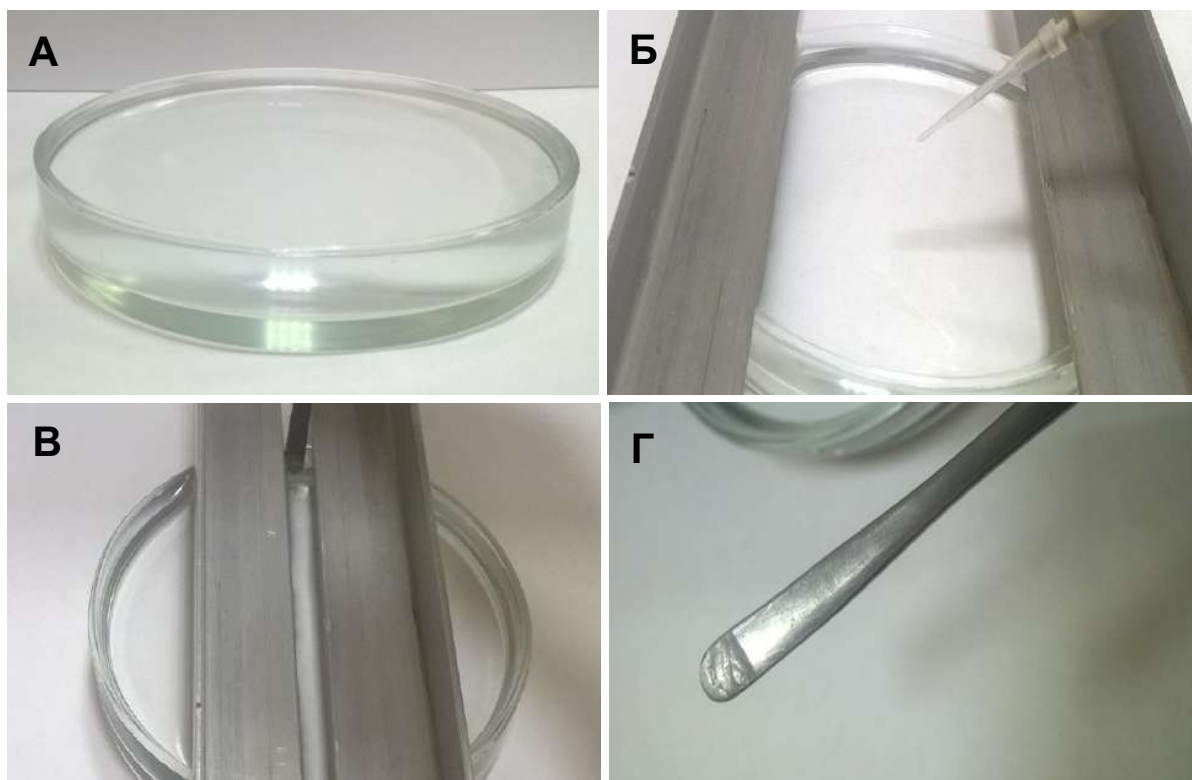


Рисунок 10 – Визуализация процесса формирования монослоев в чашке Петри

В полученном масс-спектре (Рисунок 11) были достоверно зарегистрированы (с интенсивностью, достаточной для того, чтобы зафиксировать характерное изотопное распределение) только 4 сигнала, соответствующих монокарбоксилатам бария (миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой и стеариновой кислот). Кроме того, наблюдались еще два сигнала с интенсивностью, недостаточной для распознавания изотопного распределения, но совпадающие с ожидаемым m/z , которые были отнесены к бариевым солям лауриновой и тридекановой кислот. Полученный результат можно объяснить тем, что процесс формирования монослоев имеет определенные ограничения, связанные с длиной и степенью насыщения углеводородной цепи. По всей видимости, для воспроизводимого образования твердых монослоев, которые могут быть сколлапсированы на поверхности водной фазы, необходимо наличие в молекуле СЖК насыщенного углеводородного «хвоста», содержащего не менее 14 атомов углерода. Ненасыщенные и насыщенные СЖК, содержащие меньшее количество атомов углерода, практически не обладают способностью к формированию твердых монослоев, в то время как жидкий монослой собрать с поверхности водной фазы не представляется возможным [141].

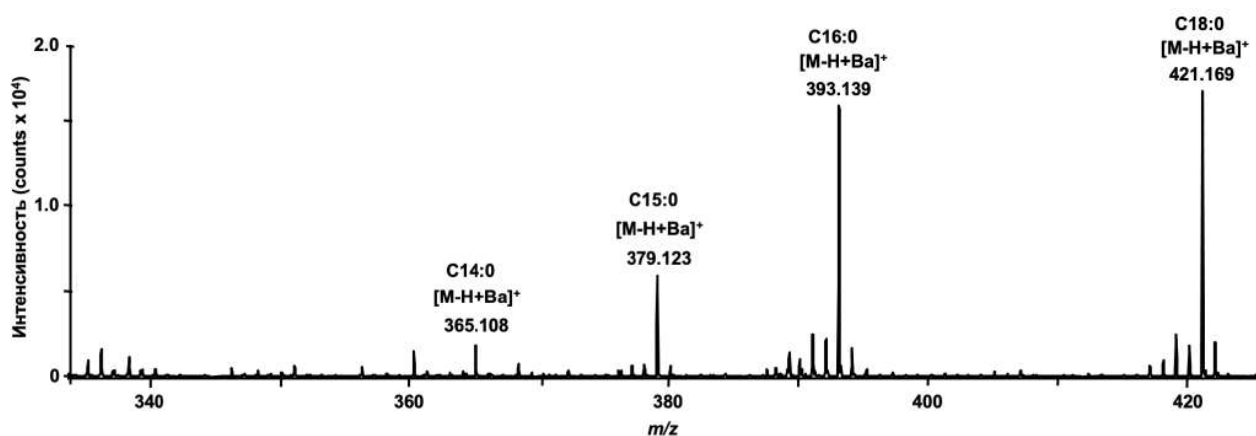


Рисунок 11 – МАЛДИ масс-спектр смеси стандартов СЖК при формировании монослоев в чашке Петри

В связи с этим, был сделан вывод, что классическую технологию Ленгмюра необходимо адаптировать к полусферической поверхности водной субфазы (капле), так как формирование монослоев карбоксилатов бария непосредственно на ячейке МАЛДИ мишени может позволить не только исключить потери аналитов, неспособных образовывать твердый монослой, но и значительно снизить количество образца, требуемого для анализа.

3.2 Самоорганизация бариевой соли стеариновой кислоты на полусферической поверхности водной субфазы

Для изучения состава и морфологии структуры, которая может образовываться при нанесении раствора СЖК в н-гексане на полусферическую поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария, в качестве модельного объекта была выбрана структура, сформированная на ячейке МАЛДИ мишени при нанесении насыщенного раствора HSt в н-гексане на поверхность капли водного раствора нитрата бария ($C=10^{-2}$ моль/л). Следует отметить, что концентрация соли была увеличена по сравнению с используемой при классическом формировании монослоев Легнмюра ($C=10^{-4}$ моль/л) в связи с изменившимся соотношением объемов водной субфазы и н-гексанового раствора HSt. Эта же концентрация была использована и при дальнейших исследованиях. Ожидалось, что на выпуклой поверхности так же, как и на горизонтальной будет происходить самоорганизация молекул стеарата бария. При этом пленка при формировании на поверхности капли будет передвигаться вниз под воздействием силы тяжести, что приведет к образованию сначала конденсированной, а затем и коллапсированной структуры на ячейке мишени за пределами водной субфазы.

Для получения информации о состоянии капли при нанесении на нее раствора HSt в н-гексане были измерены углы смачивания капли на различных стадиях эксперимента. Методом оптической тензиометрии был исследован процесс формирования плёнки на поверхности капли. На Рисунке 12 представлены результаты измерения угла смачивания в системе субфаза-подложка-воздух в момент перед нанесением раствора HSt в н-гексане, в момент нанесения раствора HSt, и спустя пять секунд. При нанесении раствора HSt в н-гексане угол смачивания значительно уменьшался (с 64° (Рисунок 12А) до 31° (Рисунок 12Б)) за счет образования на поверхности пленки ПАВ, что и приводило к снижению поверхностного натяжения, и следовательно угла смачивания. Однако, через 5 сек после нанесения раствора HSt в н-гексане капля принимала первоначальный вид, и значение угла смачивания возвращалось к исходному значению (Рисунок 12В). На основании этого можно сделать вывод о том, что образовавшаяся пленка перемещается с поверхности капли на подложку и накапливается за пределами капли водной субфазы. Образование и перемещение плёнки по поверхности водной капли также было зафиксировано при исследовании процесса методом световой микроскопии в отраженном свете (Рисунок 13).

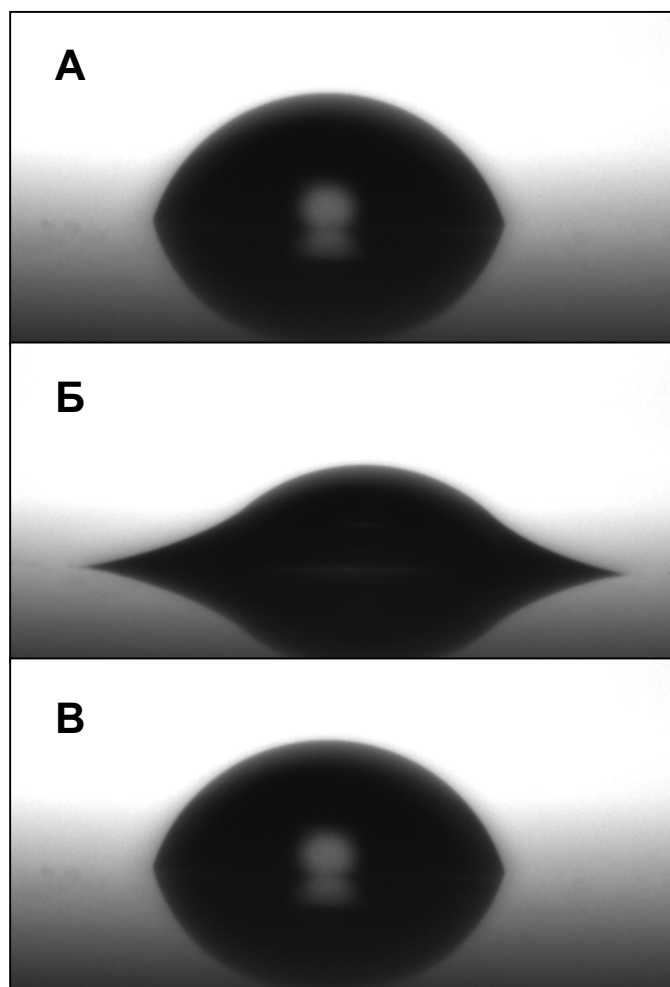


Рисунок 12 – Нанесение раствора HSt в гексане на водную субфазу, содержащую нитрат бария: А – капля перед нанесением раствора HSt в н-гексане; Б – капля сразу после нанесения раствора HSt в н-гексане; В – после испарения н-гексана

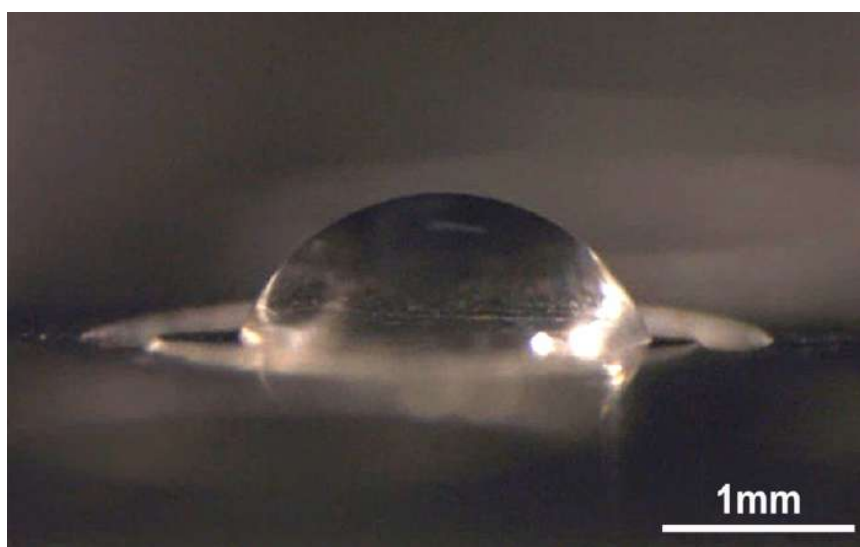


Рисунок 13 – Микрофотография капли водного раствора нитрата бария с пленкой на поверхности, образовавшейся после нанесения раствора HSt в н-гексане

Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света была исследована поверхность ячейки мишени после формирования пленки, удаления капли субфазы и промывки полученной структуры водой для избавления от избытка нитрата бария. Как показано на Рисунке 14, структура образованного на ячейках мишени материала состоит из упорядоченных концентрических кругов яркосветящегося материала, причем их скопление наблюдается по периметру водной капли. Подобное распределение вещества позволяет предположить волнообразный характер формирования пленки вследствие комплекса процессов, связанных с перемещением образовавшейся пленки по поверхности водной субфазы и испарением н-гексана. Промывка материала водой обеспечивает отсутствие исходной соли в полученных структурах, соответственно, можно сделать вывод о том, что наблюдаемые скопления вещества являются продуктом взаимодействия HSt с ионами бария.

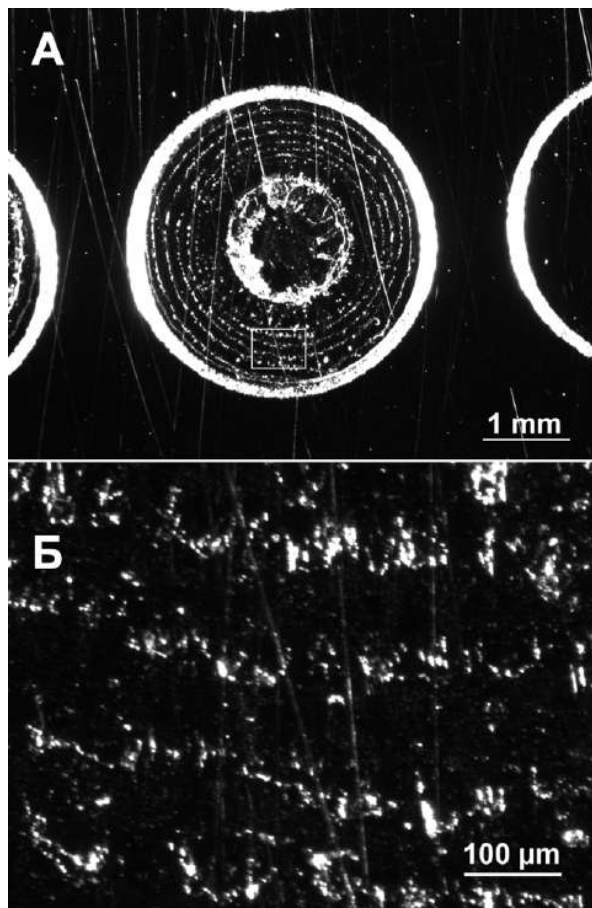


Рисунок 14 – Микрофотография ячейки МАЛДИ мишени, полученная с помощью светового микроскопа после испарения н-гексана. А – Яркие светящиеся концентрические круги коллапсированного материала. Б – Увеличенная область концентрических кругов коллапсированного материала (Указана на Рисунке А прямоугольником). Широкий яркий светящийся круг по периметру области испарения н-гексана – граница ячейки МАЛДИ мишени

Для подтверждения перехода HSt в соль бария было проведено исследование методом инфракрасной (ИК) спектроскопии (Рисунок 15). На Рисунке 15 представлены ИК спектры, полученные для различных объектов: HSt; порошок стеарата бария; монослой стеарата бария, колапсированный в ванне Ленгмюра; пленки, сформированной на капле водного раствора нитрата бария. Спектры первых трех веществ были получены в матрице из бромида калия, а спектр пленки на капле субфазы, в связи крайне малым количеством, был получен методом неполного внутреннего отражения с гидрофобизированной стеклянной подложки, на которой производилось формирование материала. Вследствие этого на спектре с капли видна часть спектра поглощения стеклянной подложки. По этим же причинам интенсивность зафиксированных полос для данного образца является невысокой. Однако положение полос определяется достаточно чётко.

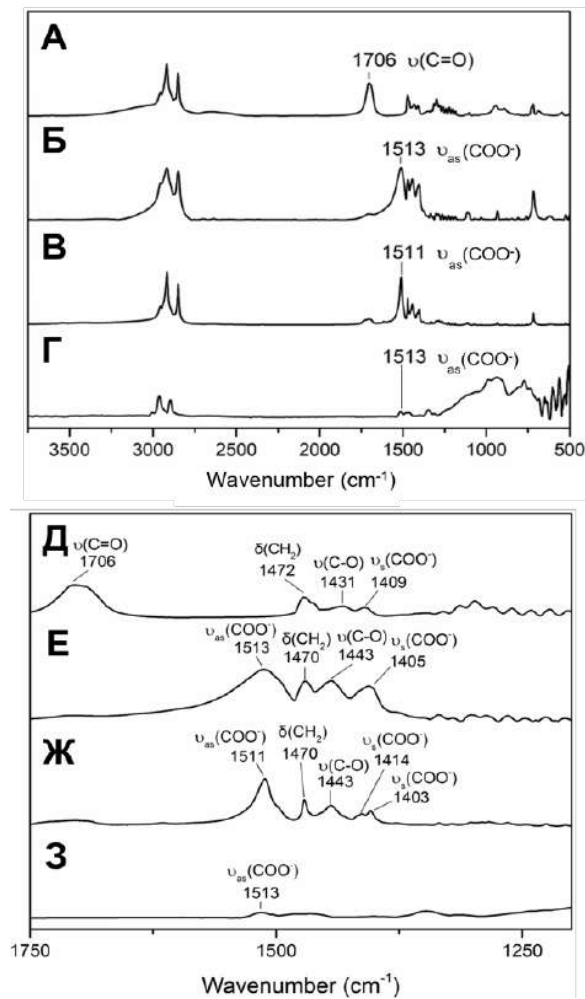


Рисунок 15 – ИК спектры HSt (А), порошка стеарата бария (Б), колапсированного монослоя стеарата бария (В) и плёнки стеарата бария, полученной на капле водной субфазы (Г). Нижняя панель (Д-З) представляет собой увеличенную область 1750-1250 cm^{-1} спектров А-Г

ИК спектры HSt и стеаратов содержали валентные колебания в диапазоне 3000-2800 см^{-1} (ассиметричные) и 1380 см^{-1} (симметричные), которые относятся непосредственно к колебаниям углеводородной цепи. Ножничные колебания групп CH_3 обнаруживались в диапазоне 1470-1450 см^{-1} . Валентные колебания C-C лежали в области 1250-1160 см^{-1} . Веерные деформационные колебания метиленовой группы приводили к появлению слабых полос при 1240 см^{-1} . Расположенные подряд метиленовые группы $(\text{CH}_2)_n$ проявлялись в спектре полосами в районе 720 см^{-1} (маятниковые колебания) и 1350-1180 см^{-1} (веерные или крутильные колебания). Рассматривая колебания -COOH группы, нужно учитывать колебания как C=O, так и C-O и O-H. Валентные колебания COO-H наблюдались в области 3350-2500 см^{-1} . Валентные колебания C=O в случае HSt характеризовались интенсивной полосой в области 1720-1700 см^{-1} . В свою очередь валентные колебания связи C-O наблюдались в диапазоне 1440-1395 см^{-1} , в этом же диапазоне находились и полосы, соответствующие деформационным колебаниям связи O-H. Кроме того, в спектрах наблюдался дублет в области 1320-1211 см^{-1} , который возникает ввиду наличия деформационных колебаний O-H и C-O. Деформационные внеплоскостные колебания связи O-H находились в диапазоне 940-925 см^{-1} .

Следует отметить, что в спектрах синтезированного стеарата бария, колапсированного монослоя стеарата бария и плёнки, полученной на капле водного раствора нитрата бария, отсутствовала или практически отсутствовала полоса поглощения C=O неионизированной карбоксильной группы в области 1700 см^{-1} , в отличие от свободной HSt. Однако во всех спектрах, кроме спектра HSt, присутствовала полоса в области 1513 см^{-1} , которая характерна для асимметричных колебаний ионизированной группы COO^- [142,143].

Таким образом, можно сделать вывод о практически полном переходе HSt в бариевую соль во всех трёх случаях. Наличие бария в составе пленки, сформированной на капле и промытой водой, было подтверждено методом локальной энергодисперсионной рентгеновской (EDX) спектроскопии (Рисунок 16). Алюминий, кремний и железо присутствуют в составе металлической мишени. Линии бария, кислорода и углерода относятся к колапсированному стеарату бария.

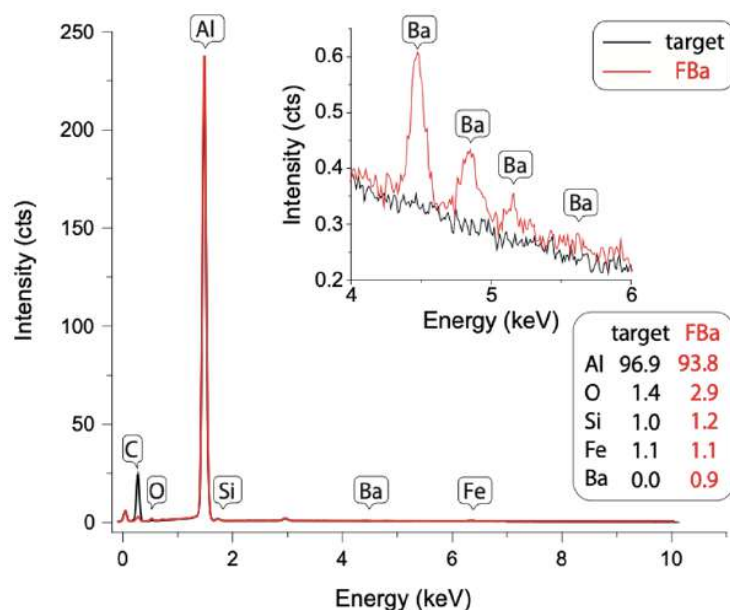


Рисунок 16 – EDX-спектры пустой ячейки МАЛДИ мишени (черный) и коллапсированных слоев стеарата бария, сформированных на поверхности ячейки МАЛДИ мишени (красный). На вставке представлена область спектров, содержащая характерные линии бария

Для исследования структурного звена пленки был проведен МАЛДИ-МС анализ полученных структур (Рисунок 17). При идентификации учитывались три параметра: точная масса, наличие характерного изотопного распределения и результаты МС/МС анализа. В масс-спектре был надежно обнаружен сигнал с m/z 421,169, соответствующий положительно заряженному иону моностеарата бария $[M-H+Ba]^+$ (Рисунок 17А) и имеющий характерное для соединения, содержащего этот металл, изотопное распределение (Рисунок 17Б). При этом сигналов, которые можно было бы интерпретировать, как принадлежащие депротонированной форме $[M-H]^-$ HSt ($m/z_{расч}$ 283,263) или протонированному дистеарату бария ($m/z_{расч}$ 705,440), обнаружено не было. В МС/МС спектре присутствовал сигнал $BaOH^+$, а также сигналы, соответствующие характерным отщеплениям H_2O и CO_2 (Рисунок 17В). В МС/МС спектре также наблюдалась серия сигналов, относящихся к разрывам σ -связей C-C в углеводородной цепи, характеризующаяся инкрементом m/z 14, соответствующего метиленовым группам (сигналы b – m на Рисунке 17В). Интенсивный сигнал m/z 195,949 соответствовал катион-радикалу $^+CH_2CO_2Ba^+$. Результаты МАЛДИ-МС анализа позволяют утверждать, что основным структурным звеном пленок, сформированных на твердой подложке путем нанесения насыщенного раствора HSt в н-гексане на полусферическую поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария, является моностеарат бария.

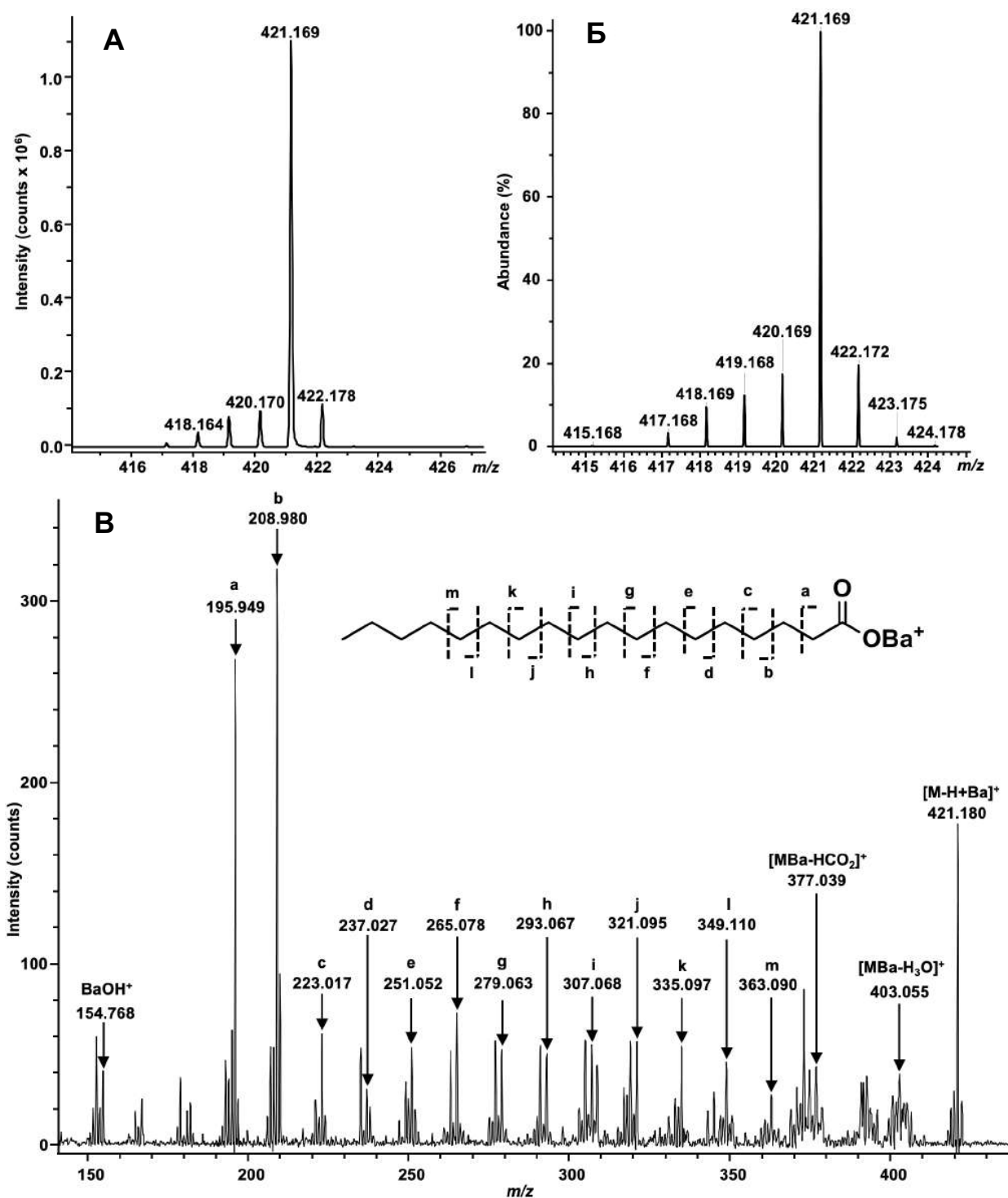


Рисунок 17 – Результаты МАЛДИ-МС анализа пленки, сформированной на капле субфазы, содержащей ионы бария: А – сигнал иона моностеарата бария в МАЛДИ масс-спектре пленки; Б – рассчитанный масс-спектр моностеарата бария; В – МС/МС спектр моностеарата бария

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) были проанализированы коллапсированные монослои стеарата бария, полученные в ванне Ленгмюра, плёнки стеарата бария, нанесённые на подложку по классической технологии

Ленгмюра-Блоджетт, и пленка стеарата бария, сформированная на твердой подложке в результате нанесения раствора HSt в н-гексане на водную каплю, содержащую ионы бария. Спектры КР, представленные на Рисунке 18, практически идентичны для трех рассмотренных структур вне зависимости от способа получения материала. На основании этого можно сделать вывод, что на капле формируется структура, подобная классическим ПЛБ, образующимся при многократном наслаивании одного монослоя на другой, или при коллапсировании одного монослоя. Таким образом, пленка, образующаяся на поверхности капли водной субфазы, является монослоем стеарата бария, который при передвижении на подложку коллапсируется, образуя мультиструктуру.

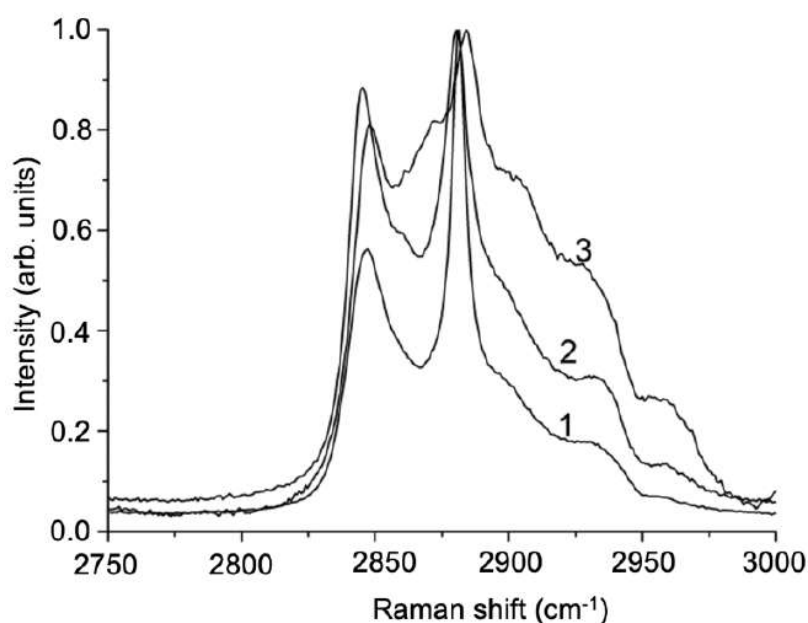


Рисунок 18 – Спектры КР, полученные при исследовании:

- 1- классические ПЛБ стеарата бария на кремниевой подложке;
- 2 – монослой стеарата бария, коллапсированный в ванне Ленгмюра;
- 3 – структура, сформированная у периметра водной капли, после испарения н-гексана

Дополнительно исследовали процесс образования пленки стеарата бария в режиме реального времени сразу после нанесения раствора HSt в н-гексане на каплю водной субфазы и испарения н-гексана. Для этого спектры КР (Рисунок 19А) регистрировали с разных частей пленки и водной капли (Рисунок 19Б). Полученные результаты хорошо согласуются с данными из работы [144], представленными на Рисунке 19В, где продемонстрировано изменение вида спектров КР для ПЛБ стеарата бария различной толщины, то есть с разным числом перенесенных монослоев. Одинаковое пространственное расположение метиленовых ($-\text{CH}_2-$) групп сопровождается наличием двух интенсивных линий на 2850 см^{-1} и 2880 см^{-1} , которые относятся к $\nu_{\text{S}}(\text{CH}_2)$ и $\nu_{\text{A}}(\text{CH}_2)$

колебаниям, соответственно. Harrand и соавторы отмечают, что при уменьшении толщины мультиструктур наблюдается снижение интенсивности пиков 2850 см^{-1} и 2880 см^{-1} , затем детализация правого плеча с последующим образованием плато (Рисунок 19В). В наиболее тонких плёнках наблюдается пик при 2920 см^{-1} . Изменение вида спектра связано с изменением пространственной конфигурации углеводородной цепи и соответственно регулярности структур. В нашем случае спектры, полученные с области за пределами периметра капли, соответствуют спектрам ПЛБ толщиной не менее 20 нм , что позволяет сделать вывод о том, что в данной области образуется структура, содержащая как минимум 8 монослоев. В то время как спектры, характерные для одного монослоя, были получены с поверхности капли водной субфазы. Неоднородное распределение плёнки, полученной на поверхности капли, происходит за счёт самопроизвольного коллапсирования, которое возникает из-за особенностей геометрии субфазы (геометрия полусферы). Соответственно, полученные результаты свидетельствуют об образовании мультиструктур уже за пределами капли из монослоя, сформированного на ней.

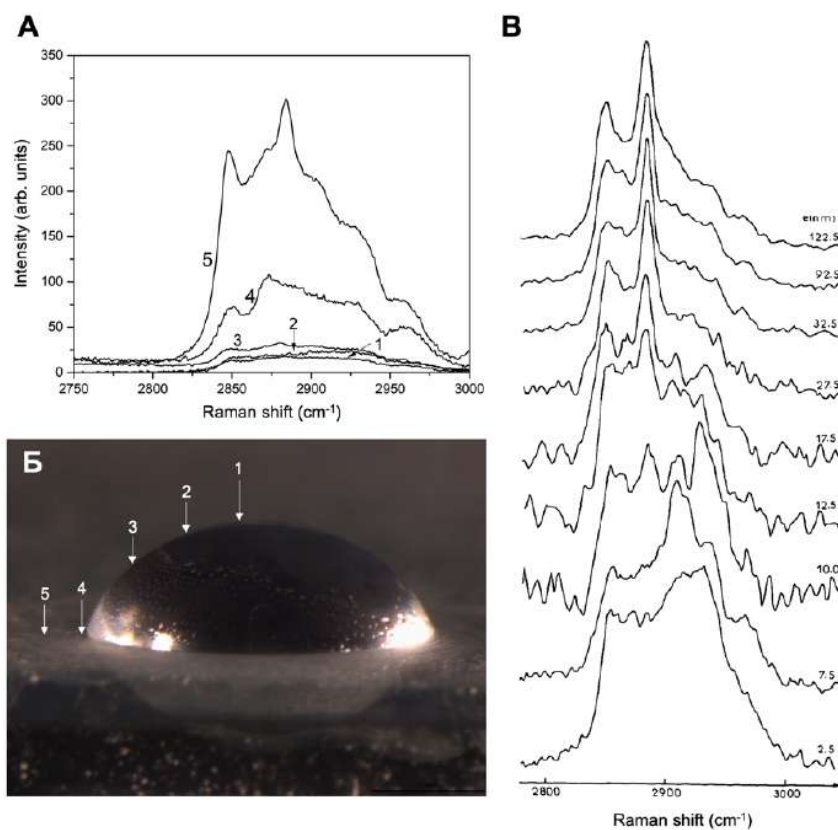


Рисунок 19 – Спектры КР, полученные с пяти разных участков образца при формировании пленки стеарата бария на поверхности водной субфазы (А); изображение образца после формирования пленки стеарата бария на поверхности водной субфазы (Б); спектры КР ПЛБ стеарата бария разной толщины по данным работы [144] (В)

Исследование морфологии сформированных на капле пленок методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) представило более детальную картину формирования упорядоченных концентрических кругов стеарата бария (Рисунок 20А). По всей видимости, процесс самопроизвольного коллапсирования не ограничивается пространством близким к периметру водной капли, а распространяется на всю область растекания н-гексана. Неравномерная яркость затемненных участков на изображениях свидетельствует о различном количестве монослоев, образующих мультиструктуру.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) была исследована морфология пленок стеарата бария, сформированных на графитовой подложке, в области близкой к границе испарения н-гексана (Рисунок 20Б,В). Образец характеризуется развитой поверхностью с формированием структур различных масштабов. Наиболее крупным структурным элементом поверхности является волнообразный рельеф с перепадом высот 300-500 нм и периодом около 10 мкм, сформированный в результате макроскопического коллапса пленки. Тонкая структура пленок представлена зернистой структурой с размером агрегатов 300-500 нм в плоскости изображения и высотой до 150 нм (Рисунок 20В).

Следует отметить, что эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом СЭМ. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что процесс самопроизвольного коллапсирования, начинающийся у периметра водной капли, затем распространяется на всю область растекания н-гексана. Причем наибольшая высота агрегатов отмечается ближе к границе испарения неполярного растворителя. Это может быть связано, как с постоянным передвижением сформированной пленки по мишени за счет непрерывного образования монослоя на свободной поверхности водной капли, так и с неравномерным осцилляторным испарением н-гексана.

Таким образом, по результатам исследований структуры, образующейся на поверхности ячейки МАЛДИ мишени при нанесении раствора HSt в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы бария, с помощью ряда спектроскопических и микроскопических методов анализа можно сделать вывод о том, что механизмом образования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений, полученных на поверхности МАЛДИ мишени, является самопроизвольное перемещение монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку

под действием силы тяжести, где происходит образование мультимолекулярных структур, аналогичных коллапсированным монослоям.

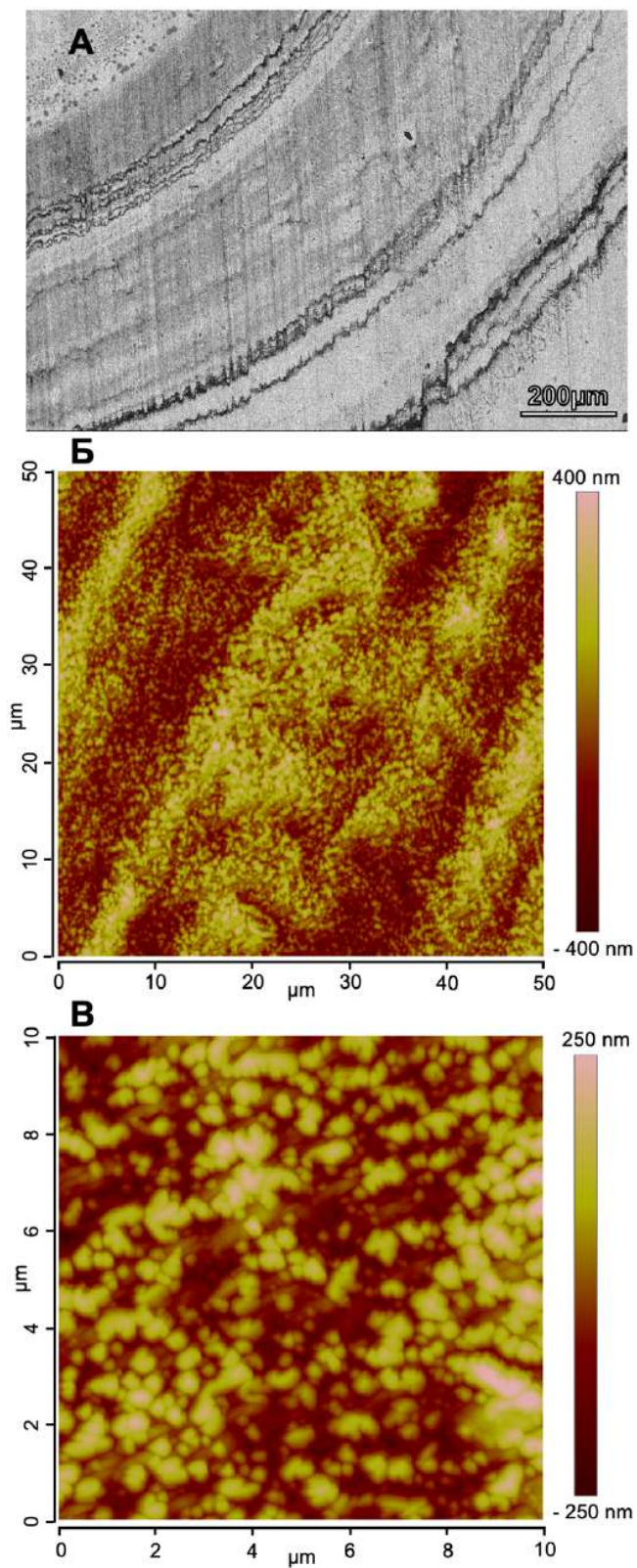


Рисунок 20 – СЭМ изображение пленок стеарата бария, сформированных на МАЛДИ мишени (А); АСМ изображения пленок стеарата бария, сформированных на графитовой подложке (50x50 мкм, Б; 10x10 мкм, В)

3.3 Анализ СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени

Исследование самоорганизации молекул стеарата бария на полусферической поверхности водной субфазы при формировании пленок на МАЛДИ мишени показало, что на границе раздела фаз достигается практически количественная диссоциация СЖК с переходом кислоты в соль. Соответственно, было сделано предположение, что нанесение на водную фазу смеси СЖК, растворенной в н-гексане, приведет к образованию монослоя Ленгмюра, состоящего из солей всех СЖК, входящих в состав смеси. Для проведения эксперимента использовали набор тех же шести СЖК, для которых монослои получали в чашке Петри: лауриновая (C12:0), тридекановая (C13:0), миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты. В качестве подложки была выбрана мишень из нержавеющей стали с полированной поверхностью (MTP 384 target plate polished steel BC, Bruker Daltonics), имеющая относительно гидрофобную поверхность, которая позволяет водным растворам образовывать каплю (Рисунок 21А). В связи с ограниченностью поверхности водной фазы, концентрацию СЖК в исследуемой смеси снизили в 100 раз по сравнению с экспериментом по получению монослоев в чашке Петри (до 250 нг/мл каждой кислоты). Оптимальное формирование монослоя наблюдалось в случае, когда на каплю водного раствора ацетата бария (C=1 мг/мл) объемом 0,5 – 0,75 мкл наносили образец в органической фазе такого же объема (Рисунок 21Б). При таком соотношении н-гексан, стекая с поверхности водной капли (Рисунок 21В), не распространялся за границы области, предназначенной для нанесения образца. После испарения органической фазы, на поверхности мишени образовывалась тонкая пленка, представляющая собой монослой (Рисунок 21Г). Кроме того, часть монослоя оставалась на кристаллах соли после высыхания водной субфазы, что, однако не приводило к ухудшению качества спектра. Нанесение органической фазы в объемах больших 0,75 мкл приводило к растеканию образца за границы ячейки для его нанесения. В тоже время, использование объемов органической фазы меньших 0,5 мкл вело к недостаточному распределению н-гексанового раствора по поверхности водной капли, что в свою очередь негативно сказывалось на формировании монослоев. Оптимальным объемом, который необходимо наносить на мишень, было выбрано значение 0,6 мкл.

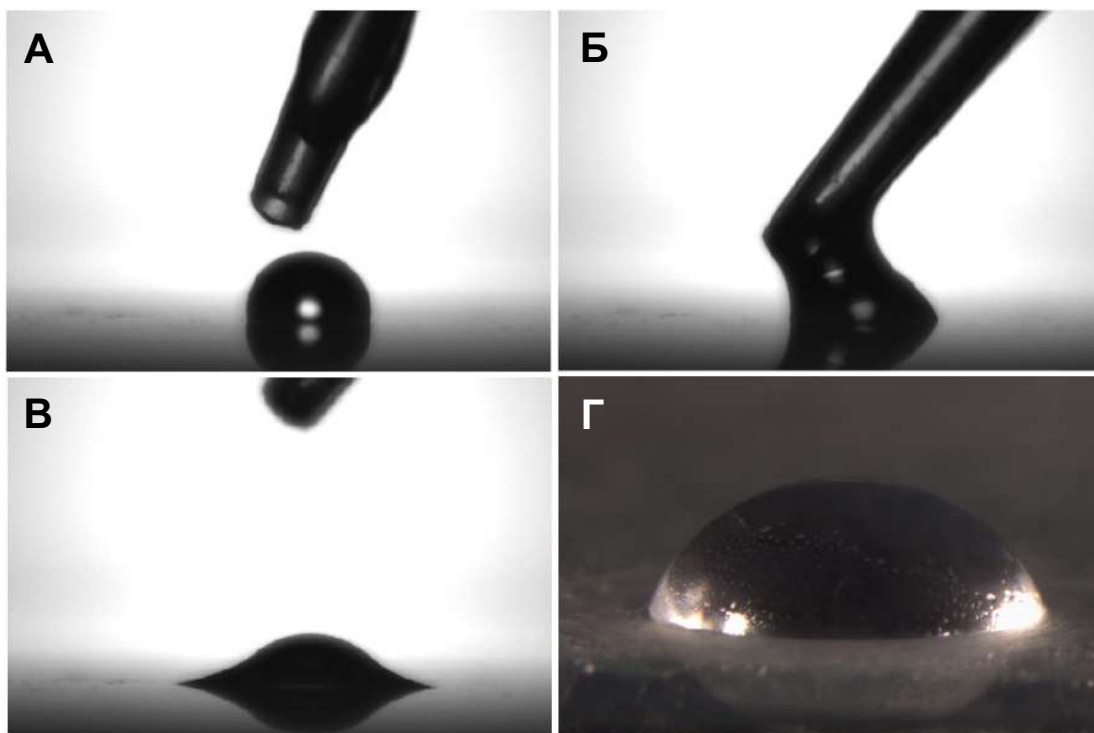


Рисунок 21 – Визуализация процесса формирования монослоев на МАЛДИ мишени

МАЛДИ-МС анализ полученных монослоев показал, что при таких условиях нанесения образца в масс-спектре регистрируются сигналы, соответствующие бариевым солям всех шести СЖК (Рисунок 22). Несмотря на значительное снижение концентрации СЖК, монокарбоксилаты бария были идентифицированы, как по значению m/z , так и по характерному изотопному распределению.

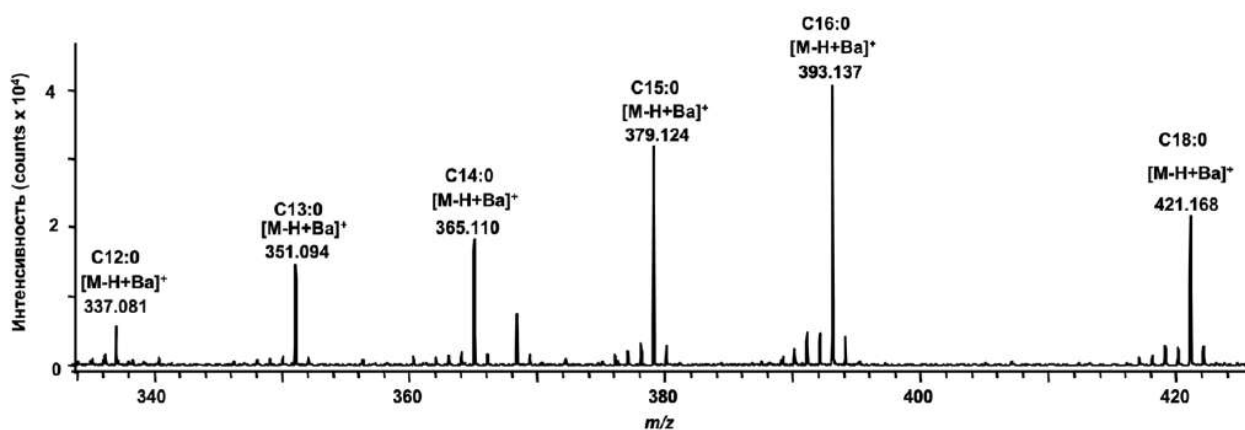


Рисунок 22 – МАЛДИ масс-спектр смеси стандартов СЖК при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени

Таким образом, процедура формирования монослоев с использованием технологии Ленгмюра была успешно адаптирована к полусферической поверхности водной субфазы (капле водного раствора соли бария, нанесенной на поверхность МАЛДИ мишени), что

позволило формировать мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев монокарбоксилатов бария в пределах ячейки МАЛДИ мишени и тем самым значительно снизило требования к количеству образца и сократило время, необходимое для пробоподготовки.

3.3.1 Определение оптимальной концентрации матрицы для осуществления эффективного МАЛДИ-МС анализа

Для апробирования предложенного подхода к анализу СЖК в качестве объекта исследования был выбран *n*-гексановый экстракт из бурых водорослей фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus*). Однако даже при условии разрушения образовавшегося монослоя с помощью 90% водного ацетонитрила с 0,1% ТФУ, ионизация проходила в достаточно жестких условиях. Для перехода солей СЖК в газообразное состояние и отщепления остатка исходной соли бария требовалось воздействие лазера высокой мощности. Так при ионизации с кристаллов ацетата бария мощность лазера составляла 85-90% от максимальной, в то время как анализ с поверхности монослоя требовал 90-95% мощности. Нами была выдвинута гипотеза о том, что добавление в водную фазу матрицы ДНВ позволит провести масс-спектрометрический анализ в более мягких условиях. Данное предположение основывается на возможности распределения ДНВ по поверхности монослоев после обработки их ацетонитрилом или включения ДНВ в состав монослоев в качестве второго аниона. Масс-спектрометрический анализ полученных монослоев проводили с постепенным увеличением мощности лазера, начиная с 30%. В случае с наибольшей концентрацией ДНВ (5 мг/мл) масс-спектр был получен при мощности лазера 45-50% от максимальной, но при этом сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария обнаружено не было (Рисунок 23А), и в масс-спектре присутствовали исключительно сигналы продуктов взаимодействия матрицы с ионами бария (m/z 410,073; m/z 426,973; m/z 444,998; m/z 466,971). При добавлении ДНВ в концентрации 1 мг/мл, в масс-спектре обнаруживались сигналы как монокарбоксилатов, так и аддуктов ДНВ с барием, при этом мощность лазера составляла 53-58% от максимальной (Рисунок 23Б). Дальнейшее уменьшение концентрации ДНВ до 0,25 мг/мл потребовало дополнительного повышения энергии лазера (ионизация проходила при 65-75% от максимальной мощности лазера), но при этом в масс-спектре детектировались сигналы, соответствующие исключительно монокарбоксилатам бария (Рисунок 23В). Таким образом, было показано, что добавление ДНВ в незначительной концентрации (не

превышающей 5% от используемой в рутинных МАЛДИ-МС экспериментах) в водную фазу перед формированием монослоя позволяет проводить МАЛДИ-МС анализ при мощности лазерного излучения, меньшей примерно на 20-25%, чем при использовании в качестве матрицы только ацетата бария.

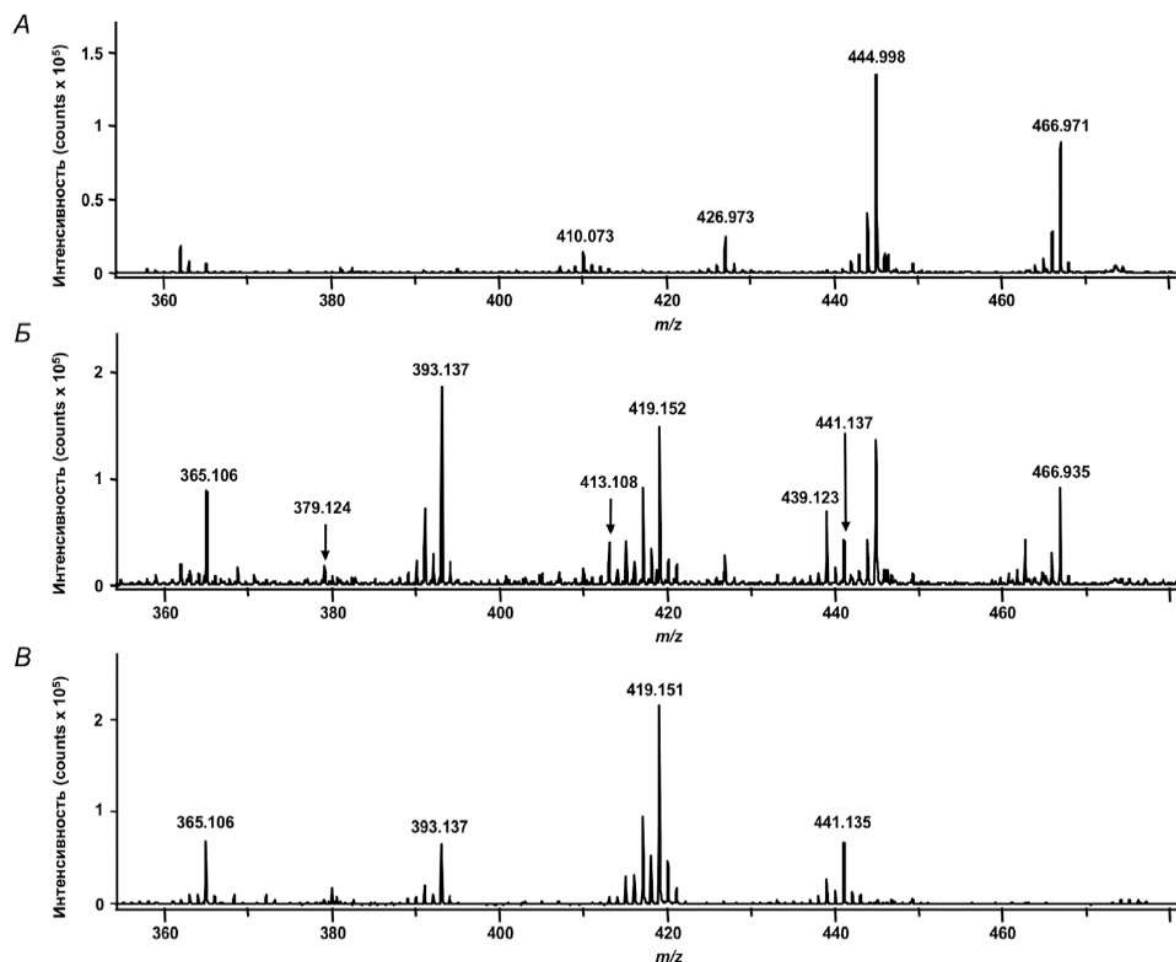


Рисунок 23 – МАЛДИ масс-спектры экстракта из *F. vesiculosus*, полученные при добавлении в водный раствор ацетата бария ДНВ в концентрации 5 (А), 1 (Б), или 0,25 (В) мг/мл

Таким образом, анионы дигидроксибензоата могут быть встроены в структуру монослоя или могут быть распределены по его поверхности.

3.3.2 Определение чувствительности и параметров линейности методики анализа СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени

На следующем этапе исследования нами были проведены эксперименты по определению чувствительности и параметров линейности предложенного подхода. В качестве модельного объекта нами был выбран раствор смеси пяти стандартов СЖК в н-

гексане: лауриновая, тридекановая, миристиновая, пентадекановая и пальмитиновая. Были приготовлены растворы стандартов СЖК, смешаны в различных пропорциях и затем трижды последовательно разбавлены н-гексаном в 10 раз. Пальмитиновая кислота была использована в качестве аналита, относительно которого были нормированы концентрации других СЖК. Нормирование интенсивностей сигналов проводили по значению интенсивности пика, соответствующего монопальмитату бария (m/z 393,14). Детали приготовления растворов, построения графиков и расчёта точности приведены в Приложении Б, а результаты исследования – в Таблице 3.

Таблица 3 – Чувствительность и параметры линейности МАЛДИ-МС метода для анализа СЖК

Обозначение	m/z [M-H+Ba] ⁺	LOD, пмоль	LOQ, пмоль	LDR	Угловой коэффициент	Точка пересечения с осью ординат	R ²	Точность
C12:0	337,075	0,05	0,50	1 x 10 ⁴	1,60E-02	4,80E-02	0,95	99,6
C13:0	351,091	0,05	0,47	1 x 10 ⁴	2,20E-02	6,54E-02	0,98	99,7
C14:0	365,106	0,01	0,04	1 x 10 ⁴	9,41E-02	2,60E-01	0,99	101,7
C15:0	379,122	0,01	0,04	1 x 10 ⁴	1,15E-01	3,35E-01	0,99	100,6
C16:0	393,138	0,01	0,09	-	-	-	-	-

Полученные значения пределов обнаружения (LOD) составили от 10 (миристиновая, пентадекановая и пальмитиновая кислоты) до 50 фмоль (лауриновая и тридекановая кислоты), в то время как пределы количественного определения (LOQ) не превышали 500 фмоль. Линейный динамический диапазон (LDR) для компонентов смеси СЖК определяли в соответствии с графиками нормированных интенсивностей сигналов аналитов от отношений концентраций, отложенных в логарифмическом масштабе (Рисунки Б.1-Б.4). Для всех исследованных аналитов LDR составил четыре порядка (Таблица 3). Важно заметить, что полученные значения LDR (10⁴) не противоречат тому, что LDR использованного в работе масс-спектрометра составляет только 10², так как они обусловлены выбранной стратегией нормализации, при которой концентрации аналитов, нормированные на значение концентрации пальмитиновой кислоты, охватывали диапазон в 4 порядка. В тоже время значения коэффициента детерминации (R²) были не ниже 0,95, а точность находилась в диапазоне от 99,6 до 101,7 % (Таблица 3).

Анализ данных, полученных после обработки масс-спектров, зарегистрированных при анализе серии разбавлений смеси стандартов СЖК, показал, что чувствительность метода значительно превышает значения, полученные в ряде других работ с

использованием МАЛДИ-МС [85, 145], но при этом уступает по данному параметру подходу предложенному Ling и соавторами [83]. Значения LOD, полученные с помощью предложенного подхода, хорошо соотносятся с данными по чувствительности методов, основанных на использовании ВЭЖХ-МС [69,146]. Аналогично, полученные нами значения LOQ были на два порядка меньше, чем в опубликованных ранее работах по определению СЖК с помощью МАЛДИ-МС и ГХ-МС, и сопоставимы с теми, что были получены при анализе с помощью ВЭЖХ-МС/МС [145-147]. Нормализация интенсивности сигналов аналитов к интенсивности сигнала СЖК, присутствовавшей во всех образцах (пальмитиновая кислота), с последующим логарифмированием полученных отношений привела к неожиданно широкому LDR величиной в четыре порядка (Таблица 3). Между тем, полученные нами значения LDR были как минимум на один порядок больше, чем в ранее опубликованных работах, в которых использовались МАЛДИ-МС [81] и ВЭЖХ-МС методы [148]. Таким образом, с точки зрения линейности предложенный подход может быть сравним, например с ГХ-МС процедурой, описанной в работе Kloos и соавторов [149].

3.3.3 Исследование влияния изотопного распределения бария на проведение полуколичественной оценки содержания СЖК в образце

Выше было упомянуто о том, что изотопное распределение бария может значительно упростить качественное определение и идентификацию соединений, в состав которых входит этот элемент. Однако в случае присутствия в образце семейств СЖК, отличающихся по значению m/z на 2–4 единицы, интерпретация масс-спектров и возможность проведения количественной оценки усложняется. Такой случай продемонстрирован на Рисунке 24. При наложении масс-спектров моностеарата бария (C18:0) и моноолеата бария (C18:1) (Рисунок 24А-В) можно отметить наличие незначительного (около 5%) перекрытия сигналов третьего по интенсивности изотопмера насыщенной кислоты и моноизотопного сигнала соответствующей мононенасыщенной кислоты. Однако, анализ масс-спектрометрических данных, полученных для смеси стеариновой и олеиновой кислот с известным их содержанием, показал, что отношения интенсивностей моноизотопных пиков в достаточной степени соответствуют отношению количеств соответствующих СЖК в образце (Рисунок 24Г).

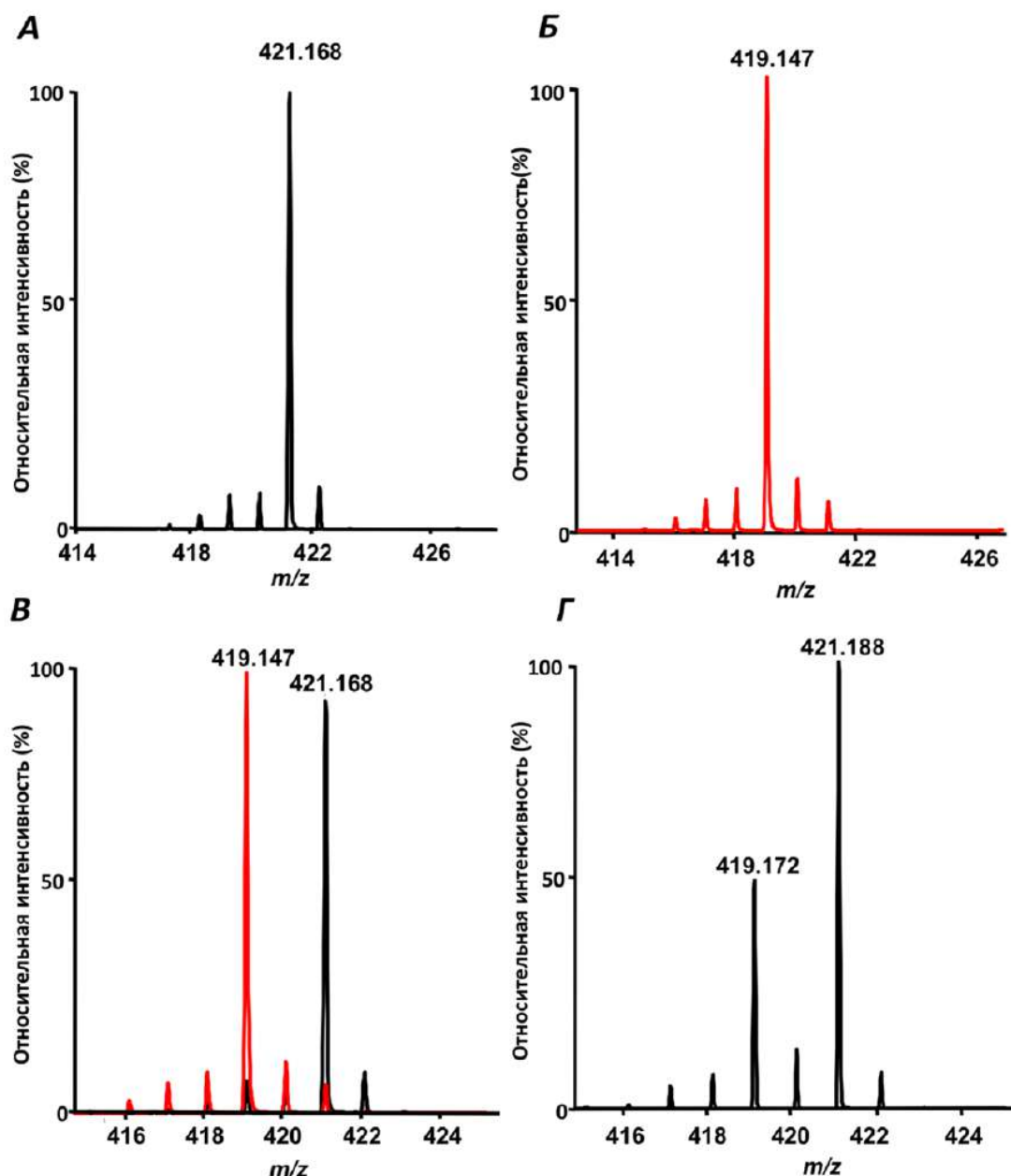


Рисунок 24 – МАЛДИ масс-спектры моностеарата бария (2,1 нмоль, А), моноолеата бария (4,3 нмоль, Б), наложение масс-спектров друг на друга (В) и масс-спектр смеси моноолеата (170 пмоль) и моностеарата (250 пмоль) бария (Г)

Для исследования возможного искажения полуколичественной оценки содержания СЖК ввиду наличия изотопного распределения бария нами был проведен эксперимент с сериями разбавлений смеси стандартов СЖК, сигналы которых в масс-спектре могут перекрываться: пальмитиновая и пальмитолеиновая (C16:0/C16:1), стеариновая и олеиновая (C18:0/C18:1). В приготовленных смесях варьировалось процентное содержание ненасыщенных СЖК от 5 до 80% (описание деталей приготовления растворов приведено в Приложении В). Результаты эксперимента приведены на Рисунке 25.

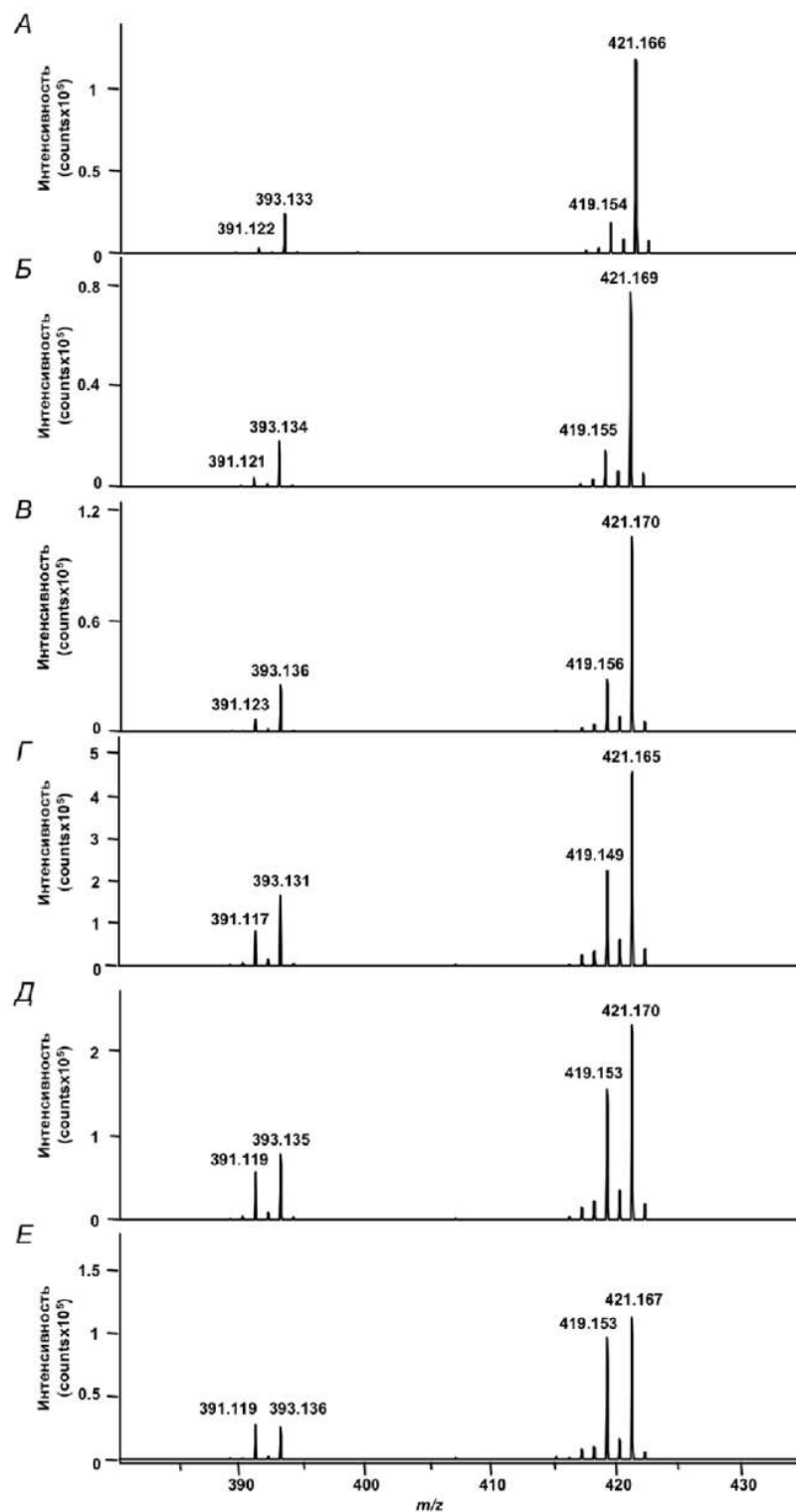


Рисунок 25 – МАЛДИ масс-спектры смеси стандартов пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой и олеиновой кислот при различном процентном содержании ненасыщенных СЖК: 5 (А), 10 (Б), 20 (В), 40 (Г), 60 (Д), 80 % (Е)

Анализ полученных данных показал, что для обеих групп СЖК отношения интенсивностей моноизотопных пиков изменялись линейно (Рисунок 26) в зависимости от процентного содержания мононенасыщенных СЖК в образце ($R^2 \geq 0,99$).

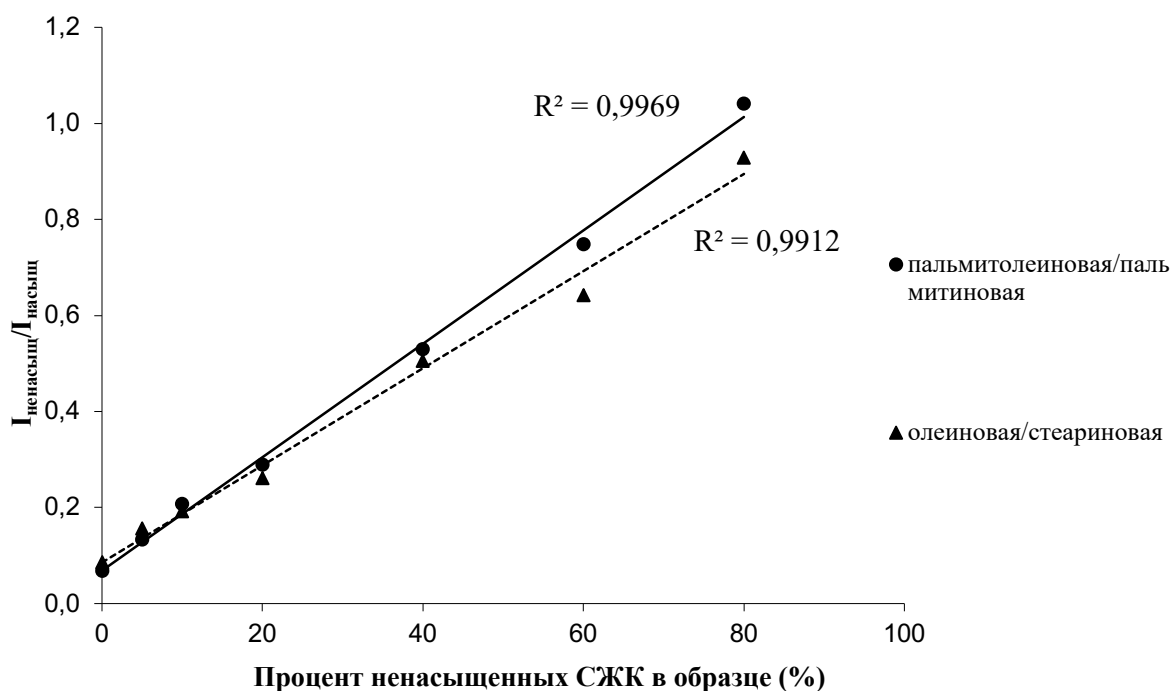


Рисунок 26 – Зависимость отношения интенсивностей сигналов моноизотопных пиков двух пар насыщенной и соответствующей ей мононенасыщенной СЖК от процентного содержания ненасыщенных СЖК в образце

Таким образом, можно заключить, что изотопное распределение бария не вносит существенных искажений при возможной количественной оценке содержания вещества в случае наличия интерферирующих компонент.

3.3.4 Исследование сходимости результатов, полученных с использованием методики анализа СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени

С целью определения оптимального числа технических повторов, которые необходимо получать для одного образца для оценки сходимости результатов, нами был проведен эксперимент, в котором *n*-гексановый экстракт из *F. vesiculosus* наносили на 3 или 4 ячейки мишени и с каждой ячейки регистрировали по 3 или 5 спектров. Для каждой серии измерений интенсивности сигналов нормировали на значение интенсивности базового пика в масс-спектре – пика моноолеата бария (m/z 419,2), затем для нормированных интенсивностей рассчитывали стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Внутри- и межячеечная сходимости результатов оценивались по величине CV. Данные, представленные в Таблице 4, свидетельствуют о том, что для оценки сходимости получаемых результатов можно ограничиться регистрацией 3 масс-спектров с одной ячейки мишени. При этом дальнейшее увеличение

числа регистрируемых масс-спектров с одной ячейки не приводит к заметному изменению сходимости.

Таблица 4 – Исследование влияния количества масс-спектров, получаемых с 3 или 5 ячеек мишени, на сходимость результатов

Обозначение	m/z [M-H+Ba] ⁺	Нормированная интенсивность ± SD (CV%)			
		Внутриячеечная сходимость (n = 3)	Межячеечная сходимость (n = 9)	Внутриячеечная сходимость (n = 5)	Межячеечная сходимость (n = 20)
C14:0	365,106	0,458 ± 0,041 (9,0)	0,465 ± 0,050 (10,8)	0,473 ± 0,063 (13,3)	0,464 ± 0,055 (11,8)
C16:1	391,129	0,102 ± 0,007 (7,3)	0,090 ± 0,013 (14,2)	0,097 ± 0,009 (9,2)	0,085 ± 0,012 (13,7)
C16:0	393,134	0,713 ± 0,040 (5,6)	0,740 ± 0,029 (3,9)	0,721 ± 0,040 (5,6)	0,718 ± 0,035 (4,8)
C18:2	417,136	0,473 ± 0,023 (4,8)	0,495 ± 0,024 (4,9)	0,506 ± 0,021 (4,1)	0,499 ± 0,025 (5,0)
C20:5	439,123	0,371 ± 0,040 (10,8)	0,402 ± 0,050 (12,3)	0,421 ± 0,056 (13,2)	0,417 ± 0,063 (15,1)
C20:4	441,136	0,214 ± 0,023 (10,8)	0,238 ± 0,028 (11,8)	0,248 ± 0,029 (11,7)	0,247 ± 0,035 (14,0)

На следующем этапе мы оценивали внутриячеечную, внутридневную и междневную сходимость результатов (Таблица 5). Для этого экстракт из *F. vesiculosus* готовили в количестве 3 независимых повторов, каждый экстракт наносили на 3 различные ячейки мишени и с каждой ячейки регистрировали по 3 масс-спектра в течение 3 дней. Интенсивности сигналов нормировали на значение интенсивности базового пика в масс-спектре – моноолеата бария (m/z 419,2).

Таблица 5 – Исследование внутриячеечной, внутридневной и междневной сходимости результатов, полученных для экстракта из *F. vesiculosus*

Обозначение	m/z [M-H+Ba] ⁺	Нормированная интенсивность ± SD (CV%)		
		Внутриячеечная сходимость (n = 3)	Внутридневная сходимость (n = 27)	Междневная сходимость (n = 27/день)
C14:0	365,106	0,221 ± 0,029 (13,1)	0,221 ± 0,022 (10,0)	0,216 ± 0,035 (16,0)
C16:1	391,129	0,100 ± 0,009 (9,2)	0,090 ± 0,012 (13,8)	0,105 ± 0,018 (17,5)
C16:0	393,134	0,441 ± 0,023 (5,3)	0,412 ± 0,048 (11,5)	0,477 ± 0,057 (11,9)
C18:2	417,136	0,438 ± 0,027 (6,2)	0,435 ± 0,020 (4,7)	0,421 ± 0,031 (7,5)
C20:5	439,123	0,133 ± 0,009 (7,4)	0,168 ± 0,022 (13,1)	0,140 ± 0,022 (16,0)
C20:4	441,136	0,287 ± 0,020 (6,9)	0,356 ± 0,042 (11,9)	0,303 ± 0,043 (14,0)

Результаты эксперимента свидетельствуют об относительно высокой внутрисуточной сходимости: для большинства исследуемых СЖК значения CV, определенного для отношений интенсивностей как описано выше, не превышали 10,0%, достигая 13,1% только для миристиновой кислоты. Значения CV для внутрисуточной сходимости лишь незначительно превышали 10%, в то время как значения CV для междневной сходимости достигали 17,5% (C16:1). Эти значения согласуются с литературными данными по анализу жирных кислот, полученными при помощи МАЛДИ-МС и ВЭЖХ-МС/МС методов [82,150].

3.3.5 Сравнение результатов, получаемых с помощью МАЛДИ-МС и ГХ-МС

Для проверки результатов анализа СЖК с помощью предлагаемого подхода экстракт из *F. vesiculosus* параллельно был проанализирован стандартным для анализа таких соединений методом – ГХ-МС. Полученные данные представлены на Рисунке 27 в виде относительных величин: в случае МАЛДИ-МС интенсивности соответствующих сигналов были нормированы на значение интенсивности пика монопальмитата бария, а для ГХ-МС значения площадей пиков были нормированы на величину площади пика метилового эфира пальмитиновой кислоты.

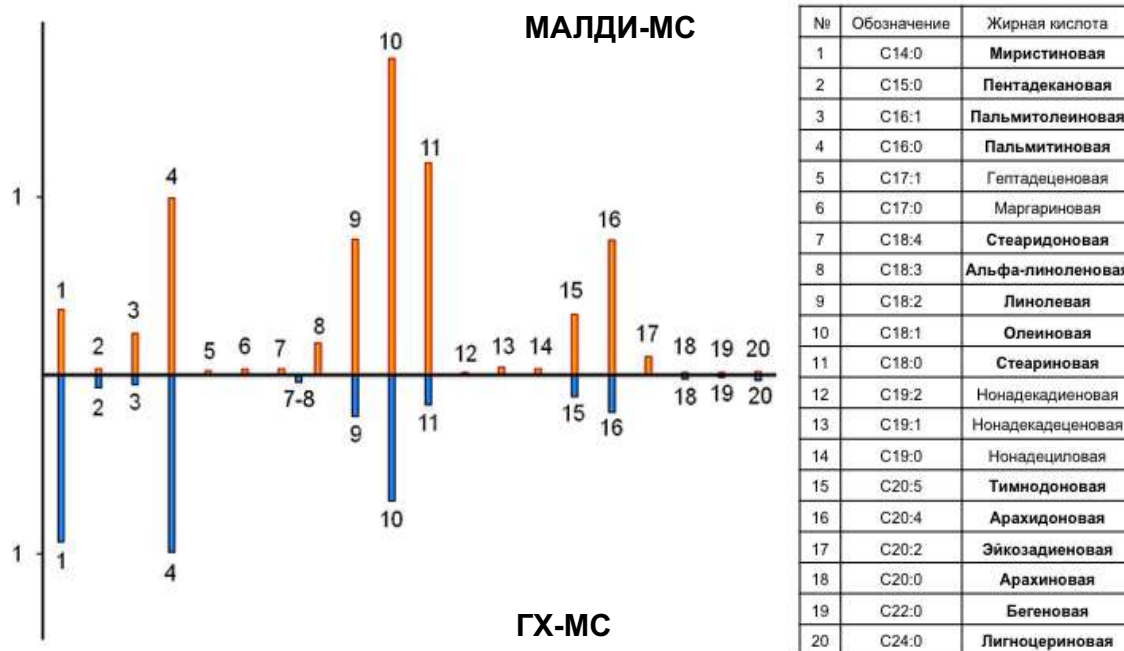


Рисунок 27 – Сравнение профилей СЖК в составе экстракта из *F. vesiculosus*, полученных методами МАЛДИ-МС и ГХ-МС

Сравнивая результаты, можно сделать вывод о хорошей согласованности между собой данных, полученных с помощью двух различных аналитических методов. Однако,

если с помощью ГХ-МС было идентифицировано 14 СЖК, то предложенный подход позволил определить 20 СЖК. Подобное различие в количестве идентифицированных СЖК может быть связано с присутствием в анализируемом продукте дериватизации экстракта из *F. vesiculosus* множества побочных летучих веществ, а также малолетучих соединений, которые могут разлагаться в испарителе газового хроматографа. Наличие подобных компонентов создаёт значительный фон и затрудняет идентификацию минорных сигналов, среди которых могут быть метиловые эфиры жирных кислот.

3.3.6 Исследование профилей СЖК в биологических образцах различной природы

Для того, чтобы продемонстрировать возможность применения метода для анализа СЖК в биологических матрицах различной природы, был выбран ряд образцов, которые находят применение в пищевой промышленности (например, для контроля качества пищевой продукции), медицинской диагностике, а также в областях науки, связанных с изучением животных и растений. Помимо фукуса, изученного на предыдущем этапе, состав СЖК был исследован в экстрактах из: семян и клубеньков гороха (*Pisum sativum* L), дафний (*Daphnia magna*), мягких тканей мидий (*Mytilus edulis*), икры беломорской сельди (*Clupea pallasii marisalbi*), фолликулярной жидкости человека, а также плазмы крови кролика и человека. Результаты экспериментов показали, что данные образцы имеют различные по составу наборы СЖК, причем отличия наблюдались как в количестве сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария, так и в их относительных интенсивностях в масс-спектрах. Число сигналов, которые были поставлены в соответствие соединениям, относящимся к классу СЖК, варьировалось от 9 в экстрактах из семян гороха до 25 для образцов фолликулярной жидкости (Таблица 6). При идентификации СЖК учитывались три параметра: точная масса, наличие характерного изотопного распределения и результаты МС/МС анализа (Таблица 7). Всего 22 СЖК были идентифицированы по изотопному распределению и результатам МС/МС анализа, в то время как ещё 9 – только по значению m/z (и три в соответствии со значением точной массы и результатами МС/МС анализа).

Таблица 6 – Список СЖК, аннотированных в экстрактах из биологических образцов различной природы

Элементный состав	Обозначение	Параметры аннотации аналитов			Биологические образцы									
		Ошибка, ppm	Изотопное распределение	МС/МС	Предположительная жирная кислота	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И
C ₁₄ H ₂₇ O ₂ Va ⁺	C14:0	19,2	+	+	Миристиновая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₅ H ₂₇ O ₂ Va ⁺	C15:1	5,3	-	+	Пентадециновая	-	+	-	+	+	-	+	+	-
C ₁₅ H ₂₉ O ₂ Va ⁺	C15:0	-7,9	+	+	Пентадекановая	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₆ H ₂₃ O ₂ Va ⁺	C16:4	5,2	+	+	Гексадекатетраеновая	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C ₁₆ H ₂₅ O ₂ Va ⁺	C16:3	12,9	+	+	Гексадекатриеновая	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C ₁₆ H ₂₇ O ₂ Va ⁺	C16:2	23,1	+	+	Гексадекадиеновая	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C ₁₆ H ₂₉ O ₂ Va ⁺	C16:1	7,7	+	+	Пальмитолеиновая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₆ H ₃₁ O ₂ Va ⁺	C16:0	-10,2	+	+	Пальмитиновая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₇ H ₃₁ O ₂ Va ⁺	C17:1	-19,7	+	+	Гептадециновая	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₇ H ₃₃ O ₂ Va ⁺	C17:0	-44,2	+	+	Гептадекановая	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₈ H ₂₇ O ₂ Va ⁺	C18:4	14,5	+	+	Стеариновая	-	-	+	+	-	+	-	-	-
C ₁₈ H ₂₉ O ₂ Va ⁺	C18:3	2,4	+	+	Линоленовая	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C ₁₈ H ₃₁ O ₂ Va ⁺	C18:2	-9,6	+	+	Линолевая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₈ H ₃₃ O ₂ Va ⁺	C18:1	-11,9	+	+	Олеиновая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₈ H ₃₅ O ₂ Va ⁺	C18:0	4,8	+	+	Стеариновая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₉ H ₃₃ O ₂ Va ⁺	C19:2	46,4	+	+	Нонадекадиеновая	+	+	+	+	-	-	+	+	+
C ₁₉ H ₃₅ O ₂ Va ⁺	C19:1	-90,0	+	+	Нонадециновая	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₁₉ H ₃₇ O ₂ Va ⁺	C19:0	-96,5	+	+	Нонадекановая	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C ₂₀ H ₂₉ O ₂ Va ⁺	C20:5	2,3	+	+	Эйкозапентаеновая	-	-	+	+	+	+	-	+	+
C ₂₀ H ₃₁ O ₂ Va ⁺	C20:4	-9,1	+	+	Арахидоновая	-	-	+	+	+	+	-	+	+
C ₂₀ H ₃₃ O ₂ Va ⁺	C20:3	-4,5	-	+	Дигомо- Эйкозодиеновая	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C ₂₀ H ₃₅ O ₂ Va ⁺	C20:2	6,7	+	+	Эйкозодиеновая	-	-	+	+	+	+	-	-	-
C ₂₀ H ₃₇ O ₂ Va ⁺	C20:1	2,2	+	+	Гондоиновая	-	-	-	+	+	+	-	+	-
C ₂₀ H ₃₉ O ₂ Va ⁺	C20:0	-8,9	-	+	Арахидиновая	-	+	+	+	+	+	-	-	-
C ₂₁ H ₂₉ O ₂ Va ⁺	C21:6	48,8	-	-	Генэйкозагексаеновая	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C ₂₁ H ₃₃ O ₂ Va ⁺	C21:4	-84,2	-	-	Генэйкозапентаеновая	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C ₂₁ H ₃₅ O ₂ Va ⁺	C21:3	-76,3	-	-	Генэйкозатриеновая	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C ₂₂ H ₃₁ O ₂ Va ⁺	C22:6	-2,2	+	+	Докозагексаеновая	-	-	-	+	+	+	-	+	+
C ₂₂ H ₃₃ O ₂ Va ⁺	C22:5	-6,4	-	-	Докозапентаеновая	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C ₂₂ H ₄₃ O ₂ Va ⁺	C22:0	2,1	-	-	Докозановая	-	+	+	+	+	+	-	+	+
C ₂₄ H ₄₇ O ₂ Va ⁺	C24:0	9,9	-	-	Тетракозановая	-	+	+	+	+	+	+	+	+

А – семена гороха *Pisum sativum* L.; Б – клубеньки гороха *Pisum sativum* L.; В – таллом *Fucus vesiculosus*; Г – дафнии *Daphnia magna*; Д – икра беломорской сельди; Е – мидии; Ж – плазма крови кролика; З – фолликулярная жидкость яловка; И – плазма

В качестве примера идентификации монокарбоксилатов бария на Рисунке 28 приведены результаты МС/МС анализа обнаруженного в экстракте из *F. vesiculosus* соединения с m/z 441,14, что соответствует расчетным данным для моноарахидата бария (арахионовая кислота, C₂₀:4). Для сравнения был проведен МС/МС анализ бариевой соли стандарта арахидоновой кислоты, полученной в тех же условиях. Как следует из Рисунка 28, масс-спектры хорошо согласуются между собой, что позволяет отнести сигнал с m/z 441,14 к моноарахидату бария. В МС/МС спектрах присутствуют сигнал катион-радикала Ba^+ , сигнал $BaOH^+$, а также сигналы, соответствующие характерным отщеплениям молекулы воды и CO_2 . Кроме того, в МС/МС спектрах также представлена серия сигналов с характерными инкрементами, соответствующими метиленовым и метиновым группам, которые позволяют определить положение двойных связей в СЖК (сигналы а-о на Рисунке 28).

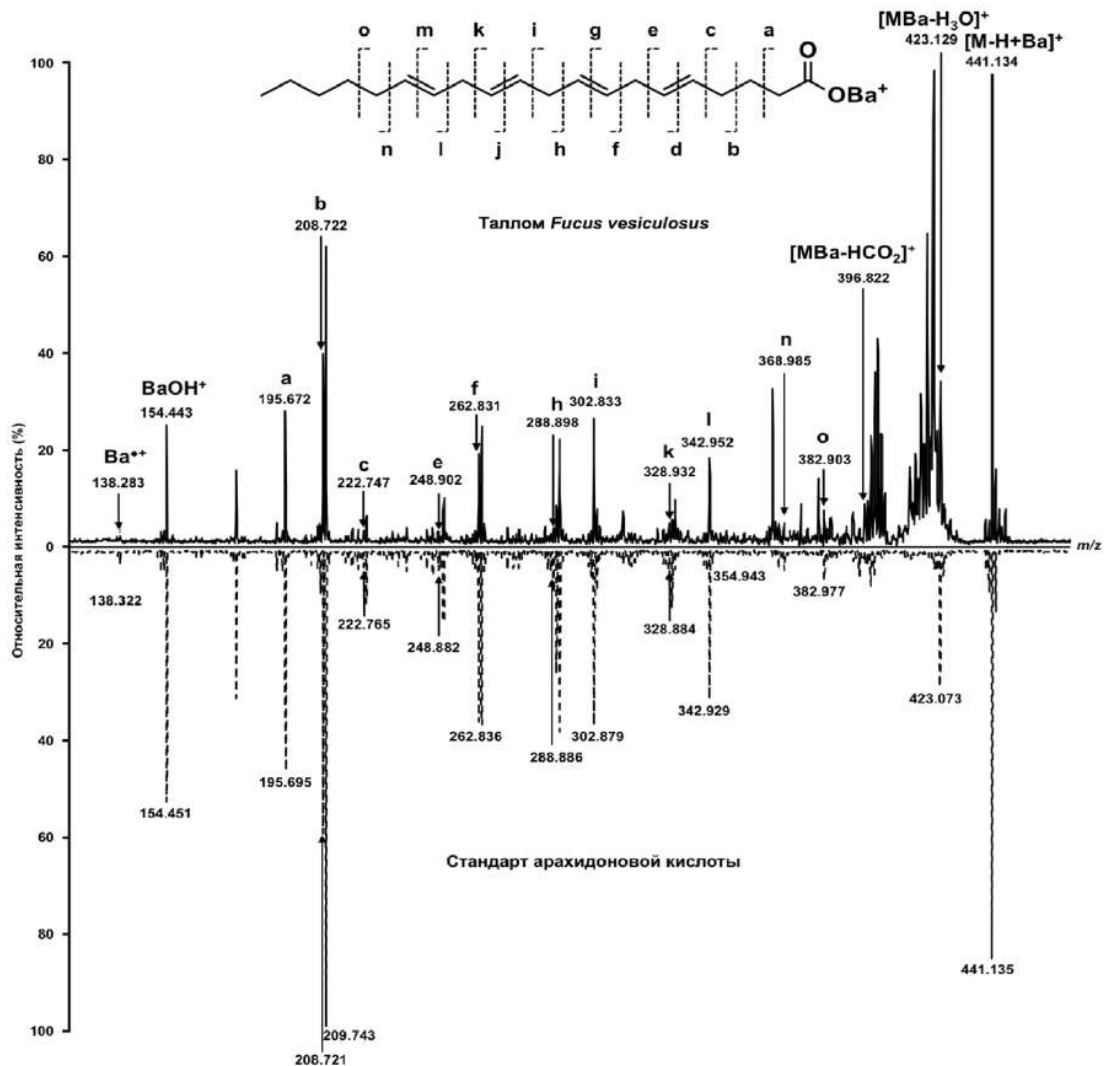
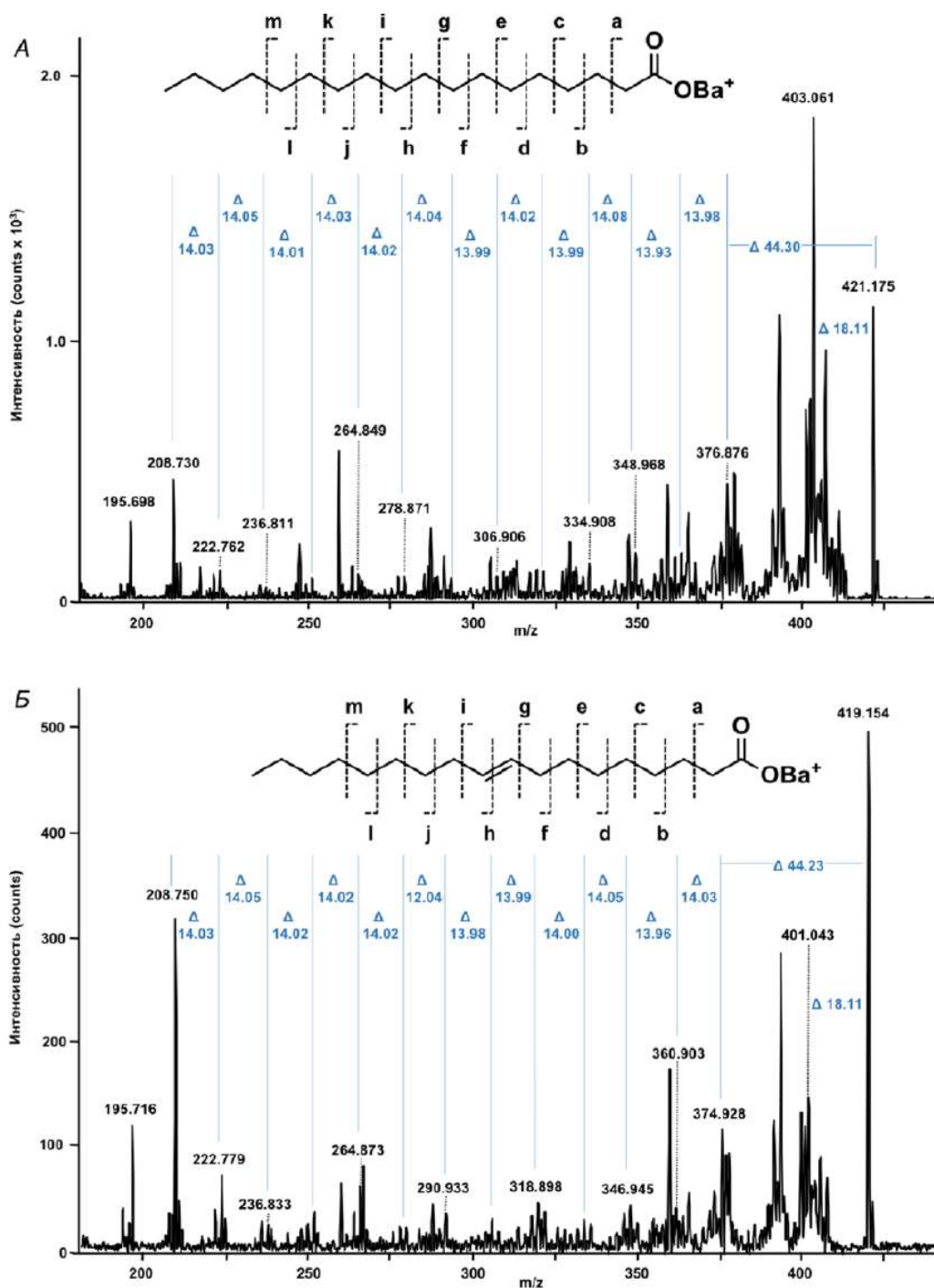


Рисунок 28 – МС/МС масс-спектр, полученный для m/z 441,14, соответствующий $[M-H+Ba]^+$ иону арахидоновой кислоты (C₂₀:4)

Известно, что с помощью МС/МС анализа можно устанавливать положения двойных связей в структуре исследуемых СЖК [151]. В связи с этим, МС/МС анализ был применен нами для анализа структуры соединений, относящихся к кластеру С18 СЖК (Рисунок 29). В результате было установлено, что в составе *F. vesiculosus* присутствует именно альфа-линоленовая кислота, а не её изомер по положению двойной связи – гамма-линоленовая кислота.



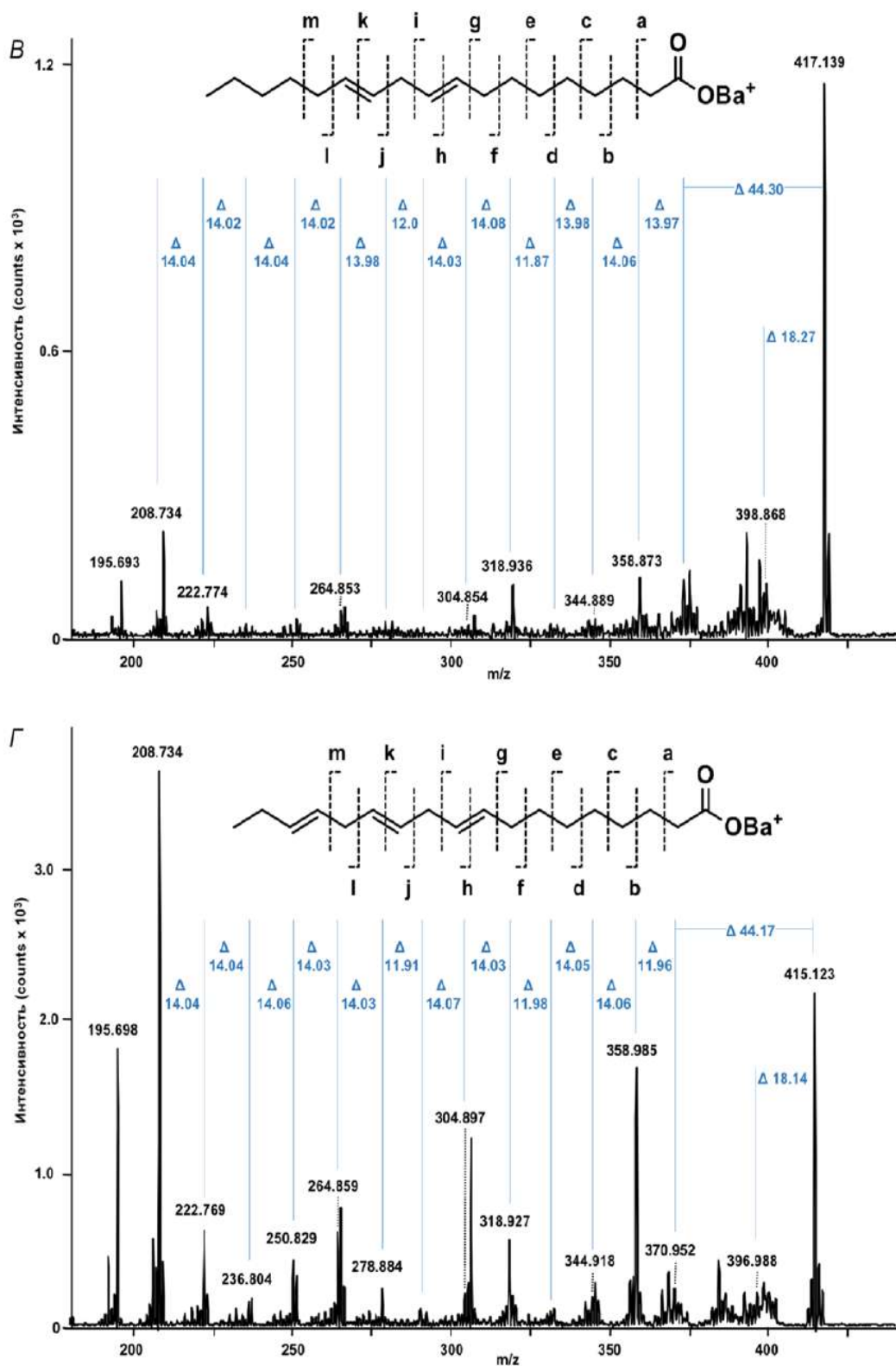


Рисунок 29 – MS/MS спектры m/z 421,175 (А), 419,154 (Б), 417,139 (В), 415,123 (Г), соответствующих $[M-H+Ba]^+$ ионам стеариновой (C18:0, А), олеиновой (C18:1, Б), линолевой (C18:2, В), альфа-линоленовой (C18:3, Г) кислот

Таблица 7 – Характерные ионы в tandemных масс-спектрах монокарбоксилатов бария, соответствующих различным СЖК, обнаруженным в биологических образцах

Обозначение	Элементный состав	m/z				
		[M-H+Ba] ⁺	[MBa-H ₃ O] ⁺	[MBa-HCO ₂] ⁺	Ba ⁺	BaOH ⁺
C14:0	C ₁₄ H ₂₇ O ₂ Ba ⁺	365,113	346,9	320,9	138,6	154,7
C15:1	C ₁₅ H ₂₇ O ₂ Ba ⁺	377,108	358,9	332,8	-	-
C15:0	C ₁₅ H ₂₉ O ₂ Ba ⁺	379,119	361,2	335,2	138,1	154,2
C16:4	C ₁₆ H ₂₃ O ₂ Ba ⁺	385,077	366,9	341,0	-	154,6
C16:3	C ₁₆ H ₂₅ O ₂ Ba ⁺	387,096	368,8	342,9	-	-
C16:2	C ₁₆ H ₂₇ O ₂ Ba ⁺	389,115	370,9	345,0	-	-
C16:1	C ₁₆ H ₂₉ O ₂ Ba ⁺	391,125	372,9	347,0	138,5	154,6
C16:0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂ Ba ⁺	393,134	375,0	348,9	138,5	154,6
C17:1	C ₁₇ H ₃₁ O ₂ Ba ⁺	405,130	387,0	361,1	-	154,6
C17:0	C ₁₇ H ₃₃ O ₂ Ba ⁺	407,135	389,0	362,9	138,5	154,6
C18:4	C ₁₈ H ₂₇ O ₂ Ba ⁺	413,112	394,9	369,0	-	-
C18:3	C ₁₈ H ₂₉ O ₂ Ba ⁺	415,123	396,9	370,9	138,3	154,5
C18:2	C ₁₈ H ₃₁ O ₂ Ba ⁺	417,134	398,9	372,9	138,4	154,5
C18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂ Ba ⁺	419,148	401,0	375,0	138,4	154,5
C18:0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂ Ba ⁺	421,171	403,0	376,9	138,4	154,5
C19:2	C ₁₉ H ₃₃ O ₂ Ba ⁺	431,173	413,1	387,0	-	154,5
C19:1	C ₁₉ H ₃₅ O ₂ Ba ⁺	433,130	415,1	389,1	-	154,5
C19:0	C ₁₉ H ₃₇ O ₂ Ba ⁺	435,143	417,1	391,1	138,4	154,5
C20:5	C ₂₀ H ₂₉ O ₂ Ba ⁺	439,123	421,0	394,8	138,3	154,5
C20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂ Ba ⁺	441,134	423,0	396,8	138,3	154,5
C20:3	C ₂₀ H ₃₃ O ₂ Ba ⁺	443,151	425,2	399,1	-	154,7
C20:2	C ₂₀ H ₃₅ O ₂ Ba ⁺	445,172	427,2	401,2	-	-
C20:1	C ₂₀ H ₃₇ O ₂ Ba ⁺	447,186	429,0	403,0	-	-
C20:0	C ₂₀ H ₃₉ O ₂ Ba ⁺	449,196	431,0	405,0	-	-
C22:6	C ₂₂ H ₃₁ O ₂ Ba ⁺	465,137	446,9	421,0	-	154,3

В н-гексановых экстрактах из семян гороха (Рисунок 31А) был обнаружен набор из 9 сигналов, представляющих монокарбоксилаты бария C14, C16, C18 и C19 соединений с преобладанием пика, соответствующего линолевой кислоте и/или её изомерам (18:2, m/z 417,134). Несмотря на то, что в масс-спектрах, полученных для экстрактов из клубеньков гороха, наиболее интенсивный сигнал также соответствует C18:2 (Рисунок 31Б), общее количество идентифицированных СЖК оказалось выше для данных образцов. Следует отметить, что по сравнению с семенами гороха в клубеньках интенсивности сигналов, соответствующих насыщенным СЖК (миристиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты) были значительно выше, чем интенсивности сигналов ненасыщенных СЖК.

Анализ экстракта из бурых водорослей *F. vesiculosus*, позволил выявить довольно скудный состав СЖК у данного образца (Рисунок 31В). В масс-спектрах экстрактов из

бурых водорослей доминирующим являлся сигнал m/z 419,148, который соответствует монокарбоксилатам бария C18:1 (олеиновая кислота и/или её изомеры), также наблюдались достаточно интенсивные сигналы солей миристиновой и пальмитиновой кислот (m/z 365,106 и 393,134, соответственно). Стоит отметить, что в масс-спектрах присутствовали интенсивные сигналы, соответствующие монокарбоксилатам бария из семейства C20 (Таблица 6), представляющими семейства омега-6 и омега-3 СЖК, причем их интенсивности располагались в следующем порядке: m/z 441,137 (C20:4) > m/z 439,124 (C20:5) > m/z 445,187 (C20:2). Кроме того, были идентифицированы сигналы линолевой и линоленовой кислот (m/z 417,140 и 415,131, соответственно).

Следующим объектом изучения состава СЖК стали ткани животных. Масс-спектры, полученные для экстрактов из дафний (представителей морской фауны), характеризуются значительно большим количеством сигналов (22), отнесенных к монокарбоксилатам бария СЖК, по сравнению с ранее исследованными образцами (Рисунок 31Г). Однако часть сигналов в данных масс-спектрах имела низкую интенсивность, вследствие чего не наблюдалось изотопного распределения, характерного для монокарбоксилатов бария. В данном случае идентификация СЖК проводилась в соответствии со значением точной массы и результатами МС/МС анализа. Следует подчеркнуть, что только в экстрактах из дафний были детектированы сигналы, соответствующие монокарбоксилатам бария C16:2, C16:3 и C16:4 (m/z 389,115, m/z 387,096, и m/z 385,077, соответственно).

Масс-спектры экстрактов из икры беломорской сельди (*Clupea pallasii marisalbi*) и мидий (*Mytilus edulis*) содержали около 20 сигналов, интерпретированных как монокарбоксилаты бария СЖК. Мажорными сигналами в данных масс-спектрах являлись сигналы, соответствующие СЖК, принадлежащим к семействам C16 и C18 (Таблица 6). В отличие от профилей объектов, описанных ранее, в масс-спектрах этих образцов присутствуют интенсивные сигналы, отнесенные к семейству C20 и докозагексаеновой кислоте (22:6) и/или её изомерам (Рисунок 31Д,Е). Причем в экстракте из мидий представлен наиболее полный перечень ненасыщенных СЖК семейства C20 с расположением по интенсивности в профиле 20:5 > 20:1 > 20:2 > 20:4 > 20:3, что даёт основания предполагать наличие всех основных представителей омега-3-, -6-, и -9-жирных кислот (Рисунок 31Е).

На завершающем этапе исследования мы оценивали применимость разработанного метода для анализа различных жидкостей организма млекопитающих. Для этого были получены МАЛДИ-МС спектры экстрактов из плазмы крови кролика и человека. Как ни странно, для экстрактов из плазмы крови кролика и человека различным оказалось не только количество идентифицированных сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария (15 и 22 соответственно), но и общий вид паттернов сигналов (Рисунки 30 и 31Ж).

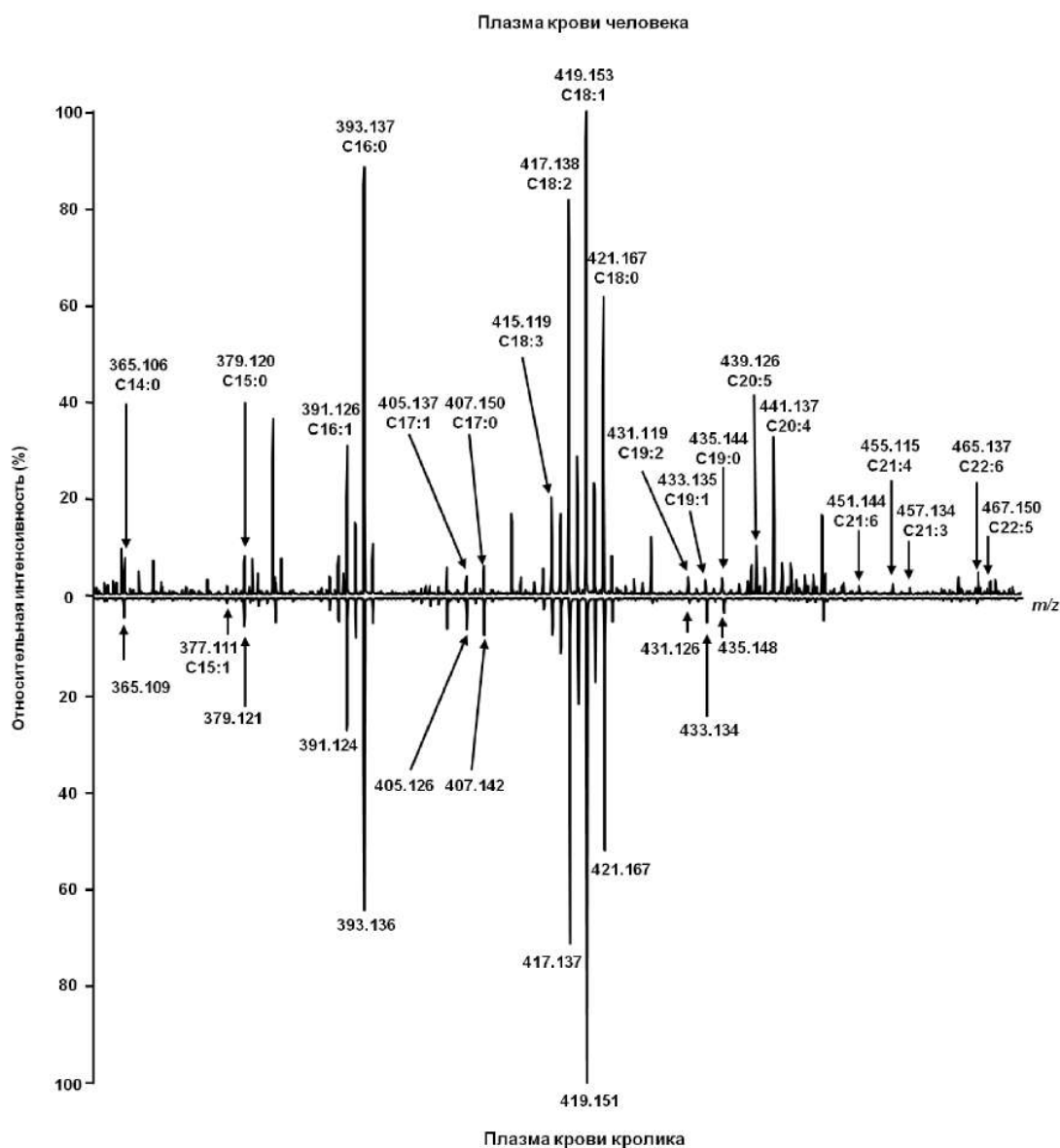


Рисунок 30 – МАЛДИ масс-спектры н-гексановых экстрактов из плазмы крови кролика и человека

Анализ профиля СЖК человеческой фолликулярной жидкости показал, что данный объект обладает наиболее богатым набором СЖК в своём составе среди рассмотренных

образцов. В масс-спектрах данного биологического материала было аннотировано 25 сигналов, относящихся к классу СЖК (Рисунок 313). В сравнении с образцами плазмы в масс-спектрах экстрактов из фолликулярной жидкости надежно детектировались монокарбоксилаты бария соединений, относящихся к семействам C19, C20 и C22.

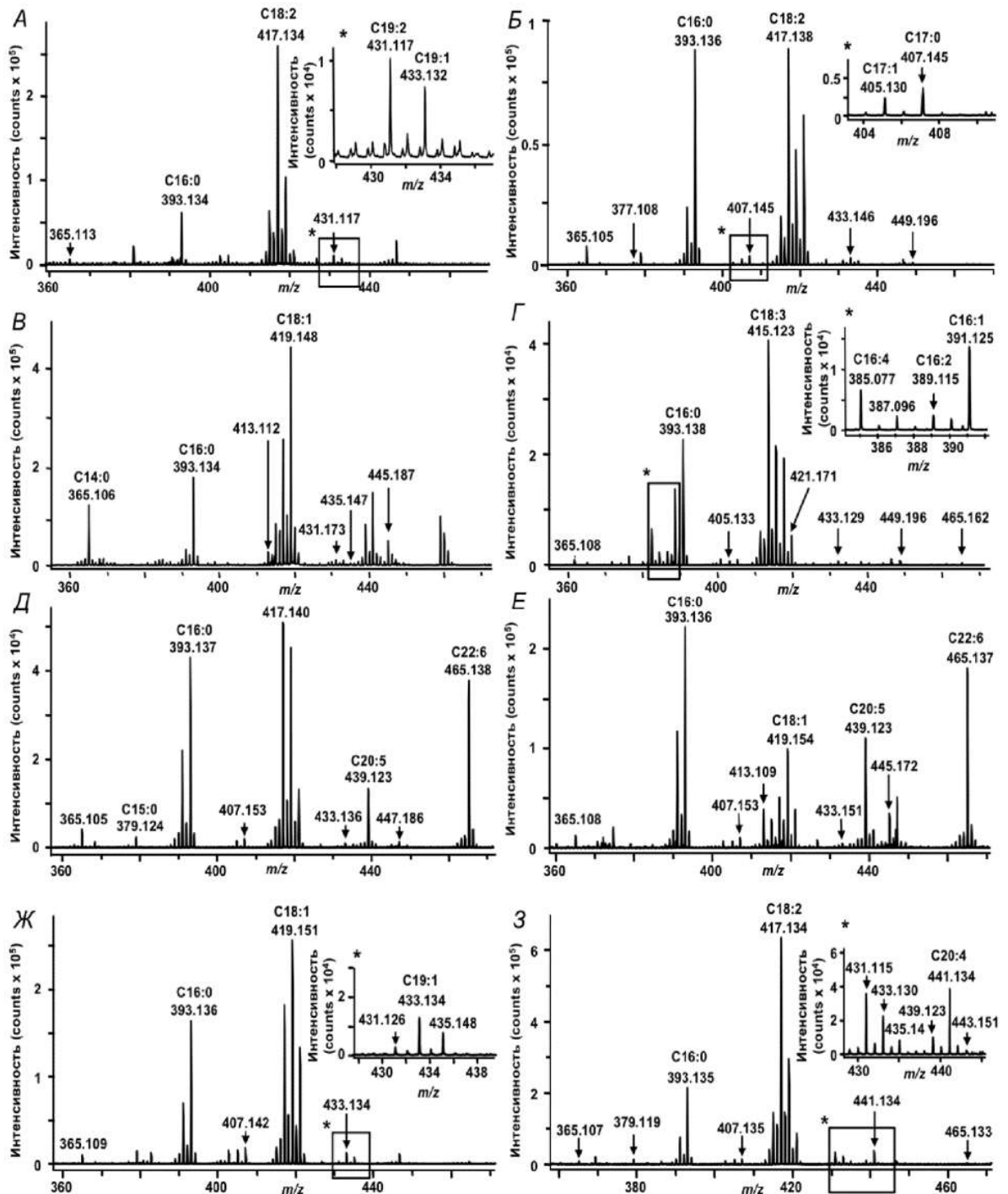


Рисунок 31 – МАЛДИ масс-спектры экстрактов из семян (А) и клубеньков (Б) гороха *Pisum sativum* L., таллома *Fucus vesiculosus* (В), дафний *Daphnia magna* (Г), икры *Clupea pallasii marisalbi* (Д), мидий *Mytilus edulis* (Е), плазмы крови кролика (Ж) и фолликулярной жидкости человека (З). На вставках представлены увеличенные в масштабе участки масс-спектров, отмеченных звёздочкой

Несмотря на то, что в паттернах сигналов монокарбоксилатов бария СЖК образцов различной природы имелись ощутимые отличия, можно выделить некоторые общие признаки. В большей части масс-спектров преобладают два кластера, представленные сигналами кислот С16 и С18. В первом кластере доминирующими сигналами были С16:0 и С16:1 (в основном пальмитиновая и пальмитолеиновая кислоты соответственно), тогда как второй был представлен в основном соединениями С18:0, С18:1, С18:2 и С18:3 (соответствующие стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислотам соответственно).

Для экстрактов из биологических образцов была также проведена оценка сходимости результатов. Экстракты из биологических образцов наносили на 4 ячейки мишени и с каждой ячейки регистрировали по 5 спектров. Внутривневная сходимость, выраженная через CV, составила менее 15% в большинстве экспериментов, причем в большинстве случаев значения CV не превосходили 10%, а лучшие показатели были получены для экстрактов из мягких тканей мидии (Таблица 8).

Таблица 8 – Значения внутривневной сходимости, полученные для экстрактов из различных биологических образцов

Образец	Обозначение СЖК	Нормированная интенсивность	
		Среднее±SD	CV%
Семена гороха (<i>Pisum sativum</i> L.)	С14:0	0,120±0,018	15,3
	С16:1	0,063±0,004	6,8
	С16:0	0,599±0,026	4,4
	С18:3	0,644±0,034	5,2
	С18:2	2,670±0,147	5,5
	С18:0	0,142±0,019	13,2
Клубеньки гороха (<i>Pisum sativum</i> L.)	С15:0	0,076±0,014	17,8
	С16:1	0,464±0,044	9,4
	С16:0	1,680±0,143	8,5
	С18:3	0,307±0,047	15,2
	С18:2	1,679±0,169	10,1
	С18:0	1,123±0,156	13,9
Таллом <i>Fucus vesiculosus</i>	С14:0	0,251±0,022	8,7
	С16:0	0,423±0,019	4,4
	С18:3	0,169±0,015	8,8
	С18:2	0,536±0,028	5,2
	С20:5	0,177±0,021	11,6
	С20:4	0,315±0,017	5,4

Образец	Обозначение СЖК	Нормированная интенсивность	
		Среднее±SD	CV%
Дафнии (<i>Daphnia magna</i>)	C16:1	0,702±0,050	7,1
	C16:0	1,171±0,051	4,4
	C18:4	0,326±0,030	9,2
	C18:3	2,058±0,204	9,9
	C18:2	1,073±0,048	4,5
	C18:0	0,225±0,033	14,7
Икра беломорской сельди (<i>Clupea pallasii marisalbi</i>)	C16:1	0,484±0,039	8,2
	C16:0	0,935±0,073	7,8
	C18:2	1,123±0,070	6,3
	C18:0	0,249±0,037	14,7
	C20:5	0,327±0,038	11,8
	C22:6	0,858±0,124	14,5
Мягкие ткани мидии (<i>Mytilus edulis</i>)	C16:1	1,344±0,133	9,9
	C16:0	2,321±0,154	6,6
	C18:2	0,515±0,029	5,7
	C20:5	1,204±0,113	9,4
	C20:1	0,538±0,035	6,5
	C22:6	1,967±0,182	9,3
Плазма крови кролика	C15:0	0,060±0,006	9,8
	C16:1	0,287±0,015	5,2
	C16:0	0,646±0,045	6,9
	C17:0	0,070±0,009	13,5
	C18:2	0,792±0,045	5,7
	C18:0	0,512±0,052	10,2
Человеческая фолликулярная жидкость	C16:1	0,283±0,032	11,3
	C16:0	0,705±0,060	8,5
	C18:3	0,490±0,042	8,6
	C18:2	2,180±0,131	6,0
	C18:0	0,251±0,027	10,6
	C20:4	0,135±0,016	11,7

Полученные оценки сходимости хорошо соотносятся с значениями, получаемыми при проведении целевого или нецелевого профилирования метаболитов [152,153], что может говорить о возможности применения исследуемого подхода для решения задач метаболомики.

3.3.7 Профилирование СЖК в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом ртути

Разработанный подход был использован при исследовании хронического отравления крыс ацетатом ртути. В качестве объекта исследования были выбраны самцы белых беспородных лабораторных крыс, были сформированы опытная и контрольная группы. В соответствии с протоколом исследования сотрудники ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России вводили животным из опытной группы ацетат ртути в виде водного раствора перорально в дозе 4 мг/кг в течение 1 месяца. Для эксперимента по исследованию профилей СЖК плазмы крови из контрольной и опытной групп было отобрано по 7 животных. Экстракцию СЖК, нанесение образца на мишень и МАЛДИ-МС анализ проводили также как при исследовании плазмы кролика и человека. Статистическую обработку полученных масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2 (Рисунок 32).

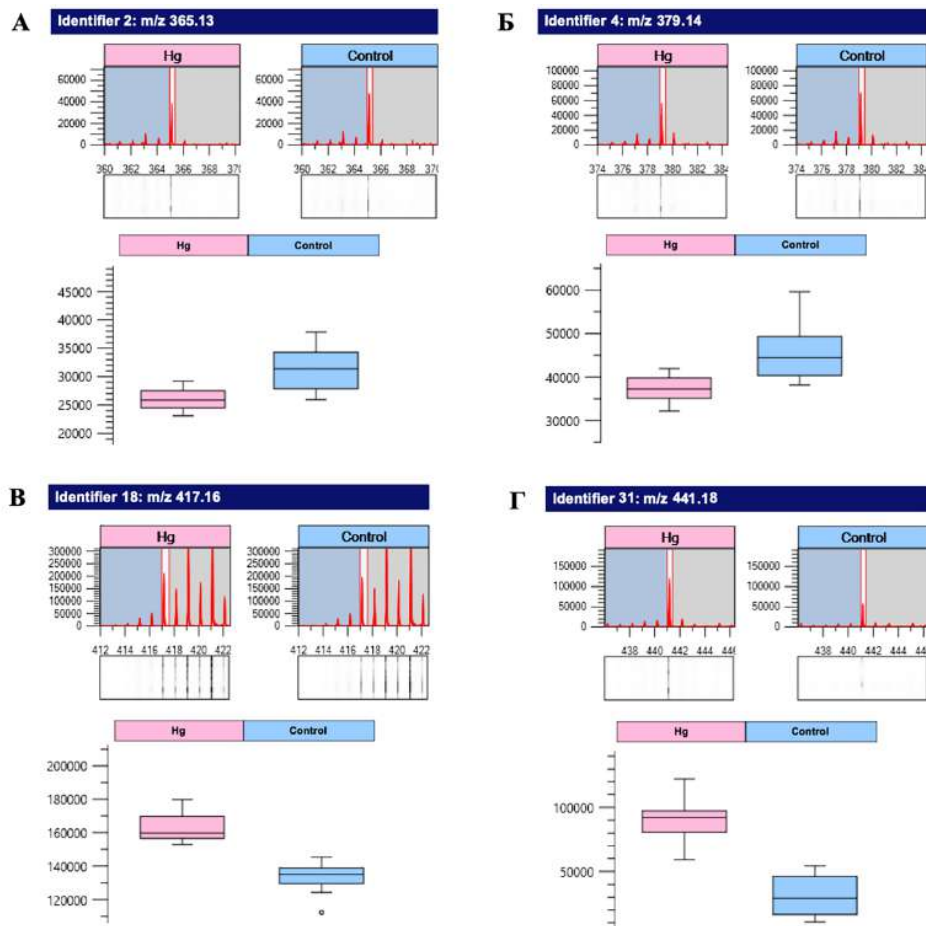


Рисунок 32 – Результаты статистической обработки данных, проведенной с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2, для контрольной (Control) и опытной групп (Hg) крыс: А – миристиновая кислота, Б – пентадекановая кислота, В –линолевая кислота, Г – арахидоновая кислота

Результаты эксперимента (Рисунок 32) свидетельствуют о наличии значимых ($p < 0,05$) изменений содержания ряда СЖК в плазме крови крыс подвергшихся интоксикации, по сравнению с контрольной группой: наряду с понижением содержания миристиновой и пентадекановой кислот наблюдалось повышение концентраций линолевой и арахидоновой кислот.

3.3.8 Оптимизация методики анализа СЖК для проведения МАЛДИ-МС анализа в режиме автоматической регистрации спектров

Следует отметить, что для достижения высокой сходимости получаемых результатов при регистрации масс-спектров для экстрактов из биологических образцов необходимо было накопить сигнал, полученный при 28000-30000 актов облучения лазером ячейки с образцом по всей поверхности коллапсированных монослоев. При анализе большого количества образцов при нескольких технических повторах длительное облучение образца лазером приводит к значительным временным затратам и требует высокой концентрации внимания оператора. Соответственно, важным представлялось усовершенствовать ранее предложенную методику с целью автоматизации процесса регистрации масс-спектров при анализе СЖК методом МАЛДИ-МС с использованием технологии Ленгмюра.

Разработанная на предыдущем этапе методика профилирования СЖК в биологических образцах включает следующие стадии: нанесение водной капли, содержащей соль бария и матрицу ДНВ, в центр ячейки стальной полированной МАЛДИ мишени; двукратное нанесение на поверхность водной капли экстракта из биологического образца в *n*-гексане; разрушение высушенного на ячейке мишени монослоя 90% водным ацетонитрилом и МАЛДИ-МС анализ. Важно отметить, что кроме разрушения структуры монослоя, раствор ацетонитрила смывает с поверхности образца излишки матрицы и другие гидрофильные полярные примеси, которые затрудняют масс-спектрометрический анализ монокарбоксилатов бария, входящих в состав монослоя. При этом в процессе испарения растворителя на гидрофобной поверхности монослоя капля водно-органической фазы обретает симметричную округлую форму и высыхает в виде пятна диаметром 1-2 мм. Масс-спектры, полученные с этой области мишени, отличаются избыточным количеством сигналов примесных соединений, на фоне которых целевые сигналы могут отсутствовать (Рисунок 33А). Соответственно, такие масс-спектры несут недостоверную информацию о составе СЖК в анализируемом образце и не могут быть

приняты для дальнейшей статистической обработки. Для получения воспроизводимых достоверных результатов оператор во время проведения анализа не должен использовать эту область для работы. Автоматический анализ предполагает стохастическое лазерное облучение образца, что не позволяет избежать нежелательной области на ячейке мишени. Поэтому нами было предложено выводить каплю, образующуюся после обработки ячейки мишени 90% водным ацетонитрилом, после приобретения ею ровной круглой формы, за пределы ячейки с помощью наконечника дозатора (Рисунок 34). При отсутствии гидрофильных примесей на поверхности образца водно-органическая капля достаточно легко перемещается по его поверхности и высыхает за границей ячейки мишени, что исключает попадание лазерного импульса в область, содержащую нецелевые компоненты образца.

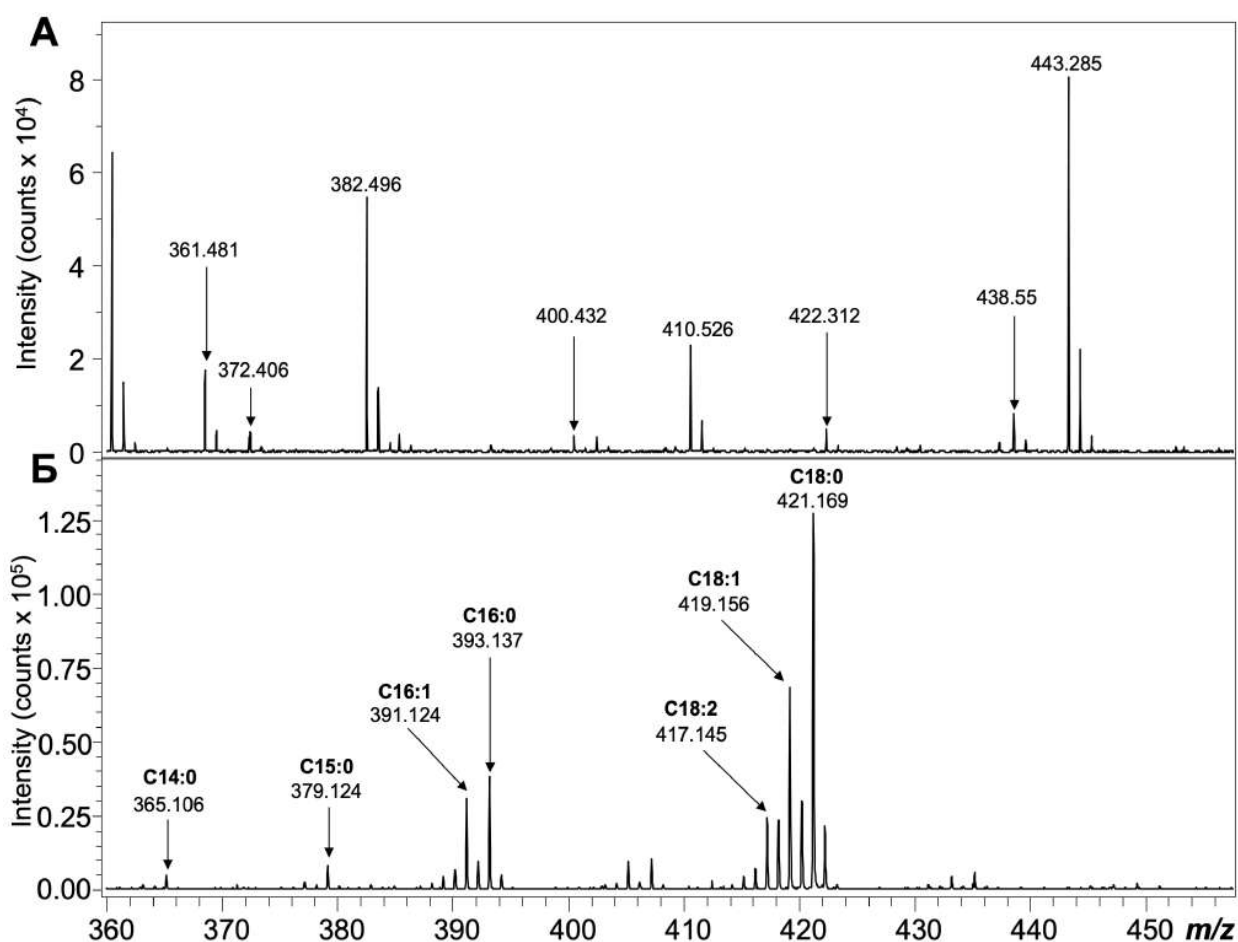


Рисунок 33 – МАЛДИ масс-спектр, полученный при облучении лазером пятна, образующегося при испарении 90% водного ацетонитрила, нанесенного на сформированные на ячейки мишени монослои (А); МАЛДИ масс-спектр экстракта из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3 (Б)

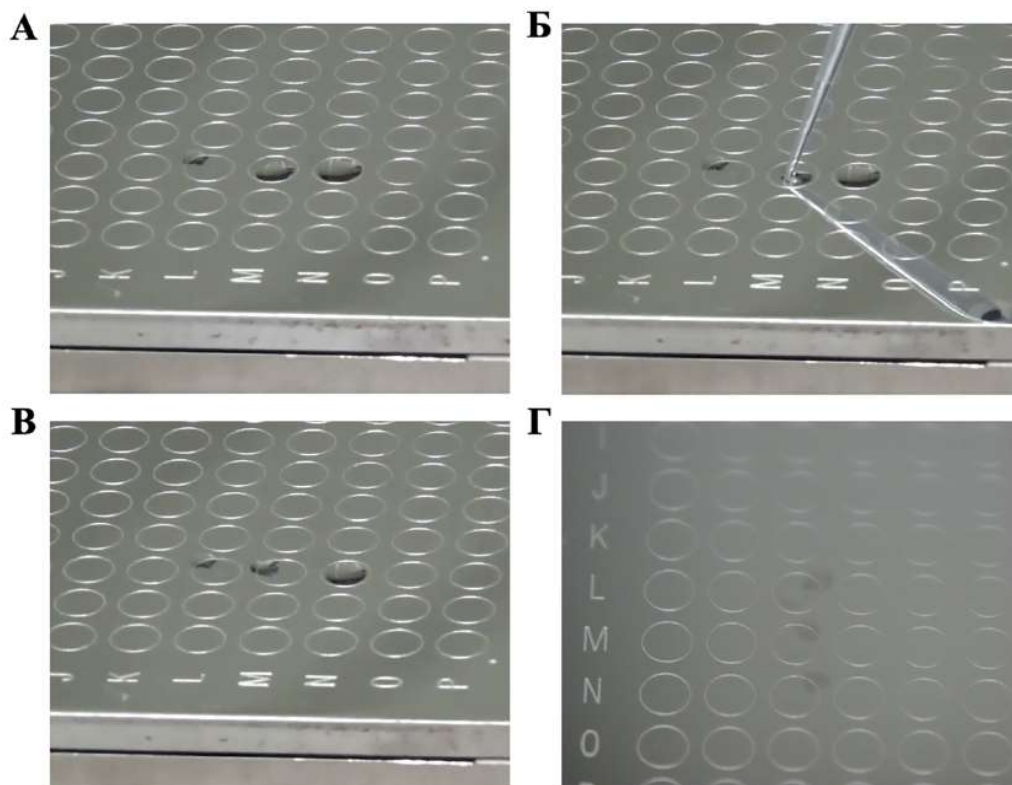


Рисунок 34 – Демонстрация процесса выведения капли раствора 90% водного ацетонитрила за пределы ячейки мишени: А – капля раствора 90% водного ацетонитрила нанесена на сформированные на ячейке мишени монослои; Б – оператор, используя наконечник дозатора, проникает внутрь капли и перемещает её на границу ячейки мишени; В – капля выведена на границу ячейки мишени; Г – после полного испарения капли на её месте образуется затемнённая область

В качестве объекта исследования нами был выбран н-гексановый экстракт из штамма бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3. Масс-спектрометрический анализ показал (Таблица 9, Рисунок 33Б), что в экстракте достоверно идентифицируются 7 СЖК, наиболее часто встречающиеся в биологических образцах (кластеры С14 – С18). При этом концентрация ацетата бария в водной субфазе была снижена до 0,25 мг/мл, а концентрация ДНВ составляла 0,25 мг/мл. В соответствии с методикой экстракт был нанесен на 3 ячейки мишени, и с каждой ячейки оператор вручную получал 3 масс-спектра без облучения области высыхания капли 90% водного ацетонитрила. Затем процедуру нанесения экстракта на 3 ячейки мишени провели повторно, но капля была выведена за пределы ячейки. При этом регистрация масс-спектров в данном случае осуществлялась в автоматическом режиме с использованием функции AutoExecute, а число масс-спектров, получаемых с одной ячейки, было таким же, как и в предыдущем случае. При оценке сходимости для каждой серии измерений интенсивности сигналов

нормировали на значение интенсивности пика моноолеата бария (m/z 419,16). Как показано в Таблице 9, результаты, полученные при двух различных режимах регистрации масс-спектров, хорошо согласуются между собой, и при автоматическом режиме получения масс-спектров CV не превышает 10%.

Таблица 9 – Значения внутриденной сходимости результатов, полученные для н-гексанового экстракта из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3 при двух различных режимах регистрации спектров

Обозначение СЖК	m/z [M-H+Ba] ⁺	Нормированная интенсивность			
		Регистрация спектров вручную		Автоматический режим регистрации спектров	
		Среднее±SD	CV,%	Среднее±SD	CV,%
C14:0	365,106	0,086±0,008	9,2	0,068±0,004	6,2
C15:0	379,124	0,102±0,009	8,8	0,095±0,005	5,2
C16:1	391,124	0,283±0,016	5,8	0,372±0,034	9,1
C16:0	393,137	0,548±0,031	5,6	0,531±0,032	6,1
C18:2	417,145	0,381±0,020	5,3	0,358±0,024	6,7
C18:0	421,169	1,661±0,167	10,1	1,964±0,114	5,8

Таким образом, была оптимизирована методика анализа СЖК в биологических образцах методом МАЛДИ-МС с использованием технологии Ленгмюра. Проведение масс-спектрометрического анализа в режиме автоматической регистрации масс-спектров позволило значительно снизить трудозатраты оператора и получить воспроизводимые результаты.

3.3.9 Профилирование СЖК в агробактериях *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021

Для того, чтобы проиллюстрировать потенциал разработанной методики анализа СЖК методом МАЛДИ-МС с использованием адаптированной к полусферической поверхности водной субфазы технологии Ленгмюра, мы провели сравнительное исследование состава и относительного количественного содержания СЖК двух близких видов ризобий: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021. Для каждого вида ризобий было исследовано по 4 биологических повтора, при этом для каждого биологического повтора лизис клеток осуществляли в двух разных средах: деионизованной воде и н-гексане. Затем каждый экстракт наносили на три ячейки мишени и с каждой ячейки регистрировали по три масс-спектра в автоматическом режиме.

По результатам анализа экстрактов из обоих видов ризобий было выявлено по 9 сигналов, которые по значению m/z , наличию характерного изотопного распределения и

результатам МС/МС анализа были отнесены к монокарбоксилатам бария (Таблица 11). Важно отметить, что при лизисе в водных условиях (Рисунок 35А,Б) были получены примерно в два раза большие интенсивности в спектрах и лучшее соотношение сигнал/шум в сравнении с теми, которые были получены при лизисе н-гексаном (Рисунок 35В,Г). Сравнение спектров, полученных для разных видов при одинаковых условиях (Рисунок 35А,В и Б,Г) не выявило различий в наборе сигналов: не было обнаружено СЖК характерных для конкретного вида.

Таблица 11 – Список СЖК, обнаруженных в н-гексановых экстрактах из водных и н-гексановых лизатов клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021

№	m/z [M-H+Ba] ⁺	Аннотация аналитов				
		Обозначение	Ошибка (ppm)	Изотопное распределение	МС/МС	Название СЖК
1	363,094	C14:1	8,2	+	-	Миристолеиновая
2	365,108	C14:0	5,5	+	+	Миристиновая
3	377,107	C15:1	2,7	+	-	Пентадеценовая
4	379,120	C15:0	-5,3	+	+	Пентадекановая
5	391,124	C16:1	5,1	+	+	Пальмитолеиновая
6	393,137	C16:0	-2,6	+	+	Пальмитиновая
7	417,142	C18:2	9,6	+	+	Линолевая
8	419,156	C18:1	7,2	+	+	Олеиновая
9	421,169	C18:0	2,4	+	+	Стеариновая

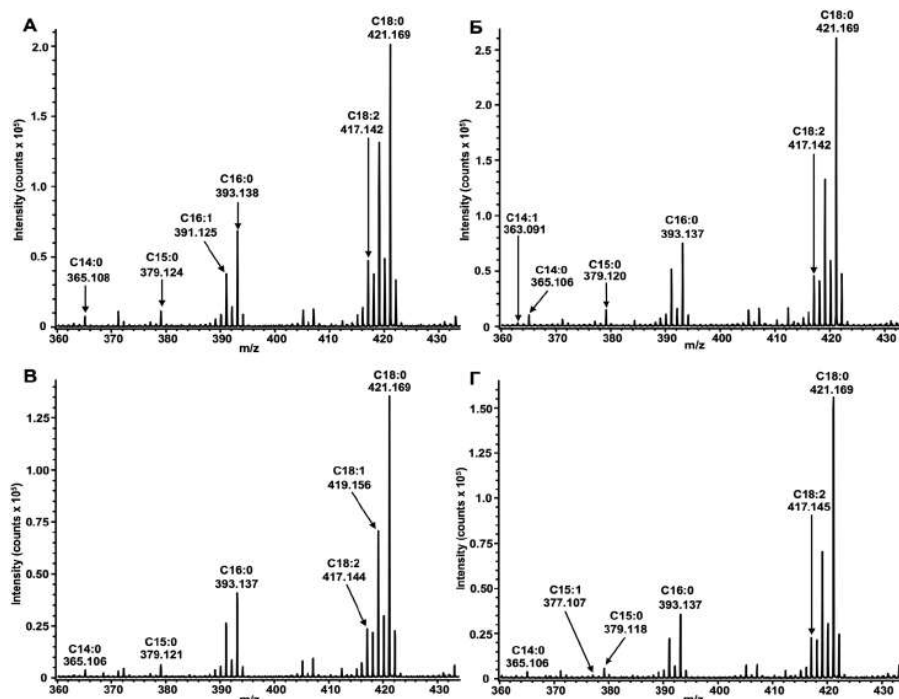


Рисунок 35 – МАЛДИ масс-спектры экстрактов, полученных из водных (А,Б) и н-гексановых (В,Г) лизатов клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 (А,В) и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021 (Б,Г)

Различия в относительном содержании идентифицированных СЖК между двумя видами ризобий оценивали методом дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2. Предварительно необходимо было определиться типом нормализации интенсивностей в зарегистрированных масс-спектрах. Мы предположили, что нормализация на мажорные компоненты обнаруженного пула СЖК может помочь скорректировать возможные вариации в значениях интенсивностей сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария, в спектрах, полученных с различных ячеек МАЛДИ мишени. Поэтому, для нормализации интенсивности сигналов мы использовали интенсивности сигналов m/z 393, 419 и 421, соответствующих пальмитиновой, олеиновой и стеариновой кислотам, а также значение полного ионного тока. Также нами было проведено сравнение двух вариантов экстракции СЖК при лизисе клеток деионизованной водой и *n*-гексаном.

Число статистически значимо различающихся ($p < 0,05$) по относительному содержанию СЖК идентифицированных в лизатах *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *S. meliloti* RCAM1021, зависело от выбранного типа нормализации, а также от типа экстракции. В случае нормализации по m/z 393 было выявлено 3 и 7 статистически значимо различающихся СЖК для *n*-гексанового и водного лизатов, соответственно. В свою очередь, при нормализации по m/z 393 было выявлено 1 и 5 статистически значимо различающихся СЖК для *n*-гексанового и водного лизатов, соответственно, а при нормализации по полному ионному току значимо отличающихся СЖК обнаружено не было. При нормализации на интенсивность сигнала m/z 421 было обнаружено наибольшее число статистически значимо различающихся СЖК в составе лизатов *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *S. Meliloti* RCAM1021: 6 для *n*-гексановых и 5 для водных лизатов (Рисунок 36).

Следует отметить, что, несмотря на то, что при лизисе *n*-гексаном интенсивность сигналов в масс-спектрах была ниже (Рисунок 35), разделение двух видов ризобий по результатам анализа методом главных компонент (Рисунок 37А,В) оказалось лучше, как и меньшая дисперсия между биологическими повторами, что может быть проиллюстрировано соответствующими тепловыми картами (Рисунок 37Б,Г). Иерархическая кластеризация всех отдельных спектров, включая все технические повторы, однозначно показывает, что лизис *n*-гексаном является предпочтительным методом с точки зрения сходимости результатов (Рисунок 38). Результаты, полученные с

помощью других типов нормализации, показали худшее разделение между двумя видами ризобий, по сравнению с нормализацией по m/z 421.

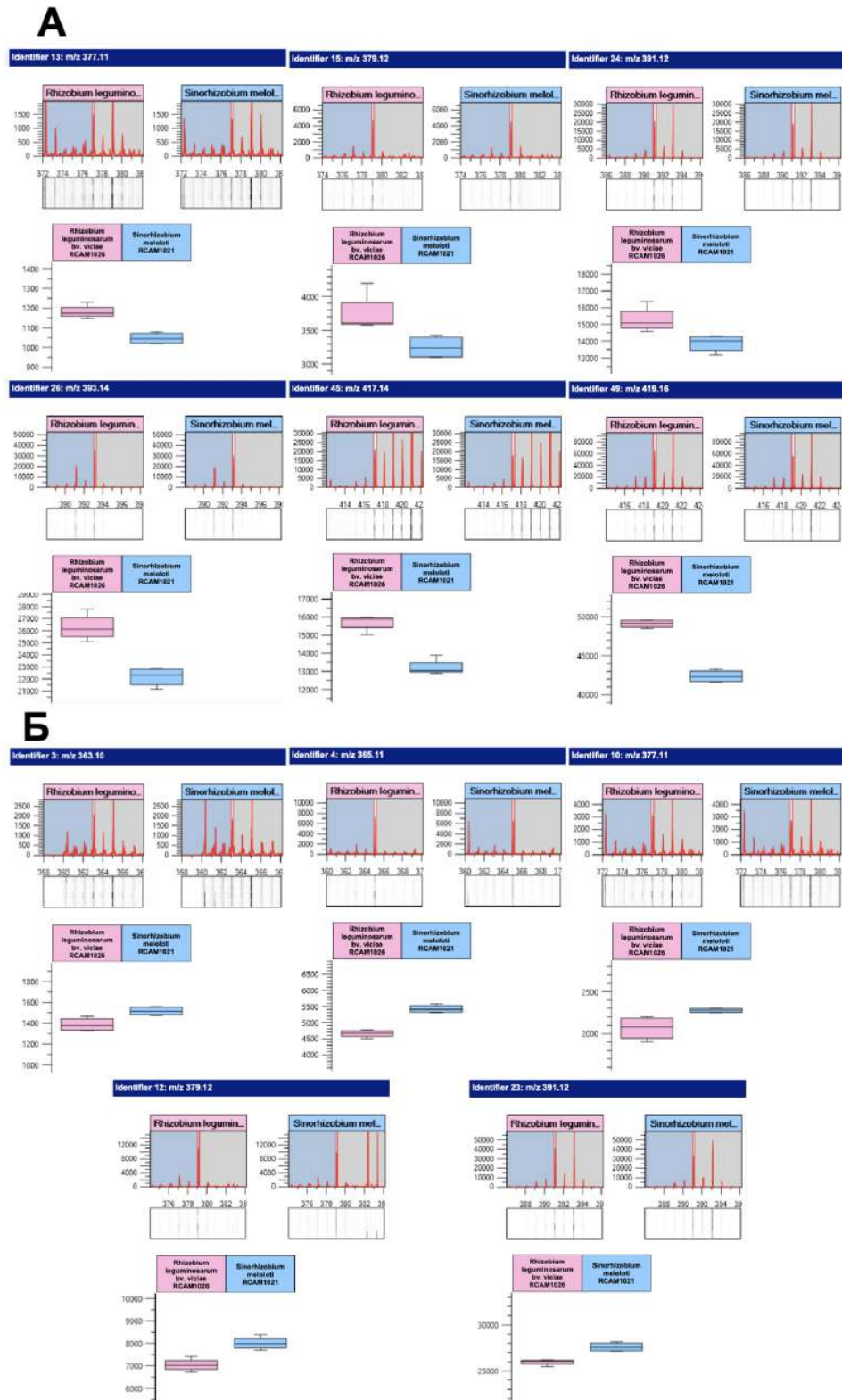


Рисунок 36 – Протоколы результатов дисперсионного анализа (Progenesis MALDI 1.2) для статистически значимо ($p < 0,05$) отличающихся СЖК в составе н-гексановых (А) и водных (Б) лизатов *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *S. meliloti* RCAM1021

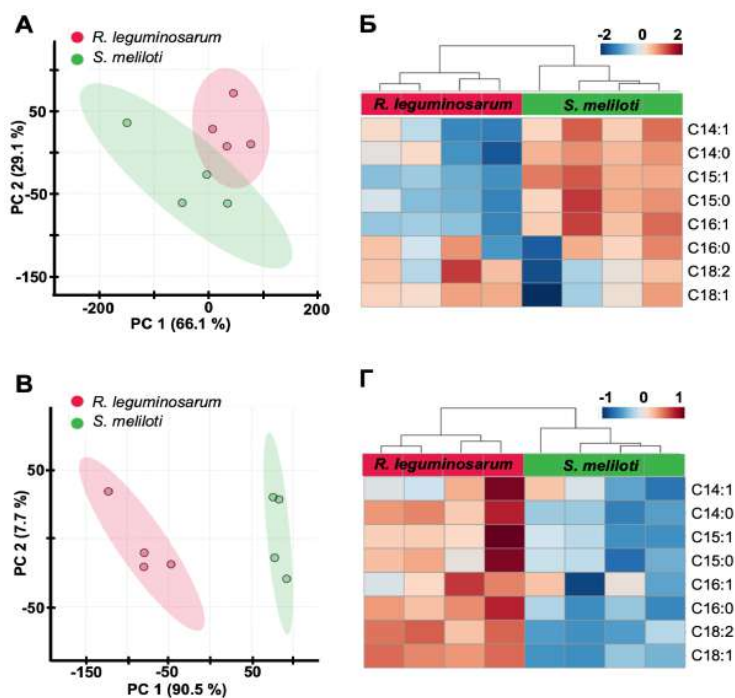


Рисунок 37 – Графики с результатами анализа методом PCA (А и В), построенные для первых двух главных компонент, и тепловые карты (Б и Г) изменений содержания СЖК между образцами *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *S. Meliloti* RCAM1021, полученные при экстракции из водных (А и В) и н-гексановых лизатов (В и Г). Интенсивности сигналов были нормированы на интенсивность сигнала m/z 421,17

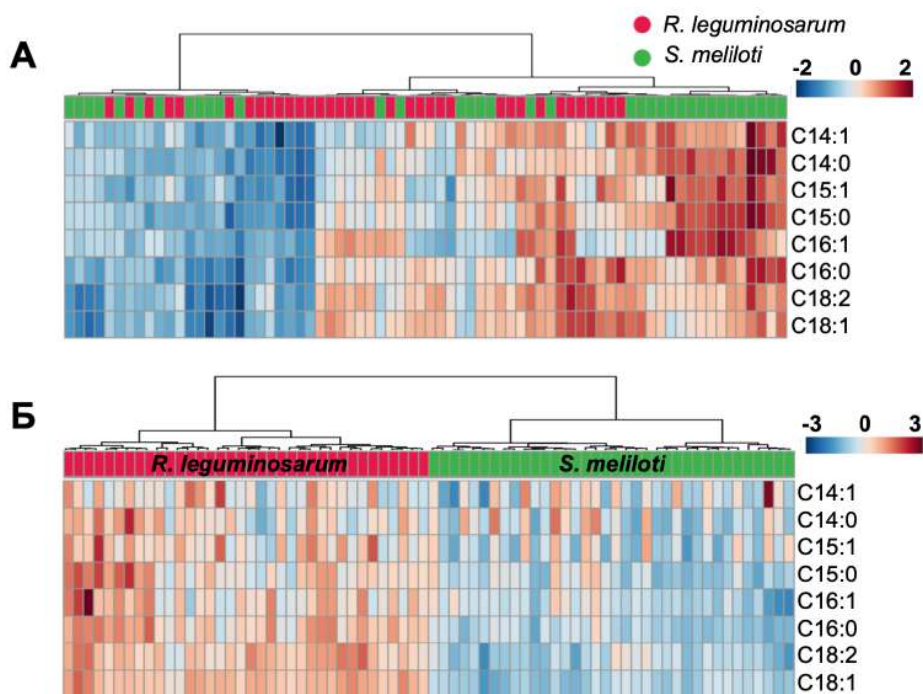


Рисунок 38 – Тепловые карты изменений содержания СЖК с учётом всех масс-спектров (биологические и технические повторности), для образцов *R. leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *S. Meliloti* RCAM1021, полученные при экстракции из водных (А) и н-гексановых лизатов (Б). Интенсивности сигналов были нормированы на интенсивность сигнала m/z 421,17

Таким образом, можно сделать вывод, что использование технологии Ленгмюра в комбинации с МАЛДИ-МС позволяет анализировать большие группы образцов, а проведение масс-спектрометрического анализа в режиме автоматической регистрации масс-спектров позволяет значительно снизить трудозатраты оператора и получить воспроизводимые результаты.

3.4 Исследование механизма образования ионов при МАЛДИ-МС анализе полипренолов в виде моноалкоголятов бария

С точки зрения масс-спектрометрического анализа вследствие крайне низкой способности к ионизации особый интерес представляет такой класс соединений, как жирные спирты, в том числе полипренолы. Опираясь на опыт, полученный при использовании технологии Ленгмюра для анализа СЖК методом МАЛДИ-МС в виде монокарбоксилатов бария, нами было сделано предположение о возможности применения данного подхода для других липофильных гидроксилсодержащих соединений, в частности, полипренолов. При этом мы предположили, что данные соединения в силу наличия у них амфифильных свойств также, как и СЖК, способны образовывать мономолекулярные пленки на поверхности водной субфазы. В качестве объекта исследования был использован экстракт из хвои пихты сибирской (*Abies sibirica* L.) с содержанием полипренолов 90%.

Для исследования возможности образования монослоя на основе полипренолов на поверхности водной субфазы было проведено исследование зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на одну молекулу полипренола на поверхности. Было установлено, что при малых значениях площади, приходящейся на одну молекулу, наблюдался рост поверхностного давления, что свидетельствует об образовании ориентированного конденсированного монослоя полипренолов на границе раздела фаз, и, следовательно, о плотной упаковке гидроксильных групп в поверхностном слое (Рисунок 39).

На следующем этапе монослои полипренолов получали в чашке Петри, заполненной водным раствором ацетата бария ($C=1$ мг/мл). Для формирования монослоя на поверхность водной фазы наносили раствор смеси полипренолов в н-гексане. Затем с помощью барьеров поджимали пленку, образовывавшуюся на поверхности водной субфазы, и собирали её с помощью предметного стекла. Собранную на стекле пленку промывали несколько раз деионизированной водой, чтобы отмыть от остатков ацетата

бария, после чего смывали её в микропробирку изопропанолом. Полученный раствор анализировали методом МАЛДИ-МС с использованием в качестве МАЛДИ матрицы ДНВ. В масс-спектре обнаружился ряд сигналов, соответствовавших по значению m/z моноалкоголятам бария полипренол гомологов с числом изопреновых звеньев в составе от 14 до 18 (Рисунок 40).

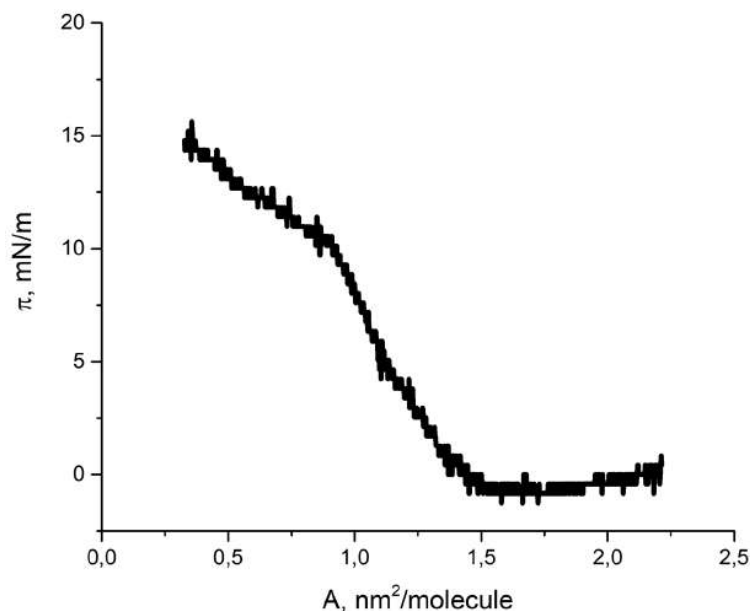


Рисунок 39 – Зависимость поверхностного давления от площади, приходящейся на одну молекулу, для смеси полипренолов из *Abies sibirica* L.

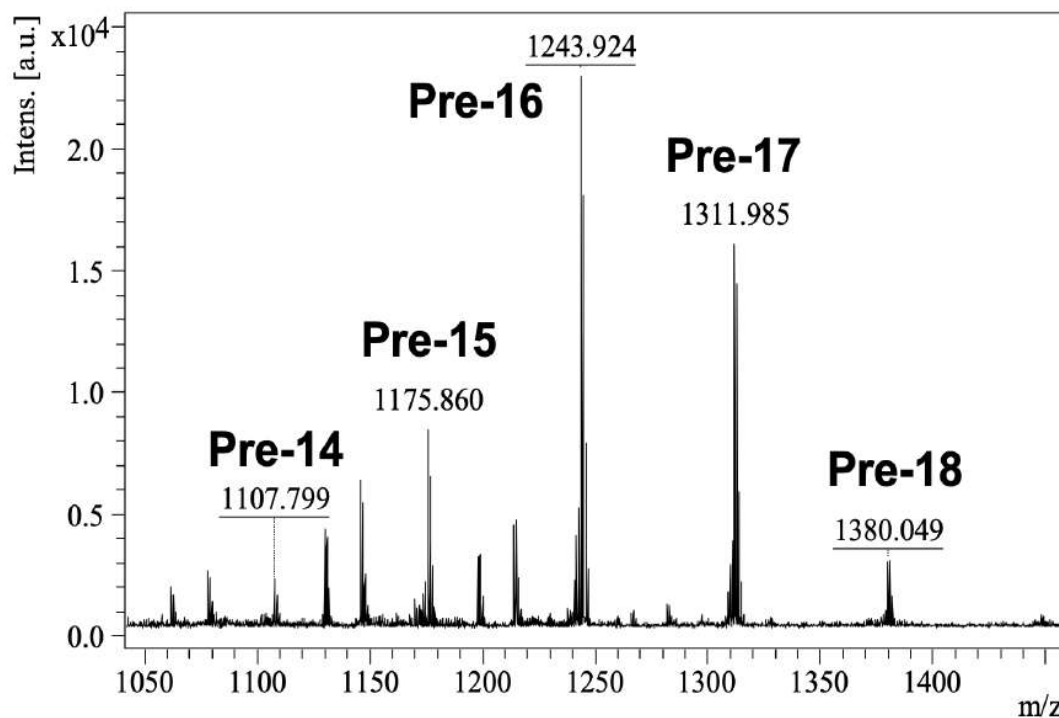


Рисунок 40 – МАЛДИ масс-спектр монослоев полипренолов из пихты сибирской, полученных в чашке Петри, заполненной водным раствором ацетата бария

Проведенный эксперимент позволил сделать предположение о возможности получения монослоев, состоящих из моноалкоголятов бария, с использованием технологии Ленгмюра для получения тонких пленок непосредственно на ячейке МАЛДИ мишени. При нанесении раствора смеси полипренолов в н-гексане на каплю водного раствора, содержащего ацетат бария и ДНВ, было установлено, что, как и в случае с СЖК, успешное формирование монослоя в пределах ячейки мишени возможно при объемах водной капли и н-гексанового раствора полипренолов равных 0,6 мкл.

В масс-спектре (Рисунок 41), полученном при анализе монослоев полипренолов, сформированных на ячейке мишени, было обнаружено 9 сигналов с близким к гауссовому распределением полимер гомологов, что характерно для полипренолов, выделенных из пихтовых деревьев [154].

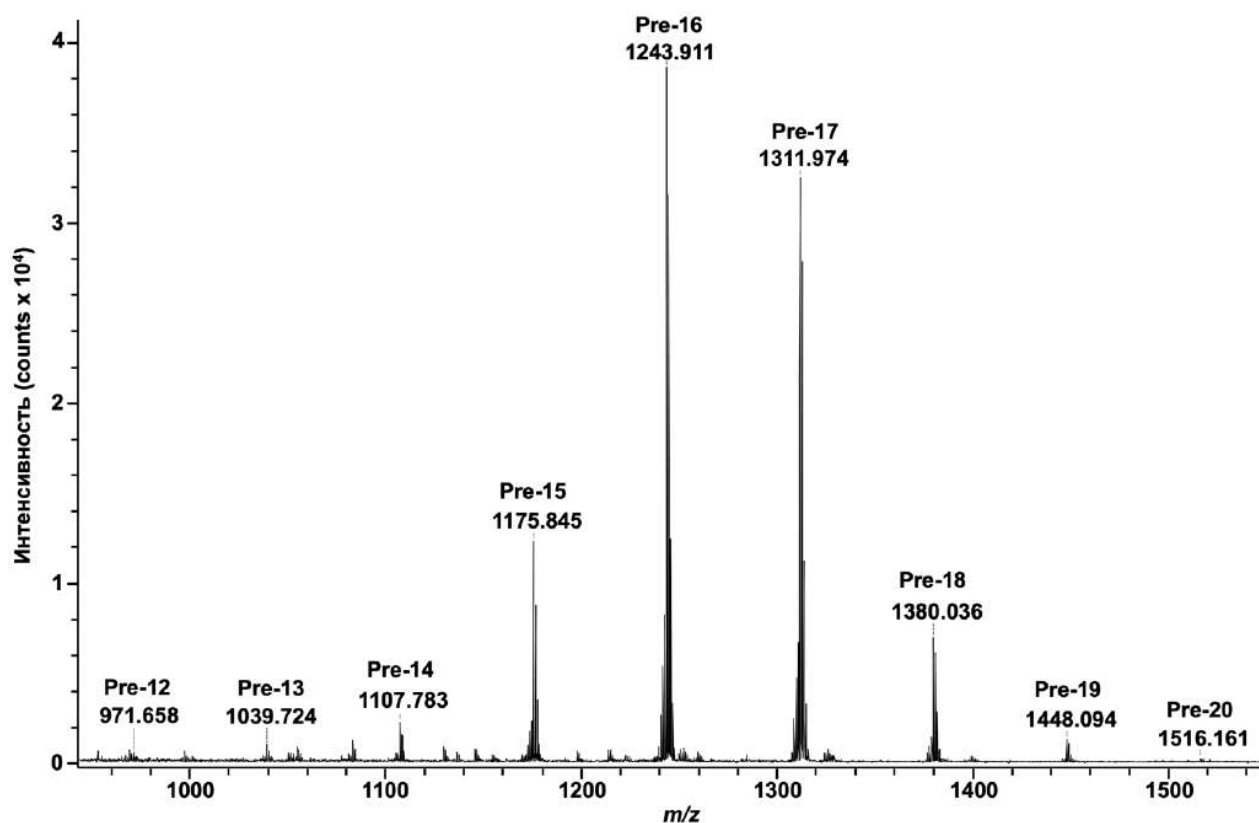


Рисунок 41 – МАЛДИ масс-спектр смеси полипренолов из *Abies sibirica* L. в концентрации 100 мкг/мл

Разница в m/z между соседними пиками составила 68, что соответствует молекулярной массе изопренового звена (C_5H_8). Значение m/z основного пика в масс-спектре (m/z 1243,911) соответствовало расчетному значению для иона $[M-H+Ba]^+$ полипренола с 16 изопреновыми звеньями (Pre-16, m/z 1243,910). Кроме того, вид изотопного распределения этого сигнала совпадал с расчетным для молекулы с брутто-

формулой $C_{80}H_{129}O_8Ba^+$ (Рисунок 42). Значения m/z остальных сигналов в масс-спектре также хорошо согласовывались с теоретическими значениями ионов $[M-H+Ba]^+$ других гомологов полипренолов (от 12 до 20 изопреновых звеньев). Следует также отметить, что набор полипренолов *Abies sibirica* L., установленный с помощью предлагаемого подхода, согласовывался с данными, полученными Vanaga и соавторами в работе [118] при исследовании липофильного экстракта из хвои *Abies sibirica* L. с использованием ОФ-ВЭЖХ-ИЭР-МС. Таким образом, можно заключить, что предложенный подход позволяет анализировать полипренолы методом МАЛДИ-МС в виде моноалкоголятов бария.

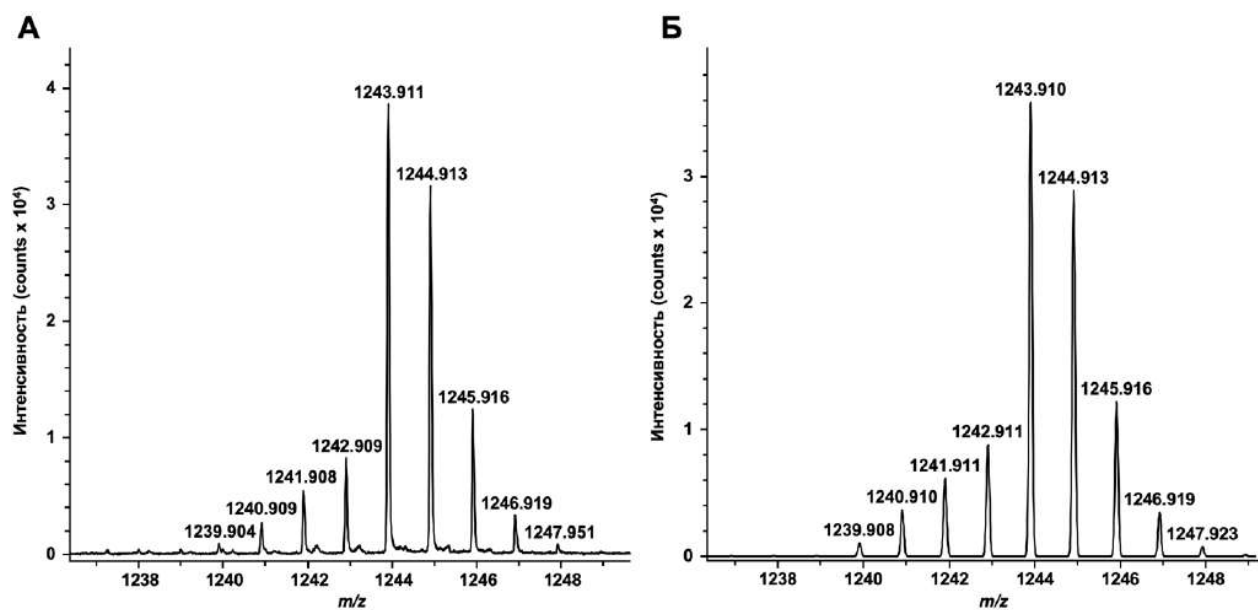


Рисунок 42 – Фрагмент МАЛДИ масс-спектра смеси полипренолов из *Abies sibirica* L. в концентрации 100 мкг/мл (А); расчетное изотопное распределение иона с брутто-формулой $C_{80}H_{129}O_8Ba^+$ (Б)

Для подтверждения идентификации полипренолов в виде $[M-H+Ba]^+$ был проведен тандемный масс-спектрометрический анализ ионов с соответствующими значениями m/z . В полученном тандемном масс-спектре (Рисунок 43) для иона-предшественника с m/z 1243,947 наблюдалась серия сигналов, соответствующих последовательному отщеплению изопреновых звеньев (68 Да), которая начиналась с иона-продукта m/z 221,003 ($C_5H_7O_8Ba^+$, $m/z_{расч}$ 220,955). Таким образом, результаты МАЛДИ-МС/МС анализа позволили подтвердить идентификацию полипренолов в виде $[M-H+Ba]^+$ ионов.

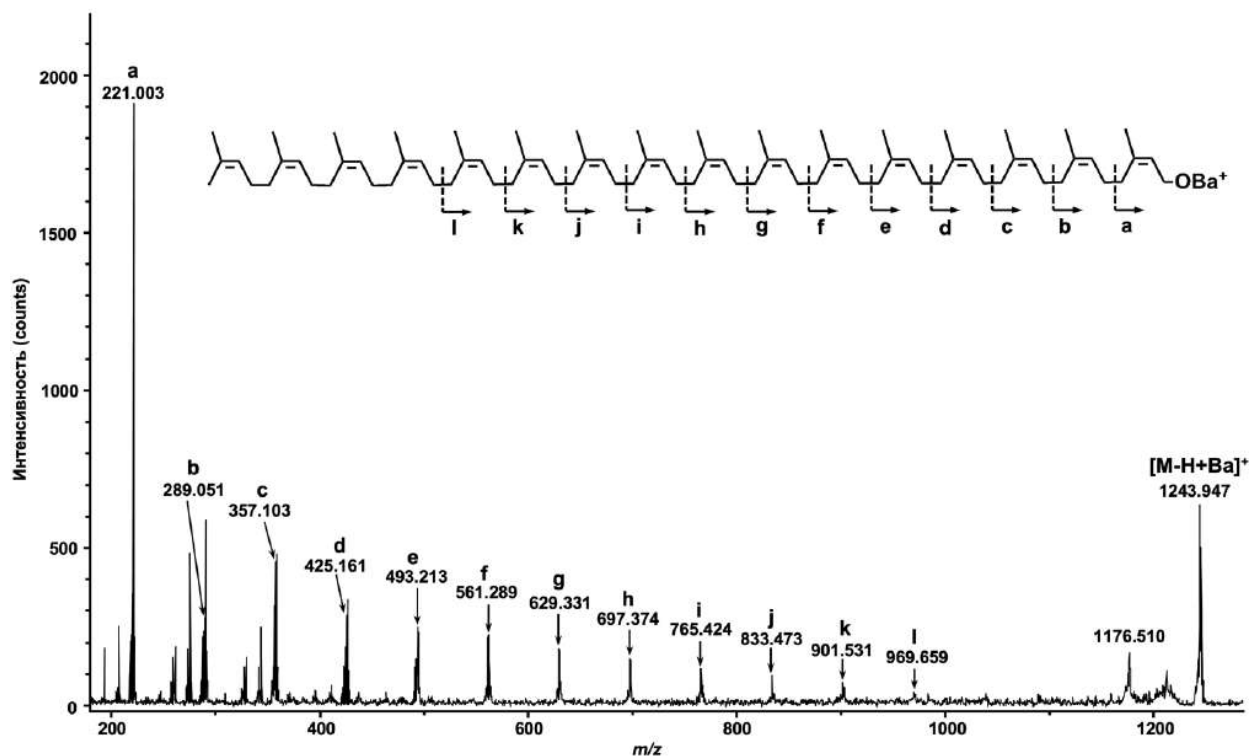


Рисунок 43 – МС/МС спектр m/z 1243,947, соответствующего $[M-H+Ba]^+$ иону полипренола с 16 изопреновыми звеньями

Важно отметить, что обработка сформированных монослоев 90% водным ацетонитрилом после полного высыхания водной капли представляла собой необходимый шаг в подготовке образца перед МАЛДИ-МС анализом. В масс-спектре, полученном для образца без обработки водным ацетонитрилом (Рисунок 44А), в диапазоне m/z 900-1500 не обнаруживалось сигналов, соответствующих моноалкоголятам бария полипренолов, в то время как после обработки данные сигналы надежно регистрировались (Рисунок 44Б). Капля 90% водного ацетонитрила первоначально покрывала всю площадь нанесенного образца и при высыхании собиралась на относительно небольшой площади ячейки. Лазерная десорбция проводилась вне области высушенной капли, то есть из области, покрытой мультимолекулярной структурой, образованной монослоями. Масс-спектры, полученные в области высушенной капли, были трудны для интерпретации и не содержали сигналов ионов $[M-H+Ba]^+$ при концентрациях полипренолов ниже 10 мкг/мл. По-видимому, во время обработки 90% водным ацетонитрилом происходит удаление с поверхности монослоев гидрофильных компонентов образца, а также избытка ДНВ и соли бария, которые могут затруднять МАЛДИ-МС анализ целевых соединений.

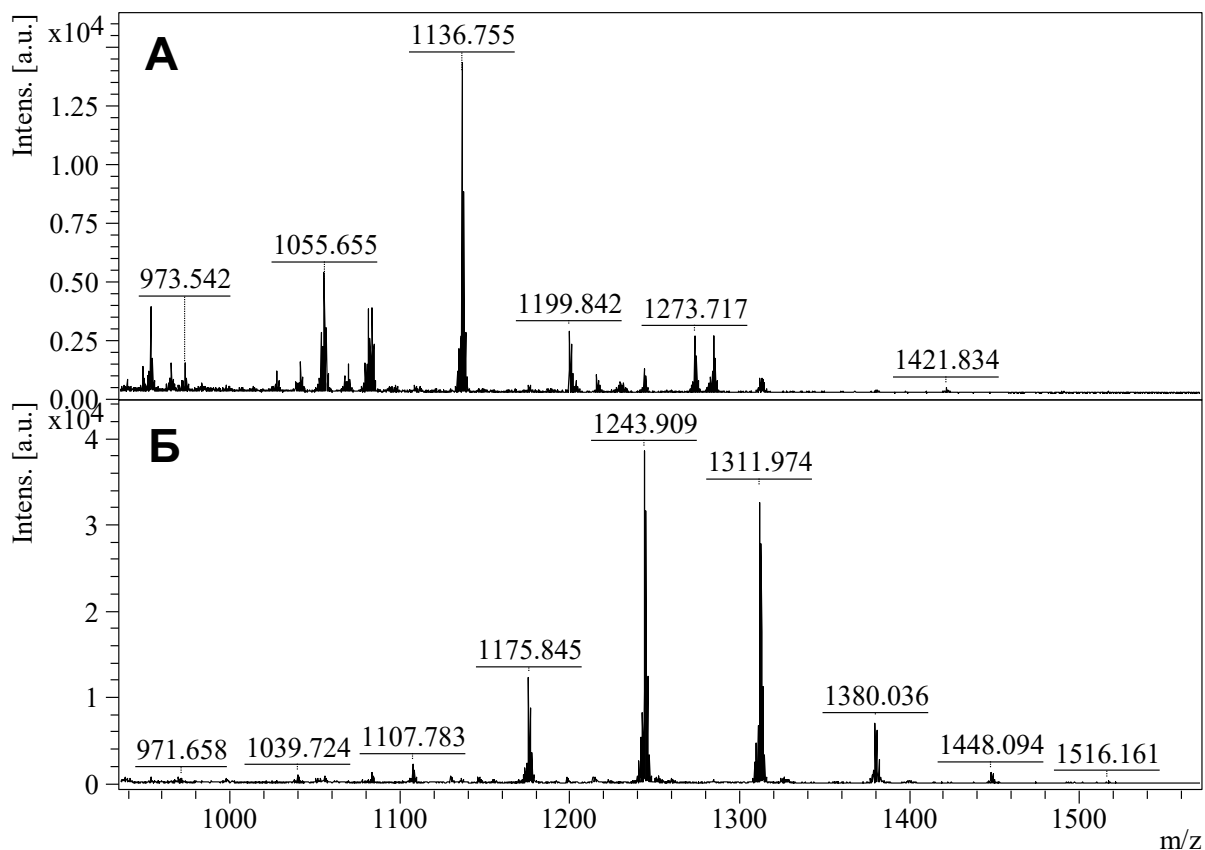


Рисунок 44 – МАЛДИ масс-спектр смеси полипrenoлов из *Abies sibirica* L. в концентрации 100 мкг/мл до (А) и после обработки 90% водным ацетонитрилом (Б)

Для оценки чувствительности предлагаемого подхода была проанализирована серия разбавлений н-гексанового раствора полипrenoлов *Abies sibirica* L. (от 100 мкг/мл до 5 нг/мл). Значение LOD определяли по соотношению сигнал/шум для сигнала наиболее распространенного полимер гомолога Pre-16 (m/z 1243,9). Выяснилось, что предел обнаружения полипrenoлов при использовании предложенного подхода составил 6 пг смеси полипrenoлов на мишени (на ячейку мишени наносили 1,2 мкл раствора смеси полипrenoлов с концентрацией 5 нг/мл) (Рисунок 45). Таким образом, чувствительность данного подхода сравнима с достигаемой при помощи методов, использующих ионизацию электрораспылением с добавлением следовых количеств соли натрия [114] или фотоионизацию при атмосферном давлении [120]. Однако следует отметить, что оценка предела обнаружения в данном случае приведена для смеси полипrenoлов и, можно ожидать, что при исследовании отдельных полипренол гомологов данное значение может оказаться ниже.

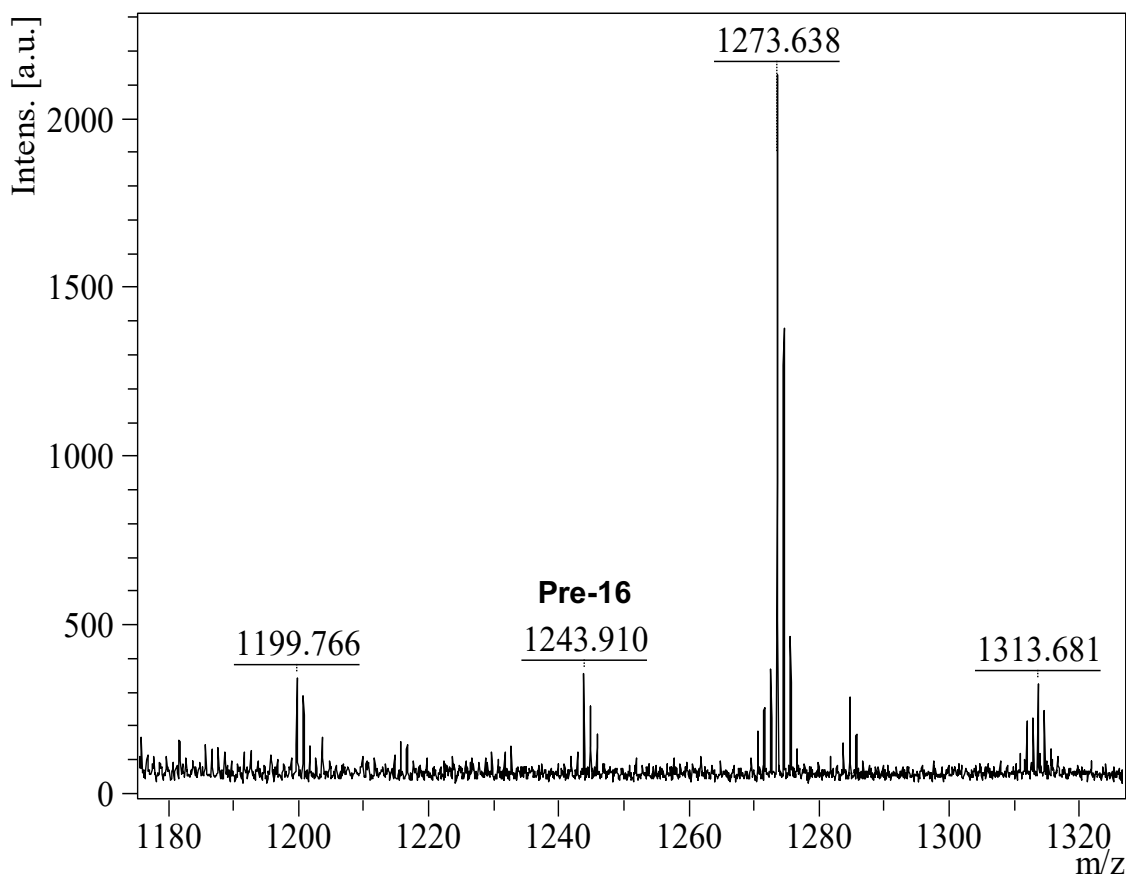


Рисунок 45 – МАЛДИ масс-спектр смеси полипренолов из *Abies sibirica* L. в концентрации 5 нг/мл

Для апробации данного подхода нами было проведено исследование состава полипренолов в многокомпонентном биологическом образце – листьях гинкго билоба, который известен высоким содержанием полипренолов в своем составе (до 2% от сухого веса) [155]. В качестве экстрагента в данном подходе использовали смесь изопропанол/н-гексан=1/9. Полученный экстракт наносили на мишень в соответствии с разработанной на прошлых этапах методикой.

По результатам анализа в масс-спектре обнаруживалось 6 сигналов с близким к гауссовому распределению по интенсивности относительно базового пика и разницей между соседними сигналами в 68 Да (Рисунок 46). Наиболее интенсивный сигнал (m/z 1311,976) соответствовал моноалкоголяту бария полипренола с 17 изопреновыми звеньями в составе ($m/z_{\text{расчетное}}$ 1311,972). Значения m/z для остальных сигналов в масс-спектре также хорошо согласовывались с расчётными данными для $[M-H+Ba]^+$ ионов других полимер-гомологов полипренола (от 15 до 20 изопреновых звеньев). Полученные данные хорошо согласуются со сведениями о составе полипренолов по данным литературных источников [112].

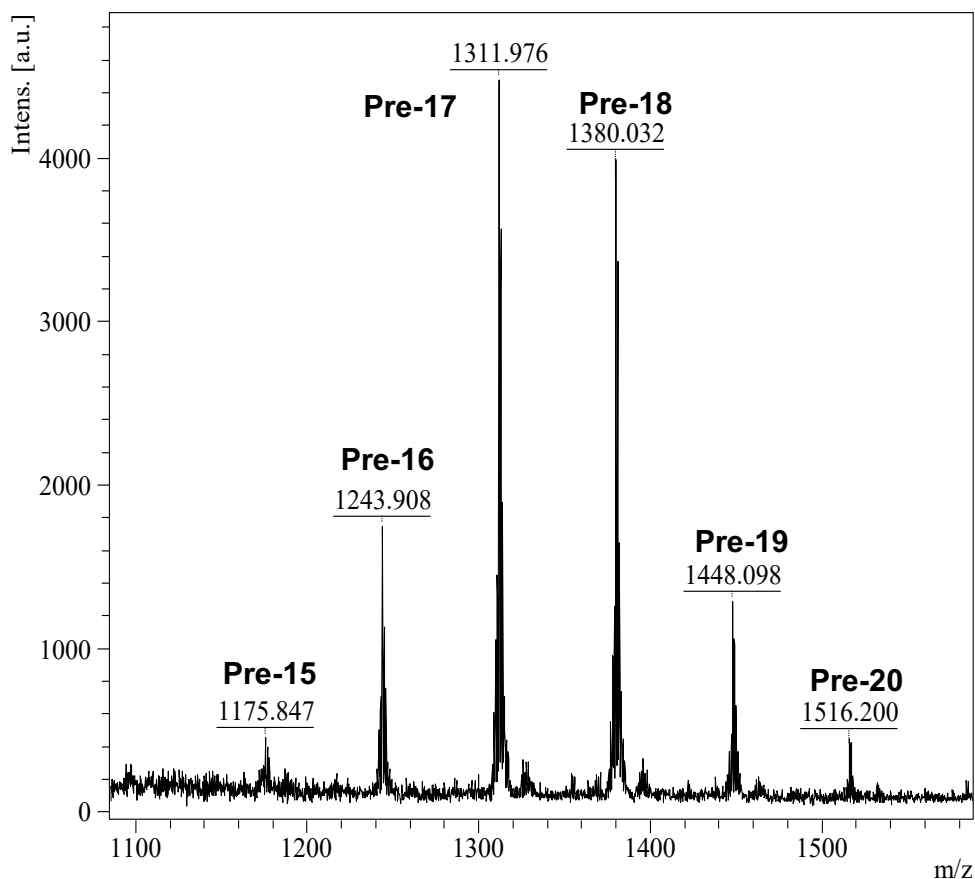


Рисунок 46 – МАЛДИ масс-спектр экстракта из сухих листьев гинкго билоба

Полипренолы, как непредельные спирты относятся к неионогенным ПАВ, и поэтому трудно было ожидать от них выраженного взаимодействия с ионами щелочноземельного металла (бария) на границе раздела водно-органических сред. Тем не менее, в масс-спектрах полипренолы регистрировались именно в форме ионов моноалкоголятов бария.

В связи с этим представляли интерес возможные механизмы образования $[M-H+Ba]^+$ ионов полипренолов при использовании предложенного подхода. Нами было выдвинуто предположение о двух вероятных способах формирования данных ионов: 1) так же как и в случае СЖК, образование смешанной соли в ходе реакции на границе раздела органической и водной фаз с отщеплением под воздействием лазерного импульса нежирного кислотного остатка; 2) в результате ион-молекулярных реакций в газовом облаке после облучении образца

Согласно первой версии, при формировании ориентированных монослоев на поверхности водной субфазы, тем более, в случае, когда поверхность является выпуклой (на поверхности капли раствора соли бария), гидроксильные группы полипренолов будут

сольватироваться водной фазой. Следовательно, такое расположение молекул полипренола будет приводить к плотной упаковке гидроксильных групп на поверхности капли, и как следствие изменению реакционной способности полипренольных гидроксигрупп в составе монослоя. В результате, возможно образование алкоголята $H(C_5H_8)_nO-Ba-OAc$, далее ионизирующегося под действием лазера до катиона $H(C_5H_8)_nO-Ba^+$.

В свою очередь при рассмотрении механизмов образования $[M-H+Ba]^+$ ионов полипренолов при МАЛДИ-МС анализе необходимо также учитывать возможность образования таких ионов в результате реакций в газовом облаке, образовавшемся при облучении образца лазерным импульсом. В источнике ионов под воздействием лазерного излучения происходит абляция пробы с образованием области высокого давления газового облака, в котором в зависимости от соотношения веществ в результате ионно-молекулярных реакций образуются положительные и отрицательные ионы. В рассматриваемом случае можно предположить, что образование положительного иона $[M-H+Ba]^+$ происходит в результате реакции замещения протона в гидроксильной группе молекулы полипренола, имеющего энергию связи порядка 2-5 эВ, ионом двухзарядного бария с потенциалом ионизации 10 эВ. При этом протон отщепляется, а на его место становится двухзарядный ион бария, что приводит к образованию однозарядного ионного комплекса с барием [156].

Для того чтобы выяснить, какой из механизмов дает основной вклад при образовании моноалкоголятов бария был проведен дополнительный эксперимент, определяющий чувствительность анализа при минимизации вероятности прохождения реакции на границе раздела фаз. Нами были рассмотрены четыре способа нанесения образца на мишень (Рисунок 47), отличавшиеся между собой как по свойствам используемого растворителя в органической фазе (неполярный н-гексан; полярный изопропанол), так и по свойствам поверхности, с которой вступают в контакт молекулы полипренола (поверхность водной капли раствора соли бария и ДНВ; кристаллы ацетата бария и ДНВ, образовавшиеся после высыхания водной капли).

На первом этапе была произведена замена органического растворителя с неполярного (н-гексан, Рисунок 47А) на полярный (изопропанол, Рисунок 47Б). Как показано в Таблице 12, замена н-гексана на изопропиловый спирт привела к незначительному снижению чувствительности предложенного подхода: от 5 нг/мл для н-

гексана до 20 нг/мл для изопранола. Это может быть обусловлено тем, что при нанесении на водную каплю изопранола происходит смешивание его с водой, что приводит к частичному переходу молекул полипренолов в объем водно-спиртовой смеси и, как следствие, снижению их концентрации на поверхности. Соответственно, количество полипренолов в ориентированном монослое на поверхности капли снижается, что вызывает уменьшение числа молекул в монослое, способных взаимодействовать с ионами бария, и как следствие оказывает негативное влияние на чувствительность анализа.

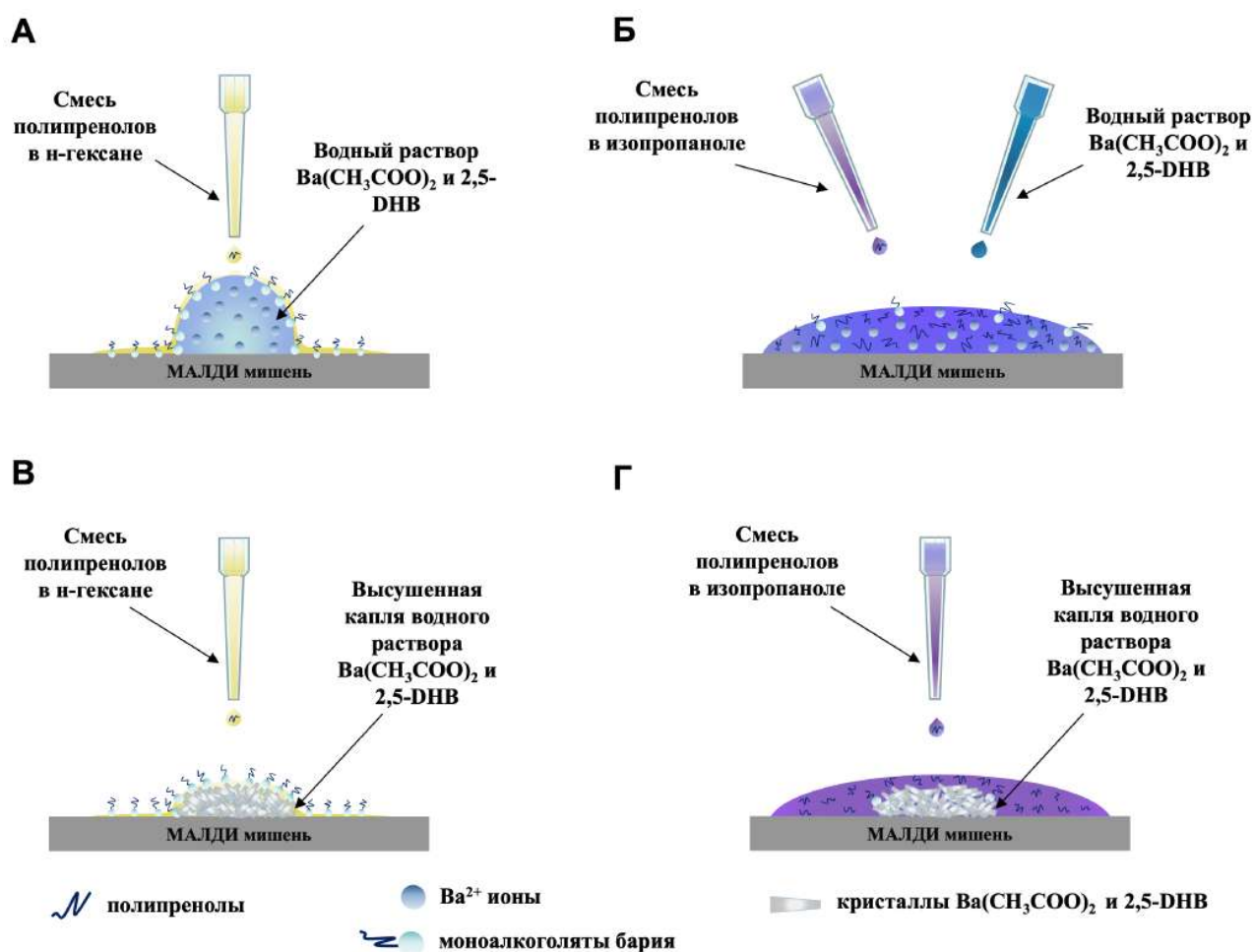


Рисунок 47 – Схематическое представление четырех различных способов нанесения растворов полипренолов

Таблица 12 – Значения предела обнаружения при различных условиях подготовки и нанесения образца

Растворитель	Предел обнаружения (мкг/мл)	
	Водная капля DHB и Ва(СН ₃ СОО) ₂	Высохшая водная капля DHB и Ва(СН ₃ СОО) ₂
н-гексан	0,005	0,005
изопропанол	0,02	10

Затем нами был рассмотрен вариант двухфазной системы, при котором смесь полипренолов в изопропанолe наносили на кристаллы ацетата бария и ДНВ, практически исключая возможность протекания реакции образования моноалкоголятов на поверхности раздела фаз ввиду отсутствия условий для ориентации амфифильного соединения (Рисунок 47Г). В данных условиях нами были зарегистрированы целевые сигналы моноалкоголятов бария только при концентрации 10 мкг/мл, что отличалось на несколько порядков в большую сторону по сравнению с результатами, полученными в предыдущих случаях (5-20 нг/мл). Это подтвердило предположение, что в данной системе образование ориентированного монослоя на границе раздела фаз практически неосуществимо в связи с сольватацией молекулами изопропанола как ионов бария, так и гидроксильных групп полипренолов. Это делает невозможным образование на поверхности ориентированных монослоев полипренолов. Соответственно, обнаружение в масс-спектре сигналов, соответствующих $[M-H+Ba]^+$ ионам полипренолов, может свидетельствовать об образовании данных ионов в результате реакций в газовой фазе, происходящих при облучении образца лазером в условиях МАЛДИ-МС анализа.

Однако в случае, когда пробоподготовка включала нанесение раствора полипренолов в н-гексане на кристаллы ацетата бария и ДНВ (Рисунок 47В) чувствительность анализа оказалась такой же высокой (5 нг/мл), как в случае с нанесением н-гексанового раствора на водную каплю (Рисунок 47А). Можно предположить, что при испарении н-гексанового раствора полипренолов на поверхности кристаллов ацетата бария, ориентация молекул полипренола также происходит, и полярная гидроксильная группа вступает в контакт с ионом бария. За счет этого при лазерном испарении образца достигается высокий выход моноалкоголятов бария, а соответственно и высокая чувствительность.

Соответственно, можно сделать вывод, что основной вклад при образовании ионов $[M-H+Ba]^+$ вносит отщепление нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса, а методика, основанная на формировании на МАЛДИ мишени монослоев бариевых солей, может быть успешно использована для анализа неионогенных ПАВ (полипренолов).

Таким образом, разработанный метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы позволяет

значительно повысить выход ионов при МАЛДИ-МС анализе по сравнению с исходными соединениями, особенно в случае неионогенных ПАВ. Разработанная методика анализа может быть эффективно использована в экспериментах, требующих значительного количества, как экспериментальных, так и технических повторов в том числе для профилирования свободных жирных кислот и полипренолов в составе биологических образцов различной природы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы для дальнейшего масс-спектрометрического анализа, позволяющий сократить время пробоподготовки и увеличить чувствительность анализа амфифильных соединений методом МАЛДИ-МС.

2. Доказано, что технология Ленгмюра, адаптированная к поверхности капли, позволяет формировать мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев стеарата бария в пределах ячейки МАЛДИ мишени в результате самопроизвольного перемещения монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести.

3. Продемонстрировано, что нанесение смеси свободных жирных кислот в н-гексане приводит к образованию регулярного монослоя монокарбоксилатов бария, что позволяет проводить профилирование свободных жирных кислот методом МАЛДИ-МС с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

4. Установлено, что при МАЛДИ-МС анализе амфифильных соединений в виде их солей бария основным механизмом образования иона $[M-H+Ba]^+$ является отщепление нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса.

5. На примере полипренолов с помощью метода МАЛДИ-МС показано, что образование солей амфифильных соединений, относящихся к неионогенным ПАВ, происходит на границе раздела фаз при нанесении н-гексанового раствора ПАВ на поверхность водной субфазы, содержащей ионы металла.

6. Определены условия проведения эффективного МАЛДИ-МС анализа амфифильных соединений в виде их солей бария. Показано, что использование в качестве водной субфазы водного раствора ацетата бария в концентрации 0,25 мг/мл, содержащего органическую матрицу, 2,5-дигидроксибензойную кислоту, в концентрации 0,25 мг/мл, позволяет проводить эффективный масс-спектрометрический анализ свободных жирных кислот и ненасыщенных спиртов в составе монослоев, сформированных на МАЛДИ мишени. Установлено, что пределы обнаружения для смеси стандартов 5 насыщенных СЖК составили от 10 до 50 фмоль, а пределы количественного определения СЖК не

превышали 500 фмоль. Для полипrenoлов предел обнаружения составил 6 пг смеси полипrenoлов, выделенных из пихты сибирской.

7. Показано, что разработанная методика анализа амфифильных соединений в виде их солей бария методом МАЛДИ-МС может быть успешно использована для профилирования свободных жирных кислот и полипrenoлов в составе биологических образцов различной природы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AA – 9-аминоакридин

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ДМАН – 1,8-бис(диметиламино)нафталин

ИК – инфракрасный

ИЭР – ионизация электрораспылением

КР – комбинационное рассеяние

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

МАЛДИ-МС – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

МС/МС – тандемная масс-спектрометрия

МТПП – мезо-тетраakis(пентафлуорофенил)порфирин

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ОФ-ВЭЖХ-ИЭР-МС – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография с ионизацией электрораспылением и масс-спектрометрическим детектированием

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПИ – потенциал ионизации

ПЛБ – пленки Ленгмюра-Блоджетт

ПТФЭ – политетрафторэтилен

СЖК – свободные жирные кислоты

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУ – трифторуксусная кислота

ФИАД – фотоионизация при атмосферном давлении

DHB – 2,5-дигидроксибензойная кислота

CHCA – α -циано-4-гидроксикоричная кислота

SPCD – модель комбинированной физической и химической динамики

CV – коэффициент вариации

EDX – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

HSt – стеариновая кислота

LDR – линейный динамический диапазон

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

PCA – метод главных компонент

SD – стандартное отклонение

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ РАБОТЫ

1. Podolskaya, E.P. Thin Film Chemical Deposition Techniques as a Tool for Fingerprinting of Free Fatty Acids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry / E.P. Podolskaya, **A.S. Gladchuk**, O.A. Keltsieva, P.S. Dubakova, E.S. Silyavka, E. Lukasheva, V. Zhukov, N. Lapina, M.R. Makhmadaliev, A.M. Gzgzyan, N.G. Sukhodolov, K.A. Krasnov, A.A. Selyutin, A. Frolov // *Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 91. – № 2. – P. 1636-1643.
2. **Гладчук, А.С.** Оптимизация методики анализа свободных жирных кислот с помощью комбинации МАЛДИ-масс-спектрометрии и технологии получения монослоев Ленгмюра / **А.С. Гладчук**, Е.Г. Батоцыренова, Е.П. Подольская // *Научное приборостроение*. – 2020. – Т. 30. – № 1. – С. 39–49.
3. **Gladchuk, A.** High-Throughput Fingerprinting of Rhizobial Free Fatty Acids by Chemical Thin-Film Deposition and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry / **A. Gladchuk**, J. Shumilina, A. Kusnetsova, K. Bureiko, S. Billig, A. Tsarev, I. Alexandrova, L. Leonova, V.A. Zhukov, I.A. Tikhonovich, C. Birkemeyer, E. Podolskaya, A. Frolov // *Methods and Protocols*. – 2020. – V. 3. – P. 36.
4. **Gladchuk, A.S.** A new approach for analysis of polyprenols by a combination of thin film chemical deposition and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / **A.S. Gladchuk**, K.A. Krasnov, O.A. Keltsieva, Y.K. Kalninia, M.L. Alexandrova, N.S. Ivanov, M.Z. Muradymov, N.V. Krasnov, V.L. Reynyuk, N.G. Sukhodolov, E.P. Podolskaya // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2021. – V. 35. – № 21. – P. e9185.
5. **Gladchuk, A.S.** Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment / **A.S. Gladchuk**, E.S. Silyavka, V.V. Shilovskikh, V.N. Bocharov, I.M. Zorin, N.V. Tomilin, N.A. Stepashkin, M.L. Alexandrova, N.V. Krasnov, A.Yu. Gorbunov, V.N. Babakov, N.G. Sukhodolov, A.A. Selyutin, E.P. Podolskaya // *Thin Solid Films*. – 2022. – V. 756. – P. 139374.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность коллективам ФГБУН ИАП РАН, ФГБУ НКЦТ им. С.Н.Голикова ФМБА России, ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и кафедры коллоидной химии Института химии СПбГУ, ресурсным центрам "Развитие молекулярных и клеточных технологий", "Геомодель", и междисциплинарному ресурсному центру по направлению "Нанотехнологии" Научного парка СПбГУ. А также к.х.н., доценту Селютину А.А., к.б.н., доценту Фролову А.А., к.х.н. Александровой М.Л., к.ф-м.н. Краснову Н.В. и многим другим за помощь в выполнении работы, ценные советы и плодотворные обсуждения результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karas, M. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons / M. Karas, F. Hillenkamp // *Analytical Chemistry*. – 1988. – V. 60. – № 20. – P. 2299–2301.
2. Tanaka, K. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1988. – V. 2. – P. 151–153.
3. Norris, J.L. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research / J.L. Norris, R.M. Caprioli // *Chemical Reviews*. – 2013. – V. 113. – P. 2309–2342.
4. Darie-Ion, L. Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research / L. Darie-Ion, D. Whitham, M. Jayathirtha, Y. Rai, A.N. Neagu, C.C. Darie, B.A. Petre // *Molecules*. – 2022. – V. 27. – № 19. – P. 6196.
5. Ren, J.L. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites / J.L. Ren, A.H. Zhang, L. Kong, X.J. Wang // *RSC Advances*. – 2018. – V. 8. – № 40. – P. 22335–22350.
6. Engel, K.M. A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research / K.M. Engel, P. Prabutzki, J. Leopold, A. Nimptsch, K. Lemmnitzer, D.R.N. Vos, C. Hopf, J. Schiller // *Progress in Lipid Research*. – 2022. – V. 86. – P. 101145.
7. Tsuchida, S. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology / S. Tsuchida, H. Umemura, T. Nakayama // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – № 20. – P. 4775.
8. Feucherolles, M. MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review / M. Feucherolles, S. Poppert, J. Utzinger, S.L. Becker // *Parasit & Vectors*. – 2019. – V. 12. – № 1. – P. 245.
9. Leopold, J. Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids / J. Leopold, Y. Popkova, K.M. Engel, J. Schiller // *Biomolecules*. – 2018. – V. 8. – № 4. – P. 173.
10. Knochenmuss, R. Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization / R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2000. – V. 35. – № 11. – P. 1237–1245.

11. Jaskolla, T.W. Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism / T.W. Jaskolla, M. Karas // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2011. – V. 22. – № 6. – P. 976–988.
12. Bae, Y.J. A Thermal Mechanism of Ion Formation in MALDI / Y.J. Bae, M.S. Kim // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 8. – P. 41–60.
13. Lu, I.-C. Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization / I.-C. Lu, C. Lee, Y.-T. Lee, C.-K. Ni // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 8. – P. 21–39.
14. Zenobi, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry / R. Zenobi, R. Knochenmuss // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2002. – V. 17. – № 5. – P. 337–366.
15. Schiller, J. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research / J. Schiller, R. Süß, J. Arnhold, B. Fuchs, J. Leßig, M. Müller, M. Petković, H. Spalteholz, O. Zschörnig, K. Arnold // *Progress in Lipid Research*. – 2004. – V. 43. – № 5. – P. 449–488.
16. Hillenkamp, F. MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications / F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic. – Weinheim: WILEY-VHC, 2014. – 477 p.
17. Karas, M. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors / M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2000. – V. 35. – № 1. – P. 1-12.
18. Fournier, I. Delayed extraction experiments using a repulsive potential before ion extraction: evidence of clusters as ion precursors in UV-MALDI. Part I: dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid / I. Fournier, A. Brunot, J.-C. Tabet, G. Bolbach // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2002. – V. 213. – № 2-3. – P. 203-215.
19. Fournier, I. Delayed extraction experiments using a repulsing potential before ion extraction: evidence of non-covalent clusters as ion precursor in UV matrix-assisted laser desorption/ionization. Part II – Dynamic effects with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix/ I. Fournier, A. Brunot, J.-C. Tabet, G. Bolbach // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2005. – V. 40. – P. 50-59.
20. Alves, S. Direct detection of particles formed by laser ablation of matrices during matrix-assisted laser desorption/ionization / S. Alves, M. Kalberer, R. Zenobi // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2003. – V. 17. – № 18. – P. 2034-2038.

21. Knochenmuss, R. Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization / R. Knochenmuss, L.V. Zhigilei // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2010. – V. 45. – № 4. – P. 333-346.
22. Chen, X. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength / X. Chen, J.A. Carroll, R.C. Beavis // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 1998. – V. 9. – № 9. – P. 885-891.
23. Knochenmuss, R. Energetics and Kinetics of Thermal Ionization Models of MALDI / R. Knochenmuss // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2014. – V. 25. – № 9. – P. 1521-1527.
24. Knochenmuss, R. A quantitative model of UV-MALDI including analyte ion generation / R. Knochenmuss // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V. 75. – № 10. – P. 2199-2207.
25. Hoteling, A.J. Electron Transfer Reactions in Laser Desorption/Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: Factors Influencing Matrix and Analyte Ion Intensities / A.J. Hoteling, W.F. Nichols, D.J. Giesen, J.R. Lenhard, R. Knochenmuss // *European Journal of Mass Spectrometry*. – 2006. – V. 12. – № 6. – P. 345-358.
26. Lin, Q. Two-photon ionization thresholds of matrix-assisted laser desorption/ ionization matrix clusters / Q. Lin, R. Knochenmuss // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2003. – V. 15. – № 16. – P. 1422–1426.
27. Knochenmuss, R. The Coupled Chemical and Physical Dynamics Model of MALDI / R. Knochenmuss // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 9. – P. 365–385.
28. Knochenmuss, R. Molecular dynamics model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes / R. Knochenmuss, L.V. Zhigilei // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – V. 109. – № 48. – P. 22947-22957.
29. Ehring, H. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry / H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp // *Organic Mass Spectrometry*. – 1992. – V. 27. – № 4. – P. 472-480.
30. Soltwisch, J. Ion yields in UV-MALDI mass spectrometry as a function of excitation laser wavelength and optical and physico-chemical properties of classical and halogen-substituted MALDI matrixes / J. Soltwisch, T.W. Jaskolla, F. Hillenkamp, M. Karas, K. Dreisewerd // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – № 15. – P. 6567–6576.

31. Knochenmuss, R. MALDI mechanisms: wavelength and matrix dependence of the coupled photo-physical and chemical dynamics model / R. Knochenmuss // *Analyst*. – 2014. – V. 139. – P. 147–156.
32. Horneffer, V. Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy / V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck // *Analytical Chemistry*. – 2001. – V. 73. – № 5. – P. 1016–1022.
33. Salum, M.L. Z-sinapinic acid: the change of the stereochemistry of cinnamic acids as rational synthesis of a new matrix for carbohydrate MALDI-MS analysis / M.L. Salum, L.M. Itovich, R. Erra-Balsells // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2013. – V. 48. – P. 1160–1169.
34. McCombie, G. Enhanced MALDI ionization efficiency at the metal-matrix interface: practical and mechanistic consequences of sample thickness and preparation method / G. McCombie, R. Knochenmuss // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2006. – V. 17. – № 5. – P. 737–745.
35. Dreisewerd, K. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser-desorption/ionization with a uniform beam profile / K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp // *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. – 1995. – V. 141. – № 2. – P. 127–148.
36. Gebauer, S.K. n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits / S.K. Gebauer, T.L. Psota, W.S. Harris, P.M. Kris-Etherton // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2006. – V. 83. – № 6 Suppl. – P. 1526S–1535S.
37. Itoh, Y. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. / Y. Itoh, Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa, M. Fujino // *Nature*. – 2003. – V. 422. – № 6928. – P.173–176.
38. Tsuchido, T. Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids / T. Tsuchido, T. Hiraoka, M. Takano, I. Shibasaki // *Journal of Bacteriology*. – 1985. – V. 5. – № 2. – P. 127–132.
39. Hirasawa, A. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120 / A. Hirasawa, K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki, G. Tsujimoto // *Nature Medicine*. – 2005. – V. 11. – № 1. – P. 90–94.

40. McGarry, J.D. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes / J.D. McGarry // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – № 1. – P. 7–18.
41. Boden, G. Obesity and Free Fatty Acids / G. Boden // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. – 2008. – V. 37 – № 3. – P. 635–646.
42. Gao, X. Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase / X. Gao, K. Li, X. Hui, X. Kong, G. Sweeney, Y. Wang, A. Xu, M. Teng, P. Liu, D. Wu // *Biochemical Journal*. – 2011. – V. 435. – № 3. – P. 723–732.
43. Kahn, S.E. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes / S.E. Kahn, R.L. Hull, K.M. Utzschneider // *Nature*. – 2006. – V. 444. – № 7121. – P. 840–846.
44. Novgorodtseva, T.P. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome / T.P. Novgorodtseva, Y.K. Karaman, N. V. Zhukova, E.G. Lobanova, M. V. Antonyuk, T.A. Kantur // *Lipids in Health and Disease*. – 2011. – V. 10. – P. 82.
45. Liu, L. Free fatty acid metabolic profile and biomarkers of isolated post-challenge diabetes and type 2 diabetes mellitus based on GC-MS and multivariate statistical analysis / L. Liu, Y. Li, C. Guan, K. Li, C. Wang, R. Feng, C. Sun // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2010. – V. 878. – № 28. – P. 2817–2825.
46. Tan, B. Identification of free fatty acids profiling of type 2 diabetes mellitus and exploring possible biomarkers by GC-MS coupled with chemometrics / B. Tan, Y. Liang, L. Yi, H. Li, Z. Zhou, X. Ji, J. Deng // *Metabolomics*. – 2010. – V. 6. – № 2. – P. 219–228.
47. Li, M. Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications / M. Li, L. Yang, Y. Bai, H. Liu // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86. – № 1. – P. 161–175.
48. Akoto, L. Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography-mass spectrometry / L. Akoto, R.J.J. Vreuls, H. Irth, R. Pel, F. Stellaard // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – V. 1186. – № 1–2. – P. 365–371.
49. Ecker, J. A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters / J. Ecker, M. Scherer, G. Schmitz, G. Liebisch // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2012. – V. 897 – P. 98–104.

50. Rohde, J.K. A Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Method for the Quantification of Short Chain Fatty Acids / J.K. Rohde, M.M. Fuh, I. Evangelakos, M.J. Pauly, N. Schaltenberg, F. Siracusa, N. Gagliani, K. Tödter, J. Heeren, A. Worthmann // *Metabolites*. – 2022. – V. 12. – № 2. – P. 170.
51. Bicalho, B. Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry / B. Bicalho, F. David, K. Rumpel, E. Kindt, P. Sandra // *Journal of Chromatography A*. – 2008. – V. 1211. – № 1–2. – P. 120–128.
52. Ruiz-Rodriguez, A. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids / A. Ruiz-Rodriguez, G. Reglero, E. Ibañez // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2010. – V. 51. – № 2. – P. 305–326.
53. Eder, K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters / Eder K. // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 1995. – V. 671. – № 1–2. – P. 113–131.
54. Christie, W.W. *Advances in Lipid Methodology—Two*; Oily Press Ltd.: Dundee, UK, 1993; pp. 69–111.
55. Johnson, D.W. Contemporary clinical usage of LC/MS: Analysis of biologically important carboxylic acids / Johnson D.W. // *Clinical Biochemistry*. – 2005. – V. 38. – № 4. – P. 351–361.
56. Nagy, K. An HPLC-MS Approach for Analysis of Very Long Chain Fatty Acids and Other Apolar Compounds on Octadecyl-Silica Phase Using Partly Miscible Solvents / K. Nagy, A. Jakab, J. Fekete, K. Vékey // *Analytical Chemistry*. – 2004. – V. 76. – № 7. – P. 1935–1941.
57. Serafim, V. Development and Validation of a LC–MS/MS-Based Assay for Quantification of Free and Total Omega 3 and 6 Fatty Acids from Human Plasma / V. Serafim, D.A. Tiugan, N. Andreescu, A. Mihailescu, C. Paul, I. Velea, M. Puiu, M.D. Niculescu // *Molecules*. – 2019. – V. 24. – № 2. – P. 360.
58. Wei, G.L. Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids / G.L. Wei, E.Y. Zeng // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 30. – № 9. – P. 1429–1436.
59. Koch, E. Rapid quantification of fatty acids in plant oils and biological samples by LC-MS / E. Koch, M. Wiebel, C. Hopmann, N. Kampschulte, N.H. Schebb // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2021. – V. 413. – № 21. – P. 5439–5451.

60. Kamphorst, J.J. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry analysis of fatty acid metabolism / J.J. Kamphorst, J. Fan, W. Lu, E. White, J.D. Rabinowitz // *Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 83. – № 23. – P. 9114–9122.
61. Trufelli, H. Profiling of non-esterified fatty acids in human plasma using liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry / H. Trufelli, G. Famiglini, V. Termopoli, A. Cappiello // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – V. 400. – № 9. – P. 2933–2941.
62. Nagumalli, S.K. A rapid and highly sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the analysis of the fatty acid profile of edible vegetable oils / S.K. Nagumalli, C.C. Jacob, G. Gamboa da Costa // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2020. – V. 1161. – P. 122415.
63. Fugmann, M. Differences in the serum nonesterified fatty acid profile of young women associated with a recent history of gestational diabetes and overweight/obesity / M. Fugmann, O. Uhl, C. Hellmuth, H. Hetterich, N.N. Kammer, U. Ferrari, K.G. Parhofer, B. Koletzko, J. Seissler, A. Lechner // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – № 5. – P. e0128001.
64. Hellmuth, C. Association between Plasma Nonesterified Fatty Acids Species and Adipose Tissue Fatty Acid Composition / C. Hellmuth, H. Demmelmair, I. Schmitt, W. Peissner, M. Blüher, B. Koletzko // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 10. – P. e74927.
65. Hellmuth, C. Nonesterified fatty acid determination for functional lipidomics: Comprehensive ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation, qualification, and parameter prediction / C. Hellmuth, M. Weber, B. Koletzko, W. Peissner // *Analytical Chemistry*. – 2012. – V. 84. – № 3. – P. 1483–1490.
66. Johnson, D.W. Dimethylaminoethyl esters for trace, rapid analysis of fatty acids by electrospray tandem mass spectrometry / D.W. Johnson // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1999. – V. 13. – № 23. – P. 2388–2393.
67. Johnson, D.W. Alkyldimethylaminoethyl ester iodides for improved analysis of fatty acids by electrospray ionization tandem mass spectrometry / D.W. Johnson // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2000. – V. 14. – № 21. – P. 2019–2024.
68. Li, X. Improved LC-MS method for the determination of fatty acids in red blood cells by LC-orbitrap MS / X. Li, A.A. Franke // *Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 83. – № 8. – P. 3192–3198.

69. Zehethofer, N. Plasma free fatty acid profiling in a fish oil human intervention study using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / N. Zehethofer, D.M. Pinto, D.A. Volmer // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2008. – V. 22. – № 13. – P. 2125–2133.
70. Hsu, F.F. Distinction among isomeric unsaturated fatty acids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument / F.F. Hsu, J. Turk // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 1999. – V. 10. – № 7. – P. 600–612.
71. Qiao, Z. MALDI Matrices for the Analysis of Low Molecular Weight Compounds: Rational Design, Challenges and Perspectives / Z. Qiao, F. Lissel // *Chemistry - An Asian Journal*. – 2021. – V. 16. – P. 868-878.
72. Yerra, N.V. 2- cyano-3-(2-thienyl)acrylic acid as a new MALDI matrix for the analysis of a broad spectrum of analytes / N.V. Yerra, B. Dyaga, S.B. Dadinaboyina, S. Pandeti, J.R. Vaidya, J.C. Tabet, J.R. Thota // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2021. – V. 32. – № 1. – P. 387–393.
73. Ayorinde, F.O. Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / F.O. Ayorinde, P. Hambright, T.N. Porter, Q.L. Keith // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1999. – V. 13. – № 24. – P. 2474–2479.
74. Ayorinde, F.O. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / F.O. Ayorinde, K. Garvin, K. Saeed // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2000. – V. 14. – № 7. – P. 608–615.
75. Yu, H. Quantitative analysis of free fatty acids in rat plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of- flight mass spectrometry with meso-tetrakis porphyrin as matrix / H. Yu, E. Lopez, S.W. Young, J. Luo, H. Tian, P. Cao // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – V. 354. – № 2. – P. 182–191.
76. Shroff, R. Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / R. Shroff, A. Muck, A. Svatoš // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2007. – V. 21. – № 20. – P. 3295–3300.

77. Li, B. 3-Aminophthalhydrazide (Luminol) as a matrix for dual-polarity MALDI MS imaging / B. Li, R. Sun, A. Gordon, J. Ge, Y. Zhang, P. Li, H. Yang // *Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 91. – № 13. – P. 8221–8228.
78. Shroff, R. 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene: a novel superbasic matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of fatty acids / R. Shroff, A. Svatoš // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2009. – V. 23. – № 15. – P. 2380–2382.
79. Eibisch, M. Time-dependent intensity changes of free fatty acids detected by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry in the presence of 1,8-bis-(dimethylamino)naphthalene - a cautionary note / M. Eibisch, R. Süß, J. Schiller // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2012. – V. 26. – № 13. – P. 1573–1576.
80. Weißflog, J. 1,8-Di(piperidiny)-naphthalene-rationally designed MAILD/MALDI matrix for metabolomics and imaging mass spectrometry / J. Weißflog, A. Svatoš // *RSC Advances*. – 2016. – V. 6. – № 79. – P. 75073–75081.
81. Calvano, C.D. 1,8-bis(dimethylamino) naphthalene/9-aminoacridine: a new binary matrix for lipid fingerprinting of intact bacteria by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry / C.D. Calvano, A. Monopoli, N. Ditaranto, F. Palmisano // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – V. 798. – P. 56–63.
82. Ling, L. DBDA as a Novel Matrix for the Analyses of Small Molecules and Quantification of Fatty Acids by Negative Ion MALDI-TOF MS / L. Ling, Y. Li, S. Wang, L. Guo, C. Xiao, X. Chen, X. Guo // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2018. – V. 29. – № 4. – P. 704–710.
83. Zhang, Y. Ammonia-treated N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride as a novel matrix for rapid quantitative and qualitative determination of serum free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Y. Zhang, Y. Wang, S. Guo, Y. Guo, H. Liu, Z. Li // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – V. 794. – P. 82-89.
84. Pirkl, A. Analysis of free fatty acids by ultraviolet laser desorption ionization mass spectrometry using insect wings as hydrophobic sample substrates / A. Pirkl, M. Meier, Y. Popkova, M. Letzel, A. Schnapp, J. Schiller, K. Dreisewerd // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86. – № 21. – P. 10763–10771.

85. Jaschinski, T. Laser desorption/ionization mediated by bionanostructures from microalgae / T. Jaschinski, A. Svatoš, G. Pohnert // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2013. – V. 15. – № 16. – P. 109–116.
86. Park, K.H. Analysis of fatty acids by graphite plate laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / K.H. Park, H.J. Kim // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2001. – V. 15. – № 16. – P. 1494–1499
87. Chen, Y.S. Synthesis of tellurium nanosheet for use in matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules / Y.S. Chen, J. Ding, X.M. He, J. Xu, Y.Q. Feng // *Microchimica Acta*. – 2018. – V. 185. – № 8. – P. 368.
88. Budimir, N. The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of negative ions for fatty acids / N. Budimir, J.C. Blais, F. Fournier, J.C. Tabet. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2006. – V. 20. – № 4. – P. 680–684.
89. Dong, X. Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS / X. Dong, J. Cheng, J. Li, Y. Wang // *Analytical Chemistry* – 2010. – T. 82 – № 14 – P. 6208–6214.
90. Liu, Y. Graphene and graphene oxide: Two ideal choices for the enrichment and ionization of long-chain fatty acids free from matrix-assisted laser desorption/ionization matrix interference / Y. Liu, J. Liu, C. Deng, X. Zhang // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2011. – V. 25. – № 21. – P. 3223–3234.
91. Lu, M. Matrix interference-free method for the analysis of small molecules by using negative ion laser desorption/ionization on graphene flakes / M. Lu, Y. Lai, G. Chen, Z. Cai // *Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 83. – № 8. – P. 3161–3169.
92. Skorupinska-Tudek, K. Polyisoprenoid alcohols – recent results of structural studies / K. Skorupinska-Tudek, J. Wojcik, E. Swiezewska // *Chemical Record*. – 2011. – V. 8. – № 1. – P. 33-45.
93. Surmacz, L. Polyisoprenoids - Secondary metabolites or physiologically important superlipids? / L. Surmacz, E. Swiezewska // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – V. 407. – № 4. – P. 627-632.
94. Hartley, M.D. At the membrane frontier: a prospectus on the remarkable evolutionary conservation of polyprenols and polyprenyl-phosphates / M.D. Hartley, B. Imperiali // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2012. – V. 517. – № 2. – P. 83-97.

95. Chojnacki, T. Dolichols and polyprenols: Elements of membranes, coenzymes and secondary metabolites / T. Chojnacki, W. Jankowski, E. Swiezewska // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2001. – V. 6. – № 2. – P. 192.
96. Burda, P. The dolichol pathway of N-linked glycosylation / P. Burda, M. Aebi // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1999. – V. 1426. – № 2. – P. 239-257.
97. Roslinska, M. Plant long-chain polyprenols as chemotaxonomic markers/ M. Roslinska, K. Walinska, E. Swiezewska, T. Chojnacki // *Cellular & Molecular Biology Letters*. – 2001. – V. 6. – № 2. – P. 228–230.
98. Wang, C. Antiviral activity of a nanoemulsion of polyprenols from Ginkgo leaves against influenza A H3N2 and hepatitis B virus in vitro / C. Wang, W.J. Li, R. Tao, J.Z. Ye, H.Y. Zhang // *Molecules*. – 2015. – V. 20. – № 3. – P. 5137-5151.
99. Yang, L. Hepatoprotective effects of polyprenols from Ginkgo biloba L. leaves on CCl4-induced hepatotoxicity in rats / L. Yang, C.Z. Wang, J.Z. Ye, H.T. Li // *Fitoterapia*. – 2011. – V. 82. – № 6. – P. 834-840.
100. Zhang, Q. Synthesis and biological activity of polyprenols / Q. Zhang, L. Huang, C. Zhang, P. Xie, Y. Zhang, S. Ding, F. Xu // *Fitoterapia*. – 2015. – V. 106. – P. 184–193.
101. Fedotova, J. Ropren[®] is a polyprenol preparation from coniferous plants that ameliorates cognitive deficiency in a rat model of beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia / J. Fedotova, V. Soultanov, T. Nikitina, V. Roschin, N. Ordayn // *Phytomedicine*. – 2012. – V. 19. – № 5. – P. 451–456.
102. Gawrys, O. Cationic derivative of polyprenol, a potential component of liposomal drug carriers, does not alter renal function in rats / O. Gawrys, K.H. Olszyński, K. Gawarecka, E. Swiezewska, T. Chojnacki, M. Masnyk, M. Chmielewski, E. Kompanowska-Jeziarska // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2014. – V. 116. – P. 659-662.
103. Bamba, T. Separation of hydrophobic metabolites using monolithic silica column in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography / T. Bamba, E. Fukusaki // *Journal of Separation Science*. – 2009. – V. 32. – № 15-16. – P. 2699–2706.
104. Řezanka, T. Chromatography of long chain alcohols (polyprenols) from animal and plant sources / T. Řezanka, J. Votruba // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – V. 936. – № 1-2. – P. 95–110.

105. Wang, C.Z. In Vivo and In Vitro Toxicity Evaluation of Polyphenols Extracted from Ginkgo biloba L. Leaves/ C.Z. Wang, J.J. Yuan, W.J. Li, H.Y. Zhang, J.Z. Ye // *Molecules*. – 2015. – V. 20. – № 12. – P. 22257-22271.
106. Yu, J. Polyphenols from the needles of *Taxus chinensis* var. *mairei* / J. Yu, Y. Wang, H. Qian, Y. Zhao, B. Liu, C. Fu // *Fitoterapia*. – 2012. – V. 83. – № 5. – P. 831-837.
107. Bamba, T. High-resolution analysis of polyphenols by supercritical fluid chromatography / T. Bamba, E. Fukusaki, S. Kajiyama, K. Ute, T. Kitayama, A. Kobayashi // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – V. 911. – № 1. – P. 113-117.
108. Sagami, H. The history and recent advances in research of polyphenol and its derivatives / H. Sagami, E. Swiezewska, Y. Shidoji // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2018. – V. 82. – № 6. – P. 947-955.
109. Basyuni, M. Polyphenol and Dolichol Content in the Seed Tissues of *Elaeis guineensis* Jacq. from Commercial Seeds / M. Basyuni, R. Hayati, A. Tia, I. Deni, B. Slamet, E. Siregar // *Systematic Reviews in Pharmacy*. – 2020. – V. 11. – № 7. – P. 89-97.
110. Griffiths, W. Analysis of Dolichols and Polyphenols and Their Derivatives by Electron Impact, Fast Atom Bombardment and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry / W. Griffiths, J. Hjertman, M. Wejde, J. Sjövall, O. Larsson // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1996. – V. 10. – P. 663–675.
111. Hermansson, K. Analysis of long-chain polyisoprenoids by fast atom bombardment mass spectrometry / K. Hermansson, P.E. Jansson, P. Low, G. Dallner, E. Swiezewska, T. Chojnacki // *Biological Mass Spectrometry*. – 1992. – V. 21. – № 11. – P. 548–553.
112. Ibata, K. Long-chain betulaprenol-type polyphenols from the leaves of *Ginkgo biloba* / K. Ibata, M. Mizuno, T. Takigawa, Y. Tanaka // *Biochemical Journal*. – 1983. – V. 213. – № 2. – P. 305–311.
113. Wolucka, B.A. Mass spectrometric analysis of prenyl phosphates and their glycosylated forms / B.A. Wolucka, E. de Hoffmann // *Acta Biochimica Polonica*. – 1994. – V. 41. – № 3. – P. 345–349.
114. Skorupińska-Tudek, K. Divergent pattern of polyisoprenoid alcohols in the tissues of *Coluria geoides*: a new electrospray ionization MS approach / K. Skorupińska-Tudek, T. Bieńkowski, O. Olszowska, M. Furmanowa, T. Chojnacki, W. Danikiewicz, E. Swiezewska // *Lipids*. – 2003. – V. 38. – № 9. – P. 981–990.

115. D'Alexandri F.L. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li⁺ cationization / F.L. D'Alexandri, F.C. Gozzo, M.N. Eberlin, A.M. Katzin // *Analytical Biochemistry*. – 2006. – V. 335. – № 2. – P. 189-200.
116. Gutkowska, M. Proteins are polyisoprenylated in *A. thaliana* / M. Gutkowska, T. Bienkowski, V.S. Hung, M. Wanke, J. Hertel, W. Danikiewicz, E. Swiezewska // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2004. – V. 322. – № 3. – P. 998–1004.
117. Guan, Z. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry of dolichols and polyprenols, lipid sugar carriers across evolution / Z. Guan, J. Eichler // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2011. – V. 1811. – № 11. – P. 800–806.
118. Vanaga, I. Identification of *Abies sibirica* L. Polyprenols and Characterisation of Polyprenol-Containing Liposomes / I. Vanaga, J. Gubernator, I. Nakurte, U. Kletnieks, R. Muceniece, B. Jansone // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – № 8. – P. 1801.
119. Gharwalová, L. Identification of Homologous Polyprenols from Thermophilic Bacteria / L. Gharwalová, A. Palyzová, H. Marešová, I. Kolouchová, L. Kyselová, T. Rezanka // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – № 6. – P. 1168.
120. Kania, M. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry as a valuable method for the identification of polyisoprenoid alcohols / M. Kania, K. Skorupinska-Tudek, E. Swiezewska, W. Danikiewicz // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2012. – V. 26. – № 15. – P. 1705–1710.
121. Bamba, T. Analysis of long-chain polyprenols using supercritical fluid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry / T. Bamba, E. Fukusaki, Y. Nakazawa, H. Sato, K. Ute, T. Kitayama, A. Kobayashi // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – V. 995. – № 1-2. – P. 203–207.
122. Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids / I. Langmuir // *Journal of the American Chemical Society*. – 1917. – V. 39. – № 9. – P. 1848–1906.
123. Blodgett, K.B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface / K.B. Blodgett // *Journal of the American Chemical Society*. – 1935. – V. 57. – № 6. – P. 1007–1022.
124. Desbat, B. Unexpected bilayer formation in langmuir films of nucleolipids / B. Desbat, N. Arazam, S. Khiati, G. Tonelli, W. Neri, P. Barthélémy, L. Navailles // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – № 17. – P. 6816–6825.

125. Houmadi, S. Langmuir-blodgett film of hydrophobin protein from *Pleurotus ostreatus* at the air-water interface / S. Houmadi, F. Ciuchi, M.P. De Santo, L. De Stefano, I. Rea, P. Giardina, A. Almenante, E. Lacaze, M. Giocondo // *Langmuir*. – 2008. – V. 24. – № 22. – P. 12953–12957.
126. Pavinatto, F.J. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and langmuir-blodgett films / F.J. Pavinatto, C.P. Pacholatti, É.A. Montanha, L. Caseli, H.S. Silva, P.B. Miranda, T. Viitala, O.N. Oliveira // *Langmuir*. – 2009. – V. 25. – № 17. – P. 10051–10061.
127. Rodrigues, D. Cellulase and alcohol dehydrogenase immobilized in Langmuir and Langmuir-Blodgett films and their molecular-level effects upon contact with cellulose and ethanol / D. Rodrigues, F.F. Camilo, L. Caseli // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – № 7. – P. 1855–1863.
128. Tajmir-Riahi, H.A. Far-infrared spectra of Langmuir-Blodgett films of chlorophyll a, chlorophyll b, pheophytin a and their adducts with water and dioxane / H.A. Tajmir-Riahi, G. Wang, R.M. Leblanc // *Photochemistry and Photobiology*. – 1991. – V. 54. – № 2. – P. 265–271.
129. Wnętrzak, A. Cyclosporin A distribution in cholesterol-sphingomyelin artificial membranes modeled as Langmuir monolayers / A. Wnętrzak, K. Makyła-Juzak, A. Chachaj-Brekiesz, E. Lipiec, N.V. Romeu, P. Dynarowicz-Latka // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2018. – V. 166. – P. 286–294.
130. Miller, L.S. Langmuir-Blodgett films for nonlinear optical applications / L.S. Miller, D.J. Walton, P.J.W. Stone, A.M. McRoberts, R.S. Sethi // *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. – 1994. – V. 5. – № 2. – P. 75–82.
131. Pitt, C.W. Optical waveguiding in Langmuir films / C.W. Pitt, L.M. Walpita // *Electronics Letters*. – 1976. – V. 12. – № 8. – P. 479–481.
132. Wang, J. Nonlinear Optical Response of Graphene Oxide Langmuir-Blodgett Film as Saturable Absorbers / J. Wang, Y. Wang, T. Wang, G. Li, R. Lou, G. Cheng, J. Bai // *Nanomaterials*. – 2019. – V. 9. – № 4. – P. 640.
133. Ahmed, I. Chitosan-fatty acid interaction mediated growth of Langmuir monolayer and Langmuir-Blodgett films / I. Ahmed, L. Dildar, A. Haque, P. Patra, M. Mukhopadhyay, S. Hazra, M. Kulkarni, S. Thomas, J.R. Plaisier, S.B. Dutta, J.K. Bal // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2018. – V. 514 – P. 433–442.

134. Ariga, K. Immobilization of Biomaterials to Nano-Assembled Films (Self-Assembled Monolayers, Langmuir-Blodgett Films, and Layer-by-Layer Assemblies) and Their Related Functions / K. Ariga, T. Nakanishi, T. Michinobu // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2006. – V. 6. – № 8. – P. 2278–2301.
135. Ruiz, G.C.M. Biomimetic collagen/phospholipid coatings improve formation of hydroxyapatite nanoparticles on titanium / G.C.M. Ruiz, M.A.E. Cruz, A.N. Faria, D.C. Zancanela, P. Ciancaglini, A.P. Ramos // *Materials Science and Engineering C*. – 2017. – V. 77. – P. 102–110.
136. Modlińska, A. The Langmuir-Blodgett technique as a tool for homeotropic alignment of fluorinated liquid crystals mixed with arachidic acid / A. Modlińska, D. Bauman // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – V. 12. – № 8. – P. 4923–4945.
137. Sangiao, S. All-Carbon Electrode Molecular Electronic Devices Based on Langmuir-Blodgett Monolayers / S. Sangiao, S. Martín, A. González-Orive, C. Magén, P.J. Low, J.M. De Teresa, P. Cea // *Small*. – 2017. – V. 13 – P. 1603207.
138. Sizov, A.S. Easily processable highly ordered Langmuir-Blodgett films of quaterthiophene disiloxane dimer for Monolayer organic field-effect transistors / A.S. Sizov, D.S. Anisimov, E. V. Agina, O.V. Borshchev, A.V. Bakirov, M.A. Shcherbina, S. Grigorian, V.V. Bruevich, S.N. Chvalun, D.Y. Paraschuk, S.A. Ponomarenko // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – № 50. – P. 15327–15334.
139. MetaboAnalyst 4.0. [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.metaboanalyst.ca> (дата обращения 01.12.2022).
140. Berglund, M. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report) / M. Berglund, M.E. Wieser // *Pure and Applied Chemistry*. – 2011. – V. 83. – № 2. – P. 397–410.
141. Roberts, G. Langmuir-Blodgett Films / G. Roberts. – New York: Plenum Press, 1990. – 425 p.
142. Ren, Y. Structure of Barium Stearate Films at the Air/Water Interface Investigated by Polarization Modulation Infrared Spectroscopy and π -A Isotherms / Y. Ren, K. Iimura, T. Kato // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – № 9. – P. 2688–2693.
143. Kawai, T. Molecular orientation in LB films of azobenzene-containing long-chain fatty acids and their barium salts studied by FT-IR transmission and reflection-absorption

spectroscopy / T. Kawai, J. Umemura, T. Takenaka // *Langmuir*. – 1990. – V. 6. – № 3. – P. 672-676.

144. Harrand, M. Polarized Raman spectra of thin films. III. Conformational analysis of Langmuir–Blodgett multilayers (1 to 49) of barium stearate / M. Harrand, M. Masson // *The Journal of Chemical Physics*. – 1987. – V. 87. – № 9. – P. 5176-5185.

145. Yang, M. Quantitative analysis of free fatty acids in human serum using biexciton auger recombination in cadmium telluride nanoparticles loaded on zeolite / M. Yang, T. Fujino // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86. – № 19. – P. 9563–9569.

146. Pettinella, C. Targeted quantitative analysis of fatty acids in atherosclerotic plaques by high sensitivity liquid chromatography/tandem mass spectrometry / C. Pettinella, S.H. Lee, F. Cipollone, I.A. Blair // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2007. – V. 850. – № 1–2. – P. 168–176.

147. Cui, Y. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of the free fatty acids in serum obtained from patients with Alzheimer's disease / Y. Cui, X. Chen, L. Liu, W. Xie, Y. Wu, Q. Wu, D. Wang // *Bio-Medical Materials and Engineering*. – 2015. – V. 26 – P. S2165–S2177.

148. Yang, W.C. Enhancement of the LC/MC analysis of fatty acids through derivatization and stable isotope coding / W.C. Yang, J. Adamec, F.E. Regnier // *Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 79. – № 14. – P. 5150–5157.

149. Kloos, D.P. Comprehensive gas chromatography-electron ionisation mass spectrometric analysis of fatty acids and sterols using sequential one-pot silylation: Quantification and isotopologue analysis / D.P. Kloos, E. Gay, H. Lingeman, F. Bracher, C. Müller, O.A. Mayboroda, A.M. Deelder, W.M.A. Niessen, M. Giera // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2014. – V. 28. – № 13. – P. 1507–1514.

150. Pichini, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: Assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts / S. Pichini, M. Pellegrini, J. Gareri, G. Koren, O. Garcia-Algar, O. Vall, F. Vagnarelli, P. Zuccaro, E. Marchei // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2008. – V. 48. – № 3. – P. 927–933.

151. Crockett, J.S. Collisional Activation of a Series of Homoconjugated Octadecadienoic Acids with Fast Atom Bombardment and Tandem Mass Spectrometry / J.S. Crockett, M.L. Gross, W.W. Christie, R.T. Holman // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 1990. – V. 1. – № 2. – P. 183–191.

152. Frolov, A. An UPLC-MC/MC method for the simultaneous identification and quantitation of cell wall phenolics in *Brassica napus* seeds / A. Frolov, A. Henning, C. Böttcher, A. Tissier, D. Strack // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – V. 61. – № 6. – P. 1219–1227.
153. Handrick, V. Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry / V. Handrick, T. Vogt, A. Frolov // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2010. – V. 398. – № 7–8. – P. 2789–2801.
154. Ibata, K. Long-chain polyprenols in the family Pinaceae / K. Ibata, M. Mizuno, Y. Tanaka, A. Kageyu // *Phytochemistry*. – 1984. – V. 23. – № 4. – P. 783–786.
155. Boateng, I.D. Separation and purification of polyprenols from *Ginkgo biloba* L. leaves by bulk ionic liquid membrane and optimizing parameters / I.D. Boateng, D. A. Soetanto, F. Li, X.M. Yang, Y.Y. Li // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – V. 170. – P. 113828.
156. Wong, C.K. Cationization Processes in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Attachment of Divalent and Trivalent Metal Ions / C.K. Wong, T.D. Chan // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1997. – V. 11. – P. 513–519.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акты внедрения разработанной методики анализа СЖК методом МАЛДИ-МС
с помощью технологии Ленгмюра



И.о. директора ФГУП «НИИ
ГПЭЧ» ФМБА России,
д.м.н., профессор

/А.С.Радилов/

Акт № 1/22

**внедрения способа анализа свободных жирных кислот с помощью метода
МАЛДИ масс-спектрометрии в биологических жидкостях и тканях
в ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России от « 14 » ноября 2022 г.**

Настоящий Акт составлен о том, что способ анализа свободных жирных кислот с помощью метода МАЛДИ масс-спектрометрии в биологических жидкостях и тканях

(название объекта интеллектуальной собственности)

Автор: Гладчук Алексей Сергеевич

(ФИО каждого автора)

Внедрены с «1» апреля 2022 г.

в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии

(наименование структурного подразделения)

для разработки методов экстракции и анализа свободных жирных кислот из биологических образцов при разработке модели лекарственного стеатоза на клеточной линии HepaRG.

Руководитель структурного подразделения:

(по профилю деятельности, при которой внедрен объект)

Зам. заведующего отделом токсикологии, к.х.н.

_____/А.И. Уколов/

**Зам. директора ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России по научной работе, к.м.н.,
доцент**

_____/С.А. Дулов/

Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
"Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д.О. Отта"
(ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта")
Менделеевская линия, д. 3
Санкт-Петербург, 199034
тел.: (812) 328-98-33, факс: (812) 328-23-61
e-mail: iagmail@ott.ru
ОКПО 01897162, ОГРН 1027800521704
ИНН/КПП 7801020890/780101001

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта"

«__» _____



**Акт внедрения методики профилирования свободных жирных кислот в
биологических жидкостях и тканях методом МАЛДИ масс-спектрометрии с
использованием технологии Ленгмюра**

№1-22
в ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта" от «24» ноября 2022 г.

Настоящий Акт составлен о том, что методика анализа свободных жирных кислот в виде монокарбоксилатов бария методом МАЛДИ масс-спектрометрии, позволяющая проводить быстрый скрининг состава свободных жирных кислот в биологических образцах различной природы

_____ (название объекта интеллектуальной собственности)

Автор: Гладчук Алексей Сергеевич
(ФИО каждого автора)

Внедрена с «24» ноября 2022 г.
в лаборатории раннего эмбриогенеза _____
(наименование структурного подразделения)

для определения влияния концентрации свободных жирных кислот на компетентность ооцитов.

Руководитель структурного подразделения:
(по профилю деятельности, при которой внедрен объект)

Заведующий отделом репродуктологии, д.м.н., профессор
_____/Гзгзян А.М./

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Описание эксперимента по определению чувствительности и параметров линейности методики анализа СЖК методом МАЛДИ-МС с помощью технологии Ленгмюра

Таблица Б.1 – Приготовление раствора смеси стандартов жирных кислот

Раствор X1					
Жирная кислота	Формула	Молярная масса, г/моль	Масса навески, г	Количество вещества, моль	Концентрация, моль/л
Пальмитиновая	$C_{16}H_{32}O_2$	256,240	0,0043	1,68E-05	7,63E-04
Раствор X4					
Жирная кислота	Формула	Молярная масса, г/моль	Масса навески, г	Количество вещества, моль	Концентрация, моль/л
Лауриновая	$C_{12}H_{24}O_2$	200,178	0,0075	3,75E-05	8,33E-04
Тридекановая	$C_{13}H_{26}O_2$	214,193	0,0075	3,50E-05	7,78E-04
Миристиновая	$C_{14}H_{28}O_2$	228,209	0,0074	3,24E-05	7,21E-04
Пентадекановая	$C_{15}H_{30}O_2$	242,225	0,0075	3,10E-05	6,88E-04

Для приготовления раствора X1 навеску пальмитиновой кислоты растворяли в 11 мл н-гексана.

Для приготовления раствора X4 навески лауриновой, тридекановой, миристиновой и пентадекановой кислот объединяли и растворяли в отдельной порции (45 мл) н-гексана.

Таблица Б.2 – Схема смешивания растворов X1 и X4

№ образца	Смешиваемые растворы	Смешиваемые соотношения, об/об	Объёмы смешиваемых растворов, мкл
1	X4/10:X1	1 : 9	10:90
2	X4/10:X1	1 : 1	50:50
3	X4:X1	1 : 1	50:50
4	X4:X1	9 : 1	90:10
5	X4:X1/10	9 : 1	90:10

X1/10 и X4/10, обозначают разбавленные в 10 раз растворы X1 и X4 соответственно.

Таблица Б.3 – Концентрации отдельных стандартов в приготовленных растворах смесей СЖК

C(0)					
Жирная кислота	Концентрация в образце, моль/л				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	8,33E-06	4,16E-05	4,16E-04	7,49E-04	7,49E-04
Тридекановая	7,78E-06	3,89E-05	3,89E-04	7,00E-04	7,00E-04
Миристиновая	7,21E-06	3,60E-05	3,60E-04	6,49E-04	6,49E-04
Пентадекановая	6,88E-06	3,44E-05	3,44E-04	6,19E-04	6,19E-04
Пальмитиновая	6,87E-04	3,82E-04	3,82E-04	7,63E-05	7,63E-06
C(0)/10					
Жирная кислота	Концентрация в образце, моль/л				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	8,33E-07	4,16E-06	4,16E-05	7,49E-05	7,49E-05
Тридекановая	7,78E-07	3,89E-06	3,89E-05	7,00E-05	7,00E-05
Миристиновая	7,21E-07	3,60E-06	3,60E-05	6,49E-05	6,49E-05
Пентадекановая	6,88E-07	3,44E-06	3,44E-05	6,19E-05	6,19E-05
Пальмитиновая	6,87E-05	3,82E-05	3,82E-05	7,63E-06	7,63E-07
C(0)/100					
Жирная кислота	Концентрация в образце, моль/л				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	8,33E-08	4,16E-07	4,16E-06	7,49E-06	7,49E-06
Тридекановая	7,78E-08	3,89E-07	3,89E-06	7,00E-06	7,00E-06
Миристиновая	7,21E-08	3,60E-07	3,60E-06	6,49E-06	6,49E-06
Пентадекановая	6,88E-08	3,44E-07	3,44E-06	6,19E-06	6,19E-06
Пальмитиновая	6,87E-06	3,82E-06	3,82E-06	7,63E-07	7,63E-08
C(0)/1000					
Жирная кислота	Концентрация в образце, моль/л				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	8,33E-09	4,16E-08	4,16E-07	7,49E-07	7,49E-07
Тридекановая	7,78E-09	3,89E-08	3,89E-07	7,00E-07	7,00E-07
Миристиновая	7,21E-09	3,60E-08	3,60E-07	6,49E-07	6,49E-07
Пентадекановая	6,88E-09	3,44E-08	3,44E-07	6,19E-07	6,19E-07
Пальмитиновая	6,87E-07	3,82E-07	3,82E-07	7,63E-08	7,63E-09

Номера образцов (1, 2, 3, 4, 5) соответствуют указанным в Таблице Б.2.

Образцы с концентрацией C(0)/10 получали 10-кратным разбавлением раствора с концентрацией C(0) н-гексаном. Образцы с концентрацией C(0)/100 получали 10-кратным разбавлением раствора с концентрацией C(0)/10 н-гексаном. Образцы с концентрацией C(0)/1000 получали 10-кратным разбавлением раствора с концентрацией C(0)/100 н-гексаном.

Таблица Б.4 – Концентрации стандартов СЖК, нормированные на концентрацию пальмитиновой кислоты

Жирная кислота	Нормированные концентрации $C_{\text{аналита}}/C_{\text{пальмитиновая кислота}}$				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	0,012	0,109	1,091	9,821	98,209
Тридекановая	0,011	0,102	1,020	9,178	91,783
Миристиновая	0,010	0,094	0,944	8,500	84,997
Пентадекановая	0,010	0,090	0,902	8,116	81,161
Пальмитиновая	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Значения в Таблице Б.4 рассчитывались на основе значений молярных концентраций, перечисленных в Таблице Б.3

Номера образцов (1, 2, 3, 4, 5) соответствуют указанным в Таблице Б.2.

Таблица Б.5 – Количества жирных кислот, нанесенных на МАЛДИ мишень

C(0)					
Жирная кислота	Количество вещества, нанесенного на мишень, моль				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	9,99E-12	5,00E-11	5,00E-10	8,99E-10	8,99E-10
Тридекановая	9,34E-12	4,67E-11	4,67E-10	8,40E-10	8,40E-10
Миристиновая	8,65E-12	4,32E-11	4,32E-10	7,78E-10	7,78E-10
Пентадекановая	8,26E-12	4,13E-11	4,13E-10	7,43E-10	7,43E-10
Пальмитиновая	8,24E-10	4,58E-10	4,58E-10	9,16E-11	9,16E-12
C(0)/10					
Жирная кислота	Количество вещества, нанесенного на мишень, моль				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	9,99E-13	5,00E-12	5,00E-11	8,99E-11	8,99E-11
Тридекановая	9,34E-13	4,67E-12	4,67E-11	8,40E-11	8,40E-11
Миристиновая	8,65E-13	4,32E-12	4,32E-11	7,78E-11	7,78E-11
Пентадекановая	8,26E-13	4,13E-12	4,13E-11	7,43E-11	7,43E-11
Пальмитиновая	8,24E-11	4,58E-11	4,58E-11	9,16E-12	9,16E-13
C(0)/100					
Жирная кислота	Количество вещества, нанесенного на мишень, моль				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	9,99E-14	5,00E-13	5,00E-12	8,99E-12	8,99E-12
Тридекановая	9,34E-14	4,67E-13	4,67E-12	8,40E-12	8,40E-12
Миристиновая	8,65E-14	4,32E-13	4,32E-12	7,78E-12	7,78E-12
Пентадекановая	8,26E-14	4,13E-13	4,13E-12	7,43E-12	7,43E-12
Пальмитиновая	8,24E-12	4,58E-12	4,58E-12	9,16E-13	9,16E-14
C(0)/1000					
Жирная кислота	Количество вещества, нанесенного на мишень, моль				
	1	2	3	4	5
Лауриновая	9,99E-15	5,00E-14	5,00E-13	8,99E-13	8,99E-13
Тридекановая	9,34E-15	4,67E-14	4,67E-13	8,40E-13	8,40E-13
Миристиновая	8,65E-15	4,32E-14	4,32E-13	7,78E-13	7,78E-13
Пентадекановая	8,26E-15	4,13E-14	4,13E-13	7,43E-13	7,43E-13
Пальмитиновая	8,24E-13	4,58E-13	4,58E-13	9,16E-14	9,16E-15

Значения в Таблице Б.5 рассчитывались на основе значений молярных концентраций, перечисленных в Таблице Б.3, с учётом того, что на мишень наносили 1,2 мкл смеси СЖК. В Таблицах Б.6-Б.9 представлены экспериментальные данные, полученные при исследовании образцов в концентрациях C(0), C(0)/10, C(0)/100, C(0)/1000. С каждой ячейки с образцом регистрировали по 4 спектра и проводили усреднение нормированных интенсивностей по 4 значениям. Для каждого сигнала, соответствующего жирной кислоте, интенсивность сигнала была нормирована на интенсивность сигнала монопальмитата бария.

Таблица Б.6 – Значения интенсивностей сигналов, полученные при исследовании образцов с концентрацией C(0)

№ образца	Жирная кислота	m/z	Интенсивность сигнала, ед				Нормированные интенсивности				Среднее	SD	CV, %
			Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4			
1	Лауриновая	337,1	364	566	462	663	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0	11,7
	Тридекановая	351,1	247	381	221	318	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0	8,9
	Миристиновая	365,1	9786	15353	11513	15395	0,071	0,07	0,077	0,076	0,073	0	4,7
	Пентадекановая	379,1	19971	32215	23815	32075	0,144	0,147	0,159	0,158	0,152	0,01	4,9
	Пальмитиновая	393,1	138321	219452	150235	202939							
2	Лауриновая	337,1	4588	7633	13343	9853	0,025	0,023	0,027	0,029	0,026	0	10
	Тридекановая	351,1	6898	11504	15377	11390	0,038	0,034	0,031	0,033	0,034	0	8,8
	Миристиновая	365,1	22627	39494	68545	47577	0,124	0,117	0,137	0,139	0,129	0,01	8
	Пентадекановая	379,1	35165	62031	106058	71565	0,193	0,184	0,212	0,209	0,2	0,01	6,6
	Пальмитиновая	393,1	181745	337495	500106	342778							
3	Лауриновая	337,1	26506	13259	28246	15259	0,103	0,086	0,1	0,098	0,097	0,01	7,6
	Тридекановая	351,1	34919	18445	38068	19798	0,136	0,12	0,135	0,127	0,129	0,01	5,7
	Миристиновая	365,1	60995	32502	64365	35984	0,237	0,211	0,228	0,231	0,227	0,01	4,9
	Пентадекановая	379,1	85002	45694	89221	50562	0,33	0,297	0,316	0,325	0,317	0,02	4,6
	Пальмитиновая	393,1	257683	153910	282156	155553							
4	Лауриновая	337,1	28849	46944	35761	46504	0,145	0,142	0,138	0,14	0,141	0	2,3
	Тридекановая	351,1	55891	89595	67754	87135	0,281	0,271	0,261	0,262	0,269	0,01	3,5
	Миристиновая	365,1	90304	149444	119944	152709	0,455	0,452	0,462	0,459	0,457	0	1
	Пентадекановая	379,1	118366	206041	171822	215105	0,596	0,623	0,662	0,647	0,632	0,03	4,6
	Пальмитиновая	393,1	198592	330533	259564	332462							
5	Лауриновая	337,1	43307	10580	13193	21666	0,134	0,122	0,126	0,118	0,125	0,01	5,2
	Тридекановая	351,1	76328	20240	20522	37959	0,236	0,234	0,195	0,208	0,218	0,02	9,2
	Миристиновая	365,1	154551	43965	43124	80248	0,478	0,509	0,41	0,439	0,459	0,04	9,4
	Пентадекановая	379,1	233171	66606	75240	133357	0,721	0,771	0,716	0,729	0,734	0,03	3,4
	Пальмитиновая	393,1	323597	86414	105063	182840							

Таблица Б.7 – Значения интенсивностей сигналов, полученные при исследовании образцов с концентратией С(0)/10

№ образца	Жирная кислота	m/z	Интенсивность сигнала, ед				Нормированные интенсивности				Среднее	SD	CV, %
			Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4			
1	Лауриновая	337,1	101	56	131	185	0,006	0,005	0,006	0,007	0,006	0,001	17,9
	Тридекановая	351,1	41	47	68	82	0,002	0,004	0,003	0,003	0,003	0,001	20,2
	Миристиновая	365,1	1190	863	1991	2578	0,069	0,073	0,098	0,103	0,086	0,017	19,7
	Пентадекановая	379,1	1828	1417	2108	2817	0,107	0,120	0,104	0,112	0,111	0,007	6,6
	Пальмитиновая	393,1	17137	11784	20322	25123							
2	Лауриновая	337,1	2304	1621	1578	2826	0,009	0,009	0,009	0,011	0,010	0,001	7,5
	Тридекановая	351,1	1656	1170	1197	2033	0,007	0,007	0,007	0,008	0,007	0,001	7,3
	Миристиновая	365,1	30869	27976	26769	45112	0,123	0,160	0,160	0,171	0,153	0,021	13,6
	Пентадекановая	379,1	44235	40144	37704	61302	0,176	0,229	0,225	0,233	0,216	0,026	12,2
	Пальмитиновая	393,1	250673	175231	167818	263568							
3	Лауриновая	337,1	3007	7339	8414	3445	0,027	0,026	0,026	0,022	0,025	0,002	7,5
	Тридекановая	351,1	2694	8153	9647	3893	0,024	0,029	0,029	0,025	0,027	0,003	10,2
	Миристиновая	365,1	29015	69334	80875	36456	0,257	0,247	0,247	0,237	0,247	0,008	3,2
	Пентадекановая	379,1	37401	86136	101844	47258	0,331	0,307	0,311	0,308	0,314	0,012	3,7
	Пальмитиновая	393,1	112932	280889	327773	153610							
4	Лауриновая	337,1	1121	5344	3372	3256	0,038	0,054	0,044	0,055	0,048	0,008	16,9
	Тридекановая	351,1	1702	7355	5400	4150	0,057	0,074	0,071	0,070	0,068	0,007	10,7
	Миристиновая	365,1	10403	36283	24177	21914	0,351	0,364	0,318	0,370	0,351	0,023	6,6
	Пентадекановая	379,1	12748	45802	33086	27508	0,430	0,460	0,435	0,464	0,448	0,017	3,8
	Пальмитиновая	393,1	29613	99602	75988	59245							
5	Лауриновая	337,1	10604	14770	20488	27586	0,098	0,084	0,078	0,075	0,084	0,010	12,5
	Тридекановая	351,1	12325	16973	21536	31789	0,114	0,096	0,082	0,087	0,095	0,014	15,2
	Миристиновая	365,1	51874	77764	113985	158461	0,482	0,440	0,433	0,431	0,447	0,024	5,3
	Пентадекановая	379,1	62050	97526	144083	203406	0,576	0,552	0,548	0,554	0,557	0,013	2,3
	Пальмитиновая	393,1	107664	176785	263098	367246							

Таблица Б.8 – Значения интенсивностей сигналов, полученные при исследовании образцов с концентрацией C(0)/100

№ образца	Жирная кислота	m/z	Интенсивность сигнала, ед				Нормированные интенсивности				Среднее	SD	CV, %
			Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4			
1	Лауриновая	337,1	1369	152	1090	240	0,015	0,013	0,016	0,016	0,015	0,001	7,9
	Тридекановая	351,1	1896	217	1439	343	0,020	0,019	0,021	0,023	0,021	0,001	7,1
	Миристиновая	365,1	19514	2025	14447	2876	0,207	0,179	0,210	0,190	0,197	0,015	7,5
	Пентадекановая	379,1	25776	3262	19415	4450	0,273	0,288	0,283	0,294	0,284	0,009	3,1
	Пальмитиновая	393,1	94371	11317	68633	15152							
2	Лауриновая	337,1	992	654	1489	1394	0,036	0,042	0,042	0,040	0,040	0,003	6,3
	Тридекановая	351,1	1342	660	1976	1794	0,049	0,042	0,055	0,052	0,050	0,006	11,4
	Миристиновая	365,1	7318	4230	10749	10295	0,268	0,269	0,300	0,298	0,284	0,018	6,3
	Пентадекановая	379,1	8927	4823	12771	11876	0,327	0,307	0,357	0,344	0,334	0,022	6,5
	Пальмитиновая	393,1	27315	15724	35778	34543							
3	Лауриновая	337,1	2809	1818	1425	4188	0,047	0,044	0,040	0,050	0,045	0,004	9,2
	Тридекановая	351,1	3682	2300	1877	5161	0,062	0,055	0,053	0,062	0,058	0,004	7,6
	Миристиновая	365,1	21100	13956	10750	30044	0,355	0,336	0,305	0,359	0,339	0,025	7,3
	Пентадекановая	379,1	24005	16245	13434	34396	0,403	0,392	0,381	0,411	0,397	0,013	3,3
	Пальмитиновая	393,1	59514	41484	35256	83628							
4	Лауриновая	337,1	1345	870	2115	1636	0,065	0,054	0,054	0,059	0,058	0,005	9,3
	Тридекановая	351,1	1989	1725	2846	2373	0,096	0,106	0,073	0,085	0,090	0,014	15,9
	Миристиновая	365,1	8677	7184	15223	10660	0,421	0,442	0,390	0,384	0,409	0,027	6,7
	Пентадекановая	379,1	10583	8086	18436	13354	0,513	0,498	0,473	0,481	0,491	0,018	3,7
	Пальмитиновая	393,1	20626	16245	39006	27773							
5	Лауриновая	337,1	3134	1938	6138	4685	0,078	0,086	0,101	0,072	0,084	0,013	15,0
	Тридекановая	351,1	3993	2692	7359	6093	0,099	0,119	0,121	0,093	0,108	0,014	12,9
	Миристиновая	365,1	20523	10427	32292	31971	0,510	0,461	0,531	0,490	0,498	0,030	6,0
	Пентадекановая	379,1	24091	12344	36603	38044	0,598	0,545	0,602	0,583	0,582	0,026	4,5
	Пальмитиновая	393,1	40260	22637	60783	65210							

Таблица Б.9 – Значения интенсивностей сигналов, полученные при исследовании образцов с концентрацией C(0)/1000

№ образца	Жирная кислота	m/z	Интенсивность сигнала, ед				Нормированные интенсивности				Среднее	SD	CV, %
			Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4			
1	Лауриновая	337,1	93	161	105	255	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	3,2
	Тридекановая	351,1	58	117	71	209	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003	0,000	9,3
	Миристиновая	365,1	1943	3424	2051	5281	0,103	0,098	0,093	0,096	0,098	0,004	4,5
	Пентадекановая	379,1	3737	6711	4551	11460	0,199	0,192	0,206	0,209	0,201	0,007	3,7
	Пальмитиновая	393,1	18806	34932	22119	54946							
2	Лауриновая	337,1	1974	2384	476	1273	0,009	0,010	0,011	0,010	0,010	0,001	5,0
	Тридекановая	351,1	2301	2740	475	1291	0,011	0,012	0,011	0,010	0,011	0,001	5,6
	Миристиновая	365,1	32309	38165	6871	18905	0,155	0,161	0,154	0,148	0,154	0,005	3,4
	Пентадекановая	379,1	55479	64878	11241	33449	0,266	0,274	0,252	0,262	0,263	0,009	3,4
	Пальмитиновая	393,1	208918	236893	44597	127618							
3	Лауриновая	337,1	2549	3361	1955	1656	0,016	0,014	0,014	0,014	0,015	0,001	8,2
	Тридекановая	351,1	2349	3042	1701	1736	0,015	0,013	0,012	0,015	0,014	0,002	11,8
	Миристиновая	365,1	28332	40374	23284	24296	0,181	0,170	0,161	0,210	0,181	0,021	11,7
	Пентадекановая	379,1	46867	68676	41342	38201	0,299	0,289	0,287	0,330	0,301	0,020	6,6
	Пальмитиновая	393,1	156494	237824	144219	115767							
4	Лауриновая	337,1	7040	9957	4291	4875	0,018	0,016	0,019	0,015	0,017	0,002	10,0
	Тридекановая	351,1	6723	9716	4024	4692	0,017	0,015	0,017	0,014	0,016	0,001	8,6
	Миристиновая	365,1	85689	129647	47581	63525	0,215	0,204	0,206	0,196	0,205	0,008	3,9
	Пентадекановая	379,1	147011	226295	80724	110199	0,369	0,355	0,349	0,340	0,353	0,012	3,5
	Пальмитиновая	393,1	398664	636692	231097	324537							
5	Лауриновая	337,1	882	2739	856	1038	0,025	0,023	0,025	0,022	0,024	0,001	6,2
	Тридекановая	351,1	980	2526	840	1074	0,027	0,021	0,024	0,022	0,024	0,003	10,9
	Миристиновая	365,1	9235	29494	10557	13866	0,257	0,250	0,305	0,288	0,275	0,026	9,4
	Пентадекановая	379,1	15148	47435	15449	21327	0,422	0,402	0,446	0,443	0,428	0,020	4,8
	Пальмитиновая	393,1	35920	117996	34658	48154							

Таблица Б.10 – Отношения интенсивностей сигналов, рассчитанные для различных разбавлений смеси стандартов СЖК

СЖК	№ образца	С _{аналит/} С _{пальмитиновая} кислота	lg(С _{аналит/} С _{пальмитиновая} кислота)	Нормированные интенсивности (I _{аналит} /I _{моноальмитат бария})			
				C(0)	C(0)/10	C(0)/100	C(0)/1000
Лауриновая	1	0,012	-1,916	0,003	0,006	0,015	0,005
	2	0,109	-0,962	0,026	0,010	0,040	0,010
	3	1,091	0,038	0,097	0,025	0,045	0,015
	4	9,821	0,992	0,141	0,048	0,058	0,017
	5	98,209	1,992	0,125	0,084	0,084	0,024
Тридекановая	1	0,011	-1,946	0,002	0,003	0,021	0,003
	2	0,102	-0,991	0,034	0,007	0,050	0,011
	3	1,020	0,009	0,129	0,027	0,058	0,014
	4	9,178	0,963	0,269	0,068	0,090	0,016
	5	91,783	1,963	0,218	0,095	0,108	0,024
Миристиновая	1	0,010	-1,979	0,073	0,086	0,197	0,098
	2	0,094	-1,025	0,129	0,153	0,284	0,154
	3	0,944	-0,025	0,227	0,247	0,339	0,181
	4	8,500	0,929	0,457	0,351	0,409	0,205
	5	84,997	1,929	0,459	0,447	0,498	0,275
Пентадекановая	1	0,010	-1,999	0,152	0,111	0,284	0,201
	2	0,090	-1,045	0,200	0,216	0,334	0,263
	3	0,902	-0,045	0,317	0,314	0,397	0,301
	4	8,116	0,909	0,632	0,448	0,491	0,353
	5	81,161	1,909	0,734	0,557	0,582	0,428

Таблица Б.11 – Расчет точности

Жирная кислота	№ образца	C _{аналит/Спальми} тиновая кислота	lg(C _{аналит/Спальмитино} вая кислота)	I _{аналит/Монопальмитат} бария		Ожидае мое значени е	Резу льтат	Точно сть, %	Средня я точно сть, %
				C(0)/10	C(0)/100				
Лауриновая	1	0,012	-1,916	-	0,015	0,017	0,015	85,9	99,6
	2	0,109	-0,962	-	0,040	0,033	0,040	122,5	
	3	1,091	0,038	-	0,045	0,049	0,045	93,4	
	4	9,821	0,992	-	0,058	0,064	0,058	90,8	
	5	98,209	1,992	-	0,084	0,080	0,084	105,3	
Тридекановая	1	0,011	-1,946	-	0,021	0,022	0,021	92,1	99,7
	2	0,102	-0,991	-	0,050	0,044	0,050	113,9	
	3	1,020	0,009	-	0,058	0,066	0,058	88,6	
	4	9,178	0,963	-	0,090	0,087	0,090	104,2	
	5	91,783	1,963	-	0,108	0,109	0,108	99,6	
Миристиновая	1	0,010	-1,979	0,086	-	0,074	0,086	116,5	101,7
	2	0,094	-1,025	0,153	-	0,163	0,153	93,8	
	3	0,944	-0,025	0,247	-	0,258	0,247	95,9	
	4	8,500	0,929	0,351	-	0,347	0,351	101,0	
	5	84,997	1,929	0,447	-	0,441	0,447	101,2	
Пентадекановая	1	0,010	-1,999	0,111	-	0,105	0,111	105,2	100,6
	2	0,090	-1,045	0,216	-	0,215	0,216	100,3	
	3	0,902	-0,045	0,314	-	0,330	0,314	95,1	
	4	8,116	0,909	0,448	-	0,440	0,448	101,7	
	5	81,161	1,909	0,557	-	0,555	0,557	100,4	

На Рисунках Б.1-Б.4 представлены зависимости нормированной интенсивности сигналов, соответствующих монокарбоксилатам определенных СЖК, от десятичного логарифма нормированной концентрации аналита.

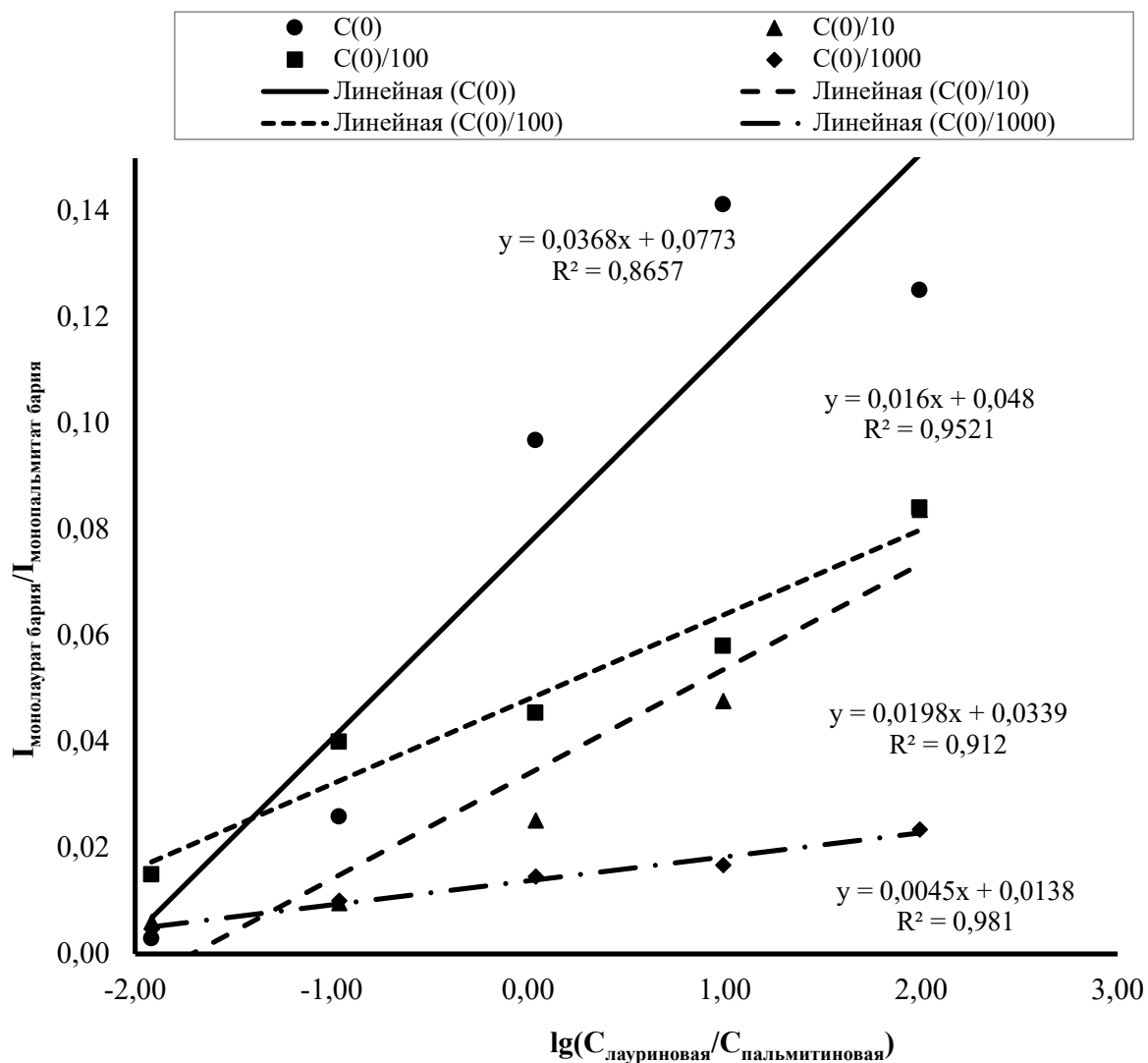


Рисунок Б.1 – Лауриновая кислота

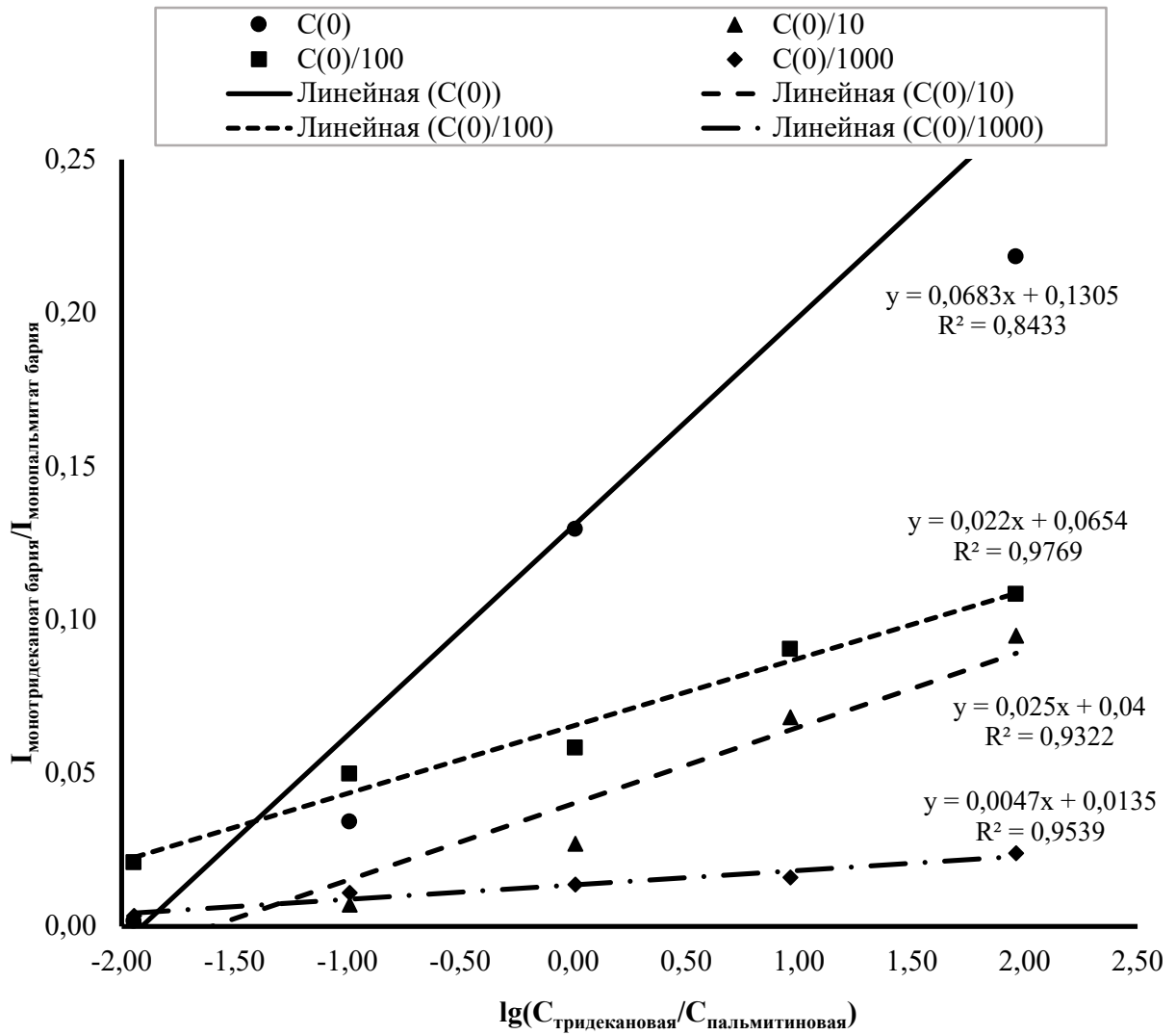


Рисунок Б.2 – Тридекановая кислота

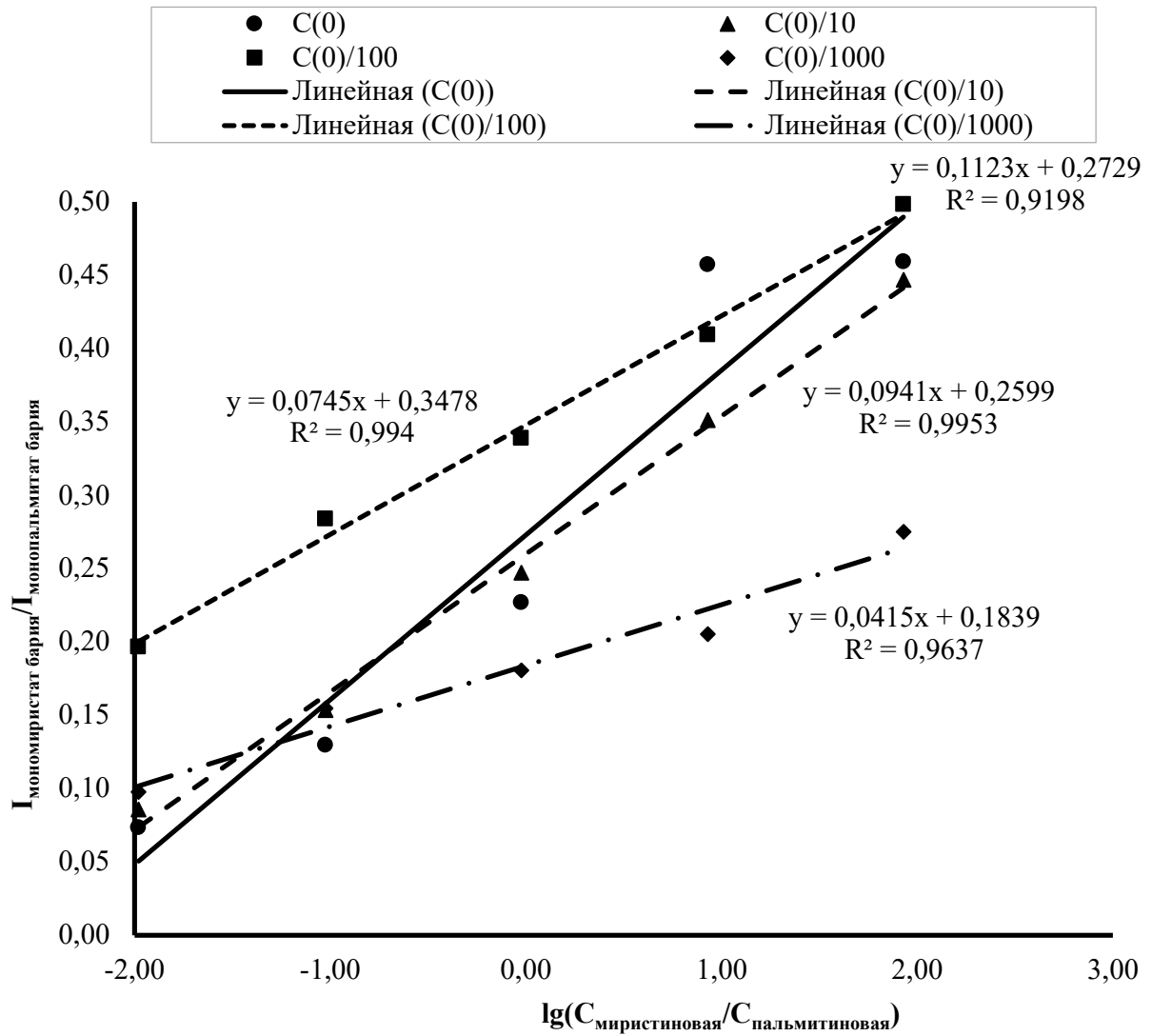


Рисунок Б.3 – Миристиновая кислота

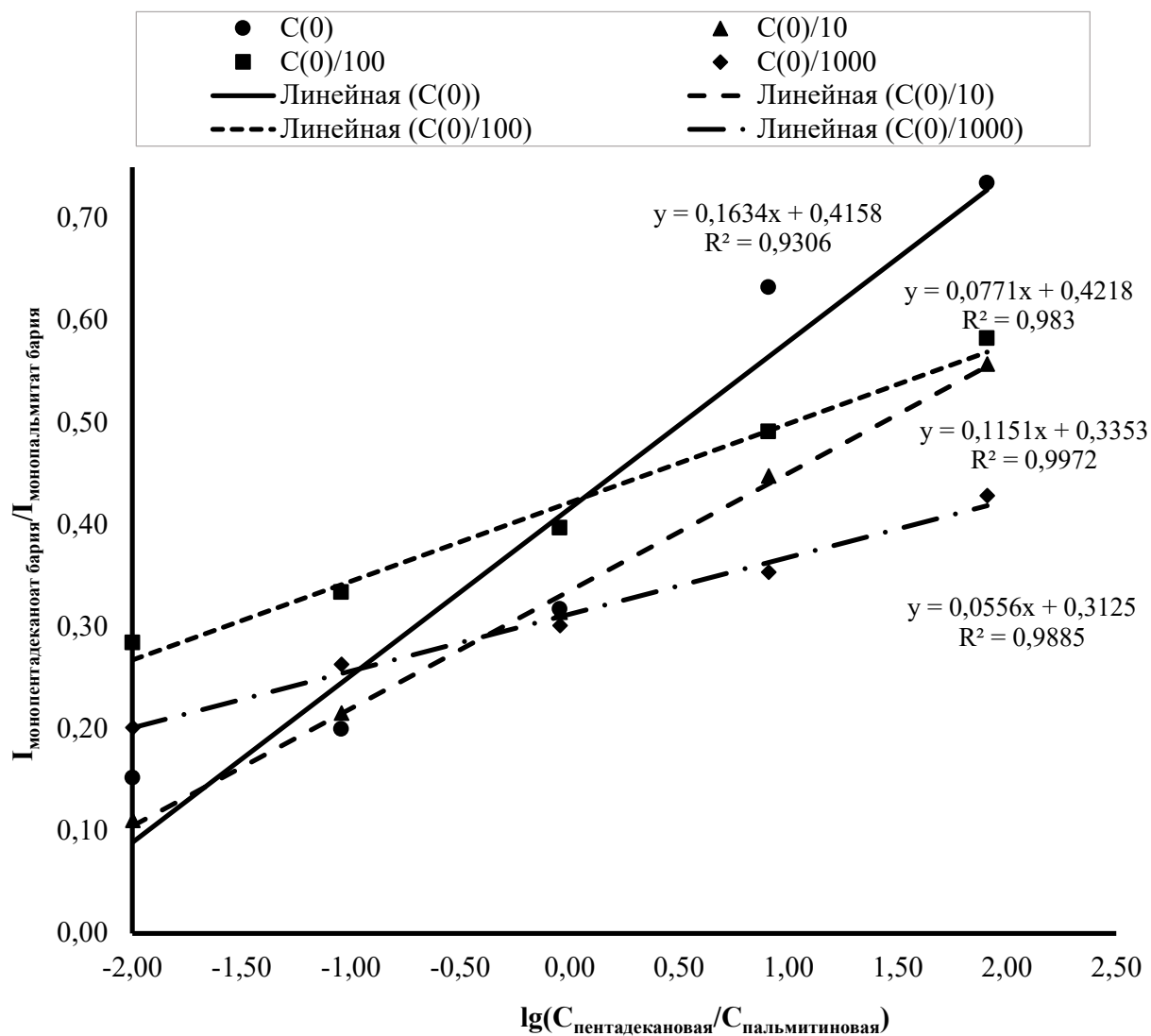


Рисунок Б.4 – Пентадекановая кислота

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Описание эксперимента по исследованию влияния изотопного распределения бария на полуколичественную оценку содержания СЖК

Были приготовлены н-гексановые растворы четырех стандартов СЖК, две из которых являются мононенасыщенными (пальмитолеиновая, олеиновая) и две насыщенными (пальмитиновая, стеариновая), с концентрацией 1 мг/мл. Затем в микропробирке были смешаны равные объемы растворов пальмитолеиновой и олеиновой кислот, после чего к полученной смеси добавили н-гексан таким образом, чтобы довести концентрацию каждой кислоты в растворе до 0,2 мг/мл. Полученный раствор был обозначен как Y1. Аналогичным образом были смешаны растворы насыщенных СЖК и получен раствор Y2.

Таблица В.1 – Схема смешивания растворов Y1 и Y2

Содержание ненасыщенных СЖК, %	Объем раствора Y1, мкл	Объем раствора Y2, мкл
5	5	95
10	10	90
20	20	80
40	40	60
60	60	40
80	80	20

Растворы, полученные смешением растворов Y1 и Y2 (Табл. В.1) и отличающиеся различным процентным содержанием ненасыщенных СЖК, наносили на мишень в соответствии с разработанной методикой. Аналогичным образом на мишень был нанесён раствор Y2, в котором содержание ненасыщенных СЖК было равно 0. С каждой ячейки мишени, на которую был нанесен образец, регистрировали по 5 спектров. Результаты анализа приведены в Таблице В.2. Интенсивность сигнала монопальмитолеата бария (m/z 391,1) нормировали на интенсивность сигнала монопальмитата бария (m/z 393,1), интенсивность сигнала моноолеата бария (m/z 419,2) нормировали на интенсивность сигнала моностеарата бария (m/z 421,2); в случае нанесения раствора Y2 сигналы с m/z 391,1 и 419,2 соответствовали третьим изотопомерам монопальмитата и моностеарата бария, соответственно.

