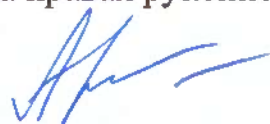


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт аналитического приборостроения Российской академии наук
Федеральное государственное унитарное предприятие "Научно-
исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека"
Федерального медико-биологического агентства

На правах рукописи



Горбунов Александр Юрьевич

МИКРОРЕАКТОРНОЕ УСТРОЙСТВО, ИНТЕГРИРУЮЩЕЕ
ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ
КСЕНОБИОТИКОВ И ПРОБОПОДГОТОВКУ В ФОРМАТЕ «ЛАБОРАТОРИЯ
НА МИШЕНИ»

1.3.2. – приборы и методы экспериментальной физики

1.4.2 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научные руководители:
кандидат химических наук,
Подольская Екатерина Петровна
кандидат биологических наук,
Бабаков Владимир Николаевич

Оглавление

Введение.....	5
1 Обзор литературы.....	11
1.1 Биотрансформация ксенобиотиков	11
1.2 Моделирование биотрансформации ксенобиотиков	14
1.2.1 Общепринятые методы моделирования.....	14
1.2.2 Применение электрохимического окисления для моделирования метаболизма	17
1.2.3 Применение фотокаталитического окисления для моделирования метаболизма	20
1.2.3.1 TiO ₂ фотокатализ	25
1.3 Методы на основе лазерной десорбции/ионизации.....	30
1.3.1. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация	31
1.3.2 Поверхностно-активированная лазерная десорбция/ионизация	33
1.4 «Лаборатория на мишени»	36
2 Материалы и методы.....	41
2.1 Материалы.....	41
2.1.1 Проведение электрохимического окисления диклофенака	42
2.1.2 Проведение УФ/TiO ₂ -ФКО диклофенака в суспензии (в объёме)	43
2.1.3 ВЭЖХ/МС/МС анализ продуктов окисления диклофенака	44
2.1.4 МС-ИЦР ПФ анализ продуктов окисления диклофенака в режиме прямого ввода	45
2.2 Проведение УФ/TiO ₂ -ФКО на модифицированной TiO ₂ МАЛДИ-мишени..	46
2.2.1 Получение покрытия TiO ₂ с использованием метода «сухих капель»	46
2.2.2 Получение покрытия TiO ₂ с использованием метода электрофоретического осаждения	46
2.2.3 Характеризация полученных покрытий.....	47
2.2.4 УФ/TiO ₂ -ФКО на МАЛДИ-мишени модифицированной TiO ₂	47
2.2.5 ПАЛДИ-МС анализ	47
2.4 96-луночный УФ/TiO ₂ -фотокаталитический микрореактор (РСμR96)	48

2.4.1	Получение TiO ₂ /ПДМС покрытий.....	50
2.4.2	УФ/TiO ₂ -ФКО амодиахина.....	50
2.4.5	Получение аддуктов глобина с продуктами окисления амодиахина.....	50
2.4.7	ПАЛДИ-МС анализ	51
2.4.8	МАЛДИ-МС анализ	52
2.4.9	Получение сорбентов на МАЛДИ-мишени	52
2.4.10	Формирование структур FLa.....	53
2.4.11	Атомно-силовая микроскопия	53
2.4.12	Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия	54
2.4.13	Световая микроскопия.....	54
2.4.14	Проведение металл-аффинной экстракции на сорбентах	54
2.4.15.	Модификация глобина человека алкилирующими агентами	55
2.4.16.	Ферментативный гидролиз в присутствии трипсина	55
3.1	Выбор метода моделирования окислительной биотрансформации	56
3.2	Проведение УФ/TiO ₂ -ФКО на МАЛДИ-мишени.....	62
3.3	Применение электрофоретически модифицированной TiO ₂ МАЛДИ- мишени для ПАЛДИ-МС.....	65
3.3.1	ЭФО TiO ₂	67
3.3.2	Модификация TiO ₂ покрытия полидиметилсилоксаном.....	70
3.3.3	ПАЛДИ-МС анализ амиодарона.....	71
3.4	Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени».....	76
3.4.1	96-луночное УФ/TiO ₂ -фотокаталитическое микрореакторное устройство (РСμR96).....	77
3.4.2	Оптимизация геометрии лунок микрореактора	79
3.4.3	Последовательные этапы пробоподготовки	85
3.5	Моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков с использованием РСμR96	87

3.5.1 Моделирование окислительной биотрансформации амодиахина.....	87
3.6 Получение аддуктов с глобином.....	89
3.6.1 Получение аддуктов глобина с продуктами окисления амодиахина.....	90
3.7 Металл-аффинная экстракция галогенсодержащих аддуктов глобина человека в формате «лаборатория на мишени»	92
3.7.1. Исследование состава и морфологии сорбента на основе стеарата лантана.....	93
3.7.2 Металл-аффинная экстракция на FLа в формате «лаборатория на мишени»	96
3.7.3 Интеграция стадии металл-аффинной экстракции с устройством РСμR96	101
4 Основные результаты и выводы.....	107
Приложение А.....	132
Приложение Б.....	152
Приложение В.....	155
Приложение Г.....	162

Введение

Актуальность темы

Масс-спектрометрия (МС) в сочетании с матрично- и поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ/ПАЛДИ) характеризуется высокой эффективностью ионизации и позволяет осуществлять высокопроизводительный анализ как низкомолекулярных аналитов, так и соединений пептидной природы. Однако, необходимость последовательного переноса образцов при многостадийной пробоподготовке приводит к значительной потере целевых соединений, может влиять на корректность полученных результатов, а также снижает производительность анализа. Решением этой проблемы может являться интегрирование последовательных этапов пробоподготовки непосредственно на МАЛДИ-мишени за счет функционализации поверхности МАЛДИ-мишени и/или путём использования дополнительных устройств, обратимо закрепляемых на ней. Для обозначения такого подхода был предложен термин "лаборатория на мишени" (lab-on-plate). "Лаборатория на мишени" позволяет осуществлять не только рутинные процедуры пробоподготовки, такие как очистка и концентрирование образцов, но и параллельно проводить различные химические реакции с последующим МС анализом полученных продуктов. Микрореакторные устройства на основе МАЛДИ-мишени особенно актуальны для приложений, требующих высокопроизводительного анализа продуктов химических взаимодействий, таких как скрининг кандидатных соединений на раннем этапе разработки лекарственных средств (ЛС).

Биологические свойства ЛС в значительной степени определяются их метаболическими превращениями в организме (биотрансформацией). Преобразование ЛС в химически реактивные метаболиты (биоактивация) рассматривается как основной механизм побочных токсических эффектов, таких как идиосинкратическая гепатотоксичность. Моделирование биотрансформации при разработке ЛС позволяет предсказать побочные токсические эффекты в ходе

ранних доклинических исследований и исключить из дальнейшего рассмотрения кандидатные соединения с нежелательным метаболизмом.

Традиционные методы моделирования с использованием биологических систем (микросомы печени, гепатоциты, клеточные и органные модели печени, лабораторные животные) позволяют получить наиболее полную картину биотрансформации исследуемого ЛС, но при этом достаточно сложны и трудоёмки. Поскольку в значительном большинстве случаев биоактивация ЛС происходит за счёт окислительных реакций фазы I, таких как дегидрогенирование и гидроксילирование, было предложено несколько простых, быстрых и сравнительно недорогих методов неферментативного моделирования окислительной биотрансформации ЛС, которые являются чисто инструментальными и не требуют использования биоматериалов. Наибольшее распространение получили методы, основанные на электрохимическом окислении (ЭХО) и УФ-индуцированном фотокаталитическом окислении в присутствии наночастиц TiO_2 (УФ/ TiO_2 -ФКО), которые представляются перспективными, так как позволяют достаточно полно имитировать окислительный метаболизм ЛС *in vivo*. Реакционная способность полученных продуктов окисления может быть оценена по образованию ковалентных аддуктов с модельными биомолекулами (например, конъюгатов с глутатионом или белками).

Совмещение простоты и эффективности фотокаталитического моделирования окислительной биотрансформации ЛС с высокой чувствительностью и скоростью ЛДИ-МС-анализа позволяет повысить производительность и снизить себестоимость предварительного скрининга кандидатных ЛС на предмет образования реактивных метаболитов в ходе ранних доклинических исследований. Таким образом, разработка высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени, интегрирующей моделирование биотрансформации ЛС и дальнейшую пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени», является актуальной задачей.

Цели и задачи

Цель работы – разработка микрореакторного устройства, интегрирующего фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующую пробоподготовку в рамках одной высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени.

Задачи исследования:

1. Разработать прототип фотокаталитического микрореакторного устройства, позволяющего последовательно проводить моделирование метаболизма исследуемых соединений, образование аддуктов белков с продуктами окисления, ферментативный гидролиз модифицированных белков и концентрирование образцов непосредственно на МАЛДИ-мишени.

2. Разработать метод формирования гидрофобного фотокаталитического покрытия на основе TiO_2 для использования в качестве эмиттера ионов при поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (ПАЛДИ) ксенобиотиков и продуктов их окисления.

3. Исследовать УФ/ TiO_2 -ФКО ряда модельных ЛС, сопоставить полученные продукты окисления с известными метаболитами.

4. Апробировать прототип устройства для моделирования окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующей пробоподготовки.

5. Разработать методики идентификации продуктов окисления ксенобиотиков и их аддуктов с белками на примере глобина человека методами ЛДИ-МС.

Научная новизна работы

Предложено научное обоснование нового технического решения, позволяющего проводить высокопроизводительное моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков в формате «лаборатория на мишени». Разработана методика фотокаталитического окисления исследуемых соединений, образования их аддуктов с белком и последующей пробоподготовки в лунках-микрореакторах непосредственно на МАЛДИ мишени.

Установлено, что электрофоретическое осаждение наночастиц TiO_2 позволяет получать высококачественное многофункциональное покрытие с воспроизводимыми характеристиками, которое может быть эффективно использовано как в качестве фотокатализатора при УФ/ TiO_2 -ФКО, так и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе. Показано, что использование в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ гидрофобного композитного покрытия, полученного путём ЭФО TiO_2 с последующей поверхностной модификацией полидиметилсилоксаном, обеспечивает формирование протонированных молекул аналита $[\text{M}+\text{H}]^+$ при отсутствии катионированных аддуктов $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Разработана методика функционализации поверхности МАЛДИ-мишени металл-аффинным сорбентом на основе стеарата лантана (монослой Ленгмюра). Показано, что стадия металл-аффинной экстракции пептидных аддуктов с метаболитами хлорсодержащих ксенобиотиков может быть успешно включена в предложенную методику как дополнительный этап пробоподготовки.

Идентифицированы аддукты глобина человека с продуктами окисления амодиахина по остаткам αCys104 , βCys93 и βCys112 , которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации. На примере аддуктов глобина человека с продуктами окисления амодиахина показана возможность их селективной экстракции методом металл-аффинной хроматографии.

Практическая значимость работы

Полученные результаты были внедрены и используются в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, а также в лабораториях химической и токсикологической диагностики и медицинских проблем химической безопасности ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России (Приложение Г).

Разработанная экспериментальная установка может быть использована в фармацевтических компаниях и научно-исследовательских учреждениях для моделирования окислительной биотрансформации и доклинической оценки потенциальной токсичности препаратов-кандидатов, а также для разработки

аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с долгоживущими белками при ретроспективной диагностике интоксикаций.

Основные положения, выносимые на защиту

1. УФ/TiO₂-ФКО позволяет моделировать окислительную биотрансформацию диклофенака (ДФ) и обеспечивает высокий выход двух основных метаболитов, образующихся *in vivo* - 5-ОН-ДФ и 4'-ОН-ДФ. По сравнению с электрохимическим окислением, УФ/TiO₂-ФКО более полно воспроизводит окислительный метаболизм ДФ и характеризуется значительно большей степенью конверсии.

2. Электрофоретическое осаждение наночастиц TiO₂ приводит к формированию однородного и механически стабильного слоя наночастиц, прочно связанного с поверхностью подложки. Дополнительное силоксилирование придаёт покрытию сверхгидрофобные свойства и значительно увеличивает эффективность ПАЛДИ-МС анализа низкомолекулярных соединений при сохранении фотокаталитических свойств.

3. Предложенный прототип 96-луночного фотокаталитического микрореакторного устройства позволяет последовательно осуществлять на МАЛДИ-мишени УФ/TiO₂-ФКО ксенобиотиков, получение аддуктов белков с продуктами ФКО, ферментативный гидролиз модифицированных белков, концентрирование и сокристаллизацию пептидов с матрицей для последующей идентификации полученных продуктов путём ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа.

4. Продукты окисления ДФ, полученные путём УФ/TiO₂-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени и полученные путём стандартного УФ/TiO₂-ФКО в суспензии, хорошо согласуются между собой как по профилю, так и по относительному выходу. Глобин человека образует ковалентные аддукты с биологически значимыми реактивными продуктами окисления амодиахина, полученными путём УФ/TiO₂-ФКО.

5. Металл-аффинный сорбент на основе образованных стеаратом лантана монослоев Ленгмюра (FLa) может быть получен непосредственно на МАЛДИ-мишени. Функционализация поверхности МАЛДИ-мишени FLa позволяет

осуществлять селективную металл-аффинную экстракцию галогенсодержащих аддуктов как дополнительный этап пробоподготовки при использовании РСμR96, что обеспечивает значительное повышение чувствительности последующего МАЛДИ-МС анализа.

Степень достоверности

В работе использованы современные методы хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения, адекватные поставленным целям и сформулированным задачам исследования. Соискатель имеет 12 опубликованных печатных работ, в том числе 6 статей в научных рецензируемых журналах и 6 тезисов научно-практических конференций, 2 утвержденных акта о внедрении полезной модели (Приложение Г).

Апробация работы

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях: 43-м Конгрессе ФЕБС (FEBS) (Прага, Чехия, 2018); Всероссийской молодежной медицинской конференции «Алмазовские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2018); 7-й ежегодной конференции Analytix (Берлин, Германия, 2019); Республиканской конференции с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, Беларусь, 2020), Международной научно-практической конференции «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2021), десятом съезде ВМСО «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» IX всероссийская конференция с международным участием.

1 Обзор литературы

1.1 Биотрансформация ксенобиотиков

Ксенобиотики

Термин ксенобиотик происходит от греческих слов ξένος (xenos) – иностранец, незнакомец, чуждый и βίος (bios) – жизнь [1]. Ксенобиотики – это соединения чужеродные для организма, которые не могут быть получены биосинтетическим путем. К основным категориям ксенобиотиков можно отнести: лекарственные средства, химические соединения из которых состоят пищевые продукты, загрязняющие вещества и т.д. [2]. В рамках данной работы основное внимание будет уделено лекарственным средствам, биотрансформация (метаболизм) которых представляет особый интерес.

Метаболизм

Метаболизм ксенобиотиков, в том числе ЛС, в печени включает реакции биотрансформации фазы I, также известные как реакции функционализации, (гидролиз, окисление или восстановление). Ключевыми ферментами фазы I являются цитохромы семейства P450, а также, в меньшей степени, эпоксидгидролазы и моноаминоксидазы. Образовавшиеся метаболиты далее могут быть детоксицированы или биоактивированы через дополнительные реакции фазы I или путём конъюгации с различными эндогенными гидрофильными молекулами через реакции биотрансформации фазы II, катализируемые трансферазами (например, глюкуронирование, сульфатирование и ацетилирование). Активное выведение (экскреция) модифицированных метаболитов, также известное как фаза III, осуществляется с участием белков-транспортёров [3,4].

Метаболизм ЛС является основным определяющим фактором гепатотоксичности, поскольку наряду с детоксикацией также могут протекать процессы биоактивации, которые в большинстве случаев ответственны за токсические эффекты. Важной особенностью метаболизма лекарств в печени является возможность преобразования исходных соединений в химически реактивные промежуточные метаболиты (т.е. биоактивация), которые атакуют

компоненты ткани, потенциально приводя к мутациям или некрозу тканей [5]. Таким образом, гепатотоксичность, вызванная ЛС, может быть следствием токсичности исходного лекарственного средства как такового или результатом действия одного или нескольких его метаболитов, которые возникают в результате биотрансформации в печени (рисунок 1). Соответственно, токсичность ксенобиотика во многом зависит от баланса между детоксикацией и биоактивацией. Следовательно, при разработке нового ЛС должны быть хорошо изучены процессы его биотрансформации, чтобы предсказать возможные физиологические эффекты, включая нежелательные [2,6].

Существует ряд пролекарств, которые преобразуются в активные действующие вещества благодаря метаболизму в печени, что уменьшает потенциальную токсичность исходного соединения, а также увеличивает его биодоступность. Примерами могут служить циклофосфамид [7] и L-Дора [8]. С другой стороны, интересным примером дозозависимой гепатотоксичности является парацетамол, биотрансформация которого при передозировке приводит к преимущественному образованию в ходе фазы I токсичного хинониминового метаболита - N-ацетил-п-бензохинонимина. Этот реактивный продукт окисления образует ковалентные аддукты с белками (истощение пула глутатиона), что приводит к некротической и апоптотической гибели клеток и, в конечном итоге, к печёночной недостаточности [9]. Кроме того, метаболизм фазы II также может приводить к образованию гепатотоксических производных. Например, карбоновые кислоты, такие как бромфенак (и другие нестероидные противовоспалительные ЛС) или вальпроевая кислота, биоактивируются с образованием тиоэфиров ацил-кофермента А, которые являются промежуточными продуктами в реакциях конъюгации фазы II и могут ковалентно связываться с восстановленным глутатионом и белками [10,11]. Следовательно, такие факторы как ингибирование или индукция ферментов биотрансформации, их генетический полиморфизм, а также взаимодействие лекарственных средств, могут определять повышенную активность и токсичность лекарства или, напротив, отсутствие эффекта.

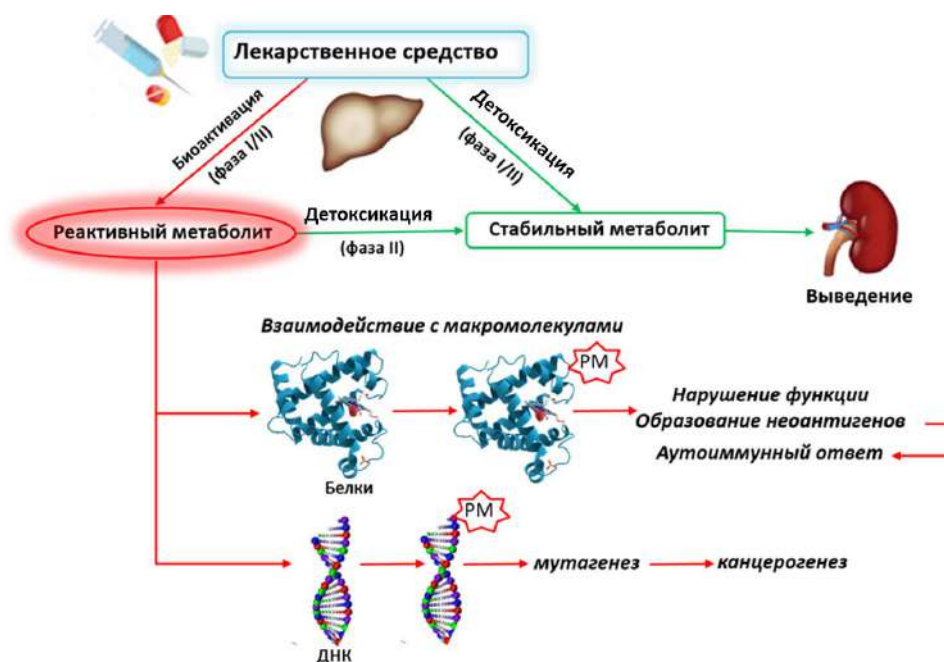


Рисунок 1 - Схематическое представление механизма гепатотоксичности

Реактивные метаболиты

В 1940-х и 1950-х годах исследования Джеймса и Элизабет Миллер предоставили первые доказательства превращения химических канцерогенов в реактивные метаболиты *in vivo* [12]. Для описания этого процесса Миллерами был предложен термин «метаболическая активация». Они обнаружили, что реактивные метаболиты аминоазокрасителя N, N-диметил-4-аминоазобензола, гепатоканцерогена для крыс, ковалентно связываются с белками и нуклеиновыми кислотами. Более того, они продемонстрировали, что ковалентное связывание этих ксенобиотиков является важной частью канцерогенного процесса. Общая схема метаболизма потенциально токсичных ксенобиотиков представлена на рисунке 1. Как показано на этой схеме, в ходе метаболизма ксенобиотиков могут образовываться не только нетоксичные метаболиты, которые являются более полярными и легко выводятся из организма (детоксикация), но также и высокоактивные метаболиты, способные взаимодействовать с жизненно важными внутриклеточными макромолекулами, что приводит к токсичности. Кроме того, реактивные метаболиты могут быть детоксицированы, например, путем взаимодействия с глутатионом [13].

Реактивные метаболиты обычно представляют собой электронодефицитные молекулы (электрофилы). Электрофильные соединения могут реагировать с электроноизбыточными молекулами (нуклеофилами) с образованием ковалентных связей. Нуклеофилы обычно содержат такие атомы, как S, N или O, которые имеют неподеленную пару электронов, способную образовать новую связь. Такие нуклеофильные группы присутствуют в макромолекулах, таких как белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Химически активные метаболиты могут напрямую реагировать с белками, что приводит к гаптенизации и образованию неоантигенных детерминант [14,15]. Такие модифицированные белки могут восприниматься иммунной системой как «чужеродные», что приводит к иммунному ответу. Химически реактивные электрофилы могут также ковалентно реагировать с ДНК, вызывая изменения в структуре ДНК или экспрессии генов. Изменения в структуре ДНК могут способствовать мутагенезу и канцерогенезу [16-19].

1.2 Моделирование биотрансформации ксенобиотиков

1.2.1 Общепринятые методы моделирования

На ранних стадиях разработки ЛС фармакокинетика кандидатного препарата (главным образом, метаболизм) обычно изучается *in vitro* с использованием клеток или субклеточных фракций печени животных и человека. Широко используемыми субклеточными фракциями являются микросомы, цитозоль и фракция S9, которые получают путем дифференциального ультрацентрифугирования гомогената клеток печени. Эти фракции обладают различными профилями активности ферментов детоксикации и применимы для разных целей [20,21]. Микросомная фракция представлена преимущественно везикулярными фрагментами эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, и, таким образом, содержит большинство ферментов фазы I (главным образом, P450). Цитозольная фракция печени содержит растворимые ферменты фазы II (трансферазы). Фракция S9 включает как цитозоль, так и микросомы, то есть содержит практически полный набор ферментов, осуществляющих биотрансформацию ксенобиотиков. Соответственно, фракция S9 демонстрирует

более низкую скорость биотрансформации с участием P450, чем микросомы, но обеспечивает более полную картину метаболических реакций, протекающих в гепатоците.

Поскольку группа ферментов P450 представлена множеством изоформ с различными профилями экспрессии у разных организмов, особенно важно идентифицировать конкретные изоформы P450, участвующие в метаболизме данного ксенобиотика. Такое фенотипирование изоформ может выполняться путём гетерологичной экспрессии рекомбинантных P450 [22]. Использование в качестве модельной системы интактных гепатоцитов технически сложнее, чем использование гомогената клеток печени, так как предполагает выделение и культивирование жизнеспособных клеток. Однако, интактные гепатоциты содержат весь спектр ферментов, метаболизирующих лекарственные средства, и часто используются для изучения процессов индукции ферментов [23]. С переходом от однотипных клеточных культур к двух- и трёхмерным органным моделям становится возможным изучение комплексных ответов на долгосрочные токсические воздействия с участием клеток различных типов [24].

Фармакокинетические исследования на животных обычно проводятся на протяжении всего процесса разработки ЛС. Исследования же на людях, требующие гораздо больших ресурсов и соблюдения строгих нормативных требований, проводятся в период от поздней фазы I до ранней фазы III клинических исследований [25]. Экстраполяция данных, полученных на животных, позволяет предсказать большинство метаболитов, которые, как ожидается, будут образовываться у человека [26]. Тем не менее, возможность образования метаболита, уникального для людей, остается серьезной проблемой, поскольку его обнаружение замедляет или даже останавливает процесс разработки ЛС спустя годы после того, как были сделаны первые крупные инвестиции. Следовательно, рекомендуется проводить фармакокинетические исследования на людях как можно раньше.

С аналитической точки зрения, радиоактивное мечение и масс-спектрометрический анализ составляют методологическую основу выявления и

идентификации метаболитов [27,28]. Использование радиоактивно меченых соединений при тестировании *in vivo* и *in vitro* позволяет обнаруживать ЛС и их метаболиты в жидкостях и тканях организма с очень низкими пределами обнаружения. Кроме того, качественную и количественную информацию о метаболитах получают путём комбинирования хроматографических методов разделения с методами масс-спектрометрического анализа [29,30]. После выделения определенного метаболита в достаточной концентрации, обязательным инструментом для абсолютной идентификации остаётся ЯМР-спектроскопия [31]. Особого внимания требует обнаружение реактивных метаболитов *in vivo* и *in vitro*. Реактивные метаболиты представляют собой высокоэлектрофильные соединения, которые вступают в последующие реакции с нуклеофильными эндогенными соединениями. В присутствии улавливающих агентов, таких как глутатион, реактивные метаболиты подвергаются реакциям конъюгации и тем самым детоксицируются с последующим выводом из организма. В отсутствие подобных улавливающих агентов или при их нехватке может происходить образование аддуктов с белками. Таким образом, при осаждении белков после инкубации с микросомами эти аддукты удаляются из анализируемой смеси и остаются не идентифицированными. В связи с этим для определения промежуточных продуктов метаболизма, являющихся жёсткими или мягкими электрофилами, в инкубационные смеси обычно добавляют низкомолекулярные "ловушки", такие как цианид калия, глутатион и N-ацетилцистеин [32,33].

Совершенно отдельным направлением исследований метаболизма лекарственных средств является предсказание метаболитов методами *in silico* [34-36]. Эти компьютерные подходы можно разделить на разные категории. Существуют, например, экспертные системы, основанные на опыте и знаниях, полученных в результате многочисленных исследований метаболизма функциональных групп в сопоставимых лекарствах [37,38]. Другие методы нацелены на прогнозирование метаболизма на основе информации об активном центре P450 [39,40]. В будущем исследования метаболизма *in silico* могут позволить предсказывать метаболизм кандидатных молекул до их синтеза. Таким

образом, ведущие структуры могут быть оптимизированы с точки зрения их метаболической стабильности и токсикологической безопасности, что делает процесс разработки лекарственных средств более эффективным.

1.2.2 Применение электрохимического окисления для моделирования метаболизма

ЭХО как инструмент изучения реакций окислительного метаболизма было впервые предложено Шоно и соавт. в 1981 [41]. На примере N-деалкилирования четырёх нейрофармакологических препаратов, включая имипрамин и диазепам, было показано, что анодное окисление в электрохимическом реакторе является очень мягким методом получения метаболитов и эффективным способом моделирования биотрансформации лекарственных средств, при этом обеспечивая больший выход продуктов по сравнению с микросомами печени. В 1986 г. было предложено идентифицировать продукты окисления в режиме реального времени путём сопряжения электрохимической ячейки с масс-спектрометром [42]. Примерно 10 лет спустя Ивахаши и Исии добавили в аналитический процесс хроматографическое разделение [43]. Таким образом, ЭХО было сопряжено с ВЭЖХ/ИЭР-МС (высоко эффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением), что позволило генерировать, разделять и выявлять продукты окисления в режиме реального времени. Современные способы электрохимической имитации окислительного метаболизма лекарств основаны на использовании систем ЭХО/ИЭР-МС и ЭХО/ВЭЖХ/ИЭР-МС. Как правило, соответствующие электрохимические ячейки должны обеспечивать высокую степень конверсии, низкую адсорбцию неполярных соединений, широкий диапазон потенциала и хорошую воспроизводимость условий.

Кулонометрические ячейки

Устройство типичной кулонометрической ячейки (проточной ячейки) показана на рисунке 2А (модель 5021, ESA Biosciences, Челмсфорд, Массачусетс, США). Главным элементом ячейки является рабочий электрод из пористого стеклоуглерода, интегрированный в типичную трехэлектродную систему с

электродом сравнения (Pd/H₂) и противоэлектродом (Pd). Раствор, содержащий ЛС, чаще всего пропускается через ячейку с помощью шприцевого насоса, при этом окисление происходит на большой поверхности рабочего электрода [44-46]. Основное преимущество кулонометрических ячеек - высокая степень конверсии даже при больших скоростях потока. При подключении ячейки непосредственно к ВЭЖХ-системе, ЭХО должно проводиться при скорости потока не более 1,5 мл/мин [47]. В системах ЭХО/ИЭР-МС, а также в улучшенных системах ЭХО/ВЭЖХ/ИЭР-МС, которые содержат инжекционный клапан между ячейкой и колонкой, применяются более низкие скорости потока - 10 мкл/мин [48]. Как правило, снижение скорости потока увеличивает время пребывания окисляемых соединений в электрохимической ячейке и, следовательно, степень конверсии. Однако слишком большое снижение скорости потока может привести к повышенной адсорбции на поверхности электрода.

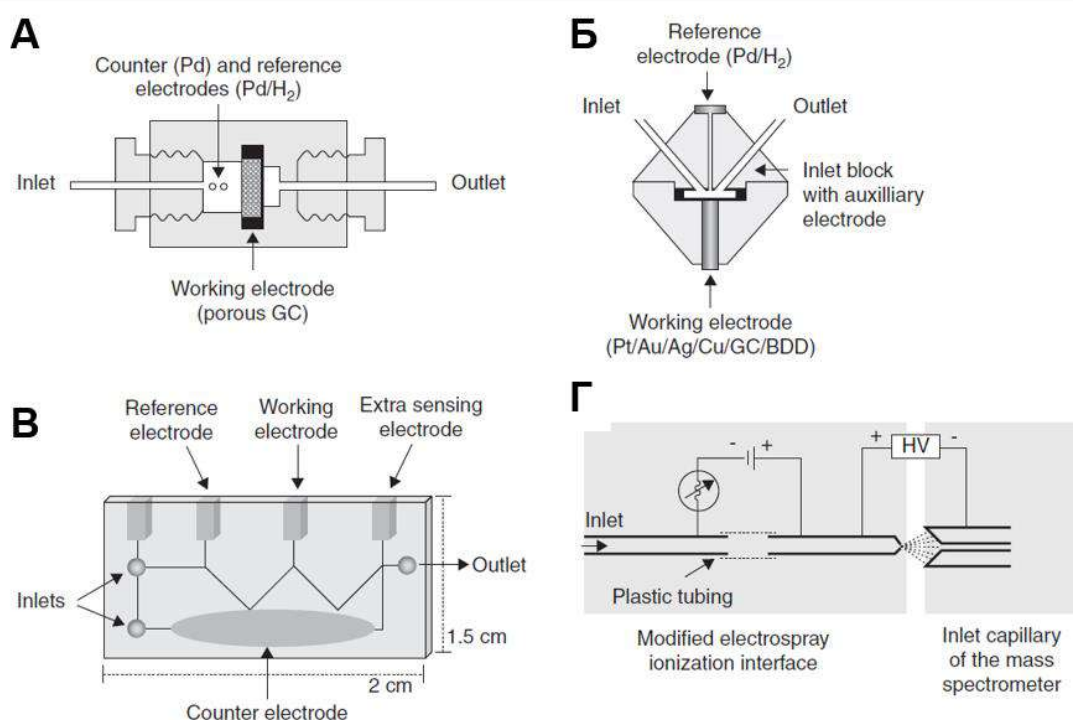


Рисунок 2 – Устройство ЭХО. (А) кулонометрическая проточная ячейка; (Б) амперометрическая тонкослойная ячейка; (В) тонкослойная ячейка, интегрированная в микрочип; (Г) ЭХО ячейка, интегрированная в источник ионов электроспрей

Амперометрическая ячейка

В отличие от кулонометрических проточных ячеек, амперометрические ячейки (тонкослойные ячейки) оснащены планарными рабочими электродами (рисунок 2Б, Reactor Cell, Antec Leyden, Zoeterwoude, Нидерланды). Для изучения процессов окисления биомолекул использовались различные тонкослойные ячейки, как коммерчески доступные, так и самодельные, подключённые к масс-спектрометру [49-51]. Значительно меньшая площадь поверхности требует максимальной скорости потока не более 10 мкл/мин. Существенным преимуществом тонкослойных ячеек является возможность использования рабочих электродов из различных материалов. Помимо графитового электрода, наиболее перспективными альтернативами являются электроды из платины и алмаза, легированного бором [52]. Оба показывают в целом меньшую адсорбцию неполярных лекарств и обеспечивают более широкий диапазон потенциала. Плоская поверхность рабочего электрода допускает меньшее содержание органического растворителя в реакционной смеси, и даже если наблюдается остаточная адсорбция, поверхность электрода можно отполировать вручную. Также описана тонкослойная ячейка на микрочипе (рисунок 2В), которая успешно использована для моделирования окислительного метаболизма амодиахина [53].

Поскольку электрораспылительный источник ионов сам по себе может рассматриваться как электрохимическая ячейка, преобразующая нейтральные молекулы в заряженные аналиты, были разработаны электрохимические модули, встроенные непосредственно в ИЭР-интерфейс. Получение продуктов окисления непосредственно в источнике ионов позволяет выявлять короткоживущие реактивные соединения, например, катион-радикалы. Типичная установка, применённая группой Brajter-Toth, показана на рисунке 2 Г. Игла ИЭР-интерфейса модифицирована таким образом, что исследуемые соединения окисляются непосредственно перед электрораспылением. Установка была использована для изучения процессов окисления мочевой кислоты, дофамина и пуриновых оснований [54-56].

К настоящему времени, ЭХО успешно использовано для имитации большинства реакций окислительного метаболизма, включая N-деалкилирование, дегидрирование, ароматическое и алифатическое гидроксילирование, а также окисление гетероатомов.

Для моделирования окислительного метаболизма лекарств были разработаны различные системы анализа в режиме реального времени. Сопряжение ЭХО и ИЭР-МС позволяет получать так называемые трехмерные масс-вольтамперограммы, обеспечивающие очень быстрое выявление в составе молекулы лабильных сайтов, чувствительных к мягкому окислению. Включение в аналитическую систему жидкостного хроматографа (ЭХО/ВЭЖХ/ИЭР-МС) дополнительно позволяет разделять изомерные продукты окисления. Добавление на выходе из ячейки улавливающих агентов, таких как глутатион, позволяет оценить реакционную способность метаболитов в отношении эндогенных соединений. Кроме того, для выяснения структуры полученных метаболитов может быть дополнительно использована спектроскопия ЯМР.

1.2.3 Применение фотокаталитического окисления для моделирования метаболизма

Способность разлагать органические соединения под воздействием облучения с соответствующей энергией позволяет использовать фотокатализаторы для моделирования процессов метаболизма лекарств [57]. Благодаря образованию активных форм кислорода, вступающих в окислительно-восстановительные реакции с молекулами ЛС, возможна имитация биохимических реакций, которым лекарство подвергается в организме в ходе биотрансформации. Было установлено, что продукты фотокаталитической трансформации структурно совпадают с метаболитами, а эффективность и скорость этого метода являются одним из его преимуществ. Полученные многообещающие результаты стали основой для дальнейшего развития этого метода моделирования.

Исследования биотрансформации ЛС с использованием УФ/TiO₂-ФКО направлены на моделирование наиболее важных реакций окислительного

метаболизма, происходящих *in vivo*. К ним относятся реакции, катализируемые ферментами, а также неферментативные процессы окисления, протекающие по радикальному механизму. Сравнение механизмов реакций, протекающих *in vivo* и при УФ/TiO₂-ФКО, позволяет оценить возможности и выявить ограничения этого метода моделирования. УФ/TiO₂-ФКО может быть использовано для предсказания лабильных сайтов в составе молекулы, которые с высокой вероятностью будут подвержены окислению *in vivo*. Кроме того, представляющие интерес метаболиты могут быть синтезированы путём УФ/TiO₂-ФКО и выделены для дальнейшей идентификации и характеристики [57].

В одной из первых публикаций, описывающей этот подход, была продемонстрирована возможность применения фотокатализа для моделирования окислительной биотрансформации дексаметазона [58]. Для инициирования фотокаталитической реакции, суспензию TiO₂, содержащую дексаметазон, облучали ксеноновой лампой мощностью 1500 Вт, оснащенной фильтром 340 нм. По окончании ФКО суспензию фильтровали через фильтр 0,45 мкм и анализировали с использованием ВЭЖХ-МС. Полученные продукты окисления хорошо согласовались с данными о метаболизме дексаметазона *in vivo*.

В дальнейшем появился еще ряд работ, посвященных использованию УФ/TiO₂-ФКО для моделирования метаболизма ксенобиотиков (см. таблицу 1). Ключевой особенностью этих работ было проведение процесса фотокатализа в объеме (в перемешиваемой суспензии), что предполагало удаление наночастиц TiO₂ перед анализом продуктов окисления и, соответственно, приводило к снижению производительности метода.

Также в литературе описан ряд подходов, позволяющих проводить ФКО с последующим масс-спектрометрическим анализом.

Так, в работе [59] описана система на основе микрочипа с покрытием TiO₂ (μ PESI) позволяющая выполнять УФ/TiO₂-ФКО ЛС и масс-спектрометрический анализ полученных продуктов. Микрочип μ PESI был интегрирован в стандартный ИЭР масс-спектрометра Waters Q-TOF (рисунок 3).

Таблица 1 – Применение УФ/TiO₂-ФКО для моделирования метаболизма ксенобиотиков

<i>Лекарственное средство</i>	<i>Используемый источник излучения</i>	<i>Параметры ФКО</i>	<i>Растворитель</i>	<i>Ссылка</i>
Дексаметазон	Ксеноновая лампа 1500 W (>340 нм)	DegussaP25 TiO ₂ , 15 мин	вода	[58]
Синефрин Октопамин	UVA лампа (40 W/м ²)	DegussaP25 TiO ₂ 60 мин – синефрин 30 мин – октопамин	вода	[59]
Силденафил	UVA лампа (40 W/м ²)	DegussaP25 TiO ₂ , 10 мин	вода	[60]
Буспирон	Ксеноновая лампа 1500 W (>340 нм)	DegussaP25 TiO ₂ , 30 мин	вода	[61]
Промазин Буспирон Тестостерон 7-этоксикумарин	UVA лампа (225 mW/см ²)	Degussa P25 TiO ₂ 15 сек – буспирон, промазин 2 мин – тестостерон, 7-этоксикумарин	вода/ацетонитр ил (99:1)	[62]
Нандролон Метилтестостерон Метандиенон Тестостерон Станозолол	UVA лампа (225 mW/см ²)	Degussa P25 TiO ₂ 2 мин - нандролон метилтестостерон метандиенон тестостерон 15 мин - станозолол	вода/ацетонитр ил (99:1) вода/ацетонитр ил (50:50)	[63]
Парацетомол Кокаин	UVA лампа (6x8W)	Degussa P25 TiO ₂ 160 мин – парацетомол 120 мин. кокаин	вода/ацетонитр ил (50:50)	[64]

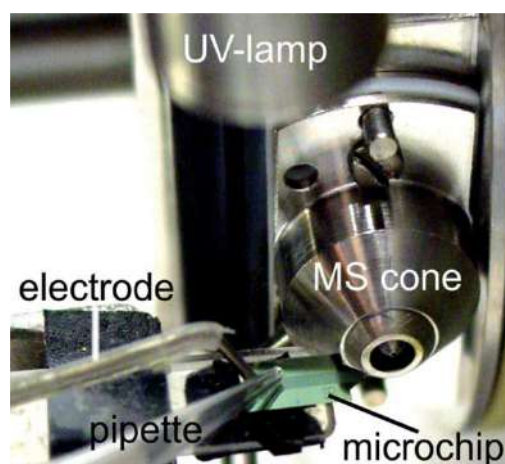


Рисунок 3 – Микрочип μ PESI, интегрированный в источник ионов электроспрей масс-спектрометра Waters Q-TOF

Перед проведением ФКО микрочип промывали, после чего на него наносили водный раствор, содержащий изучаемое ЛС. Для инициирования ФКО использовали УФ лампу с длиной волны 365 нм расположенную в источнике ионов над микрочипом. Полученные продукты окисления десорбировали с поверхности микрочипа путем подачи ионизированных капель полученных электроспылением промывочного раствора (90% метанол/1% муравьиная кислота/вода). Образующиеся ионы транспортировались в масс-спектрометр с использованием стандартной ионной оптики при атмосферном давлении. Идентифицированные продукты фотокаталитического окисления ЛС (пропранолол, лидокаин, метопролол, верапамил), полученные с помощью микрочипа, хорошо коррелировали с метаболитами, обнаруженными с помощью методов *in vitro* и *in vivo*. Авторами был сделан вывод, что предложенный подход может быть использован для быстрого прогнозирования фазы I метаболизма в ходе доклинической стадии исследования лекарственных средств.

Дальнейшим развитием подобных методов является устройство на основе вращающейся платформы [66]. Устройство представляет собой пластину, изготовленную из стекла Pyrex с покрытием TiO_2 . Платину крепили к вращающейся платформе, движущейся по осям x, y, z. Для проведения фотокаталитического окисления по периметру пластины наносили по 1 мкл водного раствора, содержащего ЛС, при этом диаметр капли образца составлял ~2,5 мм. В качестве источника излучения использовали УФ лампу 365 нм с интенсивностью светового потока 100 мВт/см^{-2} , расположенную на расстоянии 15 см от пластины. После испарения капли продукты ФКО десорбировали путем электрораспылительной ионизации (ДЕСИ) с последующим масс-спектрометрическим анализом. На рисунке 4 представлено схематическое изображение экспериментальной установки. Для проведения ДЕСИ использовали самодельное устройство на основе небулайзера от масс-спектрометра Agilent Ion Trap 6330 в режиме положительных ионов. Авторами было установлено, что пластина с фотокаталитическим покрытием может быть многократно использована после промывки органическим растворителем. При этом объем,

необходимый для реакции, составляет 1 мкл, что значительно меньше, чем в случае проведения ФКО в суспензии где объемы образца могут достигать сотен миллилитров. Также стоит отметить высокую пропускную способность предложенного подхода, позволяющего проводить фотокаталитическое окисление до 70 образцов одновременно. Возможность использования предложенного подхода для моделирования окислительной биотрансформации была оценена на модельных ЛС: буспирон, верапамил и амодиахин.

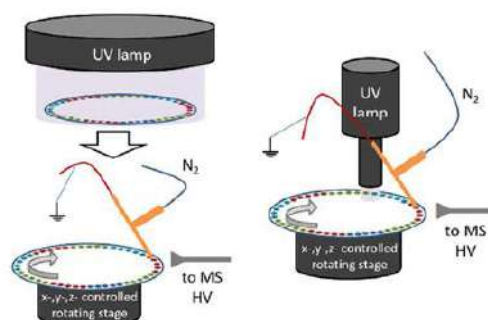


Рисунок 4 – Схематическое изображение экспериментальной установки [66]

Основным недостатком описанных выше подходов является невозможность мониторинга процесса ФКО в режиме реального времени (*in situ*) и, как следствие, определения промежуточных продуктов окисления. В связи с этим в работе [67] был предложен подход, который позволил совместить ФКО и лазерную абляцию с ИЭР (LAESI). Авторами была изготовлена экспериментальная установка, показанная на рисунке 5.

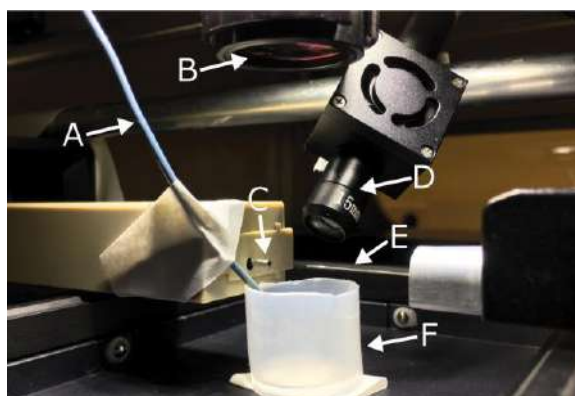


Рисунок 5 – Изображение установки LAESI-MS. (A) PEEK трубка для подачи воздуха, (B) линза фокусировки лазера среднего ИК-диапазона, (C) подогреваемый вход в MS, (D) УФ-лампа 365 нм, (E) ESI распылительная игла и (F) полипропиленовая чашка для образца [67]

За основу была взята коммерчески доступная система ионизации LAESI DP-1000 (Protea Biosciences), реализующая технологию электроспрейной ионизации с лазерной десорбцией LAESI, совмещенная с времяпролетным масс-спектрометром Waters Synapt G2S. Модельные ЛС растворяли в водной суспензии TiO_2 и помещали в полипропиленовый стакан для образцов. Для перемешивания суспензии в ходе фотокаталитической реакции производили ее барботирование потоком воздуха, который также служил источником кислорода. Далее образец подвергался УФ облучению в течении 60 мин, в течение которых суспензия также подвергалась непрерывным импульсам ИК-лазера с частотой 0,1 Гц, что приводило к десорбции полученных продуктов ФКО [67].

Следует отметить, что подобные методы отличаются технической изощрённостью, требуют специального оборудования и дополнительных материалов, что существенно ограничивает их массовое применение.

1.2.3.1 TiO_2 фотокатализ

Гетерогенный фотокатализ – это фотокаталитическое ускорение химической реакции на границе раздела фаз. Открытие этого явления ознаменовало начало его разнообразного использования в различных областях науки, и интерес к этому предмету отражен в большом количестве публикаций [68]. Принято считать, что эксперимент по фотостимулированному электролизу воды с использованием диоксида титана, проведенный в 1972 году, положил начало активным исследованиям в этой области [69]. Уникальные свойства этого материала стали причиной его широкого применения, особенно в экологической сфере [70-72]. Особого внимания заслуживает использование наночастиц TiO_2 для обеззараживания воздуха и очистки воды в связи с их способностью к разложению органических соединений [73-75]. Диоксид титана имеет также медицинское применение в качестве эффективного стерилизующего агента [76,77]. Более того, наночастицы диоксида титана могут быть использованы в качестве фототоксического агента для противораковой терапии [78].

Полупроводниковые материалы часто используются в качестве фотокатализаторов [79]. Согласно теории зонной энергии, прерывистая зонная

структура полупроводников состоит из низкоэнергетических валентных зон, заполненных электронами, высокоэнергетических зон проводимости и запрещенных зон. Когда энергия падающих фотонов равна ширине запрещенной зоны или превышает ее, происходит фотовозбуждение электронно-дырочных пар и, как следствие, фотокаталитическая окислительно-восстановительная реакция [80]. Фотокаталитический процесс в основном включает стадии генерации, разделения, рекомбинации и поверхностного захвата фотогенерированных электронов и дырочных пар. На поверхности твердого катализатора происходят фотохимические реакции, которые включают полуреакции окисления и восстановления с участием фотогенерированных дырок и электронов, соответственно [81]. Процесс, происходящий при облучении полупроводника, представлен на рисунке 6. Во время этого процесса большая часть фотогенерированных пар e^- / h^+ ($\sim 90\%$) быстро рекомбинирует на поверхности и внутри объёма частицы, что приводит к диссипации поглощенной энергии в форму света (генерация фотонов) или тепла (колебание решетки). Следовательно, эти носители заряда не могут участвовать в последующих окислительно-восстановительных реакциях, с чем связывают сравнительно невысокую фотонную эффективность (отношение скорости реакции к потоку фотонов, падающих на частицы фотокатализатора) полупроводникового фотокатализа [82].

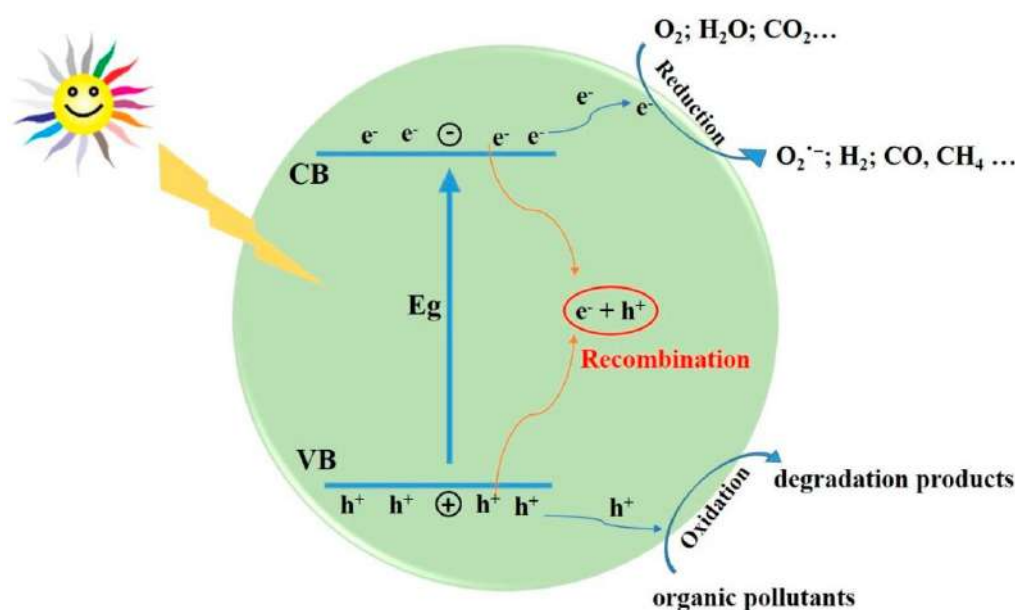


Рисунок 6 – Фотокаталитические процессы в полупроводниках [83]

Электроны и дырки, мигрировавшие на поверхность полупроводника без рекомбинации, могут участвовать в реакциях восстановления и окисления, соответственно, которые являются основой для фотодеградаций органических загрязнителей и фотокаталитического расщепления воды с образованием H_2 [84]. Будучи мощными окислителями, фотогенерированные дырки могут напрямую минерализовать органические загрязнители. Кроме того, дырки могут также образовывать гидроксильные радикалы с сильными окислительными свойствами. С другой стороны, фотовозбужденные электроны могут образовывать супероксидные радикалы. Эти свободные радикалы и пары e^- / h^+ обладают высокой реакционной способностью и могут индуцировать серию окислительно-восстановительных реакций. Кроме того, что касается расщепления воды, фотогенерированные электроны могут быть захвачены H^+ с образованием H_2 , в то время как дырки способны окислять H_2O с образованием O_2 [85-87].

В целом, чтобы повысить активность фотокатализатора и более эффективно использовать видимый свет, необходимо выполнить несколько требований. Во-первых, эффективность поглощения света определяет количество фотогенерированных носителей заряда на поверхности фотокатализатора. Кроме того, учитывая, что ультрафиолетовый свет занимает менее 4% спектра излучения солнечного света, в то время как видимый свет составляет примерно 40%, для поглощения солнечной энергии в широком диапазоне длин волн полупроводник должен обладать как можно меньшей шириной запрещенной зоны. Таким образом, оптимизация оптических свойств стала важным направлением разработки фотокатализаторов [88]. Также критически важно положение зон проводимости и валентных зон, которые ответственны за производство активных частиц. Кроме того, фотогенерированные электроны и дырки должны эффективно транспортироваться и разделяться в фотокатализаторе, поскольку в противном случае быстрая рекомбинация носителей заряда приведет к низкой реакционной способности. Наконец, готовые фотокаталитические материалы и процессы их модификации должны быть экологически безопасными и экономичными [89].

1.2.3.2 Получение покрытий TiO_2

Общепринятый способ проведения фотокатализа (в перемешиваемой суспензии) предполагает удаление наночастиц TiO_2 по завершении процесса. В связи с этим большое количество работ посвящено разработке эффективных способов получения покрытий на основе TiO_2 . Широкое распространение получили такие методы как химическое осаждение из газовой фазы [90], физическое осаждение из газовой фазы [91], золь-гель метод [92], плазменное напыление [93], электрофоретическое осаждение [94]. Среди известных методов формирования покрытий наиболее технологически гибким и перспективным может считаться электрофоретическое осаждение (ЭФО) благодаря простоте инструментальной реализации, дешевизне и возможности получения однородных покрытий с контролируемой толщиной. В отличие от технологий на основе химического и физического осаждения из газовой фазы или плазменного напыления, процесс ЭФО возможно проводить при комнатной температуре и атмосферном давлении. В сравнении с золь-гель методами, требующими использования органических прекурсоров (изопропоксид титана), ЭФО позволяет использовать экологически безопасные прекурсоры и растворители, в том числе и воду.

ЭФО основано на движении заряженных частиц в суспензии к противоположно заряженному электроду под действием электрического поля с образованием плотного, когерентного и однородного покрытия (рисунок 7). Требуемая установка состоит из простого оборудования, обычно включающего источник питания, мультиметр для регистрации плотности тока, емкость, содержащую осаждаемую суспензию (ячейка ЭФО) и два проводящих электрода, а именно рабочий электрод (подложка, на которую необходимо нанести покрытие) и противоэлектрод. Одним из основных преимуществ ЭФО является возможность настройки параметров в соответствии с особенностями подложки, то есть покрытие может быть нанесено на подложки различного размера и формы [95]. Традиционно ЭФО проводилось с использованием в качестве дисперсионной среды органических растворителей, в основном из-за того, что даже при низком

напряжении происходит электролиз воды [96], приводящий к образованию пузырьков на границе раздела электрод-суспензия и, как следствие, к неомогенности покрытий и коррозии подложки. Однако с точки зрения рентабельности и экологичности водные суспензии предпочтительнее. Чтобы преодолеть проблемы, возникающие при разложении воды, использовались различные подходы, такие как проведение ЭФО при импульсном токе (или напряжении) или при переменном токе.

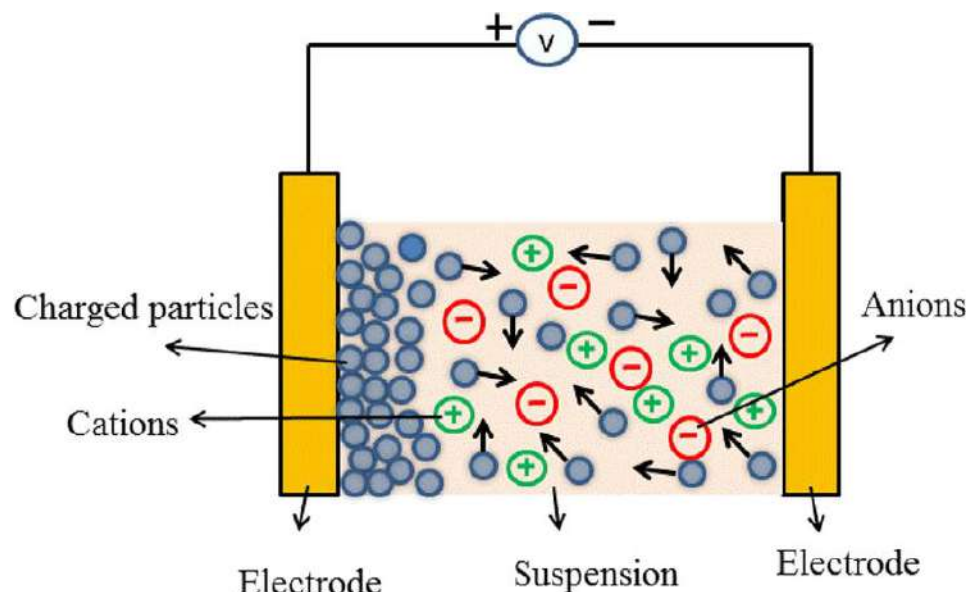


Рисунок 7 – Процесс электрофоретического осаждения [97]

Первая попытка соотнести количество осажденных частиц с параметрами, влияющими на ЭФО была предпринята Хамакером [98]. Линейное уравнение Хамакера связывает массу осажденных частиц (w) с напряженностью электрического поля (E), электрофоретической подвижностью (μ), площадью поверхности электрода (A) и массовой концентрацией частиц в суспензии (C) с помощью следующего уравнения:

$$w = \int_{t_1}^{t_2} \mu \cdot E \cdot A \cdot C \cdot dt \quad (1)$$

Несмотря на линейную зависимость между m и t , параметры, характеризующие суспензию (т. е. концентрация частиц и их электрофоретическая подвижность), имеют особое значение, поскольку они

определяют коллоидную стабильность частиц и имеют большое влияние на конечное качество покрытия. По причине относительной узости диапазона напряжений, допустимых для водных суспензий, были проведены многочисленные исследования ЭФО диоксида титана с использованием различных органических растворителей. Использование различных спиртовых сред было изучено разными авторами [99-101], при этом особое внимание уделялось влиянию значений pK_a , равновесного давления пара, вязкости и диэлектрических констант спиртов как на стабильность суспензии, так и на конечное качество получаемых покрытий. В работе [99] изучали осаждение наночастиц диоксида титана со средним размером 5 нм с использованием метанола, этанола и бутанола в присутствии триэтаноламина в качестве диспергента и обнаружили, что чем ниже pK_a спирта, тем выше абсолютное значение дзета-потенциала, что подразумевает более высокую стабильность частиц. Что касается выхода осаждения, наименьшие значения были получены для бутанольной системы, независимо от напряжения и времени осаждения. Причина более низкого выхода осаждения при использовании этого растворителя заключается в его низкой диэлектрической проницаемости ($=17,51$) по сравнению с метанолом ($=32,63$) и этанолом ($=24,55$). Это подразумевает низкую диссоциативную способность растворителя, приводящую к более низкой электрофоретической подвижности. Также было замечено, что при низких напряжениях масса, осаждаемая на площадь, определяется электрофоретической подвижностью частиц, в то время как при высоких напряжениях более значительным фактором становится сопротивление осаждаемого материала. Независимо от концентрации триэтаноламина, оптимальной для стабилизации частиц в различных спиртах, при увеличении напряжения с 5 до 60 В. наблюдалась лишь слегка большая пористость покрытия в связи с менее эффективной перегруппировкой частиц.

1.3 Методы на основе лазерной десорбции/ионизации

Еще в 1960-х годах было продемонстрировано, что высокоэнергетическое лазерное излучение может десорбировать и ионизировать неповрежденные

молекулы с поверхности твердых подложек и образованные ионы могут быть проанализированы с использованием масс-спектрометрии. Первая работа по применению лазерной десорбции ионизации была опубликована в 1963 году [102]. В данной работе было выполнено облучение различных твердых подложек сфокусированным лазерным излучением в вакуумной камере. При этом были зафиксированы интенсивные импульсы электронов и положительных ионов. В конце 1960-х годов рубиновый лазер мощностью 100 МДж был использован для десорбции органических солей с последующим масс-спектрометрическим анализом в диапазоне m/z 200 - 300 Да [103]. В 1978 году с использованием ЛДИ были получены масс-спектры олигосахаридов, гликозидов, аминокислот, пептидов, стероидов, и хлорофилла [104], причем был использован импульсный лазер с мощностью на два порядка ниже, чем в работе [103]. Однако вплоть до 1985 года верхний предел диапазона масс в экспериментах с использованием лазерной десорбции не превышал 2 кДа [105]. Прорывной результат был получен Коиче Танака в 1988 году и максимальный молекулярный вес ионизируемых соединений был увеличен до более чем 30 кДа [106]. Примерно в то же время группой Хилленкампа был разработан метод, названный МАЛДИ (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry). С использованием этого метода были получены масс спектры соединений с молекулярным весом до 70 кДа [107]. Эти работы заложили начало новой эры в развитии масс-спектрометрии.

1.3.1. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Процессы, происходящие в ходе МАЛДИ представляют собой достаточно сложную последовательность событий [108-110]. С момента начала использования МАЛДИ был предложен ряд моделей для объяснения механизма ионизации [111-113]. Существующие модели приписывают различный вклад используемой органической матрице и лазеру. Тем не менее, в настоящее время принято считать, что матрица является фундаментальным компонентом процесса, которая поглощает энергию лазера и передает ее молекулам аналита различными способами (рисунок 8). Основные обсуждения сосредоточены на переносе

энергии, т.е. на том, как матрица передает энергию, выделяемую лазером, анализам, и как эта энергия приводит к ионизации.

Процесс ионизации начинается в конденсированной фазе (первичная ионизация) во время лазерного облучения [108] и продолжается в результирующем расширяющемся факеле (вторичная ионизация), возникающем как следствие локализованного резкого увеличения энергии [109].

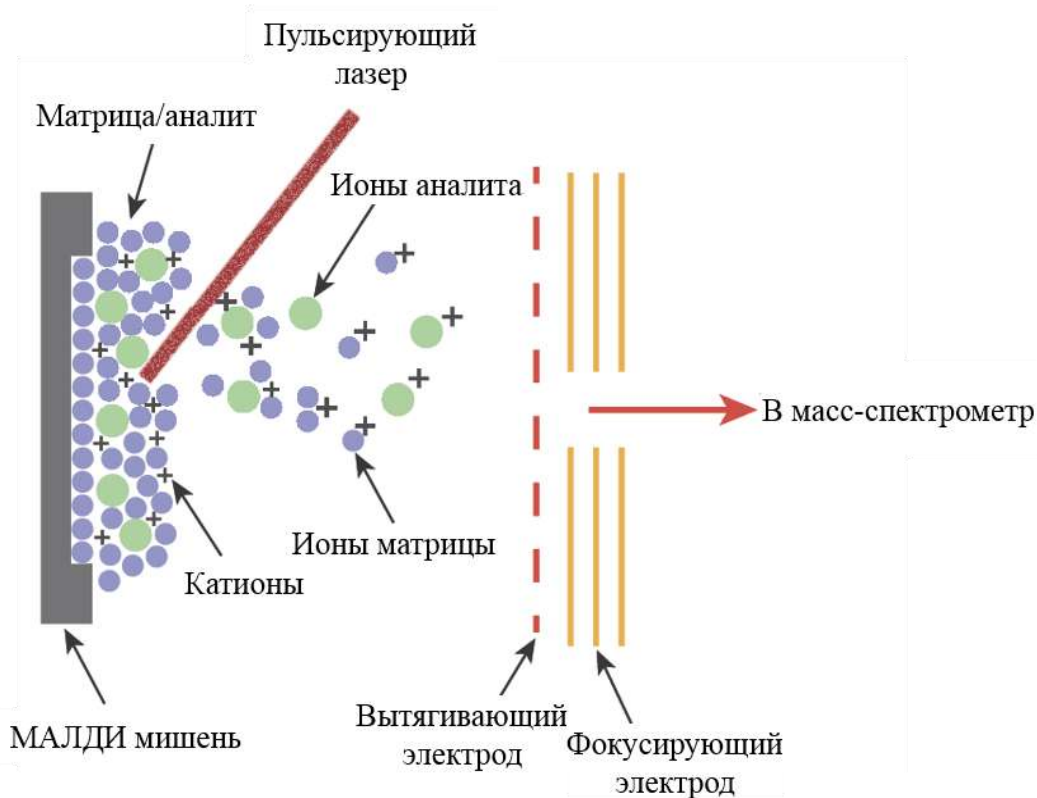


Рисунок 8 – Принципиальная схема процесса МАЛДИ

Большинство предложенных моделей постулируют основной вклад матрицы в ионизацию. Были предложены различные тепловые модели [114-120], предполагающие, что энергия, поглощенная матрицей, в основном преобразуется в тепловую энергию и затем используется для ионизации молекул аналита. Дискретная модель полярной жидкости, возможно, является наиболее значимой и в последние годы была исследована количественно [121]. Согласно этой модели, после поглощения лазерных фотонов матрица превращается в плотную жидкость, высокая температура и давление которой способствуют образованию ионов по механизмам диспропорционирования. Модель связанной физико-химической динамики постулирует еще более активную роль матрицы: взаимодействие между

электронно-переходными состояниями матрицы сопровождается реакциями объединения энергии, происходящими в конденсированной фазе, что приводит к образованию первичных матричных ионов [122-124]. Модель «счастливого выжившего» («lucky survivor») [125], с другой стороны, постулирует, что ионы аналита уже присутствуют в растворе образца и сохраняются в ионной форме при сокристаллизации с матрицей. При лазерном облучении эти предварительно сформированные ионы высвобождаются в газовую фазу в результате лазерной абляции. В этой модели матрица играет второстепенную роль в процессе ионизации, поскольку она оказывает только механическое воздействие. Все описанные выше модели в той или иной степени согласуются с экспериментальным данным и могут быть использованы для объяснения процессов МАЛДИ. Тем не менее, большинство моделей не могут в достаточной степени объяснить все экспериментальные результаты, и до сих пор ведутся оживленные дебаты по определению «правильной» модели МАЛДИ.

1.3.2 Поверхностно-активированная лазерная десорбция/ионизация

Ускоренное развитие технологий получения наноматериалов привело к реализации новых технологий на основе ЛДИ [126]. Особый интерес представляет масс-спектрометрия с ПАЛДИ, которая позволила значительно расширить возможности ЛДИ и преодолеть некоторые недостатки, присущие МАЛДИ, прежде всего – присутствие в области низких масс мешающих сигналов ионов матрицы, что затрудняет применение метода для анализа низкомолекулярных соединений [127]. В случае ПАЛДИ в качестве эмиттеров ионов применяются наноподложки (коллоидные наночастицы, наноструктурированные платформы, напыленные металлические нанокластеры), которые являются ключевыми элементами процесса десорбции/ионизации и эффективно поглощают энергию лазера, что способствуют быстрому повышению температуры поверхности и приводит к десорбции аналитов [128-131].

Впервые наноструктурированные неорганические матрицы были применены в 1988 году для масс-спектрометрического анализа белков и пептидов, тогда были использованы нанопорошки кобальта в глицерине [132]. Однако

термин ПАЛДИ-МС (Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) был предложен только в 1995 году в работе [133], чтобы подчеркнуть важность наносубстрата в механизме ЛДИ.

Считается, что в основе процесса ПАЛДИ лежит индуцированный лазером тепловой механизм [134-136] в ходе которого происходит быстрый нагрев твердой подложки в сочетании с эффектом удержания тепла, возникающим в результате взаимодействия наносекундного импульсного лазера с наноструктурой. Таким образом, при лазерном облучении локальная температура вокруг наноподложки может достигать очень высоких значений, достаточных для десорбции большинства видов аналитов [135]. Поэтому наноподложки, характеризующиеся сильным поглощением в УФ области, низкой теплоемкостью и пониженной теплопроводностью (что связано с их размером, шероховатостью поверхности и электронной теплопроводностью), могут играть важную роль в этом механизме [131].

Нетепловые процессы также обычно предлагаются в качестве возможных механизмов ЛДИ при ПАЛДИ-МС. С одной стороны, в качестве возможных механизмов процесса десорбции упоминается лазерно-индуцированная реструктуризация или разрушение поверхности [127], а с другой стороны, ионизация в ПАЛДИ также может быть вызвана различными нетепловыми процессами. Однако механизм ионизации остается во многом неясным, поскольку ей могут способствовать различные пути, такие как эмиссия горячих электронов, наличие уже существующих ионов в образце, реакции фотоионизации между молекулами растворителя (захваченными наноструктурой) и аналитами, а также перенос протонов или электронов между поверхностью и аналитами [137]. Плавление и разрушение поверхности также были предложены в качестве потенциальных составляющих механизмов ПАЛДИ ионизации.

Известно, что многие наноматериалы (такие как наночастицы на основе золота, серебра и платины, TiO_2) проявляют высокую фотохимическую активность при УФ облучении лазером [138], способствуя преобразованию световой энергии в химическую путем генерации высокоэнергетических

электронов (так называемых горячих электронов) и спаривания с дырками [131]. Процесс ПАЛДИ-МС в основном рассматривался как результат выброса горячих электронов, которые являются наиболее вероятным источником начальных зарядов, и их последующего переноса с наноструктуры на соседние молекулы. Действительно, при наносекундном импульсном лазерном возбуждении нанокластеры благородных металлов могут стать положительно заряженными из-за высвобождения большого количества электронов [139]. Далее наночастица несущая заряды, становится нестабильной, поскольку кулоновские силы отталкивания между этими зарядами превышают когезионные силы, действующие внутри нанокластера. Кулоновский взрыв в конечном итоге приводит к спонтанной фрагментации наночастицы, как показано на рисунке 9, в результате чего выбрасывается довольно большое количество электронов и ионов наносубстрата.

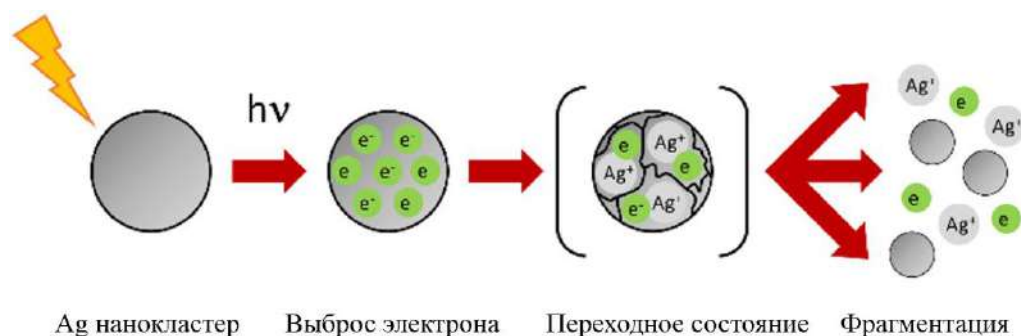


Рисунок 9 – Фрагментация наночастицы серебра под воздействием лазерного облучения

Также подчеркивается важный вклад дырок в механизм десорбции, управляемый зарядом [140]. В этом механизме участвуют наноподложки, содержащие положительные дырки, образовавшиеся в результате переноса горячих электронов с подложки на проводящую опору (например, адаптер пластины МАЛДИ). Дырки уменьшают взаимодействие между ионами аналита и поверхностью наноподложки и достигают кулоновского отталкивания между положительно заряженной наноподложкой и ионами аналита, что позволяет проводить их десорбцию в режиме положительной ионизации.

Также стоит отметить, что плавление/разрушение поверхности, происходящее в ходе ПАЛДИ, может быть рассмотрено как процесс, аналогичный лазерной абляции, если достаточное количество лазерной энергии поглощается наноподложкой [140]. Как показано на рисунке 10, индуцированная лазером плазма содержит множество частиц, таких как электроны, нейтралы, возбужденные нейтралы и ионы. Ввиду высокой плотности популяции частиц между ними могут происходить многочисленные столкновения, поэтому процесс ионизации при ПАЛДИ может быть результатом этих столкновений, которые также могут привести к образованию ионов аналитов в газовой фазе.

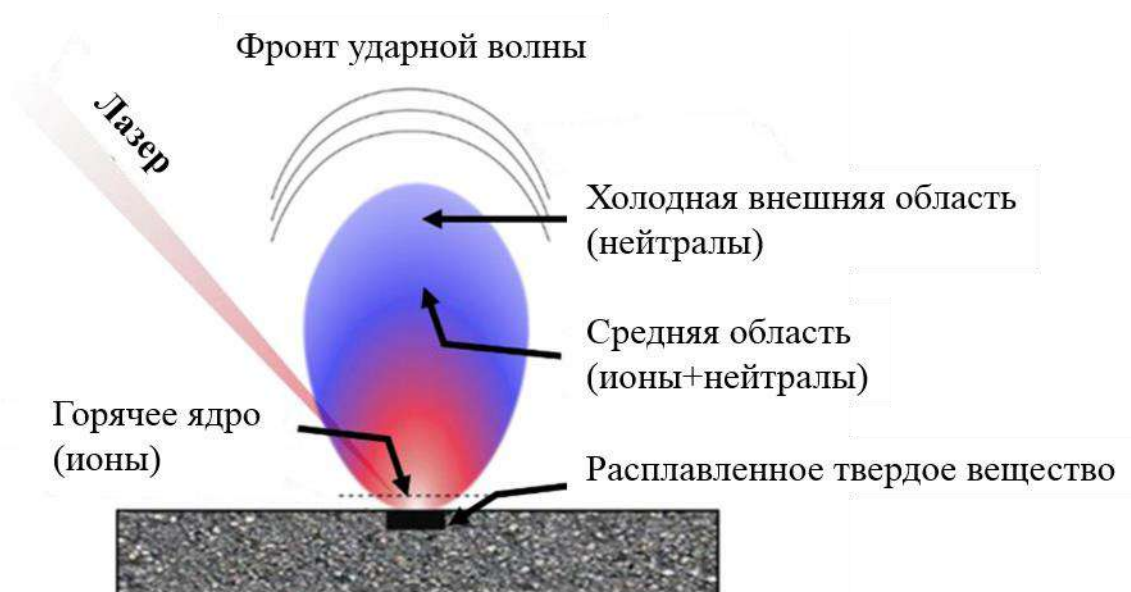


Рисунок 10 – Схематическое изображение лазерно-индуцированной плазмы

Таким образом можно предположить, что процессы ПАЛДИ представляют собой комбинацию как термического, так и нетермического переноса энергии в зависимости от природы подложки и энергии, подводимой к образцу возбуждающим лазером.

1.4 «Лаборатория на мишени»

Ключевой задачей исследований в области протеомики и метаболомики является эффективное концентрирование и очистка микролитровых объемов образцов, с минимальными сорбционными потерями и максимальным восстановлением при как можно меньшем объеме элюирования [141]. Для достижения этой цели стала необходима миниатюризация. Миниатюризация

позволяет обрабатывать ограниченные объемы проб, минимизировать нежелательную адсорбцию на поверхностях, увеличить скорость химических реакций, уменьшить расход реагентов, увеличить производительность анализа и повысить чувствительность системы детектирования.

Описано множество методических подходов, позволяющих выполнять различные этапы пробоподготовки непосредственно на МАЛДИ-мишени. Основное преимущество подобных подходов заключается в отсутствии необходимости многократного переноса образцов во время пробоподготовки и, как следствие, значительное увеличение производительности анализа [142]. При этом для технической реализации подобных подходов нет необходимости вносить конструктивные изменения в существующие МАЛДИ масс-спектрометры [143]. В работе [144] подобные подходы были объединены под одним общим термином «лаборатория на мишени» («lab-on-a-plate») – как формат интеграции лабораторных процедур непосредственно на МАЛДИ-мишени. Выполняемые в формате «лаборатория на мишени» процедуры, помимо необходимых для ионизации/десорбции, могут также включать: гомогенизацию, предварительное концентрирование, амплификацию, очистку, экстракцию, ферментативный гидролиз, дериватизацию, синтез, разделение, идентификацию с использованием дополнительных методов.

Наиболее распространенными являются стратегии позволяющие проводить концентрирование образца и повышать чувствительность анализа: добавление образцов в лунки трехмерной маски, прикрепленной к МАЛДИ-мишени и удаляемой после испарения образца [145-147], нанесение образцов на мишень, покрытую гидрофобным или омнифобным покрытием [148-150], нанесение образцов на гидрофильные участки гидрофобной мишени [151-153], нанесение образцов в нановиалы [154-156], а также нанесение образцов на мишень предварительно функционализированную материалом, с которым аналиты связываются [157-159].

Компанией BD Biosciences было реализовано устройство «BD MALDI sample concentrator», изготавливаемое из силиконового эластомера в формате

многолуночного планшета, которое крепится поверх стандартной МАЛДИ-мишени. Устройство может быть использовано для концентрирования и обессоливания образцов перед МАЛДИ-МС анализом [145]. На рисунке 11 представлена схема проведения обессоливания и концентрирования с использованием «BD MALDI sample concentrator».

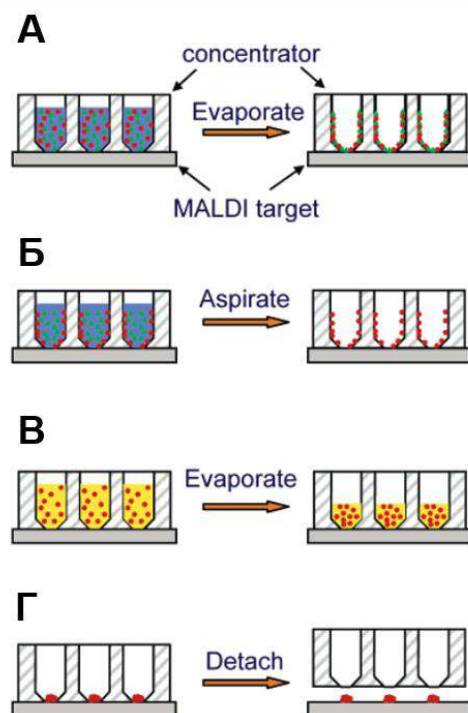


Рисунок 11 – Схематическое изображение этапов пробоподготовки выполняемых на МАЛДИ-мишени с использованием эластомерного планшета [145]

Красным цветом обозначены соединения белковой природы (белки, пептиды), зеленым – низкомолекулярные соединения (соли), синим фоном - вода, желтым - раствор с высоким содержанием солей. Многолуночный планшет герметично крепится к МАЛДИ-мишени после чего в каждую лунку добавляются анализируемые образцы (рисунок 11 А). В процессе испарения растворенные соединения осаждаются на гидрофобную поверхность лунок (рисунок 11 Б). Далее в каждую лунку добавляется промывочный раствор. Высокомолекулярные соединения, такие как белки и пептиды, связываются с гидрофобной поверхностью, а низкомолекулярные, такие как соли, остаются в промывочном растворе. После повторного испарения раствора остаются только связанные с гидрофобной поверхностью аналиты (Рисунок 11 В). При добавлении в лунки

органического растворителя, связанные с поверхностью аналиты переходят в раствор, который повторно упаривается (Рисунок 11 Г). После добавления МАЛДИ матрицы на высушенные пятна образца, многолуночный планшет удаляется с последующим МАЛДИ-МС анализом.

В работе [146] также был предложен протокол пробоподготовки с использованием 96-луночного эластомерного концентратора. Авторами было установлено, что добавление к образцам органического растворителя предотвращает потерю аналитов связанных с гидрофобной поверхностью лунок. Поэтапное проведение концентрирования, фокусировки и добавления матрицы приводит к улучшению качества получаемых масс-спектров за счет более равномерной сокристаллизацией аналита с МАЛДИ матрицей. Также была продемонстрирована возможность интеграции предложенного 96-луночного концентратора с коллектором фракций подключенным к высокоэффективному жидкостному хроматографу, что позволило реализовать предварительное разделения анализируемой пептидной смеси с последующим сбором фракций непосредственно в размещенный на МАЛДИ-мишени концентратор и МАЛДИ-МС анализом (рисунок 12) [147].

Вторая стратегия, также позволяющая реализовать принцип «лаборатория на мишени», заключается в модификации поверхности МАЛДИ-мишени гидрофобными или омнифобными материалами [160]. Применение гидрофобных покрытий позволяет наносить достаточно большие объемы образца на мишень, что особенно выгодно при анализе разбавленных образцов с низкими концентрациями [161]. Нанесение образца на гидрофобное покрытие приводит к значительному уменьшению площади контакта образца с поверхностью и соответственно к его фокусировке в очень узкую зону, приближающуюся к диаметру лазерного луча. Таким образом для десорбции/ионизации аналита становится достаточно одного выстрела лазера, что потенциально улучшает чувствительность и воспроизводимость от выстрела к выстрелу.

В работе [162] с целью увеличения чувствительности анализа и однородности нанесения образца/матрицы МАЛДИ-мишень модифицировали

полидиметилсилоксаном (ПДМС). ПДМС представляет собой эластичный, прозрачный, химически инертный и гидрофобный полимер, который нашел широкое применение в микрофлюидных системах. Авторами была оценена возможность применения ПДМС как альтернативного и привлекательного материала для модификации МАЛДИ-мишени. При этом, технология получения покрытий была достаточно простой: ~10 мкл раствора ПДМС наносили на мишень, после чего слой равномерно распределяли валиком (рисунок 12 А). Далее мишень, покрытую ПДМС, прокачивали в печи, что приводило к образованию тонкой прозрачной пленки толщиной 10 – 15 мкм. При оценке возможных фоновых сигналов от ПДМС покрытия наблюдались сигналы в диапазоне m/z 1000-2200 (рисунок 12 Б). Эти сигналы могли быть связаны с неполной полимеризацией мономерных соединений и были эффективно удалены путем промывки мишени 0,1% раствором муравьиной кислоты, как показано на рисунке. 12 В. В сравнении с немодифицированной мишенью, чувствительность МАЛДИ-МС анализа пептидов была увеличена в 7 – 11 раз, что прежде всего связано с уменьшением площади пятна образца.

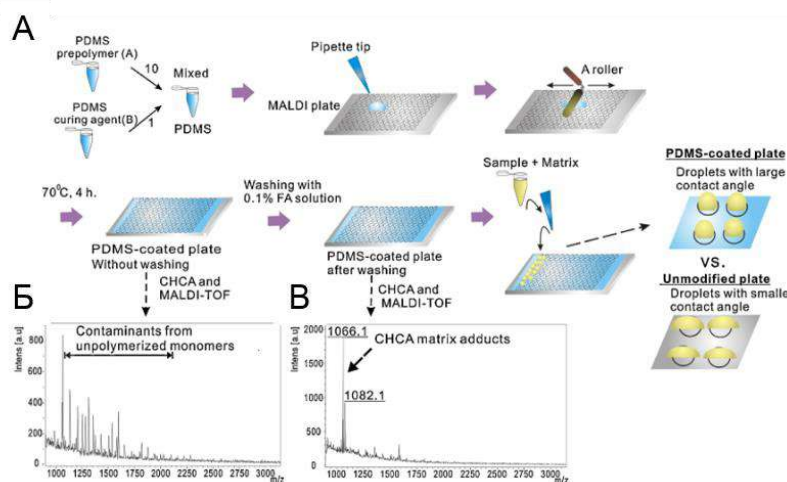


Рисунок 12 – (А) Схематическое изображение процедуры нанесения покрытия ПДМС. Раствор МАЛДИ матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) был нанесен на покрытую ПДМС мишень с последующим МАЛДИ-МС анализом для оценки фонового шума (Б) до и (В) после промывки ПДМС покрытия раствором 0,1%FA [162]

2 Материалы и методы

2.1 Материалы

Оборудование: высокоэффективный жидкостный хроматограф (ВЭЖХ) 1260 Infinity (Agilent Technologies, США); масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, снабженный двумя альтернативными источниками ионов ИЭР и МАЛДИ, оснащенный лазером Smartbeam II (длина волны 355 нм) (Bruker Daltonics, Германия) с активно-экранированным сверхпроводящим магнитом индукцией 7 Тл (МС-ИЦР ПФ); tandemный МАЛДИ масс-спектрометр с времяпролетным анализатором (МАЛДИ-ВП-МС/МС) UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия).

Вспомогательное оборудование: электрохимическая система Synthesis Cell, с сетчатым рабочим электродом из стеклоуглерода (Antec Scientific, Нидерланды); потенциостат ROXY (Antec Scientific, Нидерланды); магнитная мешалка (КА, Германия); рН-метр (Sartorius, Франция); пипетдозаторы 0,2-2 мкл, 5-50 мкл, 100-1000 мкл (Eppendorf, Германия); ультразвуковая ванна (Branson, Германия); центрифуга Z 160 M (Hermle Labortechnik, Германия); система фильтрации Smplicity G2 (EMD Millipore Corporation, США); система очистки воды Direct-Q 3 UV (EMD Millipore Corporation, США); источник постоянного тока «Эльф-4» («НПО ДНК-Технология», Россия); сушильный шкаф SNOL 67/350 (Umega, Литва); сканирующий электронный микроскоп S-3400N (Hitachi, Япония) с аналитической приставкой X-Max 20 (Oxford Instruments, США); атомно-силовой микроскоп DiNanoscope V (VEECO, США) с зондами NSG03, NT-MDT (Россия); шейкер-инкубатор Stat Fax-2200 (Bio-Rad, США); охлаждающий термоблок СПАС с контроллером Multi TEC Control (Inhaco GmbH, Германия); генератор азота Genius (Peak Scientific Instruments, США); стереомикроскоп SMZ 1500 с цифровой камерой DS-2MBWc (Nikon, Япония).

Реактивы и материалы: монолитная колонка RP-18e 100-2 мм (Merck KGaA, Германия); нержавеющая сталь марки 08х18н10т (Россия); этиловый спирт (Россия); ацетилацетон (хч) (Вектон, Россия); силиконовое масло ПМС-100

(REXANT, Китай); кристаллический йод (Россия); хлороформ (хч) (Вектон, Россия); муравьиная кислота (14265, Fluka, США).

Реактивы Sigma-Aldrich (США): 2-[2-(2,6-дихлоранилино)фенил]уксусной кислоты натриевая соль (диклофенак 93484); 4-[(7-хлорхинолин-4-ил)амино]-2-(диэтиламинометил) фенол (амодиахин А2799); (2-бутил-3-бензофуранил) [4-[(2-диэтиламино)-этокси]-3,5-дийодфенил] метанон гидрохорид (амиодарон А8423); ацетонитрил (1.00029); метанол (1.06035); трипсин (Т6567); трифторуксусная кислота (ТФУ) (302031); формиата аммония (70221); диоксид титана (718467); 9-аминокридин (92817); 9 Н -пиридо [3,4- b] индол (норгарман N6252); 5,10,15,20-Тетракис(пентафторфенил)порфириин (252921-100MG); 2',5'-Дигидроксиацетофенон (D107603); ацетон (650501); трифторацетат натрия (132101).

Реактивы и материалы Bruker Daltonics, Германия: МАЛДИ-мишень МТР 384; альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота (СНСА); 2,5-дигидроксибензойная кислота (2,5-DHB); синапиновая кислота (SA).

Стеариновая кислота, 175366 (Merck, Франция).

Реактивы Виктон (Россия): Нитрат лантана хч; Этилацетат хч; Гексан хч.

2.1. Моделирование окислительной биотрансформации диклофенака

2.1.1 Проведение электрохимического окисления диклофенака

Для проведения ЭХО диклофенака использовали коммерчески доступную систему, состоящую из электрохимической ячейки Synthesis Cell и потенциостата ROXY (рисунок 13).

80 мл раствора диклофенака (10 мкг/мл) в смеси водного формиата аммония (20 мМ) с ацетонитрилом 50/50 об./об. помещали в электрохимическую ячейку Synthesis Cell. Окисление проводили при потенциале 1,5 В в течение 60 мин.



Рисунок 13 – Внешний вид электрохимической системы

2.1.2 Проведение УФ/TiO₂-ФКО диклофенака в суспензии (в объёме)

УФ/TiO₂-ФКО диклофенака проводили в кварцевой колбе объемом 100 мл, которую помещали в лабораторный фотореактор, снабженный магнитной мешалкой и восьмью УФ-лампами (9 Вт, 365 нм), расположенными по периметру реакционной камеры (рисунок 14). В колбу помещали водный раствор диклофенака (10 мкг/мл), содержащий 1 мг/мл нанопорошка TiO₂ (размер частиц 21 нм), суспензию обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10 мин и затем облучали УФ-излучением в течение 15 мин при 20°C при интенсивном перемешивании. После завершения процесса из суспензии отбирали аликвоты, осаждали нанопорошок TiO₂ путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин, а супернатант фильтровали через фильтрующую насадку 0,2 мкм.

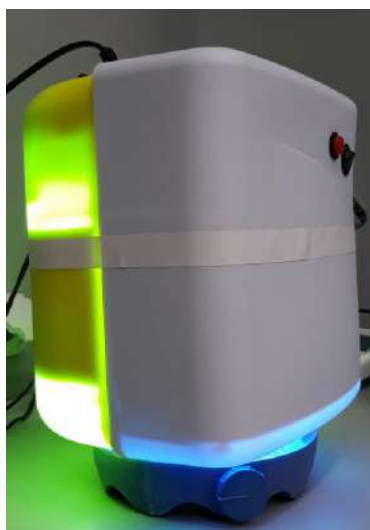


Рисунок 14 – Внешний вид фотокаталитического реактора

2.1.3 ВЭЖХ/МС/МС анализ продуктов окисления диклофенака

ВЭЖХ/МС/МС анализ выполняли с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II и МС-ИЦР ПФ Solarix XR 7T (Bruker Daltonik) с ИЭР. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия, образующего кластерные ионы в интересующей нас области масс с m/z от 100 до 600 с интервалом 135,97 Да. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения Data Analysis 5.0 (Bruker Daltonics, Германия).

Хроматографические параметры:

Объем ввода 5 мкл.

Температура термостата колонок 30 °С.

Состав подвижной фазы: фаза А – 0,1 % водный раствор муравьиной кислоты, фаза Б – 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Скорость потока элюента 200 мкл/мин.

Параметры элюирования: 0→1 мин 2% Б→2% Б; 2→60 2% Б→60% Б; 60→65 мин 80 % Б; 65→67 мин 80 % Б→2 % Б; 67→72 мин 2 % Б.

Масс-спектрометрические параметры:

Регистрация отрицательных ионов. Величина разрешения составляла не менее 100000 при m/z 400. Погрешность при определении величины m/z ионов прекурсоров и фрагментных ионов не превышала 1 ppm. Для фрагментации молекулярных ионов применяли диссоциацию, активированную соударениями, в качестве столкновительного газа использовали аргон. Масс-спектрометрические параметры приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Масс-спектрометрические параметры

Параметр	Значение
Mode	
TD (Acquisition)	1M
m/z-range	150 – 3000 Да
Transient length	0.734 сек.
# Acquisitions	1
Ion Transfer	
Funnel RF Amplitude	150 Vpp
Octapole Frequency	5 MHz
Octapole RF Amplitude	350 Vpp
Quadrupole Mass	m/z 400
Collision Cell (Hexapole)	1.5 V
DC Extract Bias	
Coll. Cell RF Frequency	2 MHz
Coll. Cell RF Amplitude	1600 Vpp
Transfer Optics (Hexapole)	
Time of flight	1.200 ms
RF Frequency	4 MHz
RF Amplitude	350 Vpp
Analyzer	
Front Trap Plate	1.5 V
Back Trap Plate	1.5 V
Sweep Excitation Power	18%
ParaCell DC Bias	
DC Bias RX0	1.645 V
DC Bias TX180	1.355 V
DC Bias RX180	1.470 V
DC Bias TX0	1.530 V

2.1.4 МС-ИЦР ПФ анализ продуктов окисления диклофенака в режиме прямого ввода

Продукты электрохимического и фотокаталитического окисления диклофенака анализировали с помощью МС-ИЦР ПФ Solarix XR 7T. Образцы вводили в режиме прямого ввода (2 мкл/мин) в источник ИЭР. Регистрировали отрицательные ионы в диапазоне m/z 150 – 600. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия, образующего кластерные ионы в интересующей нас области масс с m/z от 100 до 600 с интервалом 135,97 Да.

2.2 Проведение УФ/TiO₂-ФКО на модифицированной TiO₂ МАЛДИ-мишени

2.2.1 Получение покрытия TiO₂ с использованием метода «сухих капель»

На ячейки (sample spots) МАЛДИ-мишени МТР 384 наносили по 1,5 мкл водной суспензии TiO₂ (50 – 1000 нг/мл). Далее МАЛДИ-мишень высушивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего прокаливали в сушильном шкафу при 250°C в течение 3 часов.

2.2.2 Получение покрытия TiO₂ с использованием метода электрофоретического осаждения

Катодное ЭФО TiO₂ проводили в потенциостатическом режиме с использованием источника питания «Эльф-4». Разность потенциалов между электродами варьировали от 20 до 50 В. ЭФО проводили в ячейке, представляющей собой стеклянный стакан, расстояние между электродами составляло 10 мм (рисунок 15). В качестве электродов использовали пластины, изготовленные из нержавеющей стали 316L. В дальнейшем ЭФО было выполнено при выбранных оптимальных условиях на МАЛДИ-мишени МТР 384. Очистку электродов проводили путем последовательной обработки ультразвуком в хлороформе, метаноле и воде с последующей сушкой в токе азота.

В качестве основы электролита использовали ацетилацетон, который содержал TiO₂ (2 г/л) и йод (0,08 г/л). Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 60 мин, после чего перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин. После электрофоретического осаждения пластины высушивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего прокаливали в сушильном шкафу при 250°C в течение 3 часов. В случае дополнительной ПДМС-модификации, подложку с электрофоретически осажденным TiO₂ покрывали тонким слоем силиконового масла ПМС-100 и помещали под УФ лампы (9 Вт, 365 нм) на 60 мин, после чего последовательно промывали хлороформом и метанолом.

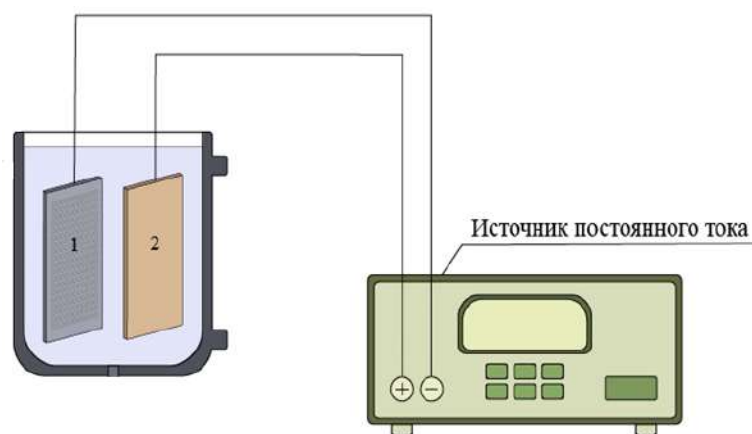


Рисунок 15 – Схема экспериментальной установки для проведения ЭФО

2.2.3 Характеризация полученных покрытий

СЭМ-изображения покрытий получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N. Элементный состав образца определяли методом рентгеновской энерго-дисперсионной спектроскопии с помощью аналитической приставки Oxford Instruments X-Max 20, входящей в состав прибора Hitachi S-3400N. АСМ изображения были получены с помощью микроскопа VEECO DiNanoscope V (США), в полуконтактном режиме (Tapping Mode), с использованием зондов NSG03, NT-MDT. Для обработки изображений использовали программное обеспечение Nanoscope Analysis.

2.2.4 УФ/TiO₂-ФКО на МАЛДИ-мишени модифицированной TiO₂

МАЛДИ-мишень МТР 384 с покрытием TiO₂ охлаждали до 4°C и наносили 1,5 мкл раствора диклофенака (10 мкг/мл) или амиодарона (10 мкг/мл). Для инициирования фотокаталитической реакции МАЛДИ-мишень помещали под UVA лампу (9 Вт, 365 нм) на расстоянии 40 мм и выдерживали 30 мин. Высушенные образцы либо оставляли необработанными, либо наносили поверх них раствор МАЛДИ матрицы.

2.2.5 ПАЛДИ-МС анализ

ПАЛДИ масс-спектры получали с помощью МС-ИЦР ПФ SolariX XR. Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 150 – 1000. Для калибровки был использован источник ионов ИЭР, которым также оснащена данная модель масс-спектрометра. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия, образующего

кластерные ионы в области масс от 100 до 1000 с интервалом 135,97 Да. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения Data Analysis 5.0 (Bruker Daltonics, Германия).

2.4 96-луночный УФ/TiO₂-фотокаталитический микрореактор (PC μ R96)

PC μ R96 показан на рисунке 16 и состоит из следующих частей: (1) МАЛДИ-мишени с покрытием TiO₂/ПДМС; (2) перфорированной эластомерной прокладки; (3) микрореакторного устройства с 96 функционализированными TiO₂/ПДМС коническими отверстиями (μ RD); (4) УФ-светодиодного модуля с охлаждением ТЕС. В сборе МАЛДИ-мишень, перфорированная прокладка и μ RD (без УФ-светодиодного модуля) представляет собой 96-луночный микрореактор/концентратор (μ RC96) (5).

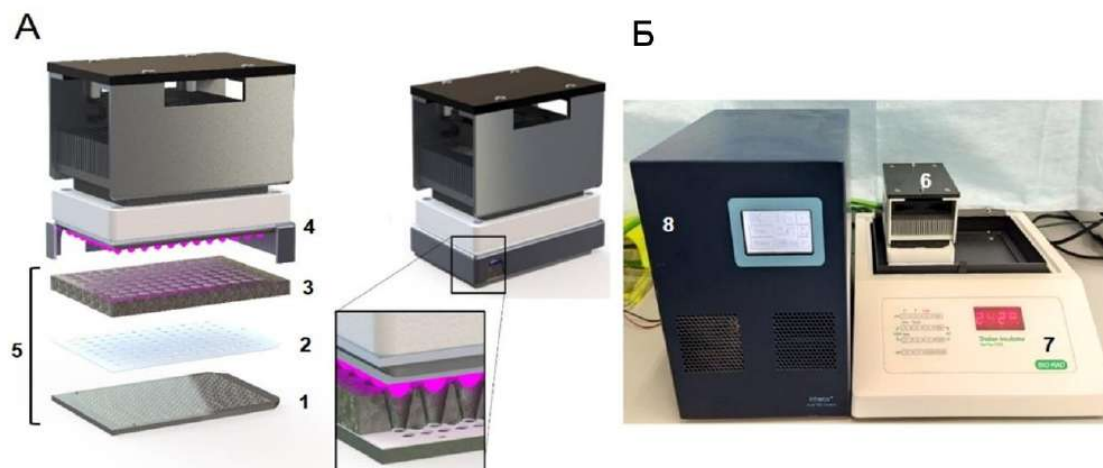


Рисунок 16 – 96-луночный УФ/TiO₂-фотокаталитический микрореактор. (А) – 3D модель PC μ R96: составные части (слева) и собранная установка (справа). В разрезе показано расположение УФ-светодиодов относительно лунок μ RC96. (Б) – собранная установка PC μ R96 (6) в шейкере-инкубаторе (7). Контроль охлаждения светодиодного модуля осуществляется блоком управления ТЕС (8)

Перфорированная эластомерная прокладка была вырезана с использованием лазерного гравера из 0,5 мм силиконового каучука. μ RD с оптимизированной геометрией отверстий был изготовлен из нержавеющей стали (AISI 321) с использованием фрезерного станка с ЧПУ (размеры показаны на рисунке 17). МАЛДИ-мишень из полированной стали МТР 384 и отверстия μ RD были функционализированы TiO₂/ПДМС покрытием.

3D модели лунок микрореактора в формате STL были созданы с помощью программного обеспечения Kompas-3D CAD (Аскон, Россия). Геометрия конических отверстий μ RD была оптимизирована путем моделирования распределения света с помощью программы Zemax OpticStudio 18.7 Professional (Zemax, США). 3D CAD модели РС μ R96 были созданы с помощью программного обеспечения SolidWorks (Dassault Systemes, Франция).

Для инициирования фотокаталитической реакции использовали ультрафиолетовые светодиоды NCSU276A (Nichia, Япония) с длиной волны 365 нм, максимальной рассеиваемой мощностью 3Вт и мощностью УФ излучения (при $I=500\text{мА}$) 765-835 мВт. Световой поток от светодиода фокусировали с помощью линзы AL-35M-119 (ARI International Corporation, США) с углом распределения 50° . Для охлаждения светодиодного модуля, состоящего из 96 светодиодов с линзами, его крепили к охлаждающему термоблоку CPAC Ultraflat (Inhoco GmbH, Германия), управляемому контроллером Multi TEC Control (Inhoco GmbH, Германия).

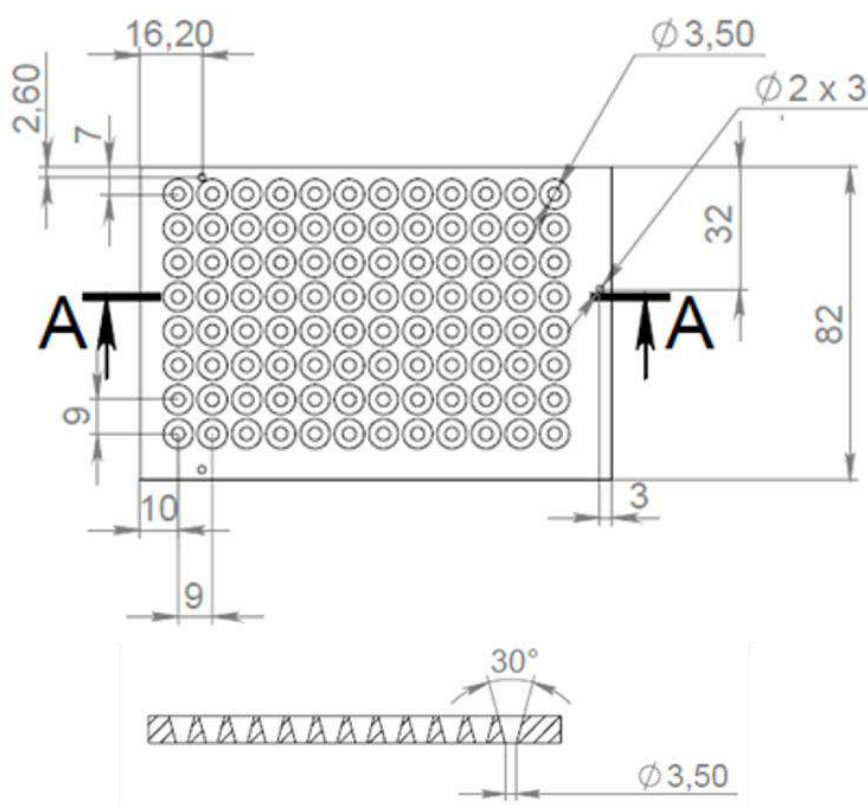


Рисунок 17 – Чертеж микрореакторного устройства с 96 коническими отверстиями (μ RD)

2.4.1 Получение TiO_2 /ПДМС покрытий

Фотокаталитическое покрытие наносили на поверхность конических отверстий путем электрофоретического осаждения. Нижнюю поверхность микрореакторной насадки герметично закрывали силиконовым листом, после чего в каждую лунку помещали суспензию наночастиц TiO_2 в ацетилацетоне (2 г/л), содержащую кристаллический йод (0,08 г/л). Далее в каждую лунку поочередно помещали электрод (анод), представляющий собой стержень из нержавеющей стали диаметром 0,5 мм, катодом являлась микрореакторная насадка. Катодное ЭФО TiO_2 проводили в потенциостатическом режиме в течение 90 сек при напряжении 30В с использованием источника постоянного тока «Эльф-4» («НПО ДНК-Технология», Россия). По завершении процедуры ЭФО суспензию удаляли из лунок и высушивали сформированные покрытия при комнатной температуре в течение 30 мин. Для получения более равномерного покрытия процедуру ЭФО проводили дважды. Микрореакторную насадку с фотокаталитическим покрытием выдерживали в сушильном шкафу при 250°C в течение 3 часов. Поверхность осажденного TiO_2 покрывали ПДМС и подвергали воздействию УФ излучения в течение 60 мин (4 УФ лампы, 9 Вт, 365 нм), после чего последовательно промывали хлороформом и метанолом.

2.4.2 УФ/ TiO_2 -ФКО амодиахина

Для моделирования окислительной биотрансформации амодиахина (AQ) в лунку микрореактора, добавляли 150 мкл водного раствора амодиахина (1 мкг/мл). Далее на микрореактор устанавливали светодиодный модуль с охлаждающим термоблоком, помещали собранное устройство в шейкер-инкубатор Stat Fax-2200 и проводили ФКО в течение 20 мин при постоянном перемешивании. По окончании ФКО светодиодный модуль снимали. Перед проведением ПАЛДИ-МС анализа микрореактор нагревали при 40°C до полного испарения растворителя.

2.4.5 Получение аддуктов глобина с продуктами окисления амодиахина

По окончании ФКО амодиахина в лунки, содержащие продукты окисления, добавляли 5 мкл водного раствора глобина человека (1 мг/мл). Далее

микрореактор накрывали силиконовым листом и выдерживали в течение 60 мин при температуре 37°C в шейкере-инкубаторе. Далее удаляли силиконовый лист и нагревали микрореактор при 40°C до полного испарения растворителя.

2.4.6 Ферментативный гидролиз

Для проведения ферментативного гидролиза в лунки, содержащие модифицированный глобин, добавляли 150 мкл раствора трипсина (30 мкг/мл) в 25мМ NH_4HCO_3 (рН 8,5). Далее микрореактор накрывали силиконовым листом и выдерживали в течение ночи при температуре 37°C в шейкере инкубаторе. Далее удаляли силиконовый лист и нагревали 96-луночный микрореактор при 60°C до полного испарения растворителя.

2.4.7 ПАЛДИ-МС анализ

Продукты УФ/ TiO_2 -ФКО амодиахина идентифицировали путем ПАЛДИ-МС с использованием электрофоретически модифицированной наночастицами TiO_2 МАЛДИ-мишени. На первом этапе выполняли идентификацию продуктов УФ/ TiO_2 -ФКО амодиахина путем измерения точной массы с использованием МС-ИЦР ПФ. Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме детектирования положительных ионов в диапазоне m/z 150 – 400. Для калибровки был использован источник ионов ИЭР. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия, образующего кластерные ионы в диапазоне масс m/z 100 – 1000. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения Data Analysis 5.0 (Bruker Daltonics, Германия). Для определения брутто-формул продуктов окисления использовали алгоритм SmartFormula (Bruker Daltonics, Германия). В связи с тем, что масс-спектрометр Solarix XR 7T не позволяет выполнять фрагментацию при использовании источника ионов МАЛДИ, для определения вероятных структур использовали МАЛДИ-ВП-МС/МС UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия). Регистрацию и интерпретацию масс-спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control 3.4 и Flex Analysis 3.4. Регистрацию масс-спектров при анализе продуктов окисления амодиахина осуществляли в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 150-400, при следующих

настройках масс-спектрометра: Ion source 1 – 20,1 кВ; Ion source 2 – 17,9 кВ; Lens – 7,0 кВ; Reflector – 21,1 кВ; Reflector 2 – 10,75 кВ. Тандемный масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме LIFT при следующих настройках масс-спектрометра: Ion source 1 – 7,6 кВ; Ion source 2 – 6,9 кВ; Lens – 3,5 кВ; Reflector – 29,4 кВ; Reflector 2 – 14,1 кВ; Lift 1 – 19,0 кВ; Lift 2 – 3,2 кВ; Pulsed Ion Extraction – 90 нс; PCIS window range: -2 – 2 Да.

2.4.8 МАЛДИ-МС анализ

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью МАЛДИ-ВП-МС/МС UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Регистрацию масс-спектров при анализе аддуктов глобина человека с продуктами окисления амодиахина осуществляли в линейном режиме с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 7500-20000 при следующих настройках масс-спектрометра: Ion source 1 – 20,1 кВ; Ion source 2 – 18,9 кВ; Lens – 5,6 кВ. На ячейку мишени наносили 0,5 мкл раствора матрицы (2,5 ДНВ (10 мг/мл) в 70 % водном ацетонитриле с 0,1 % ТФУ), затем высушивали при комнатной температуре.

Регистрацию масс-спектров при анализе триптических гидролизатов глобина осуществляли в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 700-4000, при следующих настройках масс-спектрометра: Ion source 1 – 20,1 кВ; Ion source 2 – 17,9 кВ; Lens – 7,0 кВ; Reflector – 21,1 кВ; Reflector 2 – 10,75 кВ. На ячейку мишени наносили 0,5 мкл раствора матрицы (СНСА (5 мг/мл) в 50 % водном ацетонитриле с 0,1 % ТФУ), затем высушивали при комнатной температуре. Для калибровки масс-спектрометра использовали калибровочную смесь Peptide Calibration Standard II.

Тандемный масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме LIFT при следующих настройках масс-спектрометра: Ion source 1 – 7,6 кВ; Ion source 2 – 6,9 кВ; Lens – 3,5 кВ; Reflector – 29,4 кВ; Reflector 2 – 14,1 кВ; Lift 1 – 19,0 кВ; Lift 2 – 3,2 кВ; Pulsed Ion Extraction – 90 нс; PCIS window range: -2 – 2 Да.

2.4.9 Получение сорбентов на МАЛДИ-мишени

Навеску нитрата лантана растворяли в воде, получая раствор соли с концентрацией 1 мг/мл, пробирку помещали в ультразвуковую ванну на 5 минут.

Стальную полированную МАЛДИ-мишень для очистки помещали на 5 минут сначала в емкость, заполненную изопропиловым спиртом, затем в емкость с хлороформом, после чего мишень сушили на воздухе. На ячейку мишени наносили 0,7 мкл водного раствора $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, затем последовательно добавляли 3 капли насыщенного раствора стеариновой кислоты в гексане объемом по 0,7 мкл, дожидаясь испарения гексана после каждого нанесения. Водную каплю аккуратно убирала и повторяли процедуру еще раз, в результате получали сорбент, состоящий из 6 монослоев стеарата лантана (FLa). Для удаления с сорбента излишков соли на ячейки наносили 10 мкл воды, инкубировали 10 мин, аккуратно убирала водные капли, после чего высушивали мишень.

2.4.10 Формирование структур FLa

Для оценки доступной для взаимодействия с аналитом поверхности и определения оптимального количества монослоев сорбента получали разное количество FLa на мишени. Готовили водные растворы нитратов указанных металлов с концентрацией 1 мг/мл. На ячейках МАЛДИ-мишени получали 1, 2, 4, 6 и 8 монослоев. Для получения одного монослоя каплю соли металла объемом 0,7 мкл наносили на ячейку, поверх наносили раствор насыщенной стеариновой кислоты в гексане, затем водную каплю убирала. Для получения двух монослоев на каплю субфазы наносили раствор стеариновой кислоты последовательно 2 раза, дожидаясь испарения гексана перед повторным нанесением, затем водную каплю убирала. Для формирования четырех, шести и восьми монослоев процедуру нанесения (капля субфазы + две капли стеариновой кислоты, затем удаление капли) осуществляли два, три и четыре раза соответственно. После формирования FLa удаляли избытки соли: на сорбенты наносили каплю воды объемом 8 мкл, ждали 5 минут, затем водную каплю убирала и повторяли процедуру, после чего высушивали сорбенты на воздухе.

2.4.11 Атомно-силовая микроскопия

Изображения методом атомно-силовой микроскопии были получены с помощью микроскопа diNanoscope V (VEECO, США), работающего в режиме tapping, с использованием зондов HA_NA (NT-MDT, Россия). Капли образца

формировались на поверхности высокоориентированного пиролитического графита (NT-MDT, Россия). Полученные изображения были обработаны в программном обеспечении Nanoscope Analysis 1.2.

2.4.12 Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Коллапсированные пленки стеарата лантана исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония), оснащенного энергодисперсионным спектрометром Oxford X-Max 20 (Oxford Instruments, Великобритания). Из-за однослойной организации свернутых пленок исследование проводилось без проводящего покрытия при низких ускоряющих напряжениях (2 кВ), что позволяло получать прямую тонкослойную визуализацию. Получение энергодисперсионных рентгеновских спектров (EDX) проводили при ускоряющем напряжении 20 кВ и токе пучка 1 нА с экспозицией 120 секунд; спектры были использованы для качественного подтверждения присутствия металла в коллапсированных пленках.

2.4.13 Световая микроскопия

Морфологию полученных структур изучали с помощью стереомикроскопа SMZ 1500 с цифровой камерой DS-2MBWc (Nikon, Япония) при боковом освещении волоконно-оптическим раздвоенным осветителем C-FID с галогенной лампой мощностью 12 В-100 Вт при конечном увеличении на представленных изображениях 19х и 210х.

2.4.14 Проведение металл-аффинной экстракции на сорбентах

На сорбент наносили 7 мкл буфера для сорбции, инкубировали сорбент в течение 5 минут, затем каплю буфера убирали и наносили повторно, добавляли 1 мкл аналита и оставляли на 20 минут под крышкой для проведения сорбции. Спустя 20 минут несвязавшуюся фракцию переносили с сорбента на соседнюю свободную ячейку мишени, добавляли к ней 3 мкл матрицы альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (СНСА) 7мг/мл в 50% ацетонитриле с 0,1% ТФУ. После переноса несвязавшейся фракции сорбент промывали в той же среде, в которой проходила сорбция: наносили 7 мкл буфера, пипетировали, аккуратно

убирали каплю, затем повторяли процедуру промывки, используя 0,1% водный раствор ТФУ. На промытый сорбент наносили 2 мкл 50% водного ацетонитрила и 3 мкл матрицы СНСА 7 мг/мл в 50% ацетонитриле с 0,1% ТФУ. Дожидались полного высыхания мишени, затем проводили МАЛДИ-МС анализ.

2.4.15. Модификация глобина человека алкилирующими агентами

Растворяли 10 мг глобина человека в 10 мл воды, получая раствор с содержанием белка 1 мг/мл. Параллельно готовили серию метанольных растворов каждого алкилирующего агента с концентрацией 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 100 нг/мл и 10 нг/мл. В вials вместимостью 5 мл помещали по 500 мкл раствора белка и добавляли по 5 мкл 10% водного раствора аммиака, получая растворы с рН 7,5-7,9. После этого в вials добавляли по 50 мкл метанольного раствора с различными концентрациями алкилирующего агента и выдерживали полученные растворы на ультразвуковой бане при комнатной температуре. Герметично закрытые вials выдерживали 2 часа при температуре 40°C. После инкубирования растворы охлаждали до комнатной температуры. Аликвоты растворов модифицированных белков объемом 100 мкл отбирали в пробирки и замораживали при -20°C.

2.4.16. Ферментативный гидролиз в присутствии трипсина

Брали навеску глобина и растворяли в воде, получая раствор с концентрацией белка 1 мг/мл. Готовили раствор трипсина с концентрацией 1 мг/мл. В пробирку отбирали 200 мкл раствора глобина, добавляли к нему 0,5 мкл 2,5% NH_3 , получали раствор с рН ~ 8,5, затем добавляли 10 мкл раствора трипсина, после чего пробирки помещали в термостат и инкубировали 18 часов при 37°C. Спустя 18 часов в пробирки добавляли еще 5 мкл трипсина и оставляли в термостате еще на 3 часа. После окончания инкубации полученный гидролизат фасовали по 20 мкл в микропробирки, затем высушивали в центрифужном испарителе в течение 45 минут, после чего замораживали при -20°C до дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Выбор метода моделирования окислительной биотрансформации

Изучение биотрансформации с помощью биологических систем (микросомы печени, культуры гепатоцитов, лабораторные животные) представляет собой сложный и трудоёмкий процесс, поэтому было предложено несколько быстрых и простых методов ферментативного моделирования метаболизма. Наибольшее распространение получил метод, основанный на ЭХО [52,163], однако, альтернативный подход с использованием УФ/TiO₂-ФКО представляется весьма перспективным, так как в ряде случаев позволяет более полно имитировать окислительный метаболизм *in vivo* [57,164].

На первом этапе исследования нами был выполнен сравнительный анализ эффективности ЭХО и УФ/TiO₂-ФКО для моделирования окислительной биотрансформации ксенобиотиков. В качестве модельного соединения было выбрано нестероидное противовоспалительное лекарственное средство ДФ (рисунок 18), окислительная биотрансформация которого хорошо изучена [165-166].

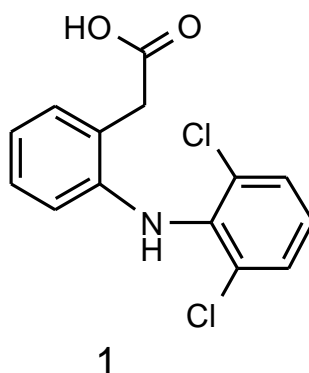


Рисунок 18 – Структурная формула диклофенака

Для проведения ЭХО ДФ использовали коммерчески доступную систему производства Antec Scientific (Нидерланды), состоящую из электрохимической ячейки Synthesis Cell и потенциостата ROXY Potentiostat. Ячейка Synthesis Cell состоит из трех электродов: сетчатого рабочего электрода из стеклоуглерода, электрода сравнения HyREF (Pd/H₂) и вспомогательного электрода (AUX) (рисунок 19).

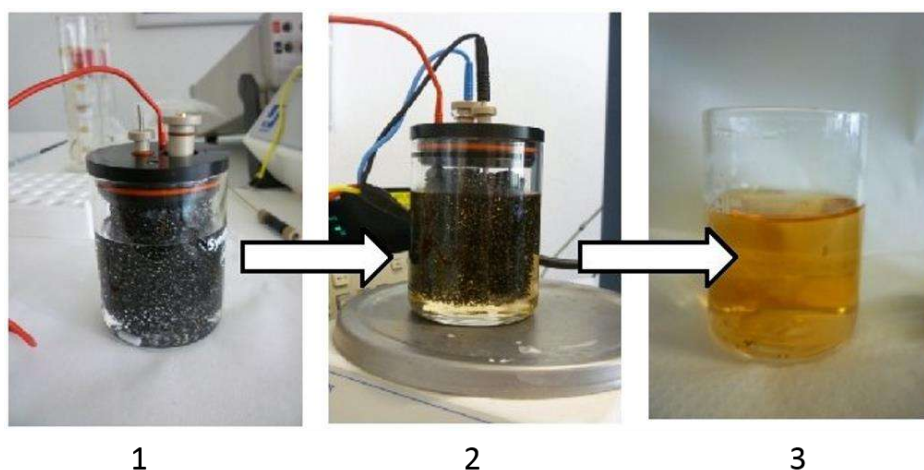


Рисунок 19 – Схема проведения ЭХО ДФ. 1 – 80 мл раствора ДФ помещали в электрохимическую ячейку Synthesis Cell; 2 – с помощью потенциостата поддерживали потенциал на рабочем электроде 1,5В в течение 60 мин; 3 – по окончании ЭХО извлекали электроды и анализировали продукты окисления

УФ/TiO₂-ФКО ДФ проводили в облучаемой суспензии наночастиц TiO₂ при постоянном перемешивании (рисунок 20).

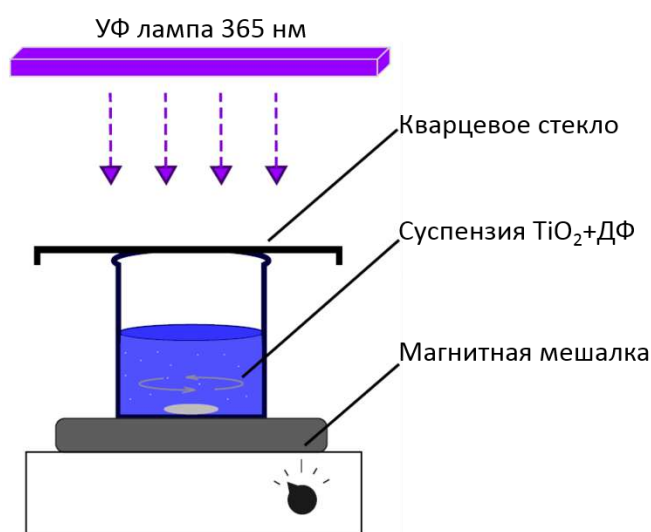


Рисунок 20 – Схема проведения УФ/TiO₂-ФКО в объеме

Характерное изменение цвета реакционного раствора в процессе ЭХО (рисунок 19 (3)) связано с образованием одного или нескольких окрашенных продуктов окисления ДФ [167], по крайней мере, один из которых был ранее идентифицирован как хинониминное производное (ДФ-2,5-ХИ, 3а), спонтанно образующееся из 5-ОН-ДФ (2а) [168]. Аналогичное изменение цвета наблюдалось и при УФ/TiO₂-ФКО (данные не приведены).

Идентификацию продуктов окисления ДФ, полученных путём ЭХО и УФ/TiO₂-ФКО проводили методом ВЭЖХ/МС/МС путём МС-ИЦР ПФ с ИЭР. На основании времён удерживания и точного измерения масс, были предложены вероятные молекулярные структуры соединений. Структуры идентифицированных веществ изображены на рисунке 21, расшифровка радикалов приведена в таблицах 3 и 4 (МС/МС спектры идентифицированных продуктов окисления представлены в Приложении А).

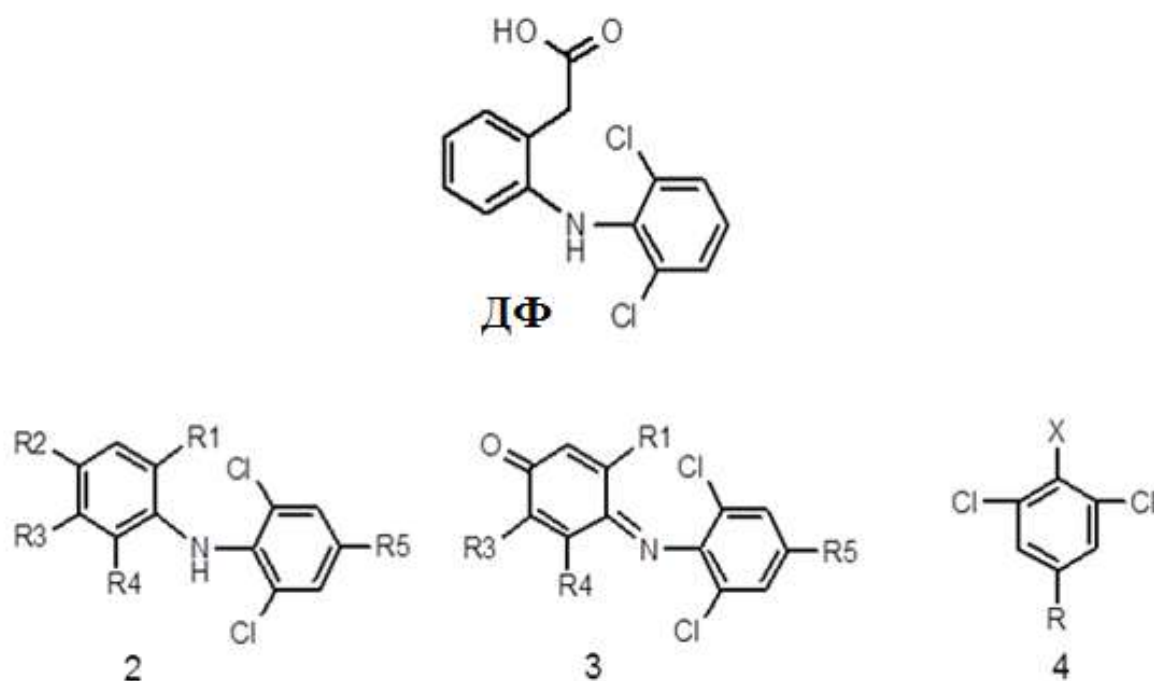


Рисунок 21 – Вероятные молекулярные структуры продуктов окисления ДФ

Таблица 3 – Продукты окисления ДФ, идентифицированные после электрохимического окисления и УФ/TiO₂-ФКО

Обозначение	R1	R2	R3	R4	R5
2a	CH ₂ COOH	OH	H	H	H
2b	CH ₂ COOH	H	H	H	OH
2c	CH ₂ COOH	H	H	OH	H
2d	CH ₂ COOH	OH	H	H	OH
2e	CH ₂ COOH	OH	H	OH	OH
2f	CH ₂ COOH	OH	OH	OH	OH
2g	COOH	H	H	H	H
2h	CHO	OH	H	H	H
2i	CHO	H	H	H	OH
2j	CHO	OH	H	H	OH
3a	CH ₂ COOH	-	H	H	H
3b	CH ₂ COOH	-	H	H	OH
3c	CH ₂ COOH	-	H	OH	OH
3d	CH ₂ COOH	-	OH	OH	OH
	R		X		
4a	OH		OH		
4b	OH		NH ₂		
4c	H		NHOH		

Таблица 4 – Идентифицированные продукты окисления ДФ полученные путем УФ/TiO₂-ФКО

Обозначение	Время выхода, мин	Брутто формула [M-H] ⁻	m/z теоретическое [M-H] ⁻	Измеренное m/z [M-H] ⁻	Ошибка, ppm	Соотношение, %*
ДФ	21.94	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₂	294,00831	294,00831	0	42.62
2a	17.14	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₃	310,00322	310,00322	0	11.08
2b	18.76	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₃	310,00322	310,00322	0	11.12
2c	18.06	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₃	310,00322	310,00322	0	35.44
2d	13.93	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₄	325,99814	325,99807	-0,21	1.35
2e	12.20	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₅	341,99305	298,00328 + CO ₂	0,20	0.10
2f	6.92	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₆	357,98796	357,98786	-0,27	0.11
2g	15.63	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ NO ₂	279,99266	279,99268	0,42	0.43
2h	19.81	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ NO ₂	279,99266	279,99281	0,53	0.49
2i	20.90	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ NO ₂	279,99266	279,99279	0,46	0.86
2j	16.03	C ₁₃ H ₈ Cl ₂ NO ₃	295,98757	295,98764	0,23	0.31
3a	24.31	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ NO ₃	307,98757	307,98760	0.09	3.22
3b	14.43	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ NO ₄	323,98249	323,98242	-0.21	1.79
3c	13.13	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ NO ₅	339,97740	339,97721	-0.55	1.21
3d	9.94	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ NO ₆	355,97231	355,97220	-0,30	0.16
4a	7.32	C ₆ H ₃ Cl ₂ O ₂	176,95046	176,95055	0,50	1.50
4b	9.4	C ₆ H ₄ Cl ₂ NO	175,96644	175,96646	0,11	1.10
4c	10.57	C ₆ H ₄ Cl ₂ NO	175,96644	175,96650	0.34	0.08
4d	9.1	C ₉ H ₈ Cl ₂ NO ₃	247,98757	247,98747	-0,4	0.13
4e	12.01	C ₉ H ₆ Cl ₂ NO ₃	245,97192	245,97180	-0,48	0.07
4f	18.69	C ₁₀ H ₈ Cl ₂ NO ₄	275,98249	275,98260	0,39	0.68

*Отношение площадей пиков продуктов окисления диклофенака к площади пика неокисленного диклофенака.

Масс-спектры смесей продуктов окисления представлены на рисунке 22.

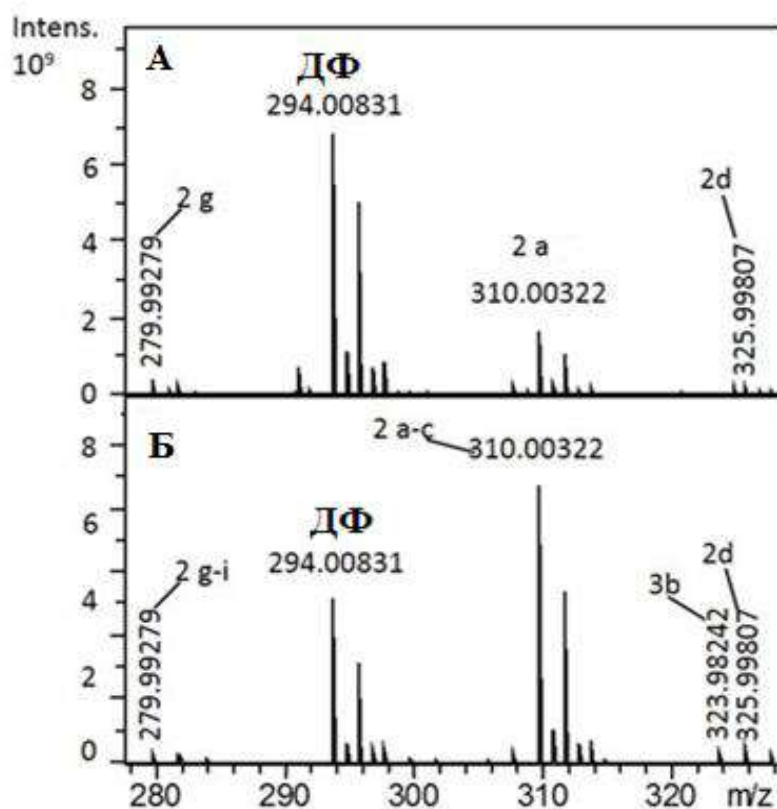


Рисунок 22 – Масс-спектры продуктов окисления ДФ полученные путем: ЭХО (А) и УФ/TiO₂-ФКО (Б)

Сигнал $[M-H]^-$ m/z 294 соответствует депротонированной молекуле ДФ, а сигнал с m/z 310 соответствует основным продуктам окисления, идентифицированным как моногидроксилированные производные ДФ (ОН-ДФ) 2(a-c). В качестве дополнительных продуктов окисления были выявлены полигидроксилированные 2(d-f), декарбоксилированные 2(g-j) и хинониминные 3(a-d) производные, а также продукты глубокой деструкции 4(a-f). Соединения 2a, 2d, 2g и 3b образуются как при ЭХО, так и при УФ/TiO₂-ФКО, остальные продукты не совпадают. В случае УФ/TiO₂-ФКО, основной сигнал m/z 310 соответствует трем моногидроксилированным изомерам, определённым как 2a – 2c, тогда как сигналы с m/z 280, 324 и 326 предположительно соответствуют продуктам окисления 2g, 3b и 2d, соответственно. Относительный выход продуктов ЭХО был невысок (не более 20% от исходного субстрата), тогда как УФ/TiO₂-ФКО обеспечивало значительно более высокий выход продуктов

окисления, среди которых более 50% составляли продукты моногидроксилирования (рисунок 22 А,Б). Следует отметить, что полученные результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными. Например, сообщалось об образовании гидроксилированных (2а-d) и хинониминового (3а) продуктов окисления ДФ в процессе УФ/TiO₂-ФКО [169,170]. Различия в полученных продуктах окисления, по-видимому, обусловлены экспериментальными параметрами, такими как длительность фотокаталитической реакции и интенсивность излучения.

Известно, что биоактивация ДФ *in vivo* происходит с образованием двух ключевых моногидроксилированных метаболитов 4'-ОН-DCI (2b) и 5-ОН-DCI (2а) [166]. Можно заключить, что УФ/TiO₂-ФКО более полно моделирует окислительный метаболизм ДФ, по сравнению с ЭХО, так как приводит к образованию двух основных биологически значимых метаболитов ОН-ДФ (2а, 2b). Кроме того, УФ/TiO₂-ФКО обеспечивает значительно более высокий выход продуктов окисления. Таким образом, для дальнейших экспериментов по моделированию окислительной биотрансформации использовали УФ/TiO₂-ФКО.

3.2 Проведение УФ/TiO₂-ФКО на МАЛДИ-мишени

Общепринятый способ проведения УФ/TiO₂-ФКО (в перемешиваемой суспензии) предполагает удаление наночастиц TiO₂ перед анализом продуктов окисления, что увеличивает время пробоподготовки и приводит к потере целевых соединений за счёт сорбции на твёрдой фазе. Кроме того, продукты окисления, полученные методом УФ/TiO₂-ФКО в объёме, обычно идентифицируют с помощью масс-спектрометрического анализа в совокупности с высокоэффективной жидкостной хроматографией, что привносит необходимость дополнительной пробоподготовки и существенно снижает скорость анализа.

Ранее было предложено несколько технически сложных подходов, основанных на сопряжении УФ/TiO₂-ФКО с МС в режиме реального времени, с использованием различных способов ионизации, таких как ионизация электроспреей на микрочипе (μ PESI) [65], десорбционная ионизация под действием электрораспыления (ДЕСИ) [66] и лазерная абляция с

электрораспылительной ионизацией (LAESI) [67]. Однако, все подобные методы отличаются технической изощрённостью, требуют специального оборудования и дополнительных материалов, что существенно ограничивает их массовое применение.

МАЛДИ-МС широко используется для анализа полимеров природного происхождения (пептиды, олигосахариды, белки), а также синтетических полимеров [171,172]. Существенным ограничением метода МАЛДИ-МС является присутствие в масс-спектрах в области низких масс сигналов ионов матрицы, перекрывающих пики ионов аналитов, что делает затруднительным применение данного метода для исследования низкомолекулярных органических соединений, в том числе биологически активных соединений и их метаболитов [173].

В то же время ПАЛДИ-МС может рассматриваться как альтернатива МАЛДИ-МС при анализе низкомолекулярных соединений, что прежде всего связано с незначительным уровнем фона в диапазоне низких масс и высокой эффективностью ионизации при использовании неорганических матриц (в виде наночастиц или структурированных поверхностей) [174,175]. TiO_2 является одним из наиболее распространенных и эффективных эмиттеров ионов для ПАЛДИ-МС, что, прежде всего, обусловлено его оптическими свойствами [176-178].

Нами было сделано предположение, что УФ/ TiO_2 -ФКО возможно провести в микрообъеме непосредственно на МАЛДИ-мишени модифицированной TiO_2 . Исходя из этого, мы предложили технологическую схему, при которой УФ/ TiO_2 -ФКО проводится непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим ПАЛДИ-МС анализом так, что нанопорошок TiO_2 последовательно выполняет роль фотокатализатора при ФКО и поверхности-эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе, что исключает необходимость использования МАЛДИ матрицы.

Для проведения УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ-мишени формировали тонкий слой TiO_2 путём высушивания капли суспензии нанопорошка TiO_2 , с последующим нанесением образца и УФ-облучением (рисунок 23). Количество наносимого TiO_2 оказалось важным фактором, влияющим как на интенсивность фотокаталитического окисления, так и на качество последующего ПАЛДИ-МС

анализа. Оптимальным оказалось количество не более 0,15 мкг нанопорошка TiO_2 с размером частиц 21 нм на каждую зону реакции площадью приблизительно 12,5 мм². Оптимальная концентрация ДФ для эффективного УФ/ TiO_2 -ФКО составляет 3-30 μM при объёме реакции 1,5 мкл. Поскольку УФ/ TiO_2 -ФКО на мишени протекает в микрообъёме раствора субстрата, длительность фотокаталитического окисления лимитируется скоростью высыхания капли. Высыхание капли легко может быть замедлено путём охлаждения МАЛДИ-мишени в процессе фотокаталитического окисления.

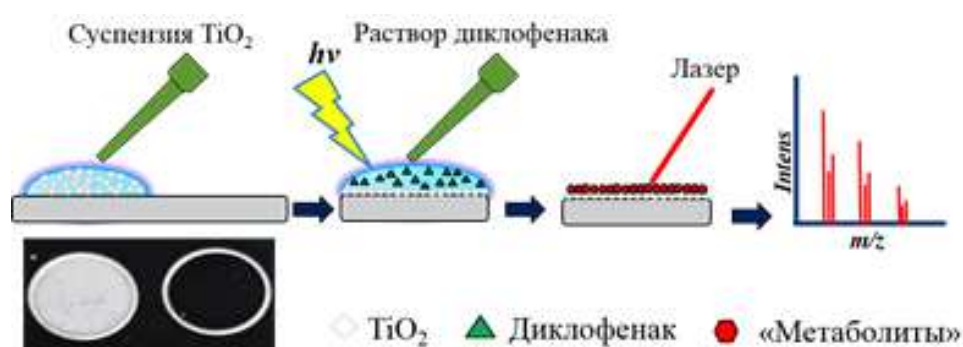


Рисунок 23 – Схема проведения УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ-мишени

Также были протестированы различные органические МАЛДИ матрицы, обычно используемые для МАЛДИ-МС низкомолекулярных соединений [173]. При этом оптимальное соотношение сигнал/шум было получено при использовании TiO_2 без добавления органических матриц (данные не приведены), что согласуется с данными об успешном применении нанопорошка TiO_2 для ПАЛДИ низкомолекулярных соединений [178]. При этом предпочтительной оказалась регистрация масс-спектров в режиме отрицательных ионов, так как в режиме положительных ионов доминировали сигналы ионов аддуктов $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и $[\text{M}+\text{K}]^+$, а ионы $[\text{M}+\text{H}]^+$ были значительно менее интенсивными (данные не приведены).

Типичный результат оптимизированного УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ-мишени приведён на рисунке 24. Несмотря на то, что высокоточное определение массы само по себе не позволяет различить изомерные продукты окисления, наблюдается практически идеальное соответствие между масс-спектрами, полученными для стандартного УФ/ TiO_2 -ФКО в перемешиваемой суспензии

(рисунок 22Б) и для ФКО на МАЛДИ-мишени (рисунок 24Г), с основным сигналом m/z 310 и дополнительными сигналами с m/z 280, 324 и 326, что позволяет предположить идентичность продуктов окисления в обоих случаях. Следует отметить, что предложенный подход не подразумевает сопряжения ФКО и МС в режиме реального времени и поэтому не позволяет осуществлять мониторинг образования продуктов окисления с временным разрешением для идентификации последовательных этапов окисления. Тем не менее, в большинстве случаев для оптимизации условий ФКО может быть вполне достаточно варьирования продолжительности реакции и интенсивности УФ-излучения.

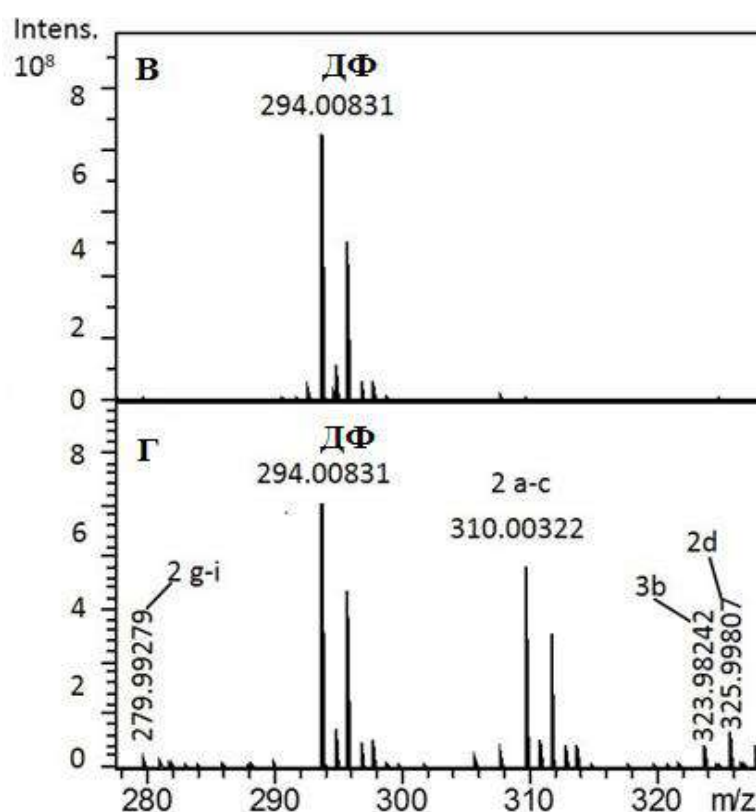


Рисунок 24 – МАЛДИ-масс-спектры ДФ (В) и его продуктов окисления, после УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ-мишени (Г)

3.3 Применение электрофоретически модифицированной TiO_2 МАЛДИ-мишени для МАЛДИ-МС

Дальнейшим развитием предложенного подхода, основанного на проведении УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ-мишени являлась разработка эффективного способа формирования покрытий TiO_2 . Используемый нами при

проведении УФ/TiO₂-ФКО на МАЛДИ-мишени метод «сухих капель», предполагающий нанесение суспензии наночастиц TiO₂ на мишень, может быть неэффективным в связи с низкой воспроизводимостью сигнала в пределах каждой ячейки нанесения образца (sample spot), что прежде всего связано с неравномерным распределением неорганической матрицы при высыхании (эффект «кофейного кольца») [179]. Известен подход, предполагающий использование нанотрубок TiO₂ [180], существенным ограничением которого является невозможность формирования нанотрубок TiO₂ на стандартных МАЛДИ-мишенях, изготавливаемых из нержавеющей стали. Соответственно, титановую фольгу, на которой получают покрытие из нанотрубок, необходимо затем надежно прикрепить к мишени, что значительно усложняет и без того достаточно трудоемкий процесс формирования и характеристики покрытия [181]. Также широко распространено плазменное напыление наночастиц, ключевой проблемой которого является фазовая трансформация TiO₂ из анатаза в рутил при повышенных температурах, что приводит к снижению его фотокаталитической активности и делает подобные покрытия малоэффективными для ПАЛДИ-МС и фотокатализа [182].

Среди известных методов формирования покрытий наиболее технологически гибким и перспективным может считаться электрофоретическое осаждение, благодаря простоте инструментальной реализации, дешевизне и возможности получения однородных покрытий с контролируемой толщиной [183]. В процессе ЭФО происходит направленное движение заряженных частиц дисперсной фазы суспензии в электрическом поле, их агрегирование в приэлектродном пространстве, нейтрализация и образование покрытия на поверхности электрода. Тем не менее, несмотря на рост числа публикаций, посвященных применению технологии ЭФО в различных приложениях фотокатализа, метод практически не используется при получении покрытий для ПАЛДИ-МС. Одним из немногих исключений является работа [184], в которой ПАЛДИ-покрытия были изготовлены путем ЭФО наночастиц золота, полученных с помощью лазерной абляции в жидкости, и использованы для анализа

олигопептидного гормона ангиотензина. Таким образом, ЭФО TiO_2 можно рассматривать как эффективный способ формирования фотокаталитических покрытий, являющихся также эмиттерами ионов при ПАЛДИ-МС анализе различных низкомолекулярных аналитов, включая биологически активные соединения и их метаболиты.

3.3.1 ЭФО TiO_2

Известно, что толщина формируемого покрытия прямо пропорциональна продолжительности ЭФО и приложенному напряжению [185]. Был проведен ряд экспериментов для оптимизации данных параметров ЭФО. Качество получаемых покрытий оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Время проведения ЭФО

В ходе серии экспериментов продолжительность осаждения наночастиц TiO_2 варьировали от 30 до 180 сек при напряжении 35 В. График, представленный на рисунке 25, демонстрирует, что масса осажденного TiO_2 линейно увеличивается со временем.

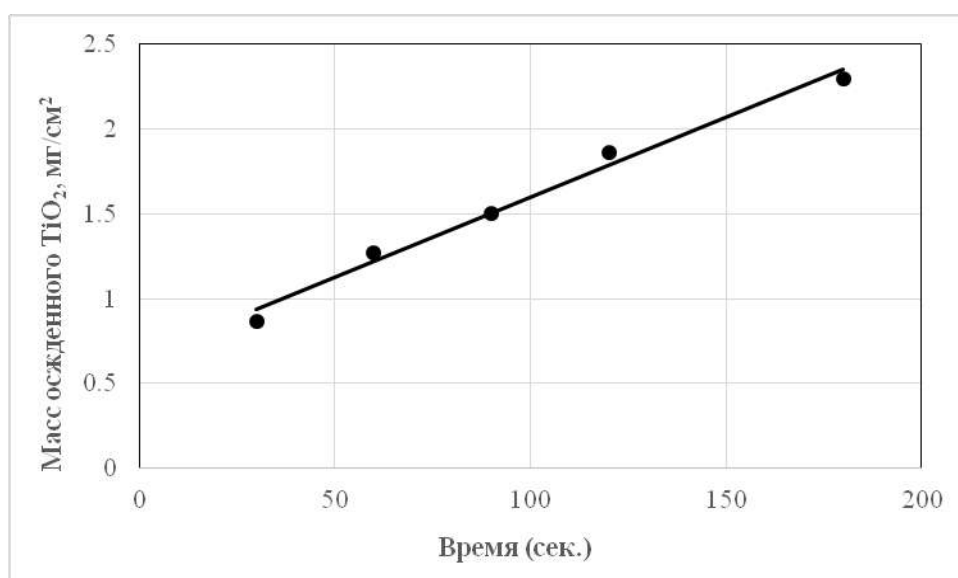


Рисунок 25 – Зависимость массы электрофоретически осажденного TiO_2 от времени при потенциале 35 В

Полученные данные согласуются с линейной моделью Хамакера [98], которая устанавливает связь между осажденной массой на единицу площади и временем осаждения. Было установлено, что увеличение времени ЭФО свыше 180

сек приводит к образованию покрытия TiO_2 с низкой адгезией к подложке, при прокаливании которого образуются трещины. Соответственно, изменение времени осаждения в диапазоне от 30 до 180 сек позволяет контролировать толщину получаемого покрытия с сохранением высокой адгезии к подложке.

Влияние приложенного напряжения

Для определения влияния напряжения его значения варьировали от 15 до 60 В. Было выявлено, что при напряжении 35 В формируются наиболее однородные и равномерные покрытия (см. рисунки 26 а, б). При более низких значениях напряжения наблюдалось неравномерное распределение частиц TiO_2 на подложке, и полученные покрытия имели низкую адгезию. При повышении напряжения свыше 40 В наблюдалась агломерация частиц, что также снижало качество покрытия и приводило к растрескиванию поверхности после прокаливании. При еще более высоком приложенном напряжении масса осажденного TiO_2 возрастала, что связано с увеличением подвижности частиц. Кроме того, более высокая разность потенциалов может быть причиной турбулентного движения частиц в суспензии и, как следствие, получения неоднородных покрытий.

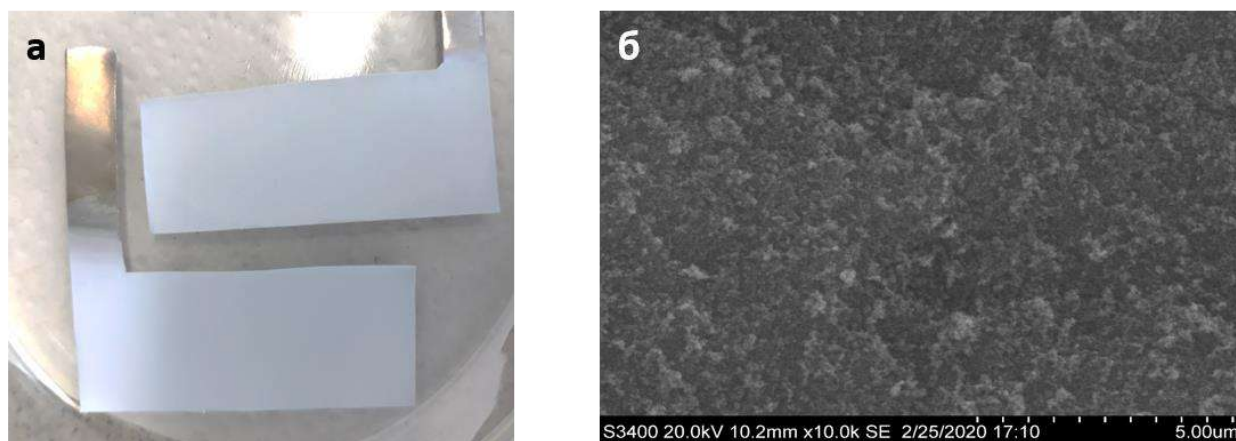


Рисунок 26 – (а) – внешний вид полученных поверхностей; (б) – СЭМ-изображение электрофоретически нанесенного покрытия TiO_2 (увеличение в 10000 раз)

Влияние состава растворителя

Также было оценено влияние состава растворителя на эффективность ЭФО. Были использованы суспензии TiO_2 на основе изопропилового спирта и

ацетилацетона. При использовании ацетилацетона в суспензию добавляли йод для образования свободных протонов, которые в дальнейшем могут адсорбироваться на поверхности наночастиц TiO_2 , придавая им положительный заряд [186]. Покрытия, полученные при использовании суспензий на основе ацетилацетона, были более однородными, что объясняется более низкой вязкостью и более высокой диэлектрической проницаемостью ацетилацетона, приводящими к повышенной подвижности заряженных частиц в растворе [187].

Характеризация полученных покрытий

На рисунке 27 представлено АСМ-изображение покрытия TiO_2 , полученного при напряжении 35 В и времени ЭФО 90 сек. Значение R_z составило 13,7 нм, средняя толщина покрытия 45 нм. Химический состав образцов был подтвержден с помощью энерго-дисперсионной рентгеновской спектроскопии (рисунок 28). Содержание титана и кислорода в образце составило 56,2% и 42,8% соответственно.

Покрытия, полученные с использованием напряжения 35В при времени осаждения 90 секунд, были наиболее однородными и механически стабильными, что позволило считать данные параметры оптимальными. Таким образом, ЭФО TiO_2 дает возможность получать высококачественные покрытия на подложках из нержавеющей стали, включая стандартные МАЛДИ-мишени.

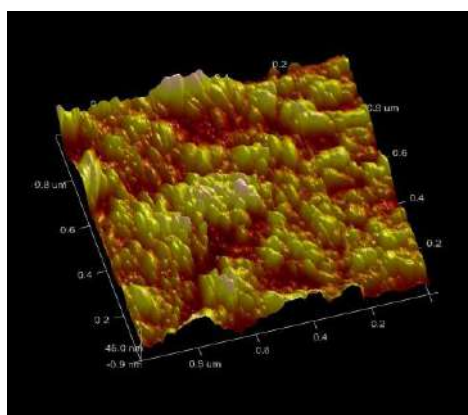


Рисунок 27 – АСМ- изображение поверхности TiO_2

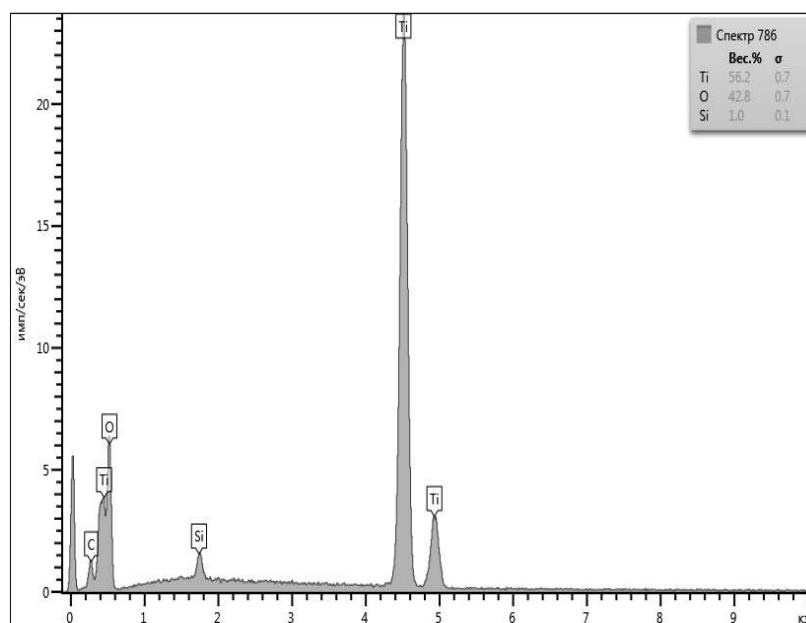


Рисунок 28 – Рентгеновский энерго-дисперсионный спектр полученного покрытия TiO_2

3.3.2 Модификация TiO_2 покрытия полидиметилсилоксаном

Гидрофильность TiO_2 , дополнительно усиленная шероховатостью покрытия в нанодиапазоне, приводит к значительному растеканию образца по поверхности TiO_2 -модифицированной МАЛДИ-мишени (рисунок 29А). В связи с этим TiO_2 -покрытие было дополнительно модифицировано гидрофобным слоем ПДМС.

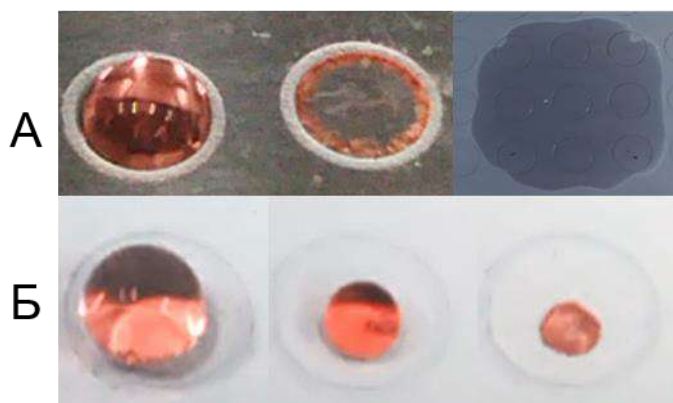


Рисунок 29 – Высыхание 5 мкл водной капли на необработанной и покрытой TiO_2 (А) и покрытой TiO_2 /ПДМС (Б) МАЛДИ-мишени. Красный краситель был добавлен для визуализации образования пятна образца

Ранее было показано, что толщина ковалентно привитого ПДМС-слоя зависит от средней молекулярной массы (СММ) используемого ПДМС, причём логарифмическая зависимость практически линейна в диапазоне масс 1.3-28.0 кДа

[189,188]. Было обнаружено, что использование ПДМС со СММ 6 кДа обеспечивает получение привитого слоя толщиной 2.2 нм, придающего плёнкам TiO_2 высокую гидрофобность без снижения их фотокаталитических свойств [189]. Мы предположили, что ПДМС со СММ 5.6 кДа, использованный в нашей работе, будет формировать гидрофобный слой толщиной около 2 нм с оптимальными свойствами. Действительно, полученное ПДМС-модифицированное TiO_2 -покрытие демонстрировало высокую гидрофобность при сохранении фотокаталитических свойств и ЛДИ-активирующей способности. ПДМС-модификация существенно повышала выход продуктов УФ/ TiO_2 -ФКО и функциональную долговечность фотокаталитического TiO_2 -покрытия при его повторном использовании. TiO_2 /ПДМС-модификация МАЛДИ-мишени обеспечивала формирование очень компактных пятен образцов (менее 1 мм в диаметре), что существенно повышало чувствительность ПАЛДИ-МС анализа низкомолекулярных аналитов, таких как ЛС и их метаболиты (рисунок 29Б). При этом, TiO_2 /ПДМС-покрытие совместимо со стандартными органическими матрицами, что позволяет проводить МАЛДИ-МС анализ пептидов и белков после их сокристаллизации с матрицей. Важно отметить, что при TiO_2 -ПАЛДИ низкомолекулярные соединения ионизируются преимущественно в форме натриевых и калиевых аддуктов [190], что снижает чувствительность МС анализа и затрудняет интерпретацию масс-спектров [191-192]. ПДМС-модифицированное TiO_2 -покрытие обеспечивало практически исключительное образование ионов $[\text{M}+\text{H}]^+$, тем самым устраняя интерферирующий эффект аналитически избыточных аддуктов $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и $[\text{M}+\text{K}]^+$.

3.3.3 ПАЛДИ-МС анализ амиодарона

Воздействие наносекундного импульсного лазера на поверхность TiO_2 сопровождается тепловыми, термоупругими, термопластическими, электрическими и фотоэлектрическими эффектами [193]. Поглощение мощного излучения из области собственного поглощения полупроводника приводит к созданию высокой концентрации свободных носителей заряда и внутренних электрических полей в приповерхностной области, быстрому и локальному

нагреву этой области, что способствует эффективной десорбции и ионизации молекул аналита [194].

Основным механизмом образования заряженных ионов в ПАЛДИ является протонирование, что предполагает зависимость вероятности ионизации от сродства к протону (основности) изучаемых соединений [195]. В качестве модельного соединения для оценки эффективности полученных покрытий TiO_2 для ПАЛДИ-МС анализа был выбран амиодарон (рисунок 30), имеющий высокий показатель константы основности ($\text{pKb} = 10,5$).

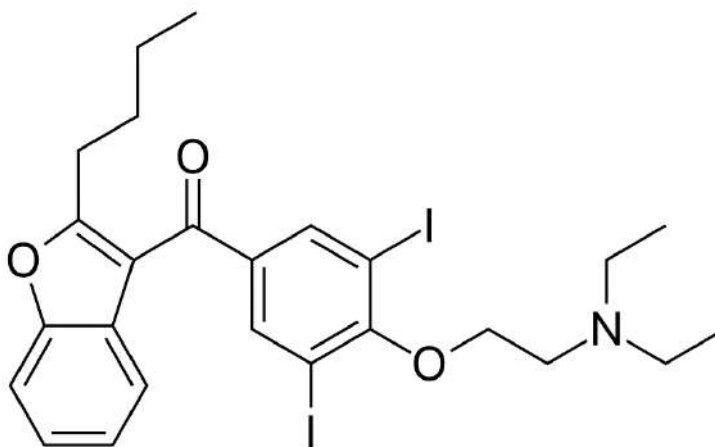


Рисунок 30 – Структурная формула амиодарона

Первоначально была оценена возможность применения наночастиц TiO_2 для ПАЛДИ-МС анализа амиодарона. Для формирования ПАЛДИ-покрытия был использован метод «сухих капель», при котором анализируемый образец добавляли к суспензии наночастиц и 1 мкл смеси депонировали на подложку с последующим ПАЛДИ-МС анализом. На полученном ПАЛДИ масс-спектре (рисунок 31а) сигнал $[\text{M-H}]^+$ m/z 646,0309 соответствует протонированной молекуле амиодарона (расчетное значение m/z 646,030964), а доминирующие сигналы с m/z 668,0129 и 683,9868 являются следствием образования аддуктов $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и $[\text{M}+\text{K}]^+$ соответственно. Источником следовых количеств ионов натрия и калия предположительно является деионизованная вода. В процессе ЭФО также происходит контаминация слоя наночастиц TiO_2 следовыми количествами катионов натрия и калия, источником которых предположительно служит стекло, из которого изготовлена ячейка. Ионизация катионами натрия и калия в обоих этих случаях является основным механизмом передачи заряда молекулам аналита.

При этом масс-спектр, полученный с применением ПДМС-модифицированного ПАЛДИ-покрытия (рисунок 31б) содержит только один интенсивный сигнал, соответствующий протонированной молекуле амиодарона с m/z 646,02874 $[M+H]^+$, при практически полном отсутствии сигналов калиевых и натриевых аддуктов, что, по-видимому, объясняется экранирующим эффектом ПДМС [189]. В случае протонированной молекулы амиодарона, соотношение сигнал/шум при использовании ПДМС-модифицированного ПАЛДИ-покрытия увеличилось более чем в 10 раз по сравнению с покрытием, полученным методом «сухих капель».

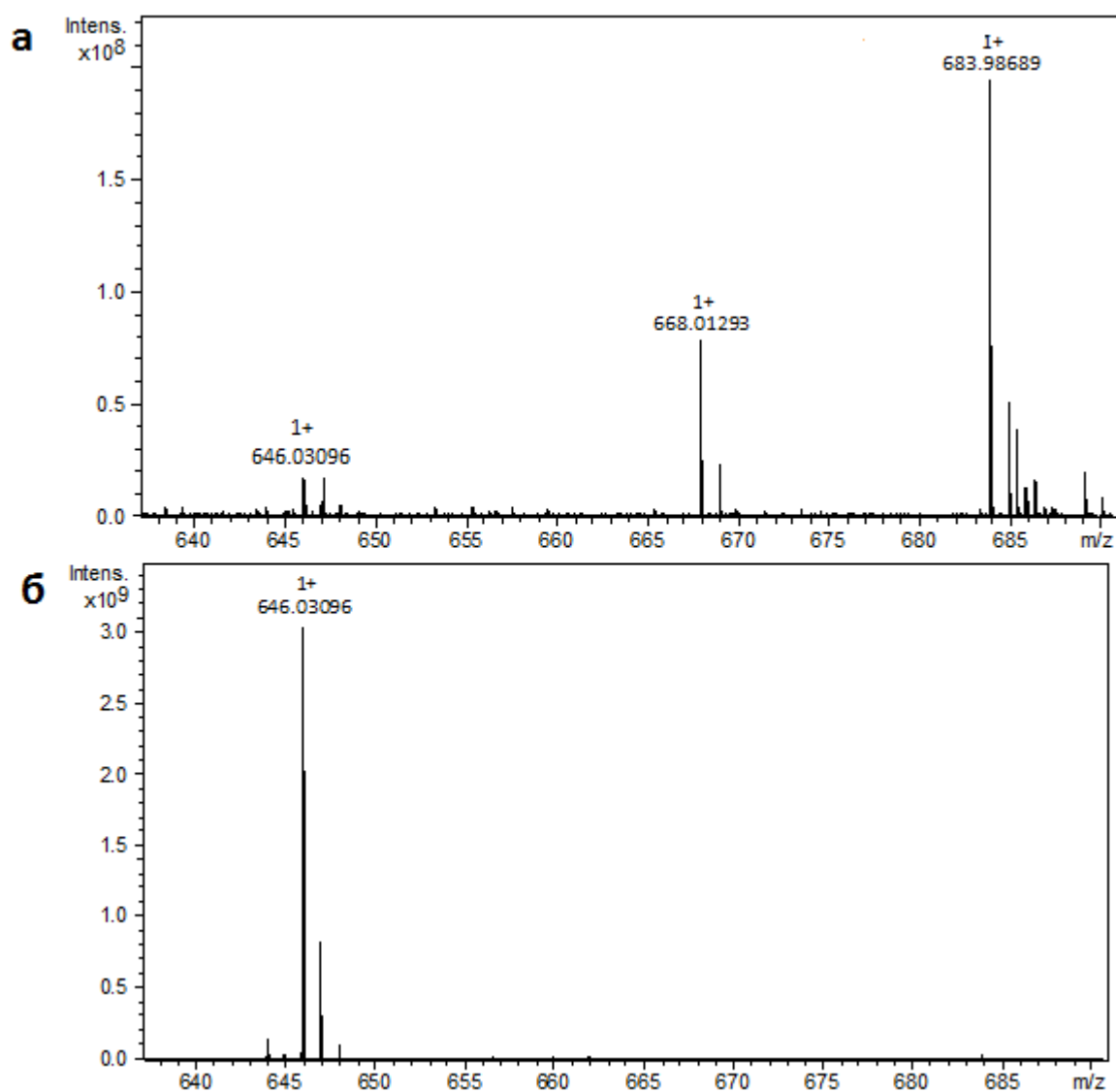


Рисунок 31 – ПАЛДИ-масс-спектр амиодарона (10 нг/мл). а – TiO_2 нанесен методом «сухих капель»; б – ЭФО покрытие TiO_2 модифицированное ПДМС

Таким образом, модификация ПАЛДИ-покрытия ПДМС не препятствует десорбции/ионизации аналита и повышает чувствительность анализа благодаря концентрированию образца в центре лунки МАЛДИ-мишени.

При использовании метода «сухих капель» наблюдается зависимость эффективности ионизации амиодарона от количества TiO_2 , нанесенного на МАЛДИ-мишень (рисунок 32). Максимальная интенсивность сигнала амиодарона наблюдается при нанесении TiO_2 в количестве 50 нг на ячейку. Снижение эффективности ионизации при дальнейшем увеличении количества наносимого TiO_2 может быть объяснено тем, что амиодарон адсорбирован на поверхности наночастиц по всей толщине слоя, в то время как глубина эффективного действия УФ лазера ограничена (~ 100 нм).

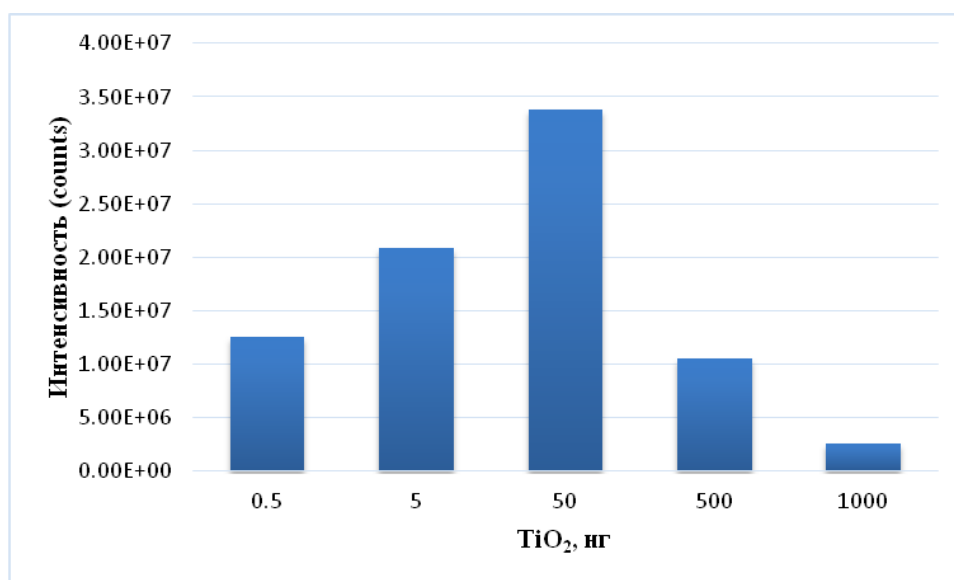


Рисунок 32 – Зависимость интенсивности сигнала амиодарона от количества TiO_2 нанесенного на МАЛДИ-мишень с помощью метода «сухих капель»

Примечательно, что при использовании ПАЛДИ-покрытия, полученного путем ЭФО с последующей обработкой ПДМС, интенсивность сигнала практически не зависит от толщины покрытия. Можно предположить, что взаимодействие молекул амиодарона с метильными группами ($-\text{CH}_3$) на поверхности ПДМС значительно слабее, чем с гидроксильными группами ($-\text{OH}$) на поверхности TiO_2 .

Для оценки чувствительности предложенного подхода на полученное ПАЛДИ-покрытие наносили по 1 мкл растворов амиодарона в диапазоне

концентраций 1 – 100 фг/мкл. При минимальном количестве амиодарона (1 фг на ячейку) был зарегистрирован сигнал с соотношением сигнал/шум более 10:1 (рисунок 33), что свидетельствует о высокой эффективности полученного ПАЛДИ-покрытия. Для сравнения, предел детектирования амиодарона при проведении десорбции/ионизации на коммерчески доступных чипах с кремниевыми наностолбиками составляет 1 пг на ячейку [196].

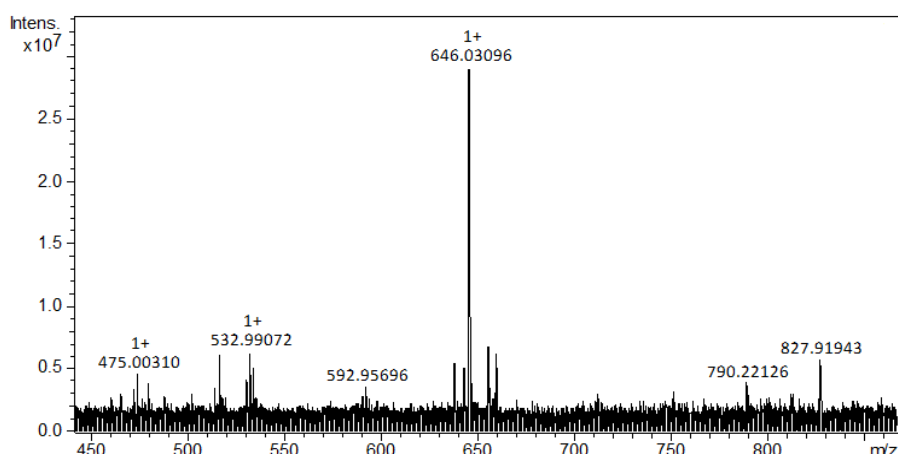


Рисунок 33 – ПАЛДИ масс-спектр амиодарона (1 фг/ячейку) полученный с использованием ЭФО покрытия TiO₂ модифицированного ПДМС

Также была оценена возможность применения ПДМС-модифицированного TiO₂-покрытия для проведения УФ/TiO₂-ФКО на МАЛДИ-мишени. Результаты УФ/TiO₂-ФКО диклофенака полностью согласуются с данными, полученными при использовании метода «сухих капель» (данные не приведены). На рисунке 34 представлен масс-спектр продуктов УФ/TiO₂-ФКО амиодарона полученный с использованием ПАЛДИ-ИЦР ПФ-МС. Сигнал m/z 646,0309 соответствует протонированной молекуле амиодарона. В результате ФКО амиодарона происходит образование моно-N-дезэтиламиодарон m/z 618,9992 который является основным метаболитом, идентифицированным в плазме крови человека [197]. При этом степень конверсии амиодарона составила более 50%.

Таким образом, нами показано, что ЭФО наночастиц TiO₂ на подложку из нержавеющей стали, с последующей модификацией осажденного слоя ПДМС, позволяет получать фотокаталитическое покрытие с воспроизводимыми характеристиками, служащее эффективным эмиттером ионов при последующем

ПАЛДИ-МС анализе. Общая схема предложенного подхода представлена на рисунке 35.

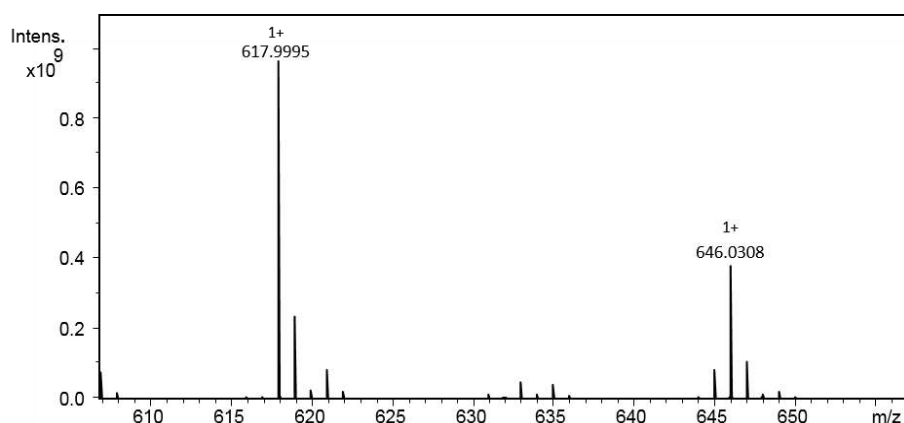


Рисунок 34 – ПАЛДИ масс-спектр продуктов окисления амиодарона после УФ/ TiO_2 -ФКО на МАЛДИ-мишени

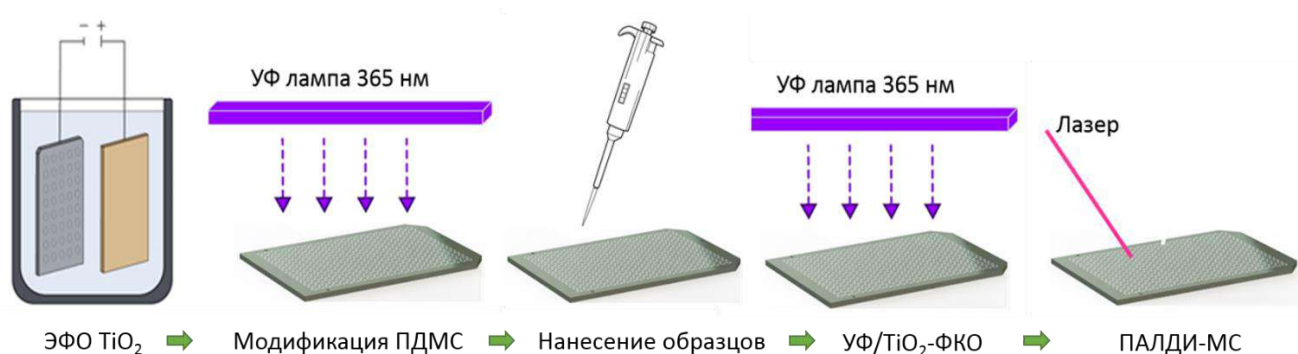


Рисунок 35 – Общая схема получения ПДМС-модифицированного ПАЛДИ-покрытия с последующим МС анализом

3.4 Микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени»

Известен ряд работ, посвященных использованию стандартной МАЛДИ-мишени как платформы для выполнения последовательных этапов пробоподготовки с последующим ЛДИ-МС анализом [144]. Для обозначения подобных подходов используется общий термин – «лаборатория на мишени» («lab-on-a-plate»). Ранее нами была реализована «лаборатория на мишени», позволяющая проводить УФ/ TiO_2 -ФКО в микрообъеме образца непосредственно на МАЛДИ-мишени, модифицированной TiO_2 , с последующим масс-

спектрометрическим анализом. Дальнейшим развитием предложенного подхода явилась разработка экспериментальной установки, позволяющей интегрировать все стадии моделирования, пробоподготовки и анализа в рамках одной платформы на основе МАЛДИ-мишени.

3.4.1 96-луночное УФ/TiO₂-фотокаталитическое микрореакторное устройство (РСμR96)

РСμR96, позволяет объединить моделирование биотрансформации ЛС и последующую пробоподготовку непосредственно на МАЛДИ-мишени. РСμR96 (рисунок 36) состоит из МАЛДИ-мишени (1), перфорированной эластомерной прокладки (2), микрореакторной насадки с 96 коническими отверстиями (μRD) (3) и охлаждаемого УФ-светодиодного модуля (4). Конические отверстия μRD и МАЛДИ-мишень функционализированы гидрофобным фотокаталитическим композитным TiO₂/ПДМС-покрытием, что позволяет проводить УФ/TiO₂-ФКО и TiO₂-ПАЛДИ-МС, соответственно. Перфорированная прокладка и μRD соответствуют стандартной МАЛДИ-мишени микропланшетного формата (мишень МТР) от Bruker Daltonics по размеру и по положениям 96 ячеек из 384. μRD обратимо закрепляется на МАЛДИ-мишени с помощью перфорированной прокладки, которая обеспечивает герметичное уплотнение благодаря своим эластомерным свойствам. Таким образом, формируется 96-луночный планшет с МАЛДИ-мишенью в качестве основания – μRC96 (5). Благодаря микропланшетному формату, μRC96 совместим со стандартными термошейкерами для микропланшетов, центрифужными концентраторами и роботизированными системами дозирования жидкостей. Для проведения УФ/TiO₂-ФКО поверх μRC96 устанавливается УФ-светодиодный модуль. Компоненты 1-5 в сборе образуют фотокаталитическое микрореакторное устройство РСμR96 (6).

Модификацию лунок μRC96 и МАЛДИ-мишени TiO₂-покрытием осуществляли путём ЭФО наночастиц Aeroxide P25. Стоит отметить, что в различных лунках μRD могут быть получены различные фотокаталитические покрытия для их последующей сравнительной оценки, причём светодиодный

модуль может быть оснащён светодиодами с разной длиной волны без изменения конструктивной схемы установки.

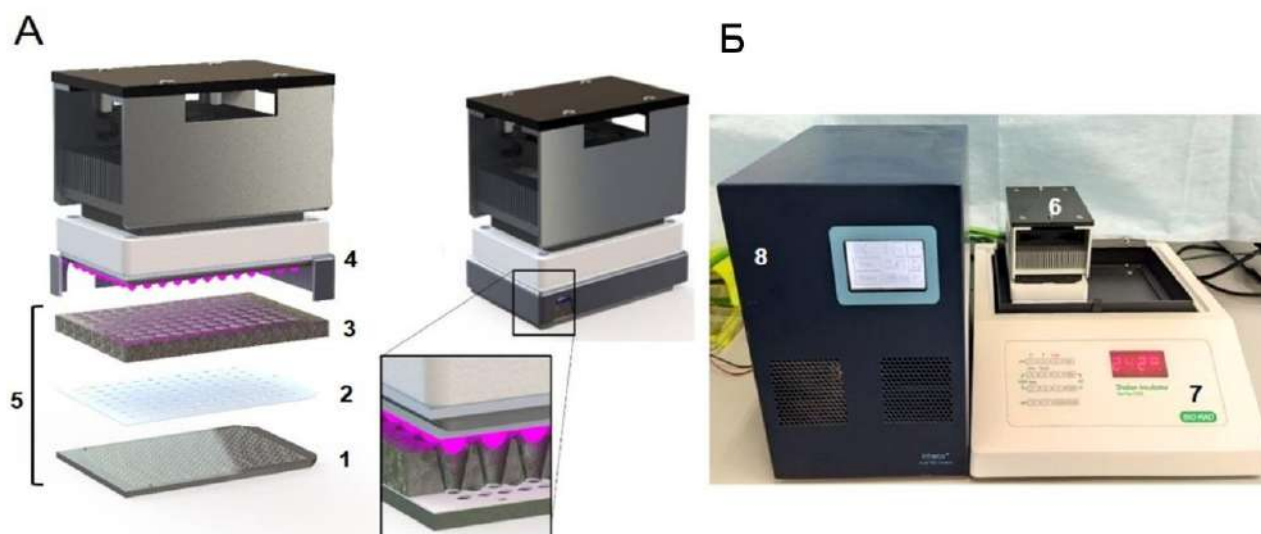


Рисунок 36 – 96-луночный УФ/TiO₂-ФКО микрореактор (PCμR96). (А) 3D-модель PCμR96 (слева) и собранная установка (справа). В разрезе показано положение УФ-светодиодов относительно лунок μRC96. (Б) Собранная установка PCμR96 (6) на шейкере-инкубаторе (7). Охлаждение модуля УФ-светодиодов управляется блоком управления ТЕС (8)

Предлагаемое устройство позволяет последовательно проводить на МАЛДИ-мишени УФ/TiO₂-ФКО ксенобиотиков, инкубацию продуктов ФКО с биомолекулами (например, с глутатионом или белками), ферментативный гидролиз белковых аддуктов и концентрирование образцов. Кроме того, в случае необходимости в лунках микрореактора также может осуществляться сокристаллизация белков и пептидов с разбавленными органическими матрицами. Концентрирование образцов на всех этапах пробоподготовки достигается испарением растворителя из лунок путём инкубации на термошейкере или центрифугирования в вакуумном концентраторе. После окончания всех этапов пробоподготовки и демонтажа μRC96 в ячейках МАЛДИ-мишени остаются пятна образцов, готовые для дальнейшего ЛДИ-МС анализа.

3.4.2 Оптимизация геометрии лунок микрореактора

Интенсивность и равномерность распределения светового потока, падающего на фотокатализатор, является ключевым фактором, определяющим эффективность фотокаталитической реакции [198]. В устройстве РСμR96 используются УФ-светодиоды, поскольку они обеспечивают направленный поток света и достаточно компактны, чтобы помещаться в лунки микрореакторной насадки. Для достижения высокого выхода продуктов УФ/TiO₂-ФКО необходимо оптимизировать геометрию лунок микрореактора таким образом, чтобы обеспечить максимальное поглощение УФ-излучения фотокаталитическим покрытием. Оптимизацию осуществляли путём моделирования распределения светового потока в лунках различной геометрии с помощью Zemax OpticStudio. Система была задана в непоследовательном режиме, расчет производился для 10⁷ лучей. Для задания светодиода были использованы кривая силы света и характеристики из спецификации на светодиод NCSU276AT.

Для финального расчета сетка детектора была задана как прямоугольник со сторонами $X = 5$ мм, $Z = 10,5$ мм и $Y = 0,01$ мм (рисунок 37). Количество пикселей соответственно: 500, 1050 и 1. Пиксели в детекторе имеют форму куба со стороной 10 мкм. Для уменьшения расчетного времени и повышения точности расчетов была использована условная симметрия лунки реактора, что позволило регистрировать значения только в половине тонкого слоя.

3D модели реактора были заранее созданы в САПР Компас 3D и загружены в Zemax OpticStudio в формате STL. Также в Zemax OpticStudio были заданы и соответственно присвоены показатели преломления и поглощения материалов: «сталь», «TiO₂» и «вода» в спектральной области 200–1000 нм. Спектральные зависимости получены с онлайн-ресурса <https://refractiveindex.info/>.

На первом этапе моделирования было изучено влияние фокусирующей линзы на распределение падающего светового потока. Было смоделировано три конфигурации фотокаталитического реактора: без линзы и с линзами, с углами распределения 30° и 50°. При этом, глубина лунки (h) составляла 10 мм; толщина покрытия TiO₂ – 50 нм; высота уровня воды – 6 мм; угол наклона лунки – 15°;

расстояние от поверхности светодиода (линзы) до нижней части насадки составляло (h_{led}) 10,5 и 6 мм соответственно (рисунок 38).

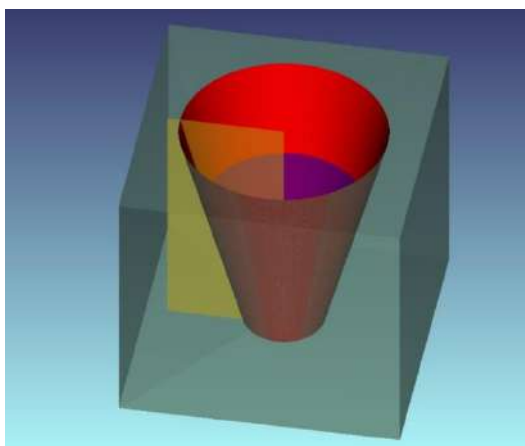


Рисунок 37 – Заданная система фотокаталитического реактора: красным цветом изображена поверхность TiO_2 , синим – вода, серым – насадка, а оранжевый прямоугольник – детектор

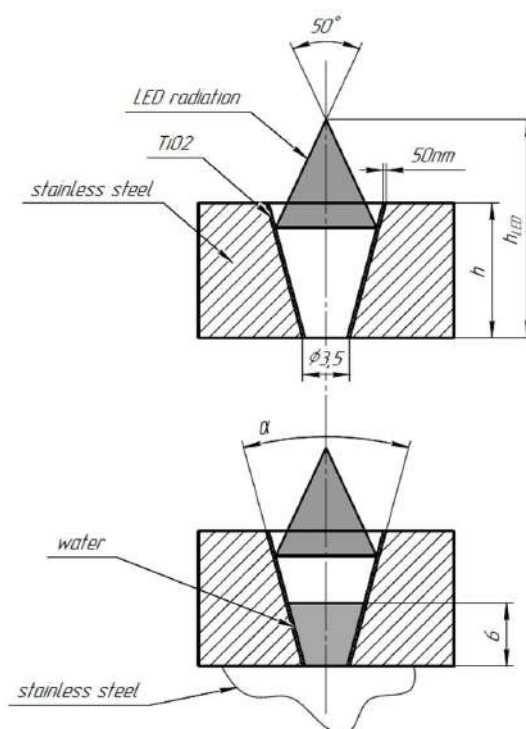


Рисунок 38 – Чертеж лунки фотокаталитического микрореактора

Из полученных в ходе моделирования результатов, представленных на рисунках 39 – 41, видно, что при использовании светодиода без линзы основная часть светового потока падает на верхнюю часть лунки, а при наличии линзы с углом распределения 30° практически все излучение попадает на дно реактора,

причем в обоих случаях стенки реактора остаются практически не освещенными. Использование линзы с углом распределения 50° позволяет получить наиболее равномерное распределение светового потока в пределах лунки.

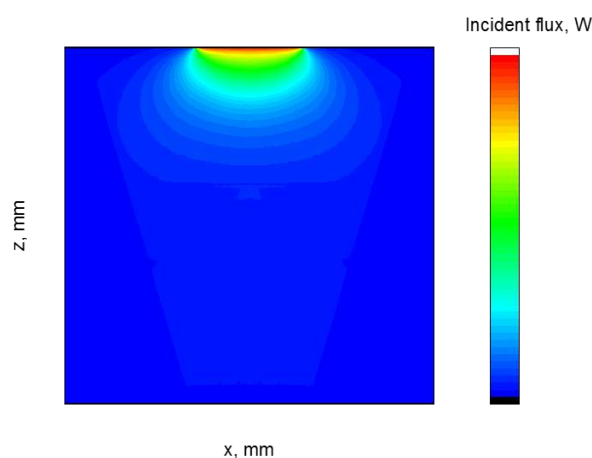


Рисунок 39 – Распределение потока излучения в плоскости продольного сечения, проходящей через ось симметрии реактора при использовании светодиода без линзы

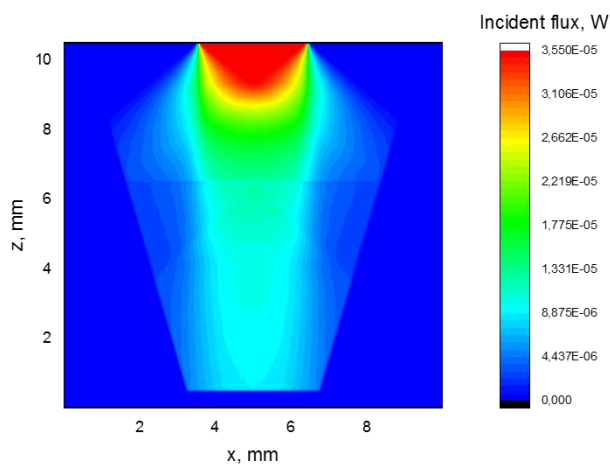


Рисунок 40 – Распределение потока излучения в плоскости продольного сечения, проходящей через ось симметрии реактора при наличии линзы с углом распределения 30°

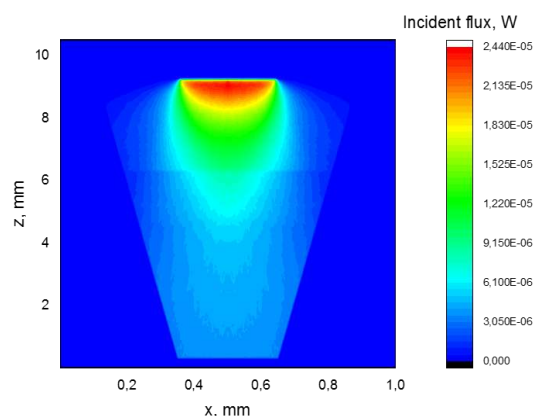


Рисунок 41 – Распределение потока излучения в плоскости продольного сечения, проходящей через ось симметрии реактора при наличии линзы с углом распределения 50°

Лучи в системе полностью поглощаются при попадании на поверхность TiO_2 , в связи с тем, что в геометрии лунки нет самопересечений, данные по оси Z возможно суммировать. Полученный таким образом график будет отображать поглощенное излучение на поверхности фотокатализатора. Для визуализации полученных результатов были построены зависимости отклонения значения поглощенного потока в каждой точке лунки (в пределах разрешения расчетной сетки) от среднего значения поглощенного потока в пределах расчетной области (рисунок 42). Установлено, что в области заполнения жидкостью и на границе воздух-жидкость распределение поглощенного потока достаточно равномерно, наблюдаются пики в области основания конуса, обусловленные пространственной близостью к излучающей области используемых светодиодов.

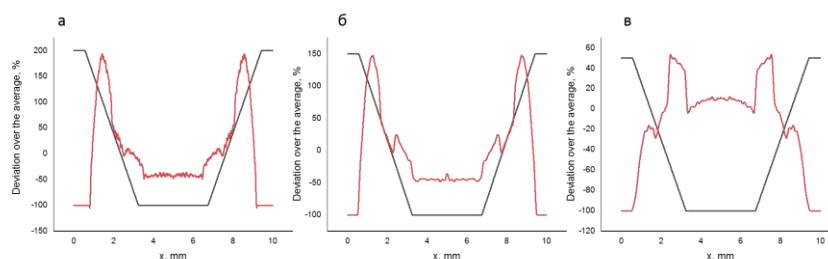


Рисунок 42 – Зависимость отклонения от среднего значения поглощенного потока в конкретной точке лунки (deviation over the average, %) от координаты (x , mm). а – без линзы; б – линза 30° ; в – линза 50° . Здесь и далее серой линией указаны границы лунки фотокаталитического реактора

В ходе дальнейшего моделирования варьировали глубину лунки (h) в диапазоне от 8 до 10 мм и угол наклона лунки в диапазоне от 15 до 25°. Полученные результаты представлены на рисунках 43–45.

Таким образом, было произведено исследование распределения потока излучения светодиода по стенкам лунки фотокаталитического реактора для трех различных конфигураций: светодиод без линзы, светодиод с линзой 30°, светодиод с линзой 50°. Показано, что поверхность фотокатализатора при использовании линзы 50° освещена равномерней, чем при использовании других конфигураций.

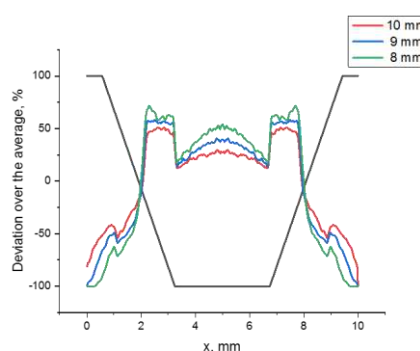


Рисунок 43 – Зависимость отклонения от среднего значения поглощенного потока в конкретной точке лунки (для конфигурации системы с углом наклона лунки 15°) для разной глубины

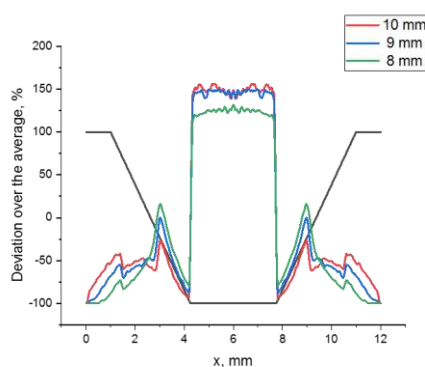


Рисунок 44 – Зависимость отклонения от среднего значения поглощенного потока в конкретной точке лунки (для конфигурации системы с углом наклона лунки 20°) для разной глубины

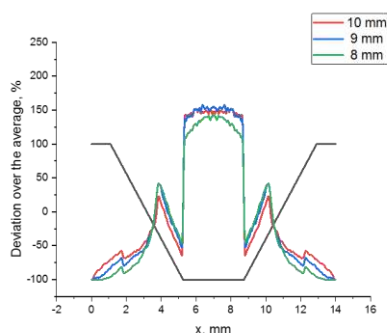


Рисунок 45 – Зависимость отклонения от среднего значения поглощенного потока в конкретной точке лунки (для конфигурации системы с углом наклона лунки 25°) для разной глубины

В дальнейшем для конфигурации со светодиодом с линзой 50° было произведено исследование влияния геометрии лунки на равномерность распределения потока излучения: изменялась глубина лунки от 8 до 10 мм, угол наклона лунки – от 15° до 25° . Установлено, что наиболее равномерное распределение светового потока наблюдается в случае использования лунки с углом наклона 15° и глубиной 10 мм.

Для определенной в ходе моделирования оптимальной конфигурации фотокаталитического реактора (линза с углом распределения 50° , $h = 10$ мм, угол наклона лунки 15°) была построена трехмерная модель визуализирующая отклонение от среднего значения поглощенного излучения на поверхности фотокатализатора (рисунок 46).

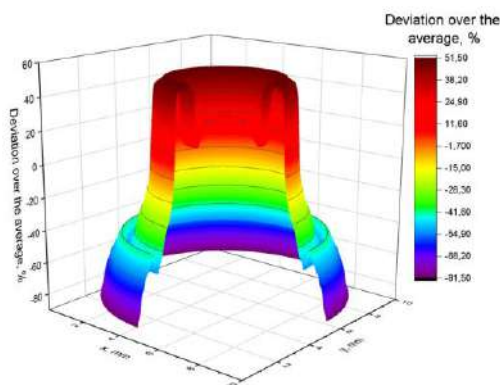


Рисунок 46 – Отклонение от среднего значения поглощенного излучения на поверхности фотокатализатора для конфигурации реактора с линзой 50° , $h = 10$ мм, угол наклона лунки 15°

3.4.3 Последовательные этапы пробоподготовки

Общая схема неферментативного моделирования биотрансформации ксенобиотиков *in vitro* и последующего анализа продуктов представлена на рисунке 44 [199].

Процесс моделирования и анализа биотрансформации с использованием РСμR96 включает симуляцию окислительного метаболизма ЛС, получение ковалентных аддуктов продуктов окисления с глутатионом или белками и последующий ЛДИ-МС анализ. Последовательные этапы пробоподготовки показаны на рисунках 47, 48. Водный раствор ксенобиотика (например, кандидатного ЛС) наносится в лунку микрореактора μRC96, на микрореактор устанавливается охлаждаемый УФ-светодиодный модуль и собранное фотокаталитическое устройство помещается на микропланшетный шейкер-инкубатор для проведения УФ/TiO₂-ФКО при постоянном перемешивании. По окончании ФКО, УФ-светодиодный модуль снимается. Перед проведением ПАЛДИ-МС анализа раствор, содержащий продукты окисления может быть упарен (48А). Для оценки реакционной способности продуктов окисления глутатион или модельный белок добавляется к раствору аналита. Модифицированный белок либо концентрируют и сокристаллизуют с матрицей для анализа методом МАЛДИ-МС (48Б) или проводят ферментативный гидролиз в той же лунке. Триптические пептиды концентрируют совместно с матрицей и анализируют методом МАЛДИ-МС/МС для идентификации модифицированных аминокислотных остатков (В).

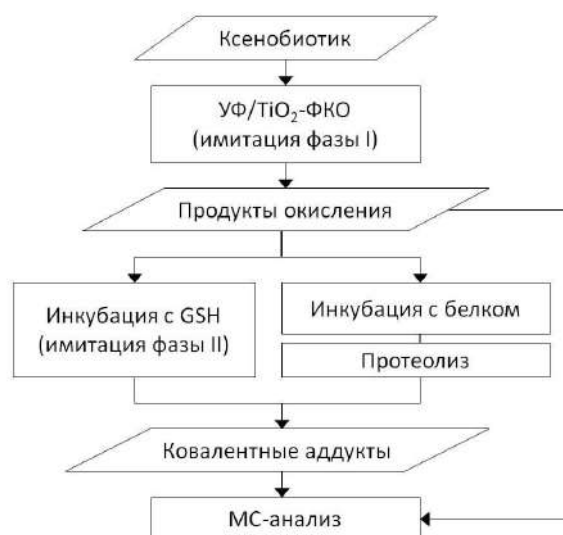


Рисунок 47 – Общая схема неферментативного моделирования биотрансформации ксенобиотиков

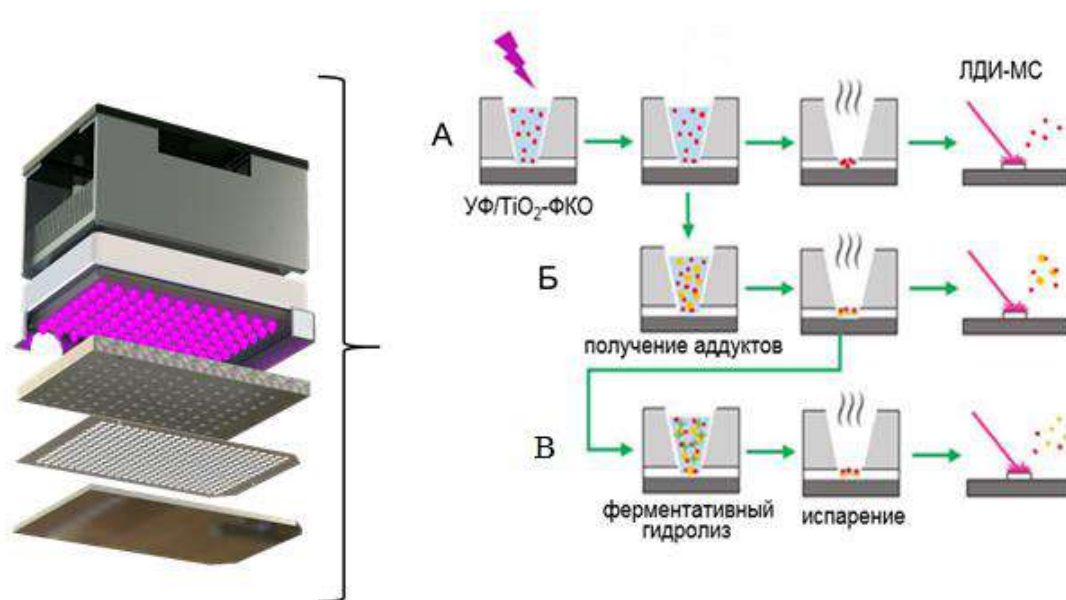


Рисунок 48 – Аналитический процесс с использованием PCμR96: А – УФ/ТiO₂-ФКО с последующим МАЛДИ-МС анализом (красными точками показаны ЛС и продукты окисления); Б – образование аддуктов продуктами окисления ЛС с модельным белком с последующим МАЛДИ-МС анализом полноразмерных белков (оранжевыми точками показаны белковые аддукты); В – ферментативный гидролиз белковых аддуктов с последующим МАЛДИ-МС анализом триптических пептидов (зелеными звездочками показан трипсин, оранжевыми – триптические пептиды)

3.5 Моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков с использованием РС_μR96

3.5.1 Моделирование окислительной биотрансформации амодиахина

В качестве модельного соединения был выбран AQ (рисунок 49) являющийся эффективным препаратом для лечения малярии [200].

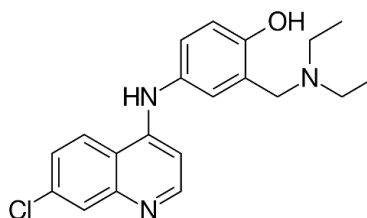


Рисунок 49 – Структурная формула AQ

При профилактическом применении AQ наблюдаются серьезные побочные эффекты, включая токсический гепатит и агранулоцитоз. Известно, что AQ подвергается окислительной биоактивации *in vivo* с образованием электрофильных метаболитов, способных ковалентно связываться с макромолекулами, такими, как белки и ДНК [201-203]. Высокая реакционная способность таких метаболитов может препятствовать их обнаружению в экспериментах с использованием биологических систем (микросомы печени, культуры гепатоцитов, лабораторные животные), что связано с образованием более стабильных конечных продуктов, например, конъюгатов с глутатионом.

Брутто-формулы продуктов окисления AQ были определены путём точного измерения масс (таблица 5). Масс-спектр AQ и продуктов его окисления показан на рисунке 50. На основании данных ПАЛДИ-МС/МС анализа были определены вероятные структуры продуктов окисления (Приложение Б).

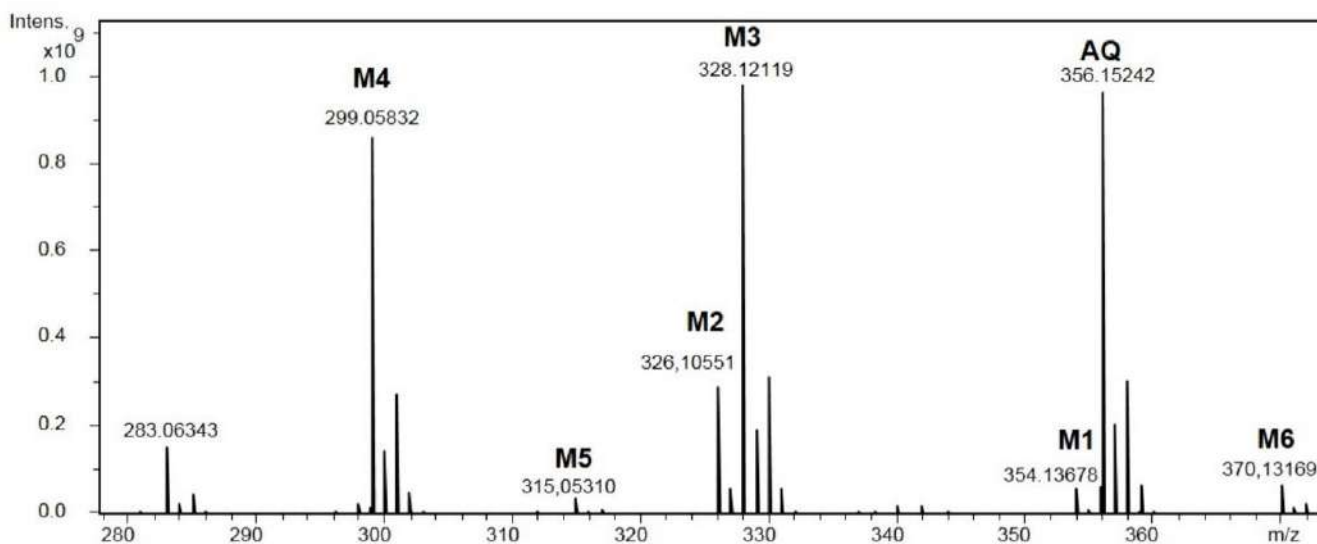
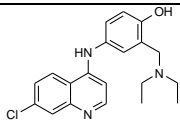
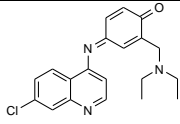
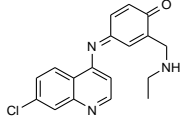
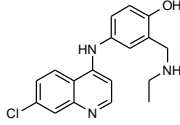
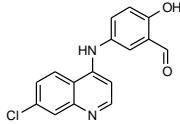
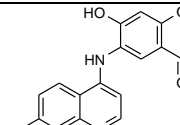
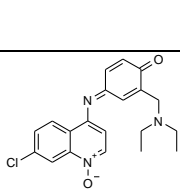


Рисунок 50 – ПАЛДИ-масс-спектр продуктов УФ/TiO₂-ФКО AQ

Сигнал m/z 356,1524 соответствует протонированной молекуле амодиахина. Под воздействием УФ излучения происходит обратимое дегидрирование молекулы амодиахина до соответствующего хинонимина с m/z 354,1367 (M1), который способен образовываться в условиях *in vivo* путем неферментативного окисления амодиахина. Дальнейшее УФ/TiO₂-ФКО приводит к образованию продуктов N-деалкилирования с m/z 326 (M2) и с m/z 328 (M3). M3 является главным стабильным метаболитом, образующимся *in vivo* при окислительной биотрансформации AQ. Продукт окисления с m/z 340, по-видимому, представляет собой окисленную форму M3. Также идентифицирован альдегидный продукт с m/z 299 (M4), описанный ранее в работе и полученный при моделировании метаболизма AQ путем его инкубации с рекомбинантными цитохромами P450 человека и микросомами печени человека и крысы. Сигнал m/z 315 соответствует продукту дополнительного ароматического гидроксирования альдегида, также описанному в работе. Сигнал с m/z 370 наиболее вероятно соответствует продукту N-окисления AQ. Сигнал с m/z 283 соответствует потере молекулы диэтиламина при фрагментации AQ и продукта его окисления M1 в источнике ионов.

Таблица 5 – Идентифицированные продукты окисления AQ

Обозначение	Брутто-формула [M+H] ⁺	m/z теоретическое [M+H] ⁺	Наблюдаемый m/z [M+H] ⁺	Ошибка, ppm	Структура
AQ	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₃ O	356,15241	356,15242	0,02	
M1	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₃ O	354,13676	354,13678	0,05	
M2	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₃ O	326,10546	326,10551	0,15	
M3	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₃ O	328,12111	328,12119	0,24	
M4	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₂ O ₂	299,05818	299,05832	0,46	
M5	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₂ O ₃	315,05309	315,05310	0,3	
M6	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₃ O ₂	370,13168	370,13169	0,02	

3.6 Получение аддуктов с глобином

Ковалентная модификация белков играет важную роль в фармакологической активности широкого спектра лекарственных препаратов. Так, установлено, что образование аддуктов белков с реакционноспособными метаболитами может служить причиной иммуотоксичности лекарственного средства за счет индукции нежелательного иммунного ответа и реакций гиперчувствительности [204]. Определение точной химической природы подобных аддуктов является важным шагом в изучении фармакокинетики ЛС. Из литературных данных известно, что, несмотря на высокую реакционную

способность многих метаболитов ЛС, они способны мигрировать из гепатоцитов в эритроциты, где могут избирательно алкилировать цистеиновый остаток в составе гемоглобина [205]. В качестве модельного белка был выбран глобин человека, который обладает несколькими нуклеофильными центрами, способными связывать алкилирующие агенты. Глобин инкубировали с продуктами ФКО ЛС и анализировали методом МАЛДИ-МС.

3.6.1 Получение аддуктов глобина с продуктами окисления амодиахина

Можно было ожидать, что m/z белка увеличится соответственно количеству и химической природе присоединенных продуктов окисления. На рисунке 51 представлен масс-спектр, на котором наблюдаются сигналы как соответствующие интактным α - и β -субъединицам глобина, так и смещенные в область больших масс, что подтверждает образование ковалентных аддуктов. При этом, соотношение интенсивностей сигналов интактного глобина и образованных аддуктов говорит о практически полной модификации белка, а наличие двух отдельных пиков модифицированной β -субъединицы указывает на возможность модификации по двум сайтам.

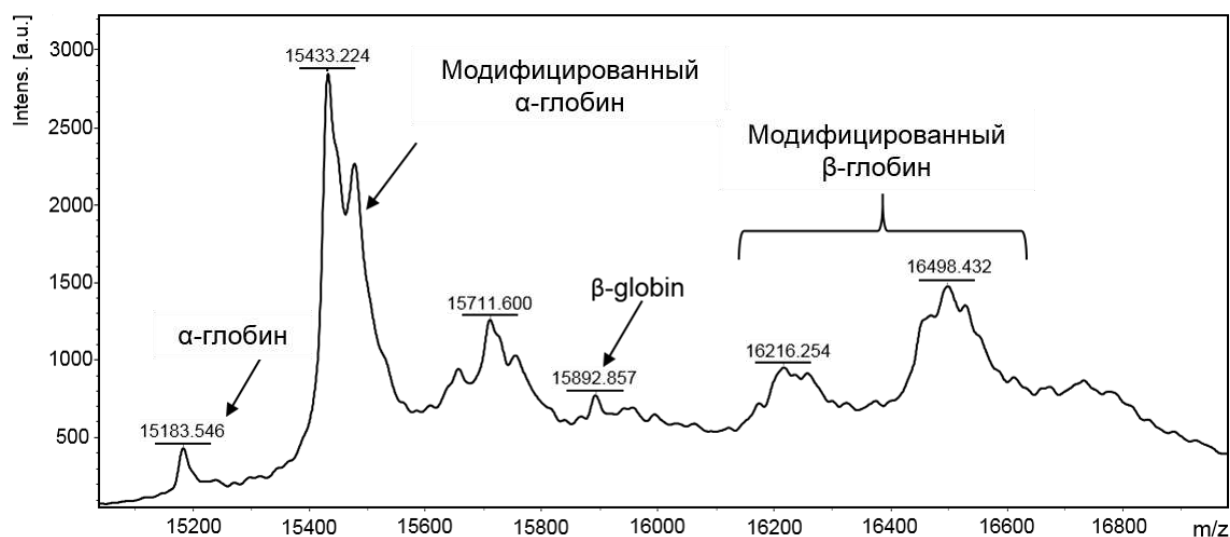


Рисунок 51 – Масс-спектр глобина после инкубации с продуктами окисления амодиахина

Для идентификации аминокислотных остатков, модифицированных продуктами окисления амодиахина, был проведён МАЛДИ-МС анализ триптического гидролизата. Нами был обнаружен ряд сигналов с m/z 1701,5;

1718,4; 1999,9; 2016,1 предположительно принадлежащих модифицированным пептидам GTFATLSELHCDK (m/z 1421,3) и LLGNVLCVLAHHFGK (m/z 1719,6), входящим в состав β -субъединицы глобина и содержащих остатки цистеина в 93 и 112 положениях (β Cys92 и β Cys112), соответственно (рисунок 52). Увеличение значений m/z на 280 и 296 соответствует присоединению хинонимина M1, с учётом нейтральной потери диэтиламина (73 Да), и альдегидного продукта M4, соответственно.

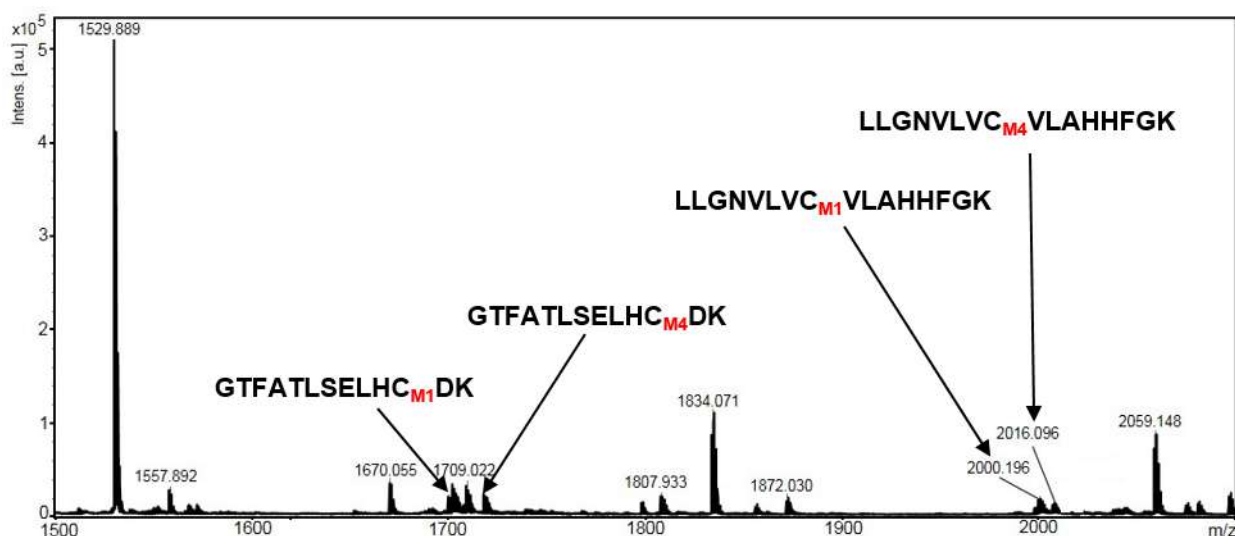


Рисунок 52 – Масс-спектр триптического гидролизата модифицированного глобина

Для каждого идентифицированного аддукта был проведен MS/MS анализ и на основе масс-спектров фрагментных ионов были восстановлены аминокислотные последовательности модифицированных пептидов и определены сайты модификации. На рисунке 53 показан фрагментный масс-спектр пептида LLGNVLCVLAHHFGK, модифицированного M4 (m/z 2016,1). Алкилирование происходит по β Cys112, о чем свидетельствует соответствующая разница между m/z фрагментных ионов y_9 и y_{10} .

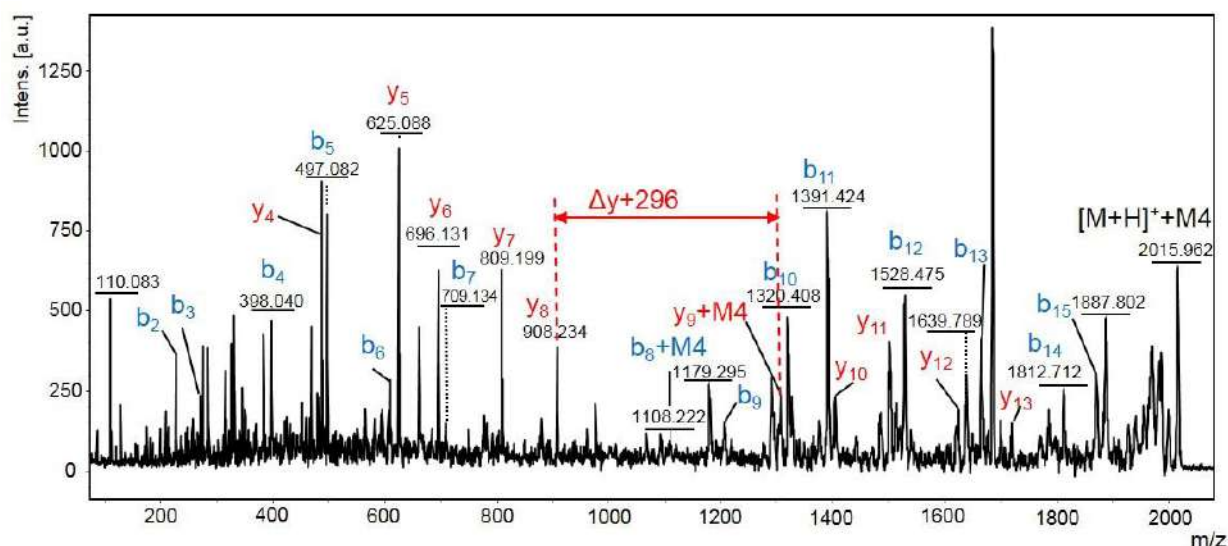


Рисунок 53 – Фрагментный масс-спектр пептида LLGNVLCVLANHFGK модифицированного по Cys112 продуктом окисления M4

Идентифицированные аддукты глобина могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации при терапии АQ.

Полученные результаты свидетельствуют об образовании остатками β Cys93 и β Cys112 ковалентных аддуктов с продуктами окисления АQ. Однако триптический гидролизат модельного белка, ковалентно модифицированного реактивными метаболитами, представляет собой достаточно сложную многокомпонентную смесь, причём содержание целевых пептидных аддуктов может быть достаточно низким. Даже в случае практически полной модификации β -субъединицы глобина человека метаболитами амодиахина в масс-спектре гидролизата сигналы целевых аддуктов обладают низкой интенсивностью. Соответственно, возникла необходимость введения в эксперимент еще одной стадии, позволяющей повысить чувствительность анализа хлорсодержащих аддуктов.

3.7 Металл-аффинная экстракция галогенсодержащих аддуктов глобина человека в формате «лаборатория на мишени»

Функционализация поверхности МАЛДИ-мишени самособирающимися монослоями позволяет придать поверхности новые уникальные свойства, способствующие значительному повышению эффективности масс-спектрометрического анализа [144]. Ранее было продемонстрировано, что

монослои стеаратов металлов (FMe), полученные при самосборке молекул стеариновой кислоты (HSt) на поверхности водной субфазы, содержащей ионы металлов, проявляют свойства металл-аффинного сорбента [206-208]. Кроме того, недавно был предложен подход, позволяющий проводить формирование такой регулярной двумерной структуры непосредственно на твердой подложке, в качестве которой использовали МАЛДИ-мишень (MTP 384 target plate polished steel BC, Bruker Daltonics) [209]. Было показано, что нанесение раствора стеариновой кислоты в гексане на помещенную на твердую подложку каплю водной субфазы, содержащей ионы лантана, приводит к образованию коллапсированного монослоя стеарата лантана (FLa). Полученная структура характеризовалась развитой поверхностью, сформированной из четко выраженных агрегатов стеарата металла со средним диаметром 300 – 400 нм, высоким уровнем адгезии к поверхности, полированной МАЛДИ-мишени, и наличием свойств, соответствующих металл-аффинным сорбентам. Следует отметить, что такая функционализация поверхности предназначена для проведения металл-аффинной хроматографии непосредственно в пределах ячейки мишени (формат «лаборатория на мишени») [144], что позволяет не только в разы снизить затраты на реактивы, сократить время эксперимента, но и заметно повысить выход ионов целевых соединений и, как следствие, чувствительность анализа. Эффективность сорбента в значительной степени зависит от поверхности, доступной для взаимодействия с аналитом. Соответственно, представлялось интересным исследовать формирование мультимолекулярных структур FLa в пределах ячейки МАЛДИ-мишени, изучить морфологию и состав полученного сорбента, и исследовать возможность проведения металл-аффинной хроматографии в формате «лаборатория на мишени».

3.7.1. Исследование состава и морфологии сорбента на основе стеарата лантана

На ячейках МАЛДИ-мишени (внутренний диаметр 3,1 мм) путем нанесения органической фазы на каплю водной субфазы (рисунок 54) были сформированы 1, 2, 4, 6 и 8 слоев FLa, в трех последних случаях водную каплю удаляли и наносили

заново после формирования каждого двух слоев. Во всех экспериментах в качестве водной субфазы использовали раствор LaCl_3 ($C=10^{-2}$ моль/л, pH 3, $V=0,7$ μl), а органической – насыщенный при 20°C раствор HSt в н-гексане ($V=0,7$ μl). Затем сформированные FLa дважды промывали водой и высушивали при 25°C .

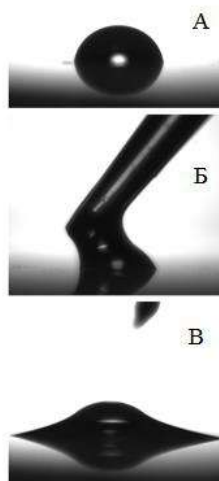


Рисунок 54 – Формирование FMe (Me = металл) на гидрофобной поверхности: А – капля водной субфазы; Б – нанесение раствора стеариновой кислоты в гексане; В – распределение органической фазы по подложке

Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света была исследована морфология полученных структур непосредственно на поверхности подложки. По интенсивности свечения было установлено, что при увеличении количества слоев образуются скопления гетероморфных частиц, при этом наибольшее количество материала остается после промывки при формировании 6 слоев FLa (Рисунок 55А).

По всей видимости, при нанесении большего количества слоев нарушаются взаимодействия между слоями, и часть сформированного материала не удерживается на подложке. Сорбент, полученный непосредственно на МАЛДИ-мишени, обладает характерной структурой. Многократное наслаивание слоя на слой порождает специфичную объемную структуру с надломами поверхности.

При стекании с капли у краев ячейки н-гексан быстро испаряется, что приводит к многократному наплзанию новых частей слоя на предыдущие, их деформации и разрушению. В результате на мишени образуется структура с

периодическими утолщениями и взломами. Результаты, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, свидетельствуют о формировании на мишени материала с достаточно развитой поверхностью (рисунок 55Б), что, соответственно, позволило ожидать от сформированных FLа хорошей сорбционной способности. Для подтверждения состава были получены EDX-спектры с 6 сформированных слоев FLа, которые подтвердили наличие атомов лантана в составе структуры (рисунок 55 В). Структурное звено сорбента определяли методом МАЛДИ-МС. Анализ проводили после нанесения раствора матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота (ДНВ) в 70% водном ацетонитриле, 10 мг/мл, 2 μ l) на сформированные монослои FLа. В масс-спектре был обнаружен сигнал с m/z 705,439 (Рисунок 55 Г), на основании чего был сделан вывод, что основным структурным звеном слоев является $(C_{17}H_{35}COO)_2La^+$. Это полностью согласуется с результатами, полученными ранее [209,210].

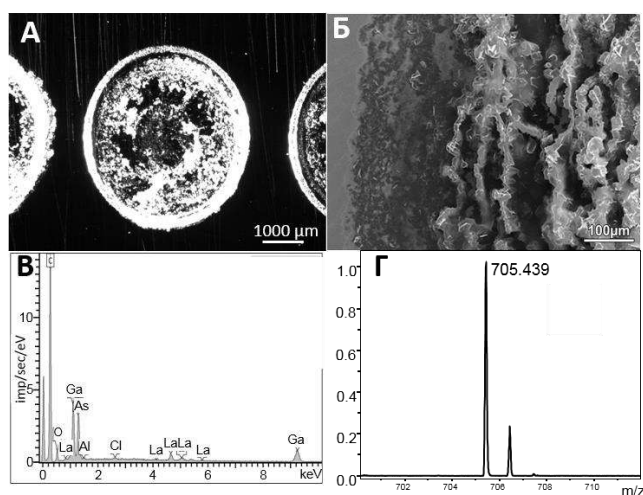


Рисунок 55 – А – изображение 6 слоев FLа, сформированных на МАЛДИ-мишени при увеличении в 10 раз, Б – изображение 6 слоев FLа, сформированных на МАЛДИ-мишени при увеличении в 100 раз, В – EDX-спектр подложки с 6 сформированными FLа, Г – фрагмент МАЛДИ масс-спектра FLа

Последующий фрагментный анализ также подтвердил эту структуру (Рисунок 56). Таким образом, нами была проведена функционализация поверхности МАЛДИ-мишени мультимолекулярными структурами FLа для проведения процедуры металл-аффинной хроматографии в формате «лаборатория на мишени».

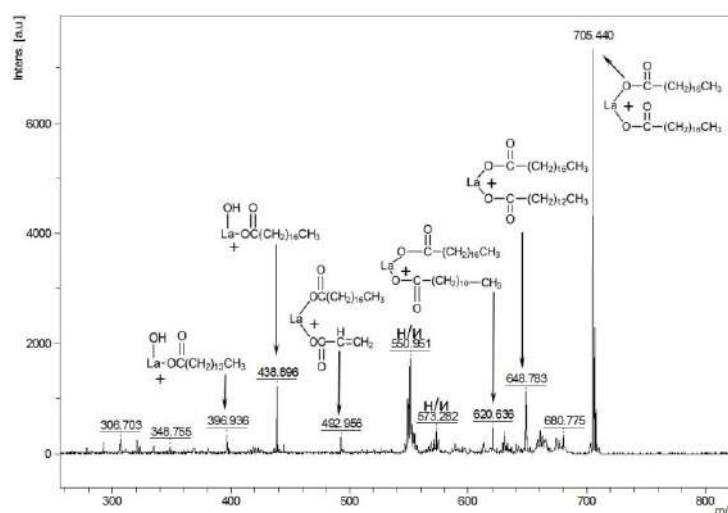


Рисунок 56 - Фрагментный масс-спектр, полученный с FLа

3.7.2 Металл-аффинная экстракция на FLа в формате «лаборатория на мишени»

В качестве объектов исследований были выбран глобин человека, модифицированный модельными хлорсодержащими ксенобиотиками из группы хлорацетамидов, которые являются типичными алкилирующими агентами (рисунок 57): *N*1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид (Cl-1), *N*1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамид (Cl-2).

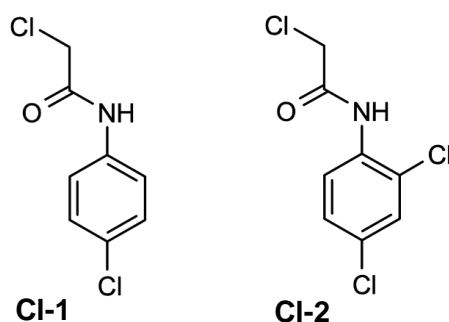


Рисунок 57 – Структуры алкилирующих агентов: *N*1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид (Cl-1) и *N*1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамид (Cl-2)

Выбранные модельные соединения из группы хлорацетамидов являются типичными алкилирующими агентами. Структурное звено представленных хлорсодержащих соединений, состоящее из бензольного кольца и атомов хлора, часто встречается также в различных лекарственных средствах.

Реакция проходит по механизму нуклеофильного замещения по атомам серы цистеиновых фрагментов, в результате чего образуются соответствующие S-алкилпроизводные. Схема реакции изображена на рисунке 58.

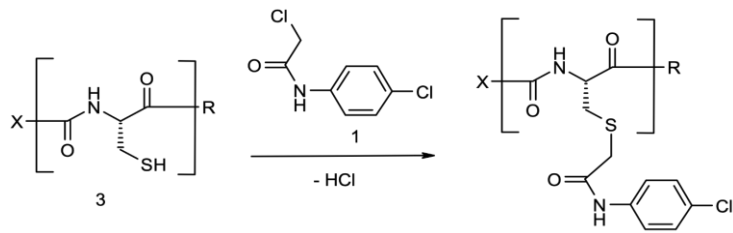


Рисунок 58 – Реакция алкилирования белка агентом Cl-1

Был проведён МАЛДИ-МС анализ полноразмерных белков после проведения инкубации с Cl-1 и Cl-2 в соотношении 10 мкг алкилирующего агента на 1 мг белка. Как видно на спектрах глобина (рисунок 59) модификация α и β -субъединиц прошла не полностью. Можно заметить, что в α -субъединице наблюдается один сдвиг по значению m/z на дельту, равную 167 и 201 (что соответствует массам присоединенных фрагментов Cl-1 и Cl-2 соответственно), а в β -субъединице – два сдвига, что объясняется числом цистеинов в молекуле белка (α Cys104, β Cys93 и β Cys112).

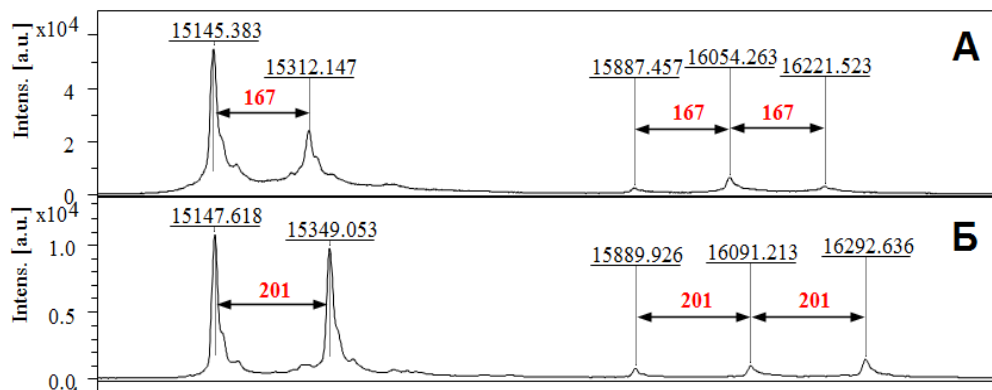


Рисунок 59 – Линейные МАЛДИ масс-спектры полноразмерных α и β субъединиц глобина человека после инкубации с алкилирующими агентами при соотношении ксенобиотик/белок = 10 мкг/1 мг: А — Cl-1; Б — Cl-2

После проведения МАЛДИ-МС анализа триптического гидролизата глобина были идентифицированы четыре аддукта глобина человека с Cl-1 и Cl-2 (рисунок 60, Приложение В), представленные в таблице 6.

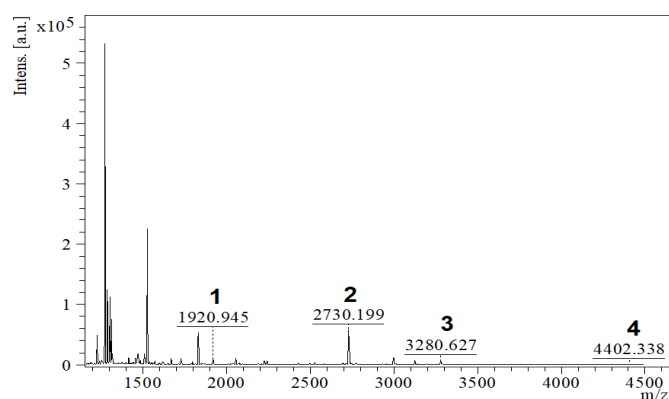


Рисунок 60 – МАЛДИ масс-спектр триптического гидролизата глобина человека, модифицированного С1-2 в соотношении 100 мкг ксенобиотика на 1 мг белка. Номера сигналов соответствуют номерам аддуктов, представленным в таблице 6

Таблица 6 – Обнаруженные цистеинсодержащие аддукты глобина человека с С1-1 и С1-2

№ п/п	С _x	m/z нативного пептида	m/z пептида, модифицированного С1-1	m/z пептида, модифицированного С1-2	Аминокислотная последовательность/ pI	Субъединица глобина
1	112	1719,97	1886,986	1921,10	LLGNVLVC ₁₁₂ VLANHFGK 8,84	бета
2	93	2529,21	2696,232	2730,31	GTFATLSELHC ₉₃ DKLHVD PENFR 5,17	бета
3	112	3079,65	3246,654	3280,75	LLGNVLVC ₁₁₂ VLANHFGKE F TPPVQAAYQK 8,76	бета
4	104	4201,31	4368,322	4402,41	LLSHC ₁₀₄ LLVTLAAHLPAEF TPAVHASLDKFLASVSTVL TSK 7,34	альфа

Чтобы оценить чувствительность металл-аффинной экстракции на сорбентах FL_a, полученных непосредственно на МАЛДИ-мишени, были приготовлены растворы глобина человека с соотношением ксенобиотик (С1-1, С1-2)/белок: 10 мкг/1 мг, 1 мкг/1 мг, 100 нг/1 мг, 10 нг/1 мг, 1 нг/1 мг в 1 мл образца. Для глобина оценивали количество сигналов четырех интересующих аддуктов и

их интенсивность после проведения металл-аффинной хроматографии. Минимальное соотношение сигнал/шум (S/N), по которому можно судить о результате, составляет 3.

В процессе исследования было установлено, что к пептиду LLGNVLVC₁₁₂VLANHFGK β-субъединицы глобина чувствительность гораздо выше, чем к остальным, вследствие чего данный пептид был выбран как маркерный. В таблице 7 представлены обнаруженные модифицированные пептиды и пределы их обнаружения (Приложение В).

Таблица 7 – Пределы обнаружения галогенсодержащих аддуктов белков крови

№	Аминокислотная последовательность/pI (субъединица глобина)	Алкилирующий агент	m/z [M+H] ⁺	Предел обнаружения	
				Концентрация алкилирующего агента	Мольное соотношение алкилирующего агента и белка
Глобин человека					
1	LLGNVLVC ₁₁₂ VLANHFGK	Cl-1	1886,986	1 нг/мл	1:12000
	8,84 (бета)	Cl-2	1920,947	10 нг/мл	1:1500
2	GTFATLSELHC ₉₃ DKLHVDPENFR	Cl-1	2696,232	1 мкг/мл	1:12
	5,17 (бета)	Cl-2	2730,193	1 мкг/мл	1:15
3	LLSHC ₁₀₄ LLVTLAANLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSK (альфа)	Cl-1	4368,322	10 мкг/мл	1:1,2
	7,34	Cl-2	4402,284	10 мкг/мл	1:1,5

Проведение металл-аффинной экстракции согласно разработанной методике позволяет значительно увеличить интенсивность целевых сигналов хлорсодержащих аддуктов. Для аддукта глобина, модифицированного Cl-1, в случае концентрации алкилирующего агента 10 нг/мл и 1 нг/мл сигнал маркерного пептида LLGNVLVC_{Cl-1}VLANHFGK до проведения экстракции на

спектрах отсутствовал, после же удавалось получить четкий сигнал, таким образом предел обнаружения данного пептида был достигнут при соотношении 1 моль алкилирующего агента к 12000 моль глобина (рисунок 61). Для аддукта этого пептида с Cl-2 предельное соотношение составило 1:1500 (рисунок 62). Стоит отметить, что детектирование соотношения модифицированной формы к немодифицированной, равное 1:1000 уже считается хорошим результатом металл-аффинной экстракции [211].

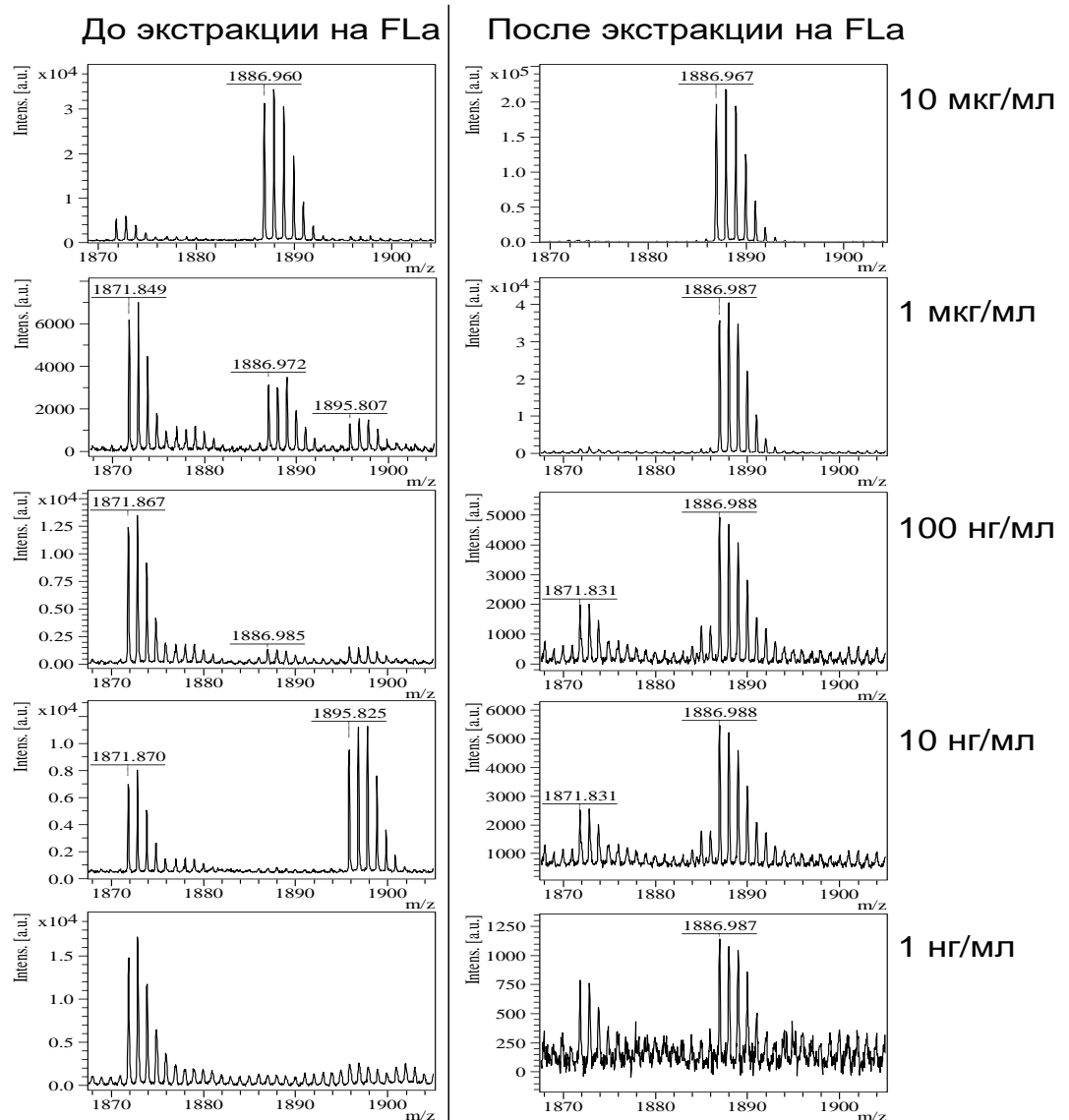


Рисунок 61 – Сигнал, соответствующий аддукту $\text{LLGNVLVC}_{\text{Cl-1}}\text{VLANHFGK}$ в МАЛДИ масс-спектре до и после металл-аффинной экстракции на FLa при различной концентрации алкилирующего агента при инкубации

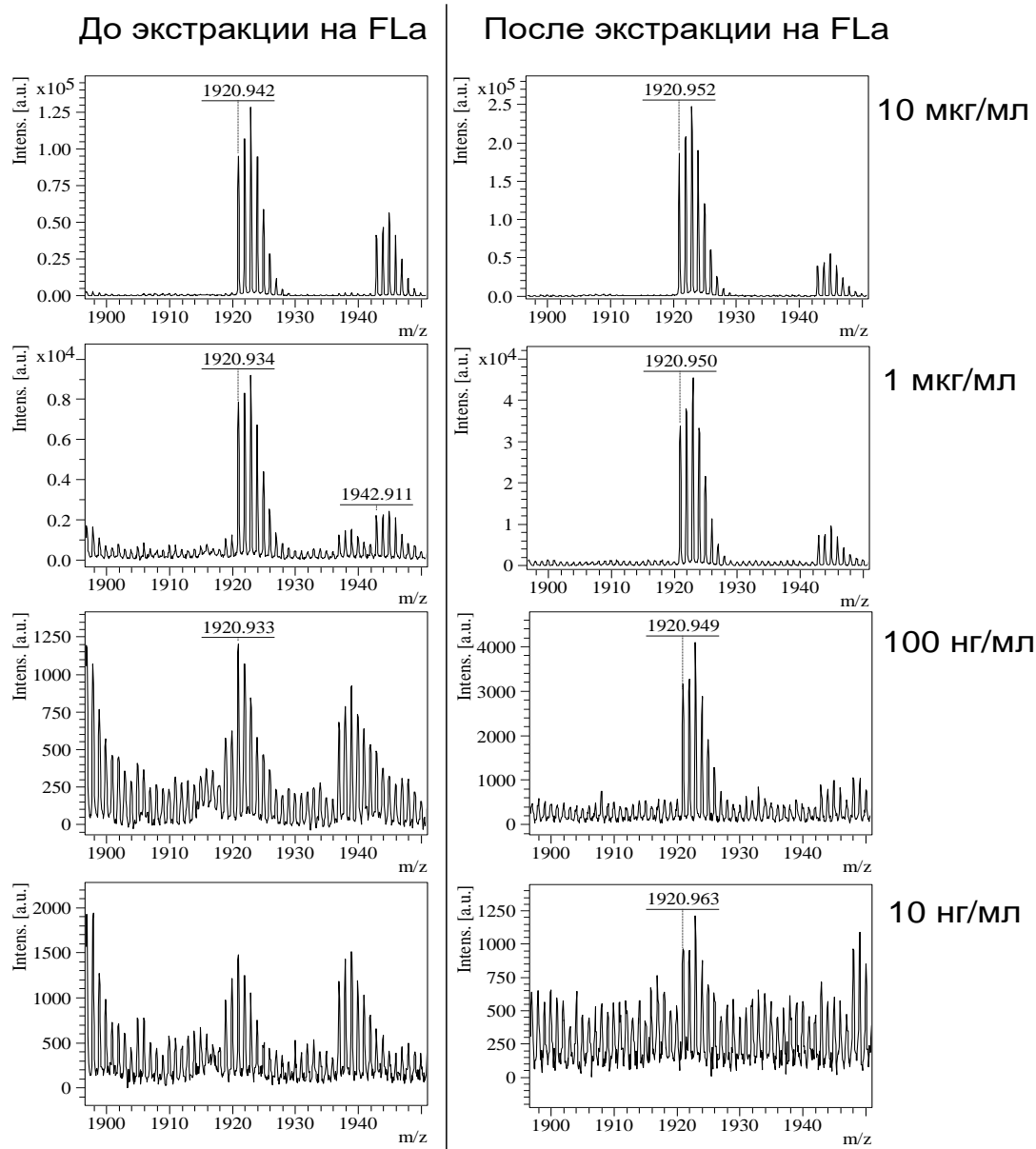


Рисунок 62 – Сигнал, соответствующий аддукту LLGNVLVC_{C1-2}VLANHFGK в МАЛДИ масс-спектре до и после металл-аффинной экстракции на FLa при различной концентрации алкилирующего агента при инкубации

3.7.3 Интеграция стадии металл-аффинной экстракции с устройством РСμR96

На завершающем этапе исследования стадия металл-аффинной экстракции была введена в процедуру пробоподготовки в формате «лаборатории на мишени» при использовании устройства РСμR96. Перед установкой микрореакторной насадки поверхность МАЛДИ-мишени была функционализирована 3

коллапсированными монослоями FLа и для сравнения распространенным металл-аффинным сорбентом нанопорошком TiO₂. С использованием РСμR96 были последовательно проведены все стадии моделирования окислительной биотрансформации и пробоподготовка, включая металл-аффинную экстракцию, на примере амодиахина и глобина человека.

Нами были получены продукты окисления AQ (таблица 5), и проведена модификация глобина человека. Объектом исследования стал пептид LLGNVLVC₁₁₂VLANHFGK, образующийся в результате триптического гидролиза β-субъединицы глобина человека. Формирование сорбента и подготовку образца для анализа проводили согласно последовательности действий, представленной в таблице 8.

Результаты МАЛДИ-МС анализа продемонстрированы на рисунке 63 А - В. На МАЛДИ масс-спектре, полученном до проведения металл-аффинной хроматографии (MAX) (Рисунок 63А) сигналы целевых пептидов (m/z 1999,971; 2015,943) имеют низкую интенсивность. При этом на масс-спектре после MAX на TiO₂ (Рисунок 63Б) присутствует ряд интенсивных сигналов, принадлежащих нецелевым пептидам глобина человека, в то время как сигнал одного из целевых пептидов на масс-спектре отсутствует (m/z 1999,971). На рисунке 63В, представлен МАЛДИ масс-спектр после проведения MAX на FLа. Как показано на рисунке в диапазоне m/z, соответствующему пептиду LLGNVLVC₁₁₂VLANHFGK (m/z 1719,634), модифицированному продуктами окисления AQ присутствует ряд интенсивных сигналов с m/z 1999,971; 2015,943; 2037,977, два из которых по результатам фрагментного анализа были идентифицированы, как аддукты LLGNVLVC₁₁₂VLANHFGK с M1 и M4 (Таблица 9, Рисунок 63В, Приложение В). На основании чего можно сделать вывод, что FLа проявляет более высокие специфичные свойства чем TiO₂. А практически полное отсутствие в масс-спектре с FLа сигналов неспецифично связанных пептидов свидетельствует о высокой селективности данного сорбента.

Таблица 8 – Последовательность подготовки сорбента и образца для МАЛДИ-МС анализа в формате «лаборатория на мишени» с использованием РСμR96. Синим цветом отмечены блоки, посвященные формированию сорбента на ячейке МАЛДИ-мишени, коричневым – процедуре металл-аффинной экстракции, зеленым – МАЛДИ-МС

№	Наименование этапа	№	Наименование этапа
1	НАНЕСЕНИЕ ВОДНОЙ СУБФАЗЫ На ячейку нанести 0,7 μl водного раствора нитрата лантана (III) с концентрацией 10 ⁻² М/л (субфаза)	8	ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ В лунку микрореактора, добавить 150 мкл водного раствора амодиахина (1 мкг/мл). Далее на микрореактор установить светодиодный модуль с охлаждающим термоблоком, поместить собранное устройство в шейкер-инкубатор и проводить ФКО в течение 20 мин при постоянном перемешивании
2	НАНЕСЕНИЕ РАСТВОРА СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ГЕКСАНЕ На поверхность субфазы трижды нанести 0,7 μl насыщенного раствора (20 °С) стеариновой кислоты в гексане	9	ПОЛУЧЕНИЕ КОВАЛЕНТНЫХ АДДУКТОВ По окончании ФКО амодиахина в лунки, содержащие продукты окисления, добавить 5 мкл водного раствора глобина человека (1 мг/мл). Далее микрореактор накрыть силиконовым листом и выдержать в течение 60 мин при температуре 37°С в шейкере-инкубаторе. Далее удалить силиконовый лист и греть микрореактор при 40 °С до полного испарения растворителя
3	УДАЛЕНИЕ ОСТАТКОВ СУБФАЗЫ Остатки водного раствора удалить	10	ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ В лунки, содержащие модифицированный глобин, добавить 150 мкл раствора трипсина (30 мкг/мл) в 25мМ NH ₄ HCO ₃ (рН 8,5). Микрореактор накрыть силиконовым листом и инкубировать в течение ночи при температуре 37°С в шейкере инкубаторе. Удалить силиконовый лист и греть 96-луночный микрореактор при 60 °С до полного испарения растворителя
4	ВЫСУШИВАНИЕ СОРБЕНТА Мишень выдержать при комнатной температуре в течение 2 минут	11	УДАЛЕНИЕ НЕСВЯЗАННОЙ ФРАКЦИИ Несвязавшуюся фракцию с поверхности сорбента собрать и при необходимости анализа перенести в свободную ячейку, добавить раствор матрицы СНСА (5 мг/мл в 70% водном ацетонитриле с 0,1% ТФУ)
5	ПРОМЫВКА СОРБЕНТА На поверхность слоев нанести 7 μl дистиллированной воды, выдерживать 1 минуту, каплю удалить. Повторить процедуру еще раз	12	ПРОМЫВКА СОРБЕНТА На сорбент нанести 7 μl буфера для сорбции, выдерживать 1 минуту, каплю удалить. На сорбент нанести 7 μl дистиллированной воды, выдерживать 1 минуту, каплю удалить
6	ВЫСУШИВАНИЕ СОРБЕНТА Мишень выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут	13	ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ На сорбент нанести 3 μl 30% водного раствора ацетонитрила с 0,1% ТФУ и 2 μl раствора матрицы СНСА (5 мг/мл в 70% водном ацетонитриле с 0,1% ТФУ). Высушивать при комнатной температуре в течение 20 минут
7	УСТАНОВКА МИКРОРЕАКТОРНОЙ НАСАДКИ НА МАЛДИ-МИШЕНЬ μRD обратимо закрепляется на МАЛДИ-мишени с помощью перфорированной прокладки	14	МАЛДИ-МС анализ

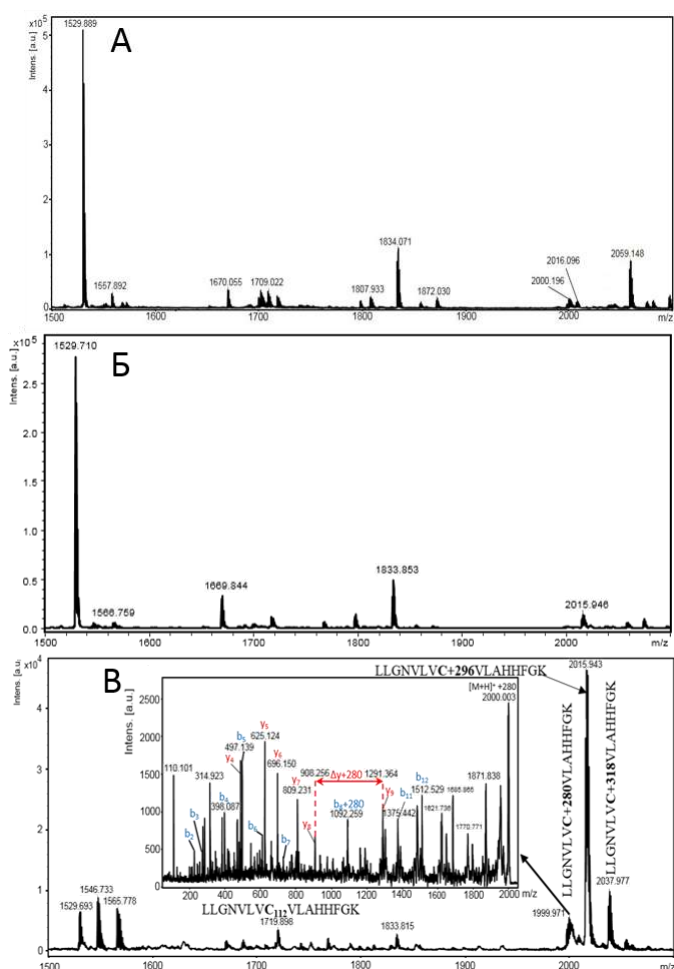


Рисунок 63 – МАЛДИ-МС спектры триптического гидролизата глобина человека, модифицированного продуктами окисления амодиахина: А – до проведения металл-афинной хроматографии; Б – после проведения металл-афинной хроматографии на TiO_2 ; В – после проведения металл-афинной хроматографии на FLa (показан пептид β -субъединицы глобина LLGNVLVCVLAHHFGK, модифицированный продуктом окисления AQ M1, M4 и M7). Во врезке – фрагментный масс-спектр пептида LLGNVLVCVLAHHFGK, модифицированного M1 по $\beta\text{Cys}112$ (m/z 1999,971)

Стоит отметить, что в масс-спектре этого же образца до металл-афинной экстракции на FLa сигнал с m/z 2037,977 отсутствует (Рисунок 63А). Тем не менее, это соединение было идентифицировано программой Mascot с достаточным уровнем достоверности, как пептид LLGNVLVCVLAHHFGK, содержащий модификацию по $\beta\text{Cys}112$. $\Delta 318$ Да может соответствовать структуре с предположительной брутто формулой $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_3$ (Приложение В).

Таблица 9 – Идентифицированные продукты окисления AQ, образующие аддукты с глобином человека

Обозначение	Брутто-формула [M+H] ⁺	m/z ПО [M+H] ⁺	m/z аддукта [M+H] ⁺	Разница масс, Да	Mascot score
AQ	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₃ O	356,15242	-	-	-
M1	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₃ O	354,13678	1999,971	280 (с учетом нейтральной потери диэтиламина 73 Да)	86
M4	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₂ O ₂	299,05832	2015,943	296	66
M7	-	-	2037,977	318	47

Таким образом, показана возможность функционализации поверхности МАЛДИ-мишени мультимолекулярными структурами на основе самособирающихся монослоев стеарата лантана. Показано, что сформированные непосредственно на поверхности мишени структуры обладают развитой поверхностью и могут быть использованы для металл-аффинной экстракции белковых аддуктов с хлорсодержащими соединениями при проведении эксперимента в формате «лаборатория на мишени», проявляя высокий уровень специфичных и селективных свойств, и обеспечивая высокий выход ионов целевых аддуктов. Введение стадии металл-аффинной хроматографии как дополнительного этапа пробоподготовки при использовании РСμR96 позволяет значительно расширить функциональные возможности предложенного подхода.

3.8 Заключение

В ходе работы была разработана и изготовлена экспериментальная установка с 96-луночным УФ/TiO₂-фотокаталитическим микрореактором на основе МАЛДИ-мишени, реализующая принцип «лаборатория на мишени» за счет интеграции всех стадий пробоподготовки при моделировании биотрансформации ксенобиотиков. Описанная установка позволяет последовательно осуществлять в микрореакторе ФКО ксенобиотиков, получение аддуктов белков с продуктами ФКО, ферментативный гидролиз модифицированных белков, концентрирование образцов и, при необходимости, специфичную экстракцию аддуктов белков с галогенсодержащими ксенобиотиками на МАЛДИ-мишени для последующей идентификации целевых продуктов путём ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа. Использование установки в сочетании с ЛДИ-МС высокого разрешения позволило получить и идентифицировать продукты ФКО амодиахина и их аддукты с глобином человека. Значительное увеличение производительности анализа и возможность параллельного моделирования биотрансформации ксенобиотиков при минимальных расходах реагентов являются ключевыми преимуществами предложенного подхода, что особенно важно при доклинических исследованиях новых ЛС.

4 Основные результаты и выводы

1. Разработано и изготовлено микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующую пробоподготовку в рамках одной высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени в формате «лаборатория на мишени». С использованием разработанного устройства были получены и идентифицированы продукты окисления амодиахина и их аддукты с глобином человека (по остаткам α Cys104, β Cys93 и β Cys112), которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации.

2. Разработан простой, быстрый и высокопроизводительный подход для моделирования окислительного метаболизма, основанный на проведении УФ/TiO₂-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим масс-спектрометрическим анализом. Установлено, что УФ/TiO₂-ФКО является более предпочтительным методом моделирования окислительного метаболизма диклофенака, чем ЭХО.

3. Выявлено, что ЭФО наночастиц TiO₂ на подложку из нержавеющей стали с последующей модификацией осажденного слоя ПДМС позволяет получать высококачественное композитное покрытие с двойственной функциональностью, которое может быть использовано в качестве фотокатализатора при УФ/TiO₂-ФКО и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС.

4. Разработаны способ получения мультимолекулярных структур на основе коллапсированных монослоев стеарата лантана (FLa), обладающих свойствами металл-аффинных сорбентов, и процедура для специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов из многокомпонентных образцов непосредственно на МАЛДИ-мишени. Продемонстрировано, что сорбент на основе FLa обладает развитой поверхностью и механической стабильностью. Селективное обогащение образцов целевыми хлорсодержащими аналитами значительно повышает чувствительность МС анализа. Металл-аффинная экстракция хлорсодержащих аддуктов может быть успешно введена в качестве дополнительного этапа пробоподготовки при использовании разработанного РСμR96.

5. Ключевыми преимуществами предложенного подхода являются значительное увеличение производительности анализа, возможность параллельного моделирования биотрансформации множества различных ксенобиотиков, а также возможность синтеза стандартных образцов метаболитов ЛС при минимальных расходах реагентов.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность всем, кто способствовал выполнению данной работы, принимал участие в обсуждении результатов и оформлении статей. Автор благодарит своих научных руководителей – к.х.н. Е.П. Подольскую и к.б.н. В.Н. Бабакова за общее руководство и курирование работы на всех ее этапах, проверку и обсуждение результатов. Автор выражает благодарность д.м.н. Радилову А.С., Краснову Н.В., Краснову К.А., Бардину А.А., Гладчук А.С за помощь на отдельных этапах работы, ресурсным центрам «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Геомодель» Научного парка СПбГУ, а также Томилину Н.В. за помощь с оптической микроскопией, Шиловских В.В. за помощь со сканирующей электронной микроскопией и Селютину А.А. за возможность работы с МАЛДИ масс-спектрометрическим оборудованием.

Список сокращений

ЛДИ – лазерная десорбция/ионизация

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

ЛС – лекарственные средства

ЭХО – электрохимическое окисление

УФ/TiO₂-ФКО – УФ-индуцированное фотокаталитическое окисление в присутствии наночастиц диоксида титана

ПАЛДИ – поверхностно-активированная лазерная десорбция-ионизация

ФКО – фотокаталитическое окисление

РСμR96 – луночный УФ/TiO₂-фотокаталитический микрореактор

ДФ – диклофенак

Fla – коллапсированный монослой стеарата лантана

ВЭЖХ/ИЭР-МС – высоко эффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением

ДЕСИ – Десорбционная электрораспылительная ионизация

ЭФО – электрофоретическое осаждение

ПДМС – полидиметилсилоксан

ВЭЖХ/МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия

МС-ИЦР ПФ – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

МАЛДИ-ВП-МС/МС – тандемный МАЛДИ масс-спектрометр с времяпролетным анализатором

μRD – микрореакторное устройство с 96 функционализированными TiO₂/ПДМС коническими отверстиями

μRC96 – 96-луночный микрореактор/концентратор

AQ – амодиахин

CHCA – α-цианогидроксикоричная кислота

2,5-DHB – Дигидроксибензойная кислота

SA – синапиновая кислота

ТФУ – трифторуксусная кислота

ОН-ДФ – моногидроксилированные метаболиты диклофенака

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

АСМ – атомно-силовая микроскопия

СММ – средняя молекулярная масса

FMe – монослой стеаратов металлов

HSt – стеариновая кислота

Cl-1 – N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид

Cl-2 – N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамид

МАХ – металл-афинная хроматография

Список литературы

1. Patterson, A.D. Xenobiotic Metabolism: A View through the Metabolometer / A.D. Patterson, F.J. Gonzalez, J.R. Idle // *Chemical Research in Toxicology*. – 2010. – V.23. – N.2. – P. 851–860.
2. Граник, В.Г. Метаболизм экзогенных соединений. Лекарственные средства и другие ксенобиотики. Монография / В.Г. Граник. – М.: Вузовская книга, 2006. – 7 С.
3. Gomez-Lechon, M.J. *In vitro* evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs / M.J. Gomez-Lechon, A. Lahoz, L. Gombau, J.V. Castell, M.T. Donato // *Current Pharmaceutical Design*. – 2010. – V.16. – P. 1963–1977.
4. Yuan, L. Mechanisms of drug-induced liver injury / L. Yuan, N. Kaplowitz // *Clinical Liver Disease*. – 2013. – V.17. – P. 507–518.
5. Pessayre, D. Cytochromes P450 and formation of reactive metabolites. Role in hepatotoxicity of drugs / D. Pessayre // *Therapie*. – 1993. – V.48. – P. 537–548.
6. Serras, A.S. A Critical Perspective on 3D Liver Models for Drug Metabolism and Toxicology Studies / A.S. Serras, J.S. Rodrigues, M. Cipriano, A.V. Rodrigues, N.G. Oliveira, J.P. Miranda // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V.9. – P. 1 – 30.
7. Preissner, S. Personalized cancer therapy considering cytochrome P450 variability / S. Preissner, M. Simmaco, G. Gentile, R. Preissner // *Advances in Pharmacology*. – 2015. – V.74. – P. 113–130.
8. Di Stefano, A. L-dopa prodrugs: an overview of trends for improving parkinsons disease treatment / A. Di Stefano, P. Sozio, L. Serafina Cerasa, A. Iannitelli // *Current Pharmaceutical Design*. – 2011. – V.17. – P. 3482–3493.
9. Hinson, J.A. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis / J.A. Hinson, D.W. Roberts, L.P. James // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2010. – V.196. – P. 396–405.
10. Sidenius, U. *In vitro* reactivity of carboxylic acid-CoA thioesters with glutathione / U. Sidenius, C. Skonberg, J. Olsen, S.H. Hansen // *Chemical Research in Toxicology*. – 2004. – V.17. – P. 75–81.

11. Skonberg, C. Metabolic activation of carboxylic acids. Expert Opin / C. Skonberg, J. Olsen, K.G. Madsen, S.H. Hansen, M.P. Grillo // Journal of Drug Metabolism & Toxicology. – 2008. – V.4. – P. 425–438.
12. Conney, A.H. In memoriam: James A. Miller (1915-2000) / A.H. Conney // Journal of Cancer Research. – 2001. – V. 61. – P. 3847–8.
13. Attia, S.M. Deleterious Effects of Reactive Metabolites / S.M. Attia // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2010. – V.3. – N.4. – P. 238–253.
14. Utrecht, J. Idiosyncratic drug reactions: current understanding / J. Utrecht // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2007. – V.47. – P. 513 – 39.
15. Ikehata, K. Protein targets of reactive metabolites of thiobenzamide in rat liver *in vivo* / K. Ikehata, T.G. Duzhak, N.A. Galeva, T. Ji, Y.M Koen, R.P. Hanzlik // Chemical Research in Toxicology. – 2008. – V.21. – P. 1432 – 42.
16. Amacher, D.E. Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: the toxicology perspective / D.E. Amacher // Current Drug Metabolism. – 2006. – V.7. – P. 219 – 29.
17. Wells, P.G. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer / P.G. Wells, G.P. McCallum, C.S. Chen, J.T. Henderson, C.J Lee, J. Perstin // Toxicological Sciences. – 2009. – V.108. – P. 4 – 18.
18. Wells, P.G. Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis / P.G. Wells, C.J. Lee, G.P. McCallum, Perstin J, Harper PA. // Handbook of Experimental Pharmacology. – 2010. – V.196. – P. 131 – 62.
19. Skipper, P.L. Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again / P.L. Skipper, M.Y. Kim, H.L. Sun, G.N. Wogan // Carcinogenesis. – 2010. – V.31. – P.50–8.
20. Pelkonen, O. Prediction of drug metabolism and interaction on the basis of *in vitro* investigations / O. Pelkonen, M. Turpeinen, H. Raunio // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2005. – V.96. – P. 16 – 175.

21. Brandon, E.F.A. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons / E.F.A. Brandon, C.D. Raap, J.H.A. Schellens // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2003. – V.189. – P. 233 – 46.
22. Rodrigues, A.D. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. Attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes / A.D. Rodrigues // *Biochemical Pharmacology*. – 1999. – V.57. – P. 465 – 80.
23. Gomez-Lechon, M.J. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism / M.J. Gomez-Lechon, M.T. Donato, J.V. Castell, R. Jover // *Current Drug Metabolism*. – 2003. – V.4. – P. 292 – 312.
24. Dash, A. Tannenbaum SR. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety / A. Dash, W. Inman, K. Hoffmaster // *Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology*. – 2009. – V.5. – P. 1159 – 74.
25. Munos, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation / B. Munos // *Nature Rev Drug Discovery*. – 2009. – V.8. – P. 959–68.
26. Grossmann, S.J. Overview: drug metabolism in the modern pharmaceutical industry / S.J. Grossmann // *Drug metabolism in drug design and development*. Hoboken, Wiley & Sons, Inc., New Jersey. – 2007. – P. 3 – 13.
27. Dalvie, D. Recent advances in the application of radioisotopes in drug metabolism, toxicology and pharmacokinetics / D. Dalvie // *Current Pharmaceutical Design*. – 2000. – V.6. – P. 1561 – 3.
28. Marathe, P.H. The use of radiolabeled compounds for ADME studies in discovery and exploratory development / P.H. Marathe, W.C. Shyu, W.G. Humphreys // *Current Pharmaceutical Design*. – 2004. – V.10. – P. 2991 – 3008.
29. Ma, S. Application of mass spectrometry for metabolite identification / S. Ma, S.K. Chowdhury, K.B. Alton // *Current Drug Metabolism*. – 2006. – V.7. – P. 503 – 23.
30. Ma, S. Application of liquid chromatography/mass spectrometry for metabolite identification / S. Ma, S.K. Chowdhury // In: D. Zhang, M. Zhu, W.G.

Humphreys. Drug metabolism in drug design and development. Hoboken, Wiley & Sons, Inc., New Jersey. – 2007. – P. 319–59.

31. Betz, M. Biomolecular NMR: a chaperone to drug discovery / M. Betz, K. Saxena, H. Schwalbe // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2006. – V.10. – N.3. – P. 219 – 25.

32. Rousu, T. Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labelled trapping agents and ultra-performance liquid Chromatography/time-of-flight mass spectrometry / T. Rousu, O. Pelkonen, A. Tolonen // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2009. – V.23. – P. 843 – 55.

33. Prakash, C. In vitro screening techniques for reactive metabolites for minimizing bioactivation potential in drug discovery / C. Prakash, R. Sharma, M. Gleave // *Current Drug Metabolism*. – 2008. – V.9. – P. 952–64.

34. Afzelius, L. State-of-the-art tool for computational site of metabolism predictions: comparative analysis, mechanistical insights and future applications / L. Afzelius, C. Hasselgren, L. Weidolf // *Drug Metabolism Reviews*. – 2007. – V.39. – P. 61 – 86.

35. Czodrowski, P. Computational approaches to predict drug metabolism. *Expert Opin* / P. Czodrowski, J.M. Kriegl, S. Scheuerer // *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*. – 2009. – V.5. – P. 15 – 27.

36. Hutter, M.C. In silico prediction of drug properties / M.C. Hutter // *Current Medicinal Chemistry*. – 2009. – V.16. – P. 189 – 202.

37. Testa, B. Predicting drug metabolism – an evaluation of the expert system METEOR / B. Testa, A-L. Balamt, A. Long, P. Judson // *Chemistry & Biodiversity*. – 2005. – V.2. – P. 872 – 85.

38. Erhardt, P.W. A human drug metabolism database: potential roles in the quantitative prediction of drug metabolism and metabolism-related drug-drug interactions / P.W. Erhardt // *Current Drug Metabolism*. – 2003. – V.4. – P. 411 – 22.

39. Lewis, D.F. Humans P450s in the metabolism of drugs: molecular modelling of enzyme stubstrate interactions / D.F. Lewis // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2005. – V.1. – P. 5–8.

40. Lewis, D.F. Investigating human P450s involved in drug metabolism via homology with high-resolution P450 crystal structures of the CYP2C superfamily / D.F. Lewis, Y. Ito, P.S. Goldfrab // *Current Drug Metabolism*. – 2006. – V.7. – P. 589 – 98.
41. Shono, T. Preparation of N-dealkylated drug metabolites by electrochemical simulation of biotransformation / T. Shono, T. Toda, N. Oshino // *Drug Metabolism & Disposition*. – 1998. – V.9. – P. 481 – 2.
42. Hambitzer, G. Electrochemical thermospray mass spectrometry / G. Hambitzer, J. Heitbaum // *Analytical Chemistry*. – 1986. – V.58. – P. 1067 – 70.
43. Iwahashi, H. Detection of the oxidative products of 3-hydroxykynurenine using high-performance liquid chromatography electrochemical detection ultraviolet absorption detection electron spin resonance spectrometry and high-performance liquid chromatography electrochemical detection ultraviolet absorption detection mass spectrometry / H. Iwahashi, T. Ishii // *Journal of Chromatography A*. – 1997. – V.773. – P. 23 – 31.
44. Johansson, T. Mimicry of phase I drug metabolism - novel methods for metabolite characterization and synthesis / T. Johansson, L. Weidolf, U. Jurva // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2007. – V.21. – P. 2323 – 31.
45. Regino, M. An electrochemical cell for on-line electrochemistry/mass spectrometry / M. Regino, A. Brajter-Toth // *Analytical Chemistry*. – 1997. – V.69. – P. 5067 – 972.
46. Lohmann, W. Simulation of the detoxification of paracetamol using on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry / W. Lohmann, U. Karst // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2006. – V.386. – P. 1701 – 8.
47. Tahara, K. On-line liquid chromatography and circular dichroism detection of stereo-isomers of alpha-tocopherol derivatives generated by an electrochemical reaction / K. Tahara, E. Makii, S. Iijima // *Analytical Sciences*. – 2008. – V.24. – P. 935 – 8.
48. Jurva, U. Electrochemically assisted Fenton reaction: reaction of hydroxyl radicals with xenobiotics followed by on-line analysis with high-performance liquid

Chromatography/tandem, mass spectrometry / U. Jurva, H.V. Wikstrom, A.P. Bruins // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2002. – V.16. – P. 1934–40.

49. Modestov, A.D. Radial electrochemical flow cell for on-line coupling with mass spectrometry: theory and electrooxidation of dimethylaminomethyl ferrocene / A.D. Modestov, J. Gun, O. Lev // *Electroanalysis*. – 2004. – V.16. – N.5. – P. 367 – 78.

50. Modestov, A.D. On-line electrochemical-mass spectrometry study of the mechanism of oxidation of N,N-dimethyl-p-phenylenediamine in aqueous electrolytes / A.D. Modestov, J. Gun, I. Savotina, O. Lev // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2004. – V.565. – N.1. – P. 7 – 19.

51. Deng, H. A thin-layer electrochemical flow cell coupled on-line with electrospray-mass spectrometry for the study of biological redox reactions / H. Deng, H.T. Van Berkel // *Electroanalysis*. – 1999. – V.11. – P. 857–65.

52. Baumann, A. On-line electrochemistry/electrospray ionization mass spectrometry (EC/ESI-MS) for the generation and identification of nucleotide oxidation products / A. Baumann, W. Lohmann, S. Jahn, U. Karst // *Electroanalysis*. – 2009. – V.22. – N.3. – P. 286 – 92.

53. Odijk, M. A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies / M. Odijk, A. Baumann, A. van den Berg // *Lab on a Chip*. – 2009. – V.9. – P. 1687 – 93.

54. Mautjana, N.A. Antioxidant pathways and one-electron oxidation of dopamine and cysteine in electrospray and on-line electrochemistry electrospray ionization mass spectrometry / N.A. Mautjana, J. Estes, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth // *Electroanalysis*. – 2008. – V.20. – P. 1959–67.

55. Mautjana, N.A. One-electron oxidation and sensitivity of uric acid in on-line electrochemistry and in electrospray ionization mass spectrometry / N.A. Mautjana, J. Estes, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth // *Electroanalysis*. – 2008. – V.20. – P.2501–8.

56. Mautjana, N.A. Sensitivity of positive ion mode electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) in the analysis of purine bases in ESI MS and on-line electrochemistry ESI MS (EC/ESI MS) / N.A. Mautjana, D.W. Looi, J.R. Eyler, A. Brajter-Toth // *Electrochim Acta*. – 2009. – V.55. – P. 52–8.

57. Gawlik, M. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies – a review / M. Gawlik, R. Skibiński, J. Trawiński, Ł. Komsta // *Acta Chromatographica*. – 2018. – V.30. – N.1. – P. 1 – 8.
58. Calza, P. Ion trap tandem mass spectrometry study of dexamethasone transformation products on light activated TiO₂ surface / P. Calza, E. Pelizzetti, M. Brussino, C. Baiocchi // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2001. – V.12. – P. 1286–1295.
59. Nissilä, T. Integrated photocatalytic micropillar nanoreactor electrospray ionization chip for mimicking phase I metabolic reactions / T. Nissilä, L. Sainiemi, M.-M. Karikko, M. Kemell, M. Ritala, S. Franssila, R.A. Ketola // *Lab on a Chip*. – 2011. – V.11. – N.8. – P. 1470 – 1476.
60. Medana, C. Study of the photocatalytic transformation of synephrine: a biogenic amine relevant in anti-doping analysis / C. Medana, P. Calza, V. Giancotti, F. Dal Bello, M. Aragno, C. Baiocchi // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – V.405. – P. 1105 – 1113.
61. Medana, C. Horse metabolism and the photocatalytic process as a tool to identify metabolic products formed from dopant substances: the case of sildenafil / C. Medana, P. Calza, V. Giancotti, F. Dal Bello, E. Pasello, M. Montana, C. Baiocchi // *Drug Testing and Analysis*. – 2011. – V.3. – P. 724 – 734.
62. Calza, P. The photocatalytic process as a tool to identify metabolic products formed from dopant substances: the case of buspirone / P. Calza, M. Pazzi, C. Medana, C. Baiocchi, E. Pelizzetti // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2004. – V.35. – P. 9 – 19.
63. Ruokolainen, M. Comparison of TiO₂ photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction and direct electrochemistry for simulation of phase I metabolism reactions of drugs / M. Ruokolainen, T. Gul, H. Permentier, T. Sikanen, R. Kostianen, T. Kotiaho // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2016. – V.83. – P. 36 – 44.
64. Ruokolainen, M. Imitation of phase I oxidative metabolism of anabolic steroids by titanium dioxide photocatalysis / M. Ruokolainen, M. Valkonen, T. Sikanen,

T. Kotiaho, R. Kostianen // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – V.65. – P. 45 – 55.

65. Raof, H. Synthesis of metabolites of paracetamol and cocaine via photooxidation on TiO₂ catalyzed by UV light / H. Raof, P. Mielczarek, K.A. Michalow, M. Rekas, J. Silberring // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2013. – V.118. – P. 49 – 57.

66. Ruokolainen, M. TiO₂ Photocatalysis–DESI-MS Rotating Array Platform for High-Throughput Investigation of Oxidation Reactions / M. Ruokolainen, V. Miikkulainen, M. Ritala, T. Sikanen, T. Kotiaho, R. Kostianen // *Analytical Chemistry*. – 2017. – V.89. – N.21. – P. 11214 – 11218.

67. Van Geenen, F.A.M.G. TiO₂ Photocatalyzed Oxidation of Drugs Studied by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry / F.A.M.G. Van Geenen, M.C.R. Franssen, V. Miikkulainen, M. Ritala, H. Zuilhof, R. Kostianen and M.W.F. Nielen // *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. – 2019. – V.30. – N.4. – P. 639 – 646.

68. Mills, A. An overview of semiconductor photocatalysis / A. Mills, S. Le Hunt // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1997. – V.108. – P. 1–35.

69. Fujishima, A. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode / A. Fujishima, K. Honda // *Nature*. – 1972. – V.238. – P.37.

70. Nakata, K. TiO₂ photocatalysis: Design and applications / K. Nakata, A. Fujishima // *Journal of Photochemistry and Photobiology C*. – 2012. – V.13. – P. 169–189.

71. Herrmann, J.-M. Heterogeneous photocatalysis: Fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants / J.-M. Herrmann // *Catalysis Today*. – 1999. – V.53. P. 115–129.

72. Hashimoto, K. TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects / K. Hashimoto, H. Irie, A. Fujishima // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 2005. – V.44. – P. 8269.

73. Ochiai, T. Photoelectrochemical properties of TiO₂ photocatalyst and its applications for environmental purification / T. Ochiai, A. Fujishima // *Journal of Photochemistry and Photobiology C*. – 2012. – V.13. – P. 247–262.
74. Konstantinou, I.K. Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: Intermediates and degradation pathways / I.K. Konstantinou, T.A. Albanis // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2003. – V.42. – P. 319–335.
75. Ochiai, T. Photoelectrochemical properties of TiO₂ photocatalyst and its applications for environmental purification / T. Ochiai, A. Fujishima // *Journal of Photochemistry and Photobiology C*. – 2012. – V.13. – P. 247–262.
76. Matsunaga, T. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders / T. Matsunaga, R. Tomoda, T. Nakajima, H. Wake // *FEMS Microbiology Letters*. – 1985. – V.29. – P. 211–214.
77. Kayano, S. Bactericidal and Detoxification Effects of TiO₂ Thin Film Photocatalysts / S. Kayano, K. Yoshihiko, H. Kazuhito, F. Akira // *Environmental Science & Technology*. – 1998. – V.32. – P.726–728.
78. Yin, Z.F. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide / Z.F. Yin, L.Wu, H.G. Yang, Y.H. Su // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2013. – V.15. – P. 4844–4858.
79. Tong, H. Nano-photocatalytic materials: Possibilities and challenges / H. Tong, S. Ouyang, Y. Bi, N. Umezawa, M. Oshikiri, J. Ye // *Advanced Materials*. – 2012. – V.24. – P. 229–251.
80. Grätzel, M. Photoelectrochemical cells / M. Grätzel // *Nature*. – 2001. – V.414. – P. 338.
81. Ma, Y. Titanium dioxide-based nanomaterials for photocatalytic fuel generations / Y. Ma, X. Wang, Y. Jia, X. Chen, H. Han, C. Li // *Chemical Reviews*. – 2014. – V.114. – P. 9987–10043.
82. Schneider, J. Understanding TiO₂ photocatalysis: Mechanisms and materials / J. Schneider, M. Matsuoka, M. Takeuchi, J. Zhang, Y. Horiuchi, M. Anpo, D.W. Bahnemann // *Chemical Reviews*. – 2014. – V.114. – P. 9919–9986.

83. Kang, X. Titanium Dioxide: From Engineering to Applications / X. Kang, S. Liu, Z. Dai, Y. He, X. Song, Z. Tan // *Catalysts*. – 2019. – V.9. – N.2. – P. 191.
84. Wang, M. Inorganic-modified semiconductor TiO₂ nanotube arrays for photocatalysis / M. Wang, J. Iocozzia, L. Sun, C. Lin, Z. Lin // *Energy & Environmental Science*. – 2014. – V.7. – P. 2182–2202.
85. Wang, M. Inorganic-modified semiconductor TiO₂ nanotube arrays for photocatalysis / M. Wang, J. Iocozzia, L. Sun, C. Lin, Z. Lin // *Energy & Environmental Science*. – 2014. – V.7. – P. 2182–2202.
86. Kalyanasundaram, K. Photochemical applications of solar energy: Photocatalysis and photodecomposition of water / K. Kalyanasundaram // *Photochemistry*. – 2013. – V.41. P. 182–265.
87. Liu, B. The role of electron interfacial transfer in mesoporous nano-TiO₂ photocatalysis: A combined study of in situ photoconductivity and numerical kinetic simulation / B. Liu, J. Yang, X. Zhao, J. Yu // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2017. – V.19. – P. 8866–8873.
88. Liu, B. Thermodynamic and kinetic analysis of heterogeneous photocatalysis for semiconductor systems / B. Liu, X. Zhao, C. Terashima, A. Fujishima, K. Nakata // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2014. – V.16. – P. 8751–8760.
89. Ravelli, D. Photocatalysis. A multi-faceted concept for green chemistry / D. Ravelli, D. Dondi, M. Fagnoni, A. Albini // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – V.38. – P.1999–2011.
90. Bai, S. Steering charge kinetics in photocatalysis: Intersection of materials syntheses, characterization techniques and theoretical simulations / S. Bai, J. Jiang, Q. Zhang, Y. Xiong // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – V.44. – P. 2893–2939.
91. Ding, Z. Novel silicagel supported TiO₂ photocatalyst synthesized by CVD method / Z. Ding, X. Hu, G.Q. Lu, P. Yue, P.F. Greenfield, C.W. Bay, H. Kong // *Langmuir*. – 2000. – V.16. – P. 6216–6222.
92. Tavares, C.J. Enhancement in the photocatalytic nature of nitrogen-doped PVD-grown titanium dioxide thin films / C.J. Tavares, S.M. Marques, T. Viseu, V.

Teixeira, J.O. Carneiro, E. Alves, N.P.Barradas, F. Munnik // *Journal of Applied Physics*. – 2009. – V.106. – N.11. – P. 113535.

93. Arconada, N. Synthesis and photocatalytic properties of dense and porous TiO₂-anatase thin films prepared by sol–gel / N. Arconada, A. Durán, S. Suárez, J.M. Portela, B. Sánchez, Y. Castro // *Applied Catalysis B: Environmental*. – 2009. – V.86. – N. 1–2. – P. 1–7.

94. Gell, M. Development and implementation of plasma sprayed nanostructured ceramic coatings / M. Gell, E.H. Jordan, Y.H. Sohn, D. Goberman, L. Shaw, T.D. Xiao // *Surface and Coatings Technology*. – 2001. – V.146 – 147. – P. 48–54.

95. Besra, L. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD) / L. Besra, M. Liu // *Progress in Materials Science*. – 2007. – V.52. – N.1. – P. 1–61.

96. Kaya, C. Structural and functional thick ceramic coatings by electrophoretic deposition / C. Kaya, F. Kaya, B. Su, B. Thomas, A.R. Boccaccini // *Surface and Coatings Technology*. – 2005. – V.191. – N. 2–3. – P. 303–310.

97. Dickerson, J.H. *Electrophoretic Deposition of Nanomaterials* / J.H. Dickerson, A.R. Boccaccini // Springer, London. – 2012.

98. Yadav, V.S. Coating of bioactive glass on magnesium alloys to improve its degradation behavior: Interfacial aspects / V.S. Yadav, M.R. Sankar, L.M. Pandey // *Journal of Magnesium and Alloys*. – 2020.

99. Hamaker, H.C. The role of the forces between the particles in electrodeposition and other phenome / H.C. Hamaker, E.J.W. Verwey // *Transactions of the Faraday Society*. – 1940. – V.36. – P. 180–185.

100. Farrokhi-Rad, M. Electrophoretic deposition of titania nanoparticles in different alcohols: kinetics of deposition / M. Farrokhi-Rad, M. Ghorbani // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2011. – V.94. – N.8. – P. 2354–2361.

101. Sadeghi, A.A. Application of the multi-step EPD technique to fabricate thick TiO₂ layers: effect of organic medium viscosity on the layer microstructure / A.A.

Sadeghi, T. Ebadzadeh, B. Raissi, S. Ghashghaie, S.M.A. Fateminia // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2013. – V.117. – N.6. – P. 1731–1737.

102. Sadeghi, A.A. Electrophoretic deposition of TiO₂ nanoparticles in viscous alcoholic media / A.A. Sadeghi, T. Ebadzadeh, B. Raissi, S. Ghashghaie // *Ceramics International*. – 2013. – V.39. – N.7. – P. 7433–7438.

103. Honig, R.E. Laser-induced emission of electrons, ions, and neutral atoms from solid surfaces / R.E. Honig, J. R. Woolston // *Applied Physics Letters*. – 1963. – V.2. – N.7. – P. 138–139.

104. Vastola, F.J. Analysis of organic salts by laser ionization / F.J. Vastola, R.O. Mumma, A.J. Pirone // *Organic Mass Spectrometry*. – 1970. – V.3. – N.1. – P. 101–104.

105. Posthumus, M.A. Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules / M.A. Posthumus, P.G. Kistemaker, H.L.C. Meuzelaar, M.C. Ten Noever de Brauw // *Analytical Chemistry*. – 1987. – V.50. – N.7. – P. 985–991.

106. Lindner, B. Laser desorption mass spectrometry of nonvolatiles under shock wave conditions / B. Lindner, U. Seydel // *Analytical Chemistry*. – 1985. – V.57. – N.4. – P. 895–899.

107. 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. – N.8. – P. 151–153.

108. Karas, M. “Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds” / M. Karas, D. Bachmann, D. Bahr, F. Hillenkamp // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 1987. – N. 78. – P. 53–68.

109. Zenobi, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry / R. Zenobi, R. Knochenmuss // *Mass Spectrometry Reviews*. – 1998. – V.17. – P. 337–366.

110. Knochenmuss, R. MALDI Ionization: the role of in-plume processes / R. Knochenmuss, R. Zenobi // *Chemical Reviews*. – 2003. – V.103. – P. 441–452.

111. Karas, M. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism / M. Karas, R. Krüger // *Chemical Reviews*. – 2003. – V.103. – P. 427 – 440.

112. Karas, M. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules / M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp // *Analytical Chemistry*. – 1985. – V.57. – P. 2935–2939.

113. Karas, M. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons / M. Karas, F. Hillenkamp // *Analytical Chemistry*. – 1988. – V.60. – P. 2299–2301.

114. Allwood, D.A. Plasma modeling of matrix assisted UV laser desorption ionization (MALDI) / D.A. Allwood, P.E. Dyer, R.W. Dreyfus, I.K. Perera // *Applied Surface Science*. – 1997. – V.109/110. – P. 616–620.

115. Allwood, D.A. Ionization modeling of matrix molecules in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / D.A. Allwood, P.E. Dyer, R.W. Dreyfus // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 1997. – V.11. – P. 499–503.

116. 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. – P. 885–891.

117. Niu, S.F. Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins / S.F. Niu, W.Z. Zhang, B.T. Chait // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 1998. – V.9. – P. 1–7.

118. Lai, Y.H. Solid-phase thermodynamic interpretation of ion desorption in matrix-assisted laser desorption/ionization / Y.H. Lai, C.C. Wang, S.H. Lin, Y.T. Lee, Y.S. Wang // *The Journal of Physical Chemistry A*. – 2010. – V.114. – P. 13847–13852.

119. Ahn, S.H. Quantitative reproducibility of mass spectra in matrix-assisted laser desorption ionization and unraveling of the mechanism for gas-phase peptide ion formation / S.H. Ahn, K.M. Park, Y.J. Bae, M.S. Kim // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2013. – V.48. – P. 299–305.

120. Bae, Y.J. Degree of ionization in MALDI of peptides: thermal explanation for the gas-phase ion formation / Y.J. Bae, Y.S. Shin, J.H. Moon, M.S. Kim // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2012. – V.23. – P. 1326–1335.

121. Chu, K.Y. Thermal proton transfer reactions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / Chu, K.Y., S. Lee, M.T. Tsai, I.C. Lu, Y.A. Dyakov, Y.H. Lai, Y.T. Lee, C.K. Ni // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2014. – V.25. – P. 310–318.
122. Knochenmuss, R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption and ionization / R. Knochenmuss // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2002. – V.37. – P. 867–877.
123. Knochenmuss, R. A quantitative model of UV-MALDI including analyte ion generation / R. Knochenmuss // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V.75. – P. 2199–2207.
124. Knochenmuss, R. A bipolar rate equation model of MALDI primary and secondary ionization processes, with application to positive/negative analyte ion ratios and suppression effects // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2009. – V.285. – P. 105–113.
125. Knochenmuss, R. MALDI mechanisms: wavelength and matrix dependence of the coupled photophysical and chemical dynamics model / R. Knochenmuss // *Analyst*. – 2014. – V.139. – P. 147–156.
126. Chiang, C-K. Nanoparticle-Based Mass Spectrometry for the Analysis of Biomolecules / C-K. Chiang, W-T. Chen, H-T. Chang // *Chemical Society Reviews*. – 2011. – V.40. – N.3. – P. 1269–1281.
127. Song, K. Desorption and ionization mechanisms and signal enhancement in surface assisted laser desorption ionization mass spectrometry (SALDI-MS) / K. Song, Q. Cheng // *Applied Spectroscopy Reviews*. – 2019. – V.55. – N.3. – P. 220–242.
128. Chen, W.T. Analysis of Biomolecules through Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Employing Nanomaterials / W.T. Chen, I. Tomalová, J. Preisler, H.T. Chang // *Journal of the Chinese Chemical Society*. – 2011. – V.58. – N.6. – P. 769–778.
129. Law, K.P. Recent Advances in SALDI-MS Techniques and Their Chemical and Bioanalytical Applications / K.P. Law, J.R. Larkin // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2011. – V.399. – N.8. – P. 2597–2622.

130. Pilolli, R. Gold Nanomaterials as a New Tool for Bioanalytical Applications of Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry / R. Pilolli, F. Palmisano, N. Cioffi // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V.402. – N.2. – P. 601–623.

131. Song, K. Desorption and Ionization Mechanisms and Signal Enhancement in Surface Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) / K. Song, Q. Cheng // *Applied Spectroscopy Reviews*. 2020. – V.55. – N.3. – P. 220–242.

132. 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. – N.8. – P. 151–153.

133. Sunner, J. Graphite Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Peptides and Proteins from Liquid Solutions / J. Sunner, E. Dratz, Y-C. Chen // *Analytical Chemistry*. – 1995. – V.67. – N.23. – P. 4335–4342.

134. Lai, S.K.M. Nanosecond UV Laser Ablation of Gold Nanoparticles: Enhancement of Ion Desorption by Thermal-Driven Desorption, Vaporization, or Phase Explosion / S.K.M. Lai, H.W. Tang, K.C. Lau, K.M. Ng // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2016. – V.120. – N.36. – P. 20368–20377.

135. Ng, K.M. Ion-Desorption Efficiency and Internal-Energy Transfer in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization: More Implication (s) for the Thermal-Driven and Phase-Transition-Driven Desorption Process / K.M. Ng, S.L. Chau, H.W. Tang, X.G. Wei, K.C. Lau, F. Ye // *The Journal of Physical Chemistry*. – 2015. – V.119. – N.41. – P. 23708–23720.

136. Picca, R.A. Mechanisms of Nanophase-Induced Desorption in LDI-MS / R.A. Picca, C.D. Calvano, N. Cioffi, F. Palmisano // *A Short Review. Nanomaterials*. – 2017. – V.7. – N.4. – P. 75.

137. Luo, G. Surface Modification and Laser Pulse Length Effects on Internal Energy Transfer in DIOS / G. Luo, Y. Chen, G. Siuzdak, A. Vertes // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – V.109. – N.202. – P. 24450–24456.

138. Kamat, P.V. Picosecond Dynamics of Silver Nanoclusters. Photo ejection of Electrons and Fragmentation / P.V. Kamat, M. Flumiani, G.V. Hartland // *Journal of Physical Chemistry B*. – 1998. – V.102. – N.17. – P.3123–3128.

139. Shoji, M. Ionization of Gold Nanoparticles in Solution by Pulse Laser Excitation as Studied by Mass Spectrometric Detection of Gold Cluster Ions / M. Shoji, K. Miyajima, F. Mafune // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2008. – V. 112. – N.6. – P. 1929–1932.

140. Cheng, Y.H. The Hidden Heroes: Holes in Charge-Driven Desorption Mass Spectrometry / Y.H. Cheng, K.M. Ng // *Analytical Chemistry*. – 2020. – V.92. – N.8. – P. 5645–5649.

141. Ekström, S. Miniaturized Solid-Phase Extraction and Sample Preparation for MALDI MS Using a Microfabricated Integrated Selective Enrichment Target / S. Ekström, L. Wallman, D. Hök, G. Marko-Varga, T. Laurell // *Journal of Proteome Research*. – 2006. – V.5. – N.5. – P. 1071–1081.

142. Cockrill, S.L. Efficient micro-recovery and guanidination of peptides directly from MALDI target spots / S.L. Cockrill, K.L. Foster, J. Wildsmith, A.R. Goodrich, J.G. Dapron, T.C. Hassell, W.K. Kappel, G.B. Scott // *Biotechniques*. – 2005. – V.38. – P. 301–304.

143. Amantonico, A. Interfacing microfluidics and laser desorption/ionization mass spectrometry by continuous deposition for application in single cell analysis / A. Amantonico, P.L. Urban, J.Y. Oh, R. Zenobi // *Chimia*. – 2009. – V.63. – P. 185–188.

144. Urban, P.L. Lab-on-a-plate: Extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets / P.L. Urban, A. Amantonico, R. Zenobi // *Mass Spectrometry Reviews*. – 2011. – V.30. – N.3. – P. 435–478.

145. Chen, X. Sample preparation for MALDI mass spectrometry using an elastomeric device reversibly sealed on the MALDI target / X. Chen, A. Murawski, G. Kuang, D.J. Sexton, W. Galbraith // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V.78. – N.6. – P. 6160–6168.

146. McComb, M.E. Evaluation of an on-target sample preparation system for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in

conjunction with normal-flow peptide high-performance liquid chromatography for peptide mass fingerprint analyses / M.E. McComb, D.H. Perlman, H. Huang, C.E. Costello // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2007. – V.21. – P. 44–58.

147. Perlman, D.H. Coupling of protein HPLC to MALDI-TOF MS using an on-target device for fraction collection, concentration, digestion, desalting, and matrix/analyte cocrystallization / D.H. Perlman, H. Huang, C. Daulay, C.E. Costello, M.E. McComb // *Analytical Chemistry*. – 2007. – V.79. – P. 2058–2066.

148. Hung, K.C. Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA / K.C. Hung, H. Rashidzadeh, Y. Wang, B. Guo // *Analytical Chemistry*. – 1998. – V.70. – P. 3088–3093.

149. Hung, K.C. Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins / K.C. Hung, H. Ding, B. Guo // *Analytical Chemistry*. – 1999. – V.71. – P.518–521.

150. Yuan, X. Protein identification with Teflon as matrix-assisted laser desorption/ionization sample support / X. Yuan, D.M. Desiderio // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2002. – V.37. – P. 512–524.

151. Schuorenberg, M. Prestructured MALDI-MS sample supports / M. Schuorenberg, C. Luebbert, H. Eickhoff, M. Kalkum, H. Lehrach, E. Nordhoff // *Analytical Chemistry*. – 2000. – V.72. – P. 3436–3442.

152. Nordhoff, E. Sample preparation protocols for MALDIMS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports / E. Nordhoff, M. Schuorenberg, G. Thiele, C. Luobbert, K.D. Kloeppe, D. Theiss, H. Lehrach, J. Gobom // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2003. – V.226. – P. 163–180.

153. Xu, Y. Patterned monolayer/polymer films for analysis of dilute or salt-contaminated protein samples by MALDI-MS / Y. Xu, J.T. Watson, M.L. Bruening // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V.75. – P. 185–190.

154. Ekstroem, S. Disposable polymeric high-density nanovial arrays for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: II. Biological applications / S. Ekstroem, J. Nilsson, G. Helldin, T. Laurell, G. Marko-Varga // *Electrophoresis*. – 2001. – V.22. – P. 3984–3992.

155. Ekstroem, S. Integrated selective enrichment target—A microtechnology platform for matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry applied on protein biomarkers in prostate diseases / S. Ekstroem, L. Wallman, J. Malm, C. Becker, H. Lilja, T. Laurell, G. Marko-Varga // *Electrophoresis*. – 2004. – V.25. – P. 3769–3777.
156. Finnskog, D. High-speed biomarker identification utilizing porous silicon nanovial arrays and MALDI-TOF mass spectrometry / D. Finnskog, K. Jaras, A. Ressine, J. Malm, G. Marko-Varga, H. Lilja, T. Laurell // *Electrophoresis*. – 2006. – V.27. – P. 1093–1103.
157. Zaluzec, E.J. Direct matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometric analysis of proteins immobilized on nylon-based membranes / E.J. Zaluzec, D.A. Gage, J. Allison, J.T. Watson // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 1994. – V.5. – P. 230–237.
158. Brockman, A.H. Probe immobilized affinity-chromatography mass-spectrometry / A.H. Brockman, R. Orlando // *Analytical Chemistry*. – 1995. – V.67. – P. 4581–4585.
159. Wang, H. A general method for producing bioaffinity MALDI probes / H. Wang, K. Tseng, C.B. Lebrilla // *Analytical Chemistry*. – 1999. – V.71. – P. 2014–2020.
160. Koonig, S. Target coatings and desorption surfaces in biomolecular MALDI-MS / S. Koonig // *Proteomics*. – 2008. – V.6. – P. 706–714.
161. Owen, S.J. Increasing sensitivity and decreasing spot size using an inexpensive, removable hydrophobic coating for matrix-assisted laser desorption/ionisation plates / S.J. Owen, F.S. Meier, S. Brombacher, D.A. Volmer // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2003. – V.17. – P.2439–2449.
162. Chen, C.-J. Simple fabrication of hydrophobic surface target for increased sensitivity and homogeneity in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptides, phosphopeptides, carbohydrates and proteins / C.-J. Chen, C.-C. Lai, M.-C. Tseng, Y.-C. Liu, S.-Y. Lin, F.-J. Tsai // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – V.783. – P. 31–38.

163. Lohmann, W. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism / W. Lohmann, U. Karst // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – V. 391 – N.1. – P. 79–96.
164. Gawlik, M. Imitation of phase I metabolism reactions of MAO-A inhibitors by titanium dioxide photocatalysis / M. Gawlik, J. Trawiński, R. Skibiński // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – V.114. – P. 391 – 400.
165. Syed, M. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI) / M. Syed, C. Skonberg, S. H. Hansen // *Toxicology in Vitro*. – 2016. – V.31. – P. 93 – 102.
166. Faber, H. Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/(liquid chromatography/mass spectrometry) / H. Faber, D. Melles, C. Brauckmann, C. A. Wehe, K. Wentker, U. Karst // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V.403. – N.2. – P. 345–354.
167. Brillas, E. Electrochemical incineration of diclofenac in neutral aqueous medium by anodic oxidation using Pt and boron-doped diamond anodes / E. Brillas, S. Garcia-Segura, M. Skoumal, C. Arias // *Chemosphere*. 2010. – V.79. – N.6. – P. 605 – 612.
168. Nackiewicz, J. Oxidation of diclofenac in the presence of iron(II) octacarboxyphthalocyanine / J. Nackiewicz, Ł. Kołodziej, A. Poliwoda, M. A. Broda // *Chemosphere*. – 2021. – V.265. – P. 129 – 145.
169. Mugunthan, E. Photocatalytic degradation of diclofenac using TiO₂–SnO₂ mixed oxide catalysts / E. Mugunthan, M.B. Saidutta, P.E. Jagadeeshbabu // *Environmental Technology*. – 2017. – P. 1–13.
170. Thanasawasdi, H. Photocatalytic Oxidation of Pharmaceutical compounds: Kinetics and Pathways for Ibuprofen, Clofibric Acid, Diclofenac and Naproxen / H. Thanasawasdi, J. Leckie, T. Mill // *Journal of Advanced Oxidation Technologies*. – 2007. – V.10. – N.2. – P. – 342 – 348.
171. Bonk, T. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA / T. Bonk, A. Humeny // *The Neuroscientist*. – 2001. V.7. – N.1. – P. 6 – 12.

172. Drzezdzon, J. MALDI-MS for polymer characterization-Recent developments and future prospects / J. Drzezdzon, D. Jacewicz, A. Sielicka, L. Chmurzynski // Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – V.115. P. 121 – 128.

173. Calvano, C. D. MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story? / C. D. Calvano, A. Monopoli, T. R. I. Cataldi, F. Palmisano. – 2018. – V.410. – N.17. – P. 4015 – 4038.

174. Wu, C.-Y. Revisiting the quantitative features of surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis / C.-Y. Wu, K.-C. Lee, Y.-L. Kuo, Y.-C. Chen // Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – 2016. – V.374. – N.2079. P. 1 – 11.

175. Aminlashgari, N. Surface Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry (SALDI-MS) for Analysis of Polyester Degradation Products / N. Aminlashgari, M. Hakkarainen // Journal of The American Society for Mass Spectrometry. – 2012. – V.23. – N.6. – P. 1071 – 1076.

176. Gao, C. Two-dimensional TiO₂ Nanoflakes Enable Rapid SALDI-TOF-MS Detection of Toxic Small Molecules (dyes and their metabolites) in Complex Environments / C. Gao, D. Zhen, N. He, Z. An, Q. Zhou, C. Li, Q. Cai // Talanta. – 2018. – V.196. – P. 1 – 8.

177. Chenyi, L. Self-assembly TiO₂ nanosheets as a SALDI-TOF-MS matrix for high-throughput identification of polyfluorinated compounds in water samples / L. Chenyi, G. Hongchao, Z. Xingqi, G. Chan, J. Ning, Q. Yan, C. Qingyun // Microchemical Journal. – 2020. – V.152. – P. 1 – 10.

178. Popović, I. TiO₂ nanocrystals – assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of steroid hormones, amino acids and saccharides. Validation and comparison of methods / I. Popović, M. Nešić, M. Vranješ, Z. Šaponjić, M. Petković // RSC Advances. – 2016. – V.6. – N.2. – P. 1027 – 1036.

179. Hu, J.-B. Coffee-ring effects in laser desorption/ionization mass spectrometry / J.-B. Hu, Y.-C. Chen, P. L. Urban // Analytica Chimica Acta. – 2013. – V.766. – P. 77–82.

180. Piret, G. Surface-assisted laser desorption–ionization mass spectrometry on titanium dioxide (TiO₂) nanotube layers / G. Piret, D. Kim, H. Drobecq, Y. Coffinier, O. Melnyk, P. Schmuki, R. Boukherroub // *The Analyst*. – 2012. – V.137. – N.13. – P. 3058 – 3063.

181. LO, C. Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Titania Nanotube Arrays / C. LO, J. LIN, W. CHEN, C. CHEN, Y. CHEN // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. – 2008. – V.19. – N.7. – P. 1014 – 1020.

182. Bozorgtabar, M. Structure and photocatalytic activity of TiO₂ coatings deposited by atmospheric plasma spraying / M. Bozorgtabar, M. Rahimipour, M. Salehi, M. Jafarpour // *Surface and Coatings Technology*. – 2011. – V.205. – P. 229 – 231.

183. Obregón, S. Electrophoretic deposition of photocatalytic materials / S. Obregón, G. Amor, A. Vázquez // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2019. – V.269. – P. 236 – 255.

184. Tsuji, T. Efficient fabrication of substrates for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using laser ablation in liquids / T. Tsuji, T. Mizuki, M. Yasutomo, M. Tsuji, H. Kawasaki, T. Yonezawa, F. Mafuné // *Applied Surface Science*. – 2011. – V.257. – N.6. – P. 2046 – 2050.

185. Dor, S. The influence of suspension composition and deposition mode on the electrophoretic deposition of TiO₂ nanoparticle agglomerates / S. Dor, S. Rühle, A. Ofir, M. Adler, L. Grinis, A. Zaban // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2009. – V.342. – N.1 – 3. – P. 70 – 75.

186. Workie, B. Electrophoretic Deposition of Aluminum Nitride from Its Suspension in Acetylacetone Using Iodine as an Additive / B. Workie, B. E. McCandless, Z. Gebeyehu // *Journal of Chemistry*. – 2013. – V.2013. – P. 1 – 7.

187. Nuño, M. Photocatalytic activity of electrophoretically deposited (EPD) TiO₂ coatings / M. Nuño, R. J. Ball, C. R. Bowen, R. Kurchania, G. D. Sharma // *Journal of Materials Science*. – 2015. – V.50. – N.14. – P. 4822 – 4835.

188. Wooh, S. Stable Hydrophobic Metal-Oxide Photocatalysts via Grafting Polydimethylsiloxane Brush / S. Wooh, N. Encinas, D. Vollmer, H.-J. Butt // *Advanced Materials*. – 2017. – V.29. – N.16. – P. 1 – 7.

189. Liu, J. Optimizing Hydrophobicity and Photocatalytic Activity of PDMS-Coated Titanium Dioxide / J. Liu, L. Ye, S. Wooh, M. Kappl, W. Steffen, H.-J. Butt // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2019. – P. 1 – 17.

190. Sonderegger, H. Surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry using TiO₂-coated steel targets for the analysis of small molecule / H. Sonderegger C. Rameshan, H. Lorenz, F. Klauser, M. Klerks, M. Rainer, R. Bakry, C.W. Huck, G.K. Bonn // *Anal Bioanal Chem*. – 2011. – V.401. – N.6. – P. 1963–1974.

191. Leite, J.F. Removal of sodium and potassium adducts using a matrix additive during matrix-associated laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of peptides / J.F. Leite, M.R. Hajivandi, T. Diller, R.M. Pope // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2004. – V.18. – N.23. – P. 2953–2959.

192. Nitta, S. Desorption/Ionization Efficiency of Common Amino Acids in Surface-Assisted Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) with Nanostructured Platinum / S. Nitta, H. Kawasaki, T. Suganuma, Y. Shigeri, R. Arakawa // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2012. – V.117. – N.1. – P. 238 – 245.

193. Вейко, В.П. Лазерные технологии в микроэлектронике / В. П. Вейко, С. М. Метев. — София: Издание БАН, 1991. — 487 С.

194. Мадаминов, Х.М. Применение лазеров в полупроводниковой технологии / Х. М. Мадаминов, Г. Ф. Каримова. – Текст: непосредственный // *Молодой ученый*. – 2017. – № 1 (135). – С. 4–7.

195. Пенто, А.В. Развитие лазерных методов ионизации в масс-спектрометрии органических соединений / А.В. Пенто. – Диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук. М., 2015. 127 С.

196. Morris, N.J. Laser desorption ionization (LDI) silicon nanopost array chips fabricated using deep UV projection lithography and deep reactive ion etching / N.J.

Morris, H. Anderson, BThibeault, A. Vertes, M.J. Powell, T.T. Razunguzwa // RSC Advances. – 2015. – V.5. – N.88. – P. 72051–72057.

197. Juenke, J.M. A Rapid Procedure for the Monitoring of Amiodarone and N-Desethylamiodarone by HPLC-UV Detection / J.M. Juenke, P.I. Brown, G.A. McMillin, F.M. Urry // Journal of Analytical Toxicology. – 2004. – V.28. – N.1. – P. 63–66.

198. Casado, C. Design and validation of a LED-based high intensity photocatalytic reactor for quantifying activity measurements / C. Casado, R. Timmers, A. Sergejevs, C.T. Clarke, D.W.E. Allsopp, C.R. Bowen, J. Marugán // Chemical Engineering Journal. – 2017. – V.327. – P. 1043–1055.

199. Ivarez-Lueje, A. Electrochemical Methods for the In Vitro Assessment of Drug Metabolism / A. Ivarez-Lueje, M. Prez, C. Zapat // Topics on Drug Metabolism. – 2012.

200. Anyorigiya, T.A. Pharmacokinetic profile of amodiaquine and its active metabolite desethylamodiaquine in Ghanaian patients with uncomplicated falciparum malaria / T.A. Anyorigiya, S. Castel, K. Mauff, F. Atuguba, B. Ogutu, A. Oduro, D. Dosoo, K-P. Asante, S. Owusu-Agyei, A. Dodoo, A. Hodgson, F. Binka, L.J. Workman, E.N. Allen, P. Denti, L. Wiesner, K.I. Barnes // Malaria Journal. – 2021. – V.20. – N.18.

201. Arguelho, M. L. P. M. Electrochemical and theoretical evaluation of the interaction between dna and amodiaquine: evidence of the guanine adduct formation / M. L. P. M. Arguelho, J. Alves P. H. Stradiotto, N. R. Lacerda V. L. Júnior, J.M. Pires, A. Beatriz // Química Nova. – 2010. – V.33. – N.6. – P. 1291–1296.

202. Jewell, H. Role of hepatic metabolism in the bioactivation and detoxication of amodiaquine / H. Jewell, J.L. Maggs, A.C. Harrison, P. M. O’neill, J. E. Ruscoe, B.K. Park. – 1995. – V.25. – N.2. – P. 199–217.

203. Jurva, U. Electrochemical Generation of Electrophilic Drug Metabolites: Characterization of Amodiaquine Quinoneimine and Cysteinyl Conjugates by MS, IR, and NMR / U. Jurva, A. Holmén, G. Grönberg, C. Masimirembwa, L. Weidolf // Chemical Research in Toxicology. – 2008. – V.21. – N.4. – P. 928–935.

204. LoPachin, R.M. Protein Adduct Formation as a Molecular Mechanism in Neurotoxicity / R.M. LoPachin, A.P. DeCaprio // *Toxicological Sciences*. – 2005. – V. 86 – N.2. – P. 214 – 225.

205. Tailor, A. Mass Spectrometric and Functional Aspects of Drug–Protein Conjugation / A. Tailor, Waddington J.C., Meng X., Park B.K. // *Chemical Research in Toxicology*. – 2016. V. 29 – N.12. – P. 1912–1935.

206. Shreyner, E.V. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography / E.V. Shreyner, M.L. Alexandrova, N.G. Sukhodolov, A.A. Selyutin, E.P. Podolskaya // *Mendeleev Communications*. – 2017. V. 27 – N.3. – P. 304 – 306.

207. Gladilovich, V. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron(III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics / V. Gladilovich, U. Greifenhagen, N. Sukhodolov, A. Selyutin, D. Singer, D. Thieme, P. Majovsky, A. Shirkin, W. Hoehenwarter, E. Bonitenko, E. Podolskaya, A. Frolov // *Journal of Chromatography, A*. – 2016. V. 1443. – P. 181 – 190.

208. Babakov, V.N. Application of lanthanum stearate monolayers as a metal-affinity sorbent for the selective sorption of soman adducts to human serum albumin / V.N. Babakov, E.V. Shreiner, O.A. Keltsieva, Y.A. Dubrovskii, V.V. Shilovskikh, I.M. Zorin, N.G. Sukhodolov, I.G. Zenkevich, E.P. Podolskaya, A.A. Selyutin // *Talanta*. – 2019. V. 195. – P. 728–731.

209. 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.

210. Kurdyukov, D.A. Ni-functionalized submicron mesoporous silica particles as a sorbent for metal affinity chromatography / D.A. Kurdyukov, E.N. Chernova, Y.V.

Russkikh, D.A. Eurov, V.V. Sokolov, A.A. Bykov, V.V. Shilovskikh, O.A. Keltsieva, E.V.Ubyivovk, Y.A. Anufrikov, A.V. Fedorova, A.A. Selyutin, N.G. Sukhodolov, E.P. Podolskaya, V.G. Golubev // *Journal of Chromatography A*. – 2017. – V. 1513. – N.1. – P. 140–148.

211. Wang, Z.G. Development of the affinity materials for phosphorylated proteins/peptides enrichment in phosphoproteomics analysis / Z.G. Wang, N. Lv, W.Z. Bi, J.L. Zhang, J.Z. Ni // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – P. 8377-8392.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

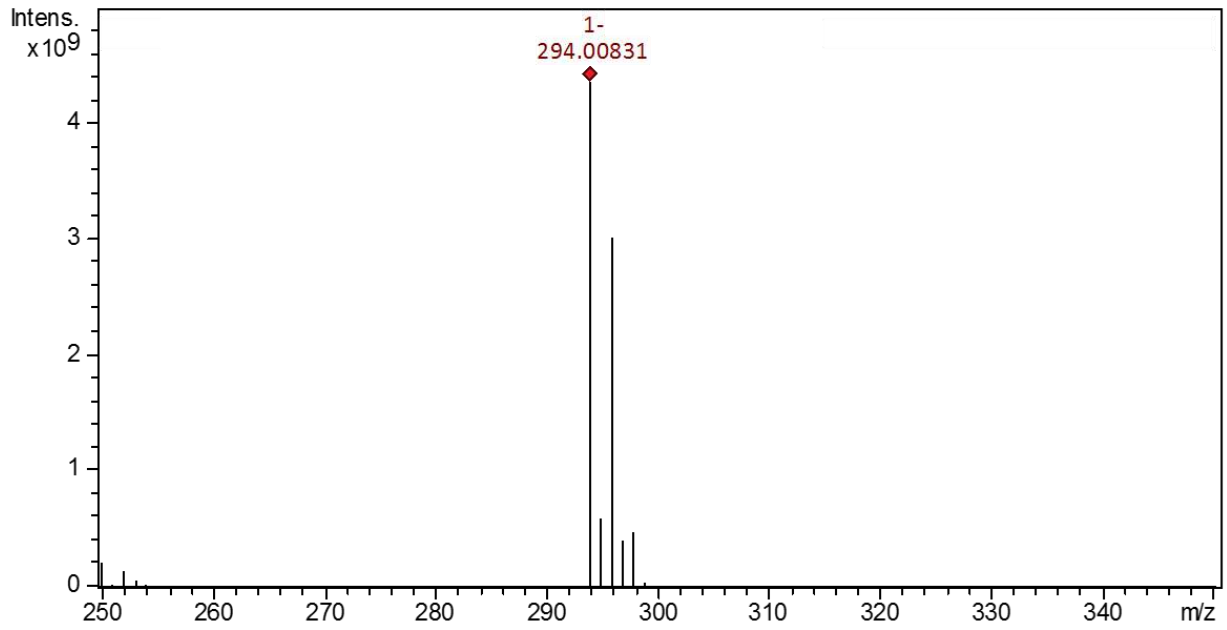


Рисунок 1 – Масс-спектр диклофенака (m/z 294,0083)

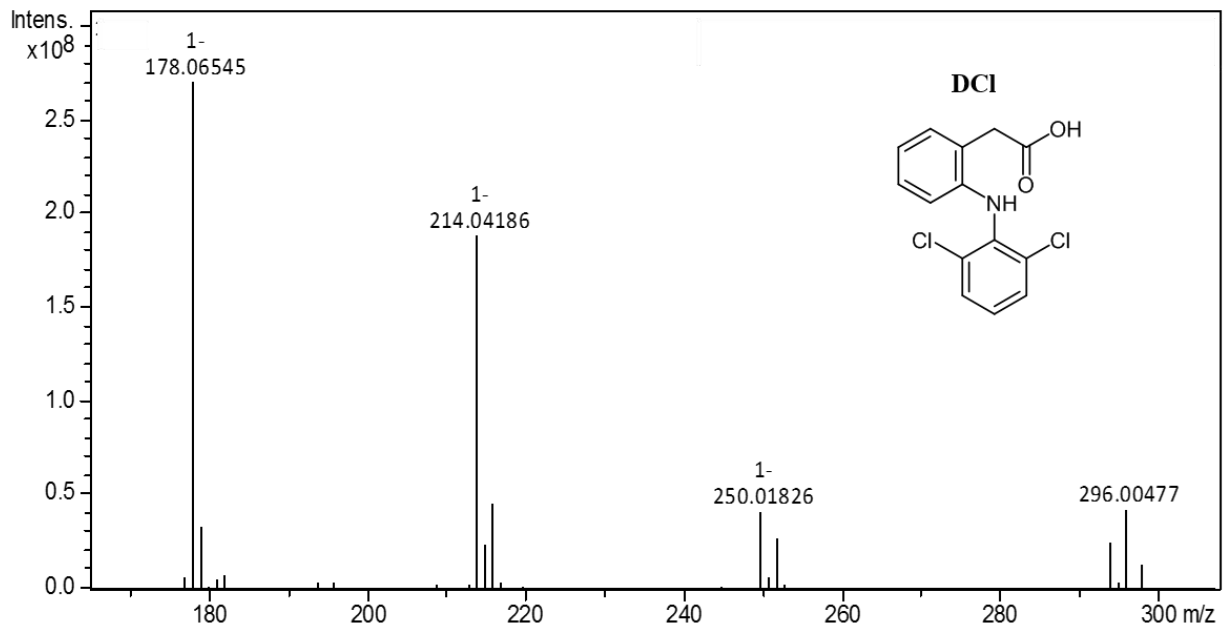


Рисунок 2 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 294,0083 и его структура

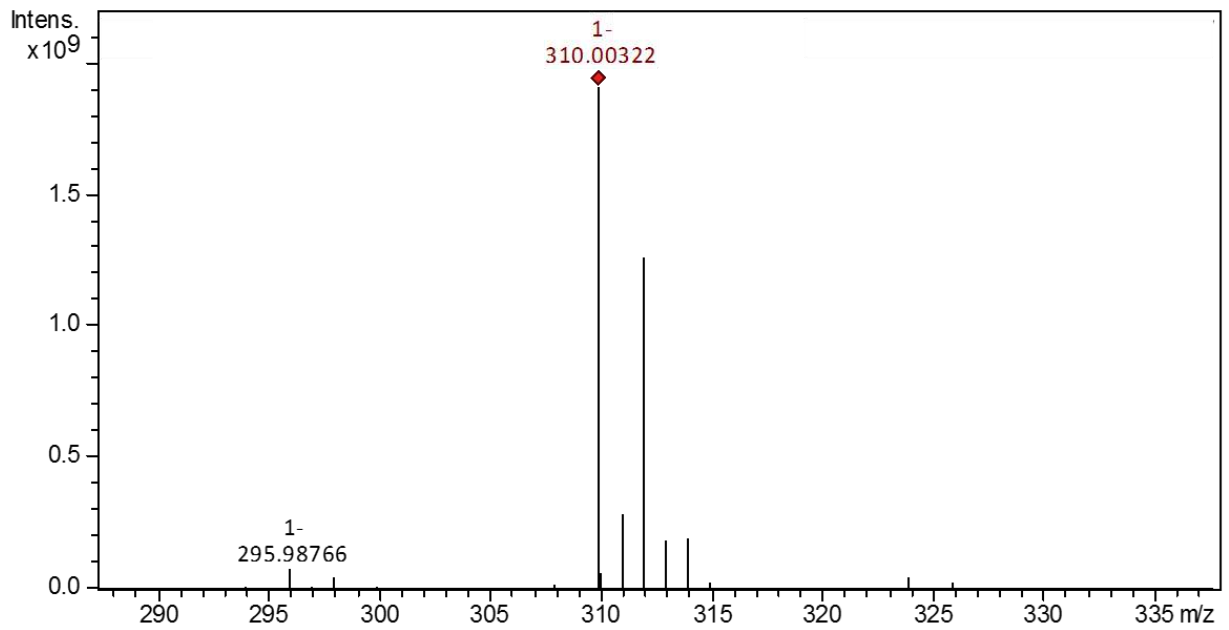


Рисунок 3 – Масс-спектр продукта окисления 2a (m/z 310,0032)

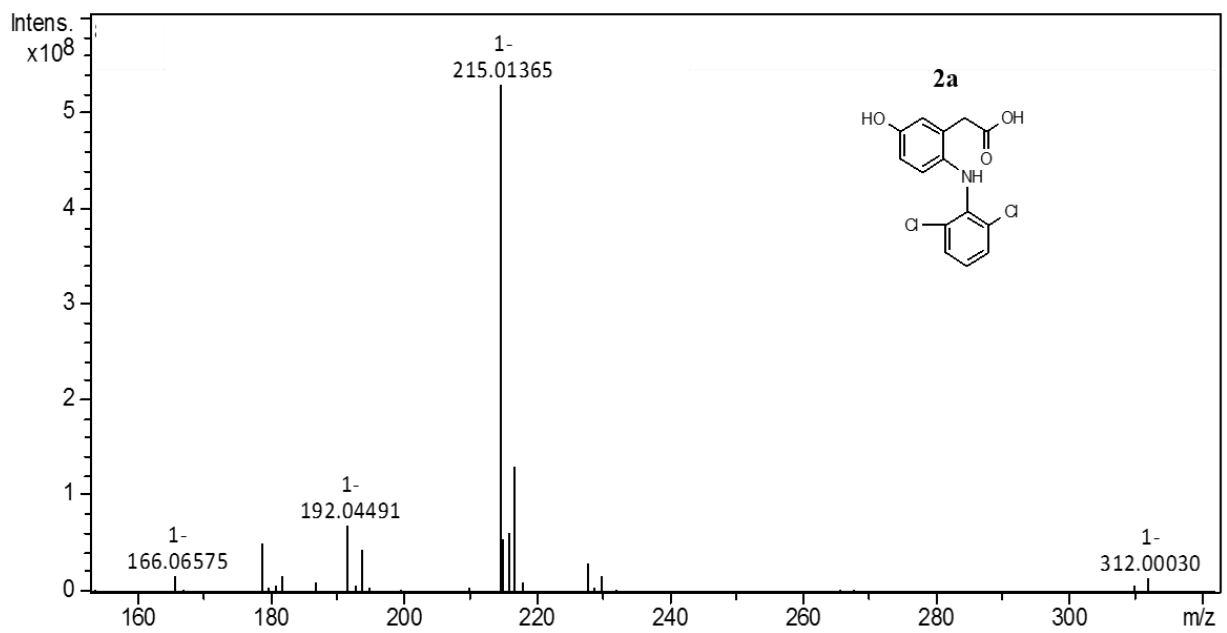


Рисунок 4 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 310,0032 и его структура

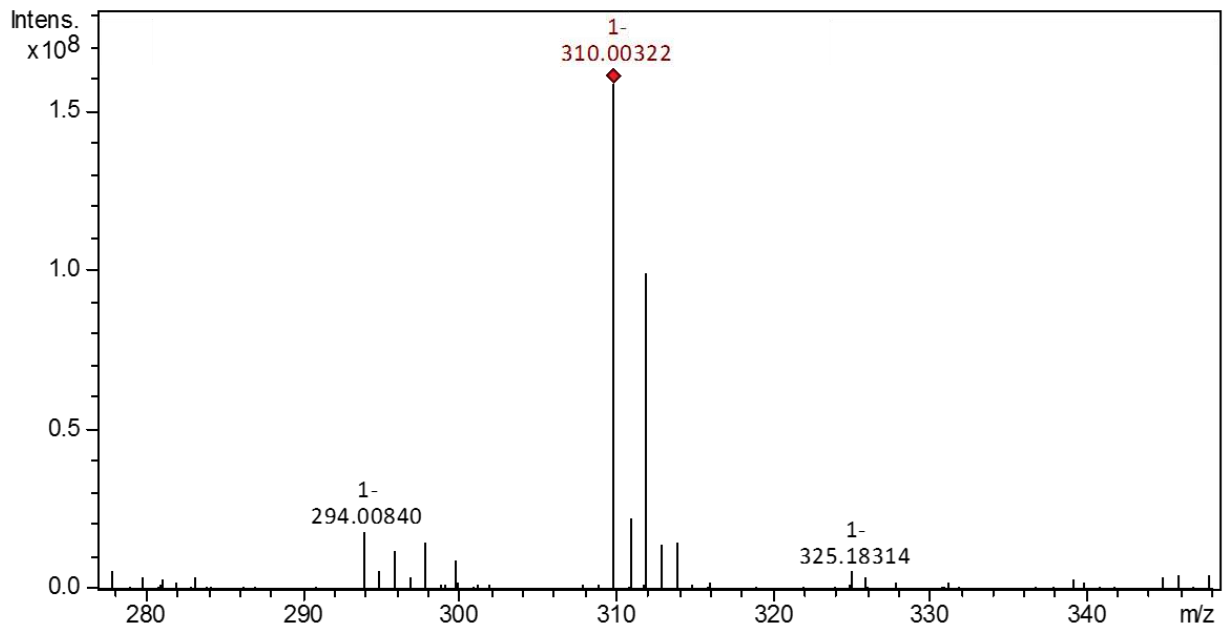


Рисунок 5 – Масс-спектр продукта окисления 2b (m/z 310,0032)

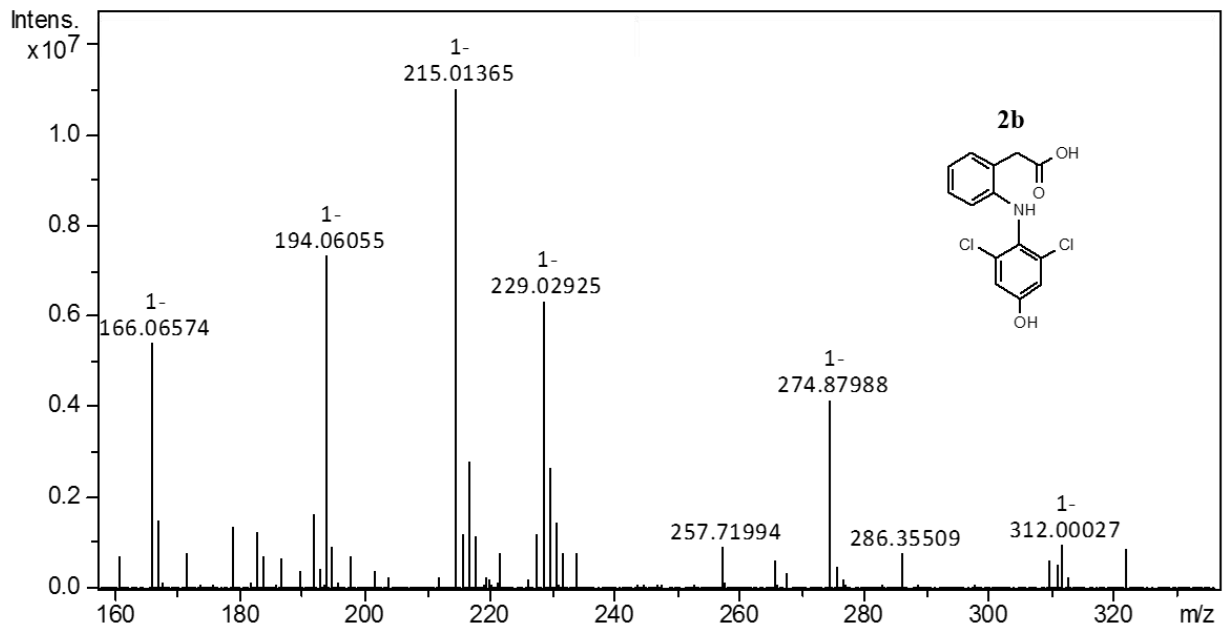


Рисунок 6 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 310,0032 и его структура

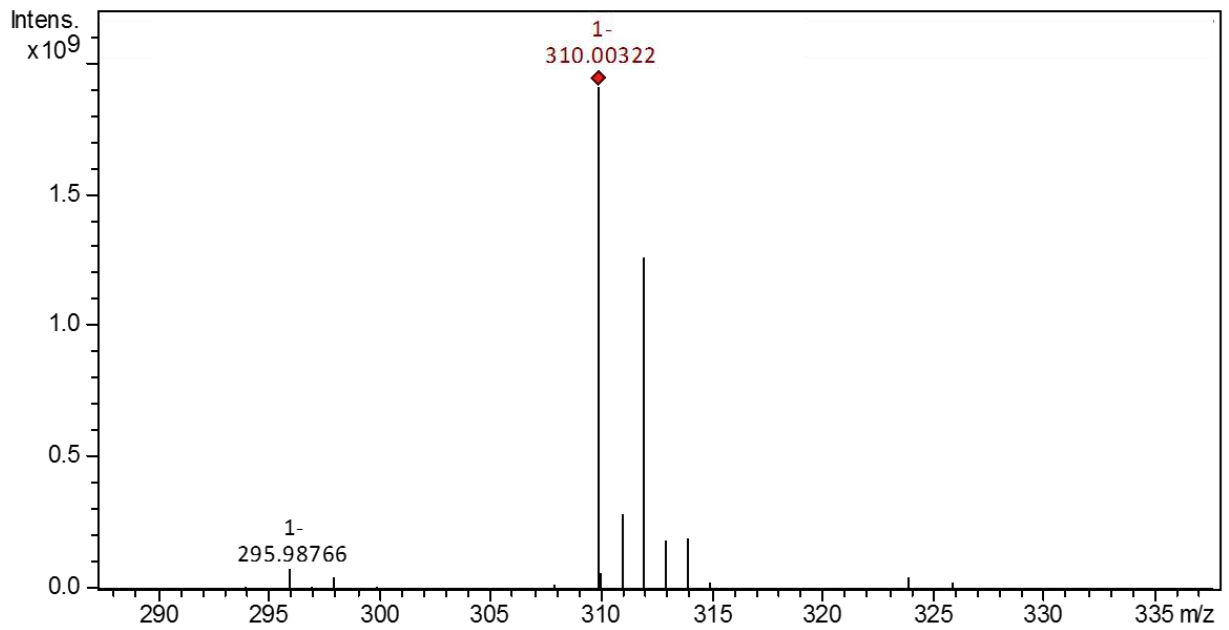


Рисунок 7 – Масс-спектр продукта окисления 2с (m/z 310,0032)

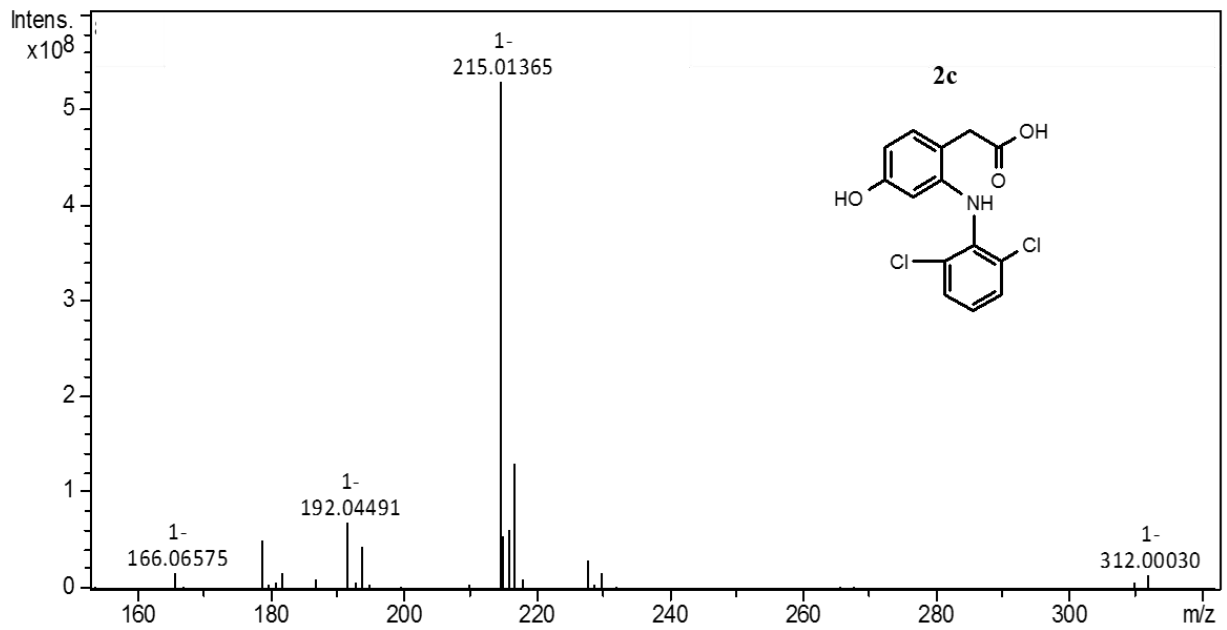


Рисунок 8 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 310,0032 и его структура

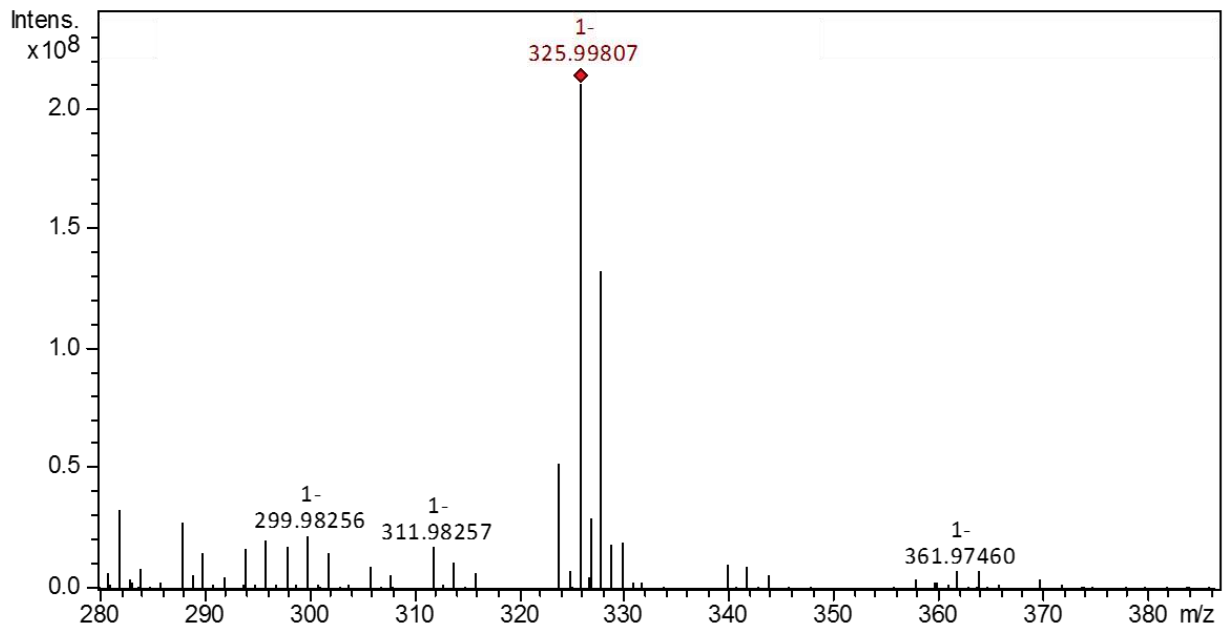


Рисунок 9 – Масс-спектр продукта окисления 2d (m/z 325,9980)

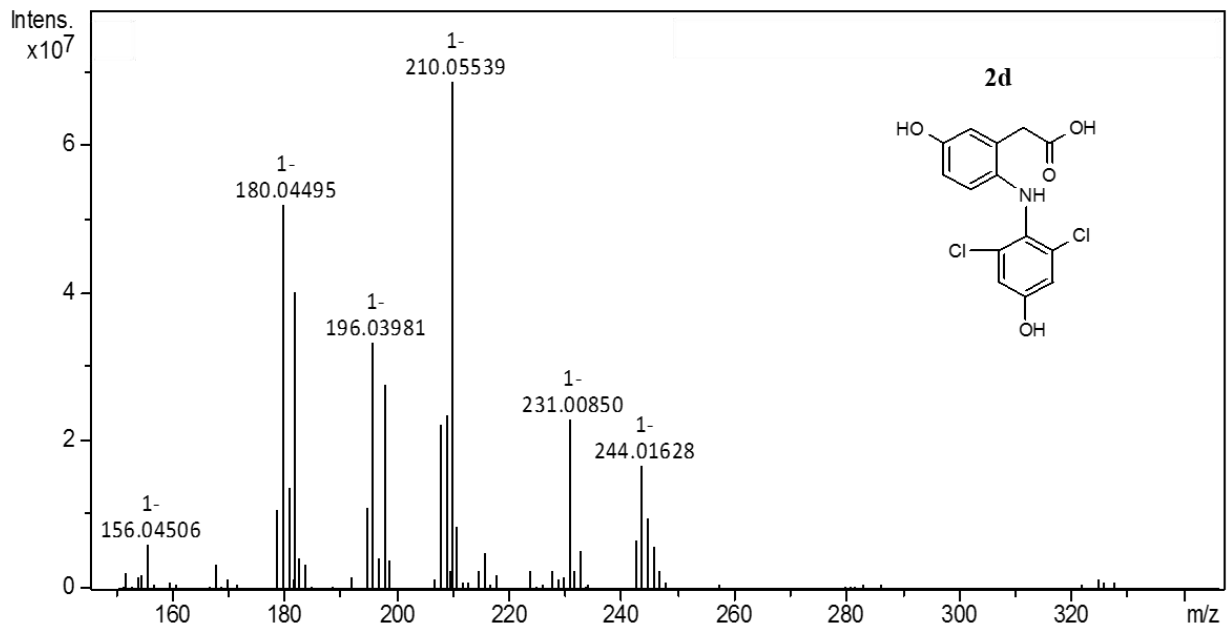


Рисунок 10 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 325,9980 и его структура

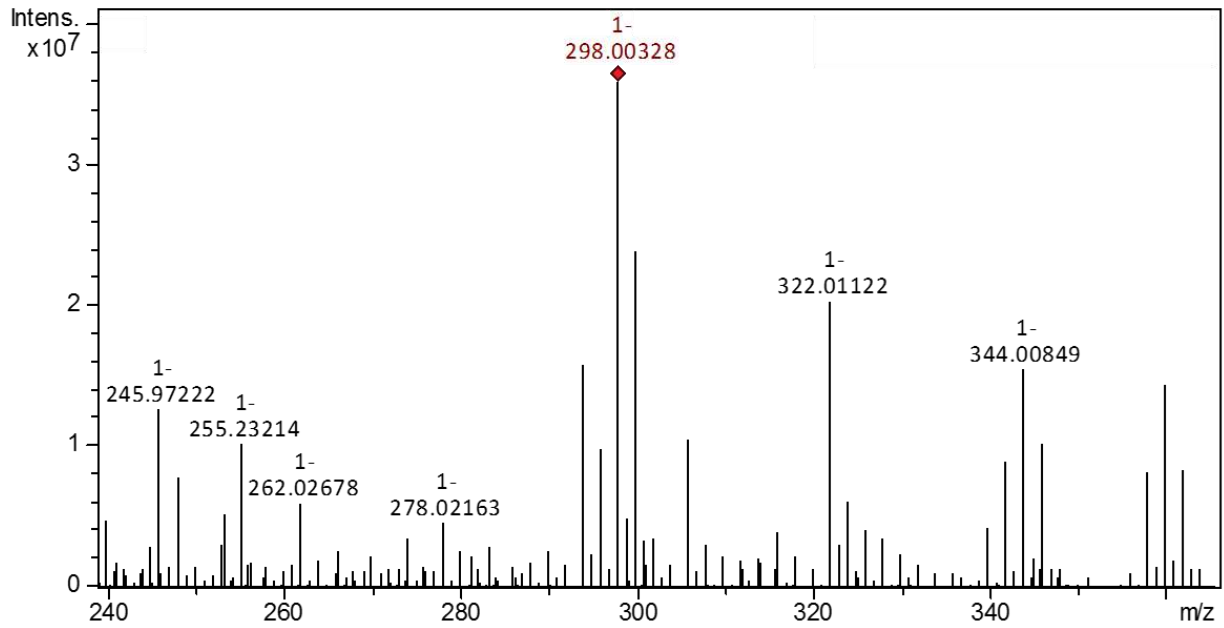


Рисунок 11 – Масс-спектр продукта окисления 2e (m/z 298,0032)

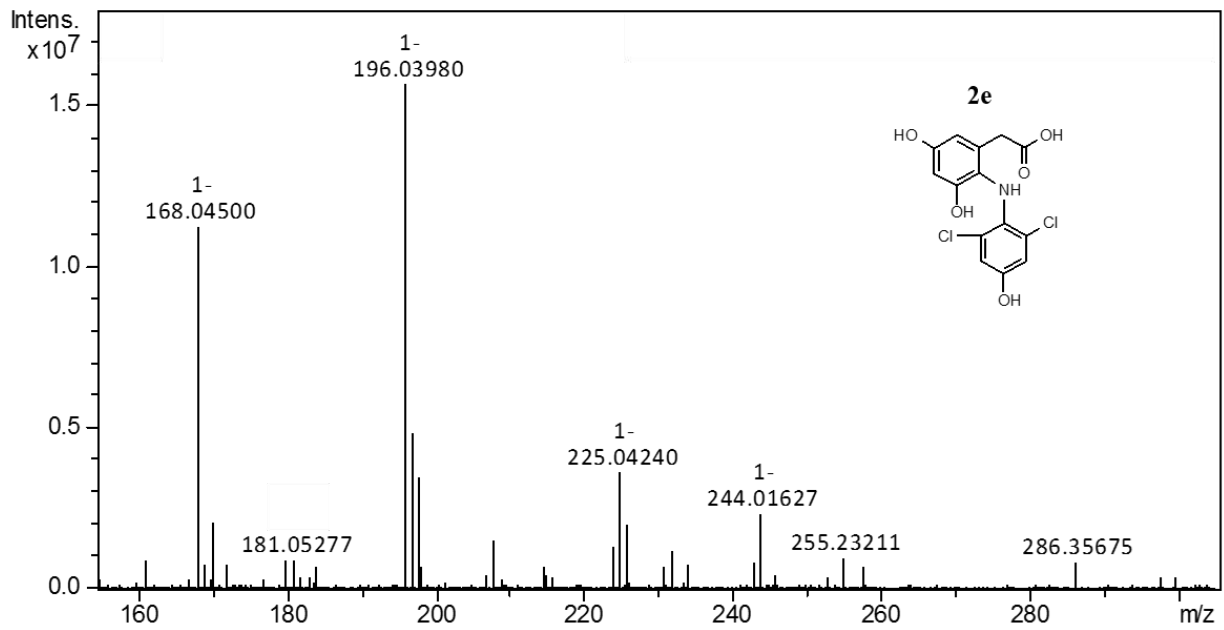


Рисунок 12 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 298,0032 и его структура

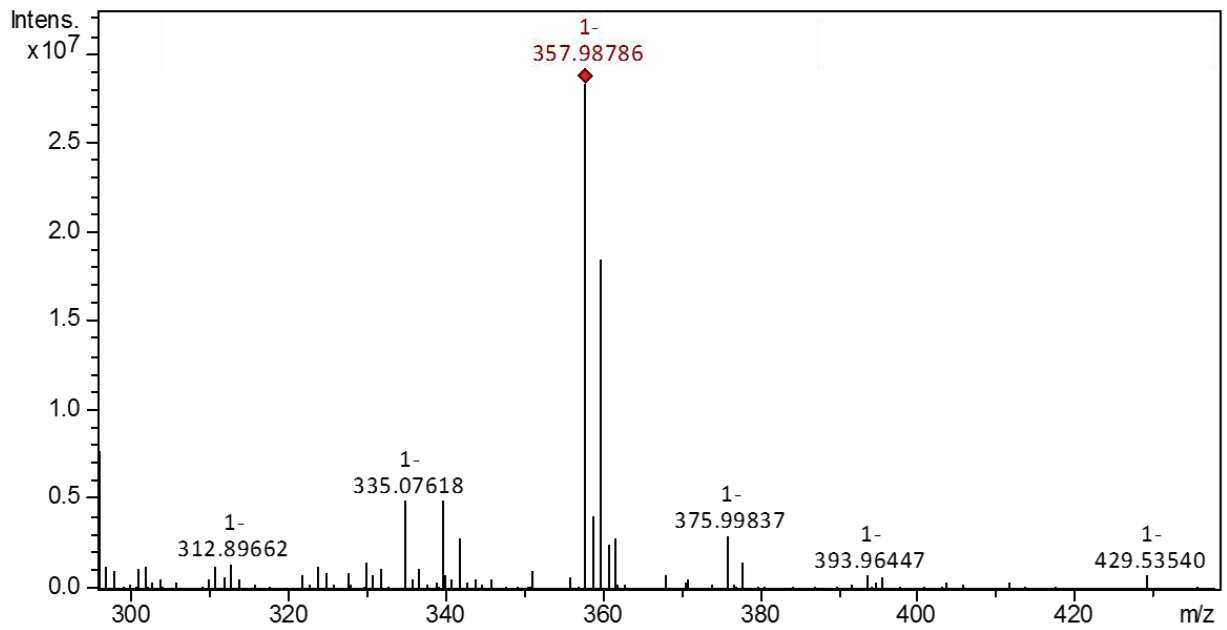


Рисунок 13 – Масс-спектр продукта окисления 2f (m/z 357,9878)

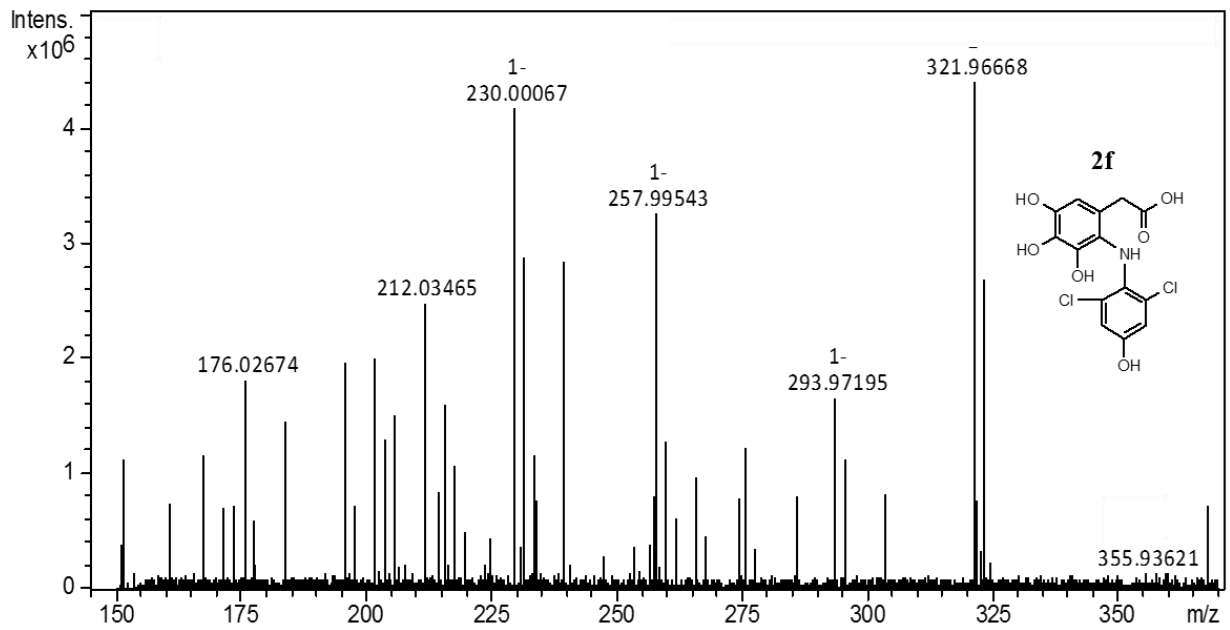


Рисунок 14 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 357,9878 и его структура

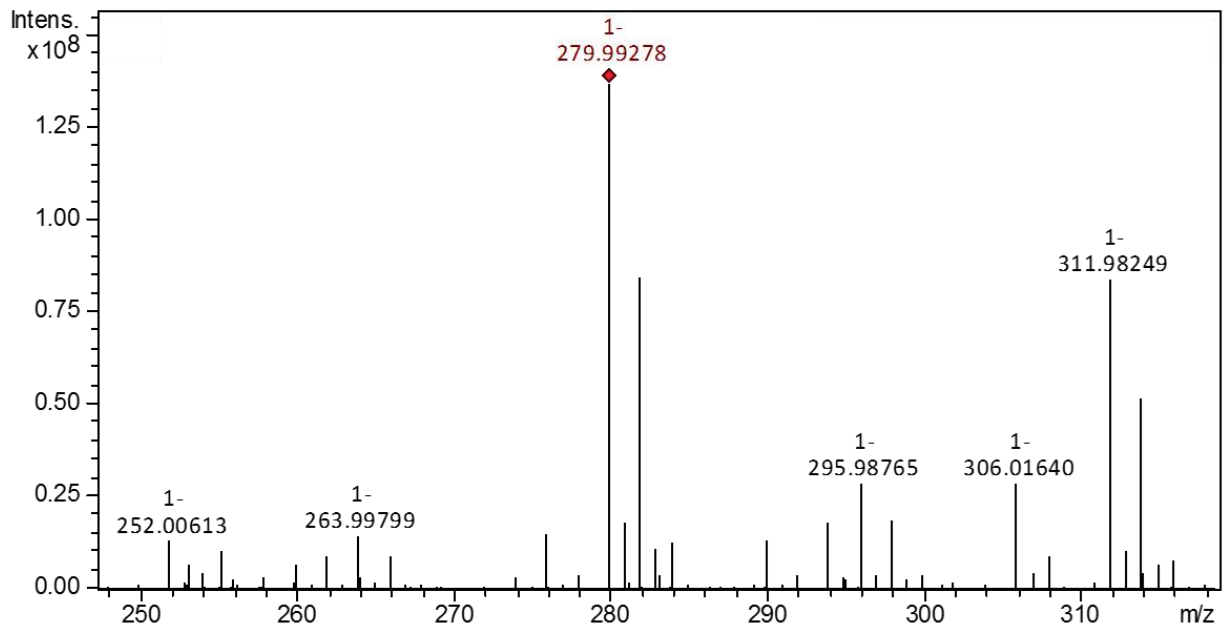


Рисунок 15 – Масс-спектр продукта окисления 2g (m/z 279,9927)

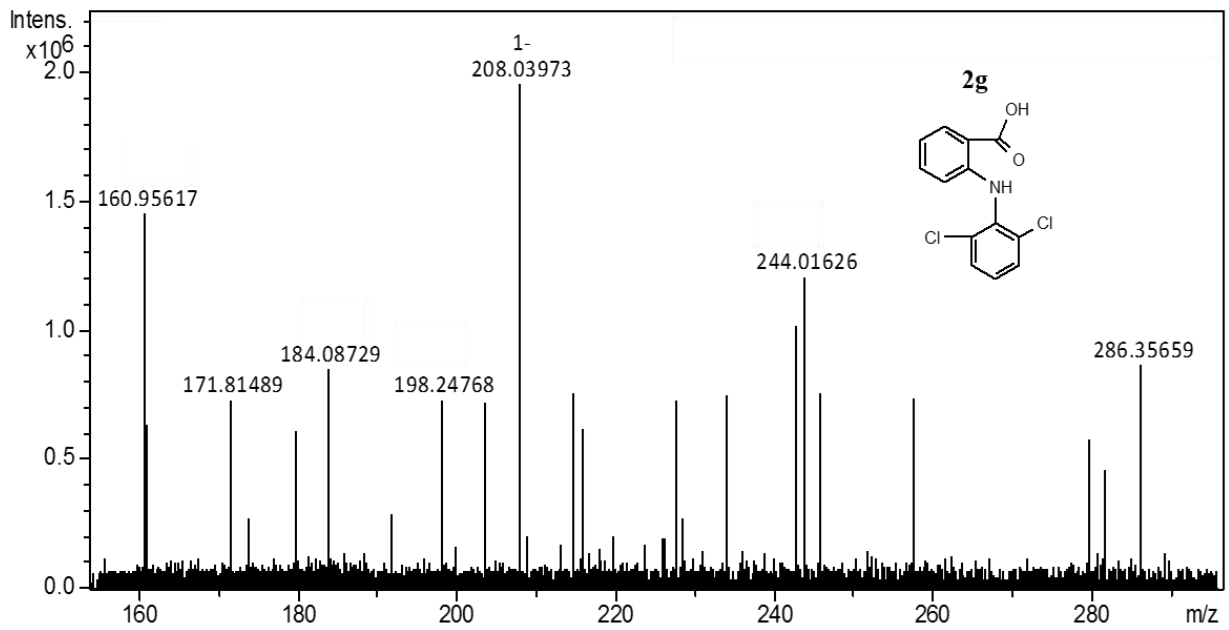


Рисунок 16 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 279,9927 и его структура

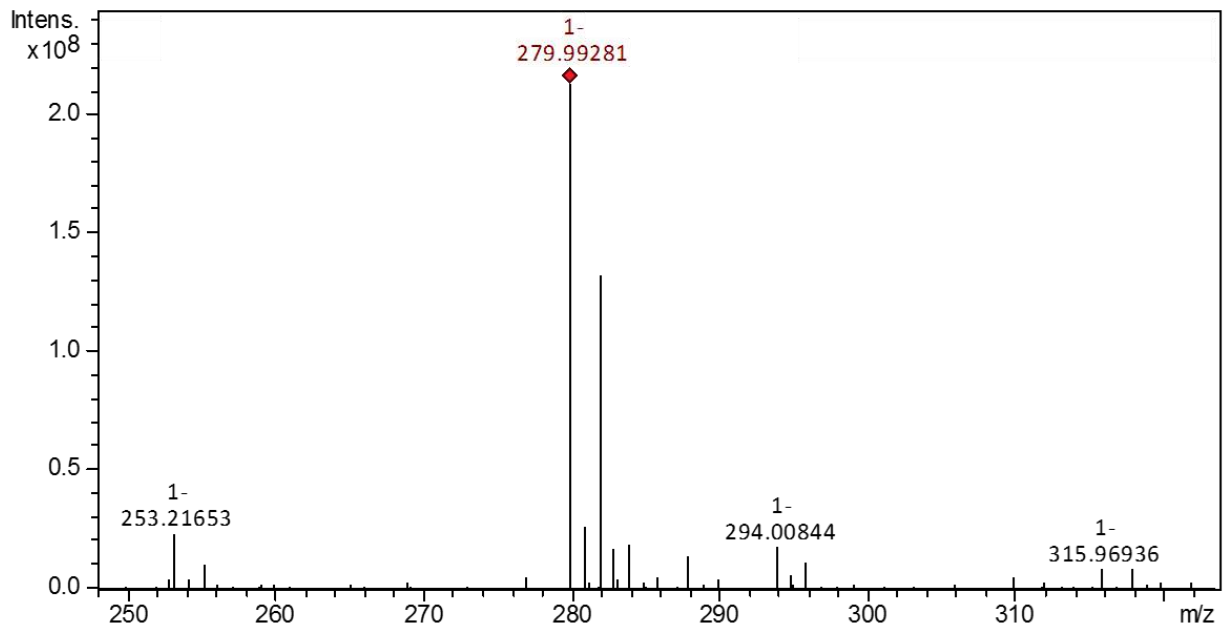


Рисунок 17 – Масс-спектр продукта окисления 2h (m/z 279,9928)

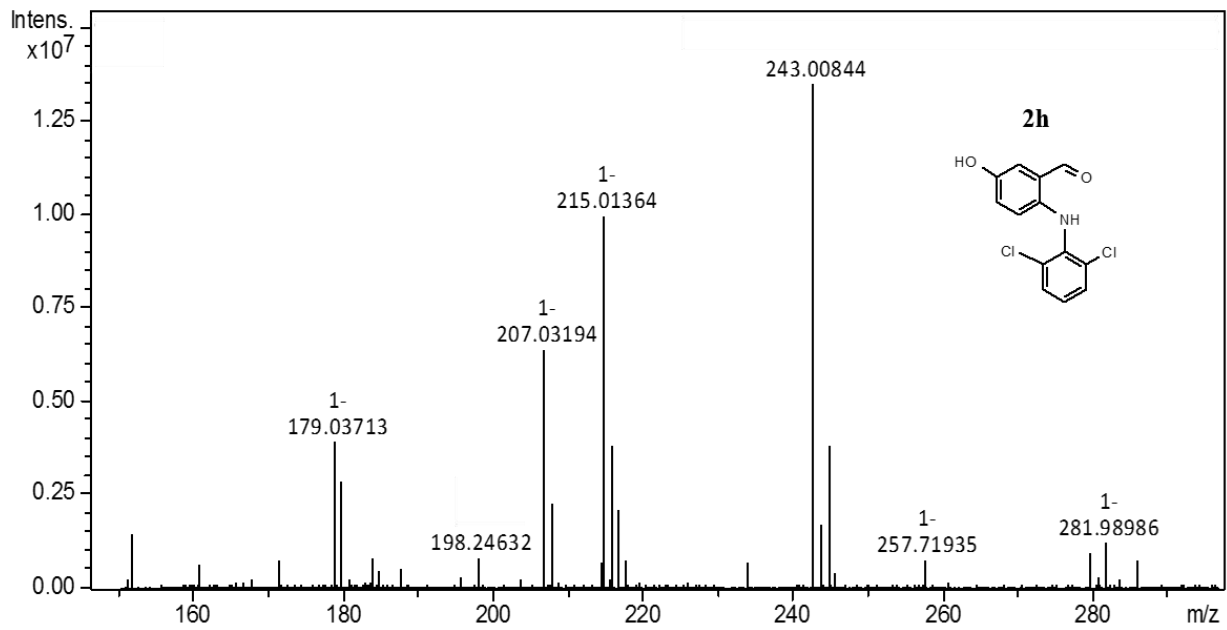


Рисунок 18 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 279,9928 и его структура

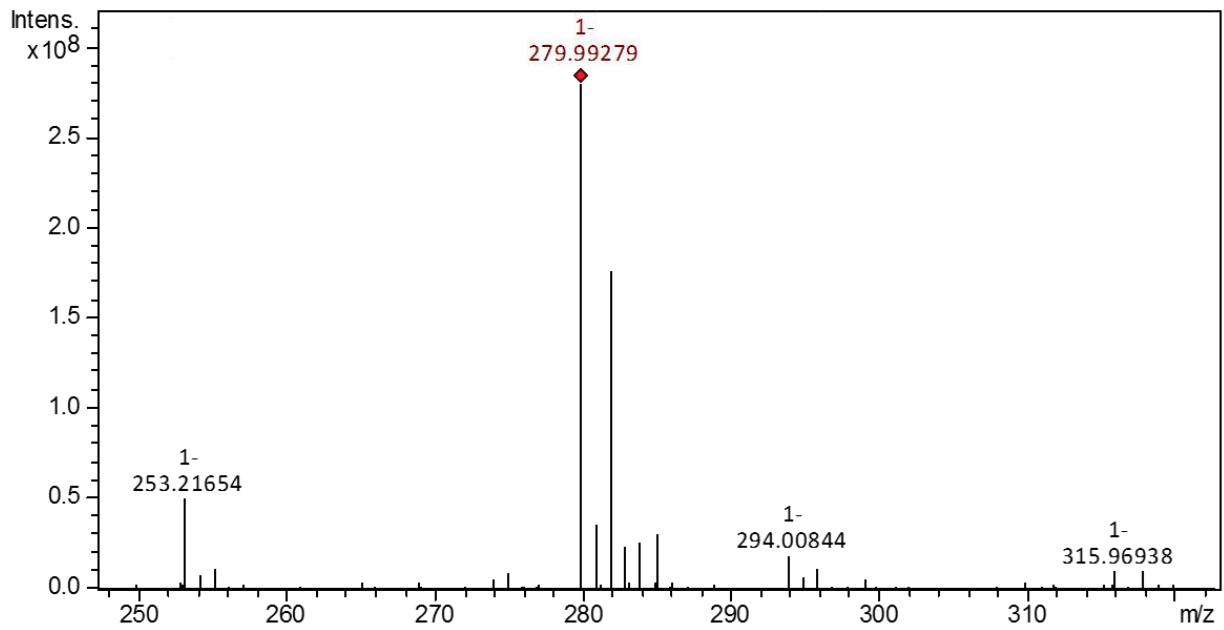


Рисунок 19 – Масс-спектр продукта окисления 2i (m/z 279,9927)

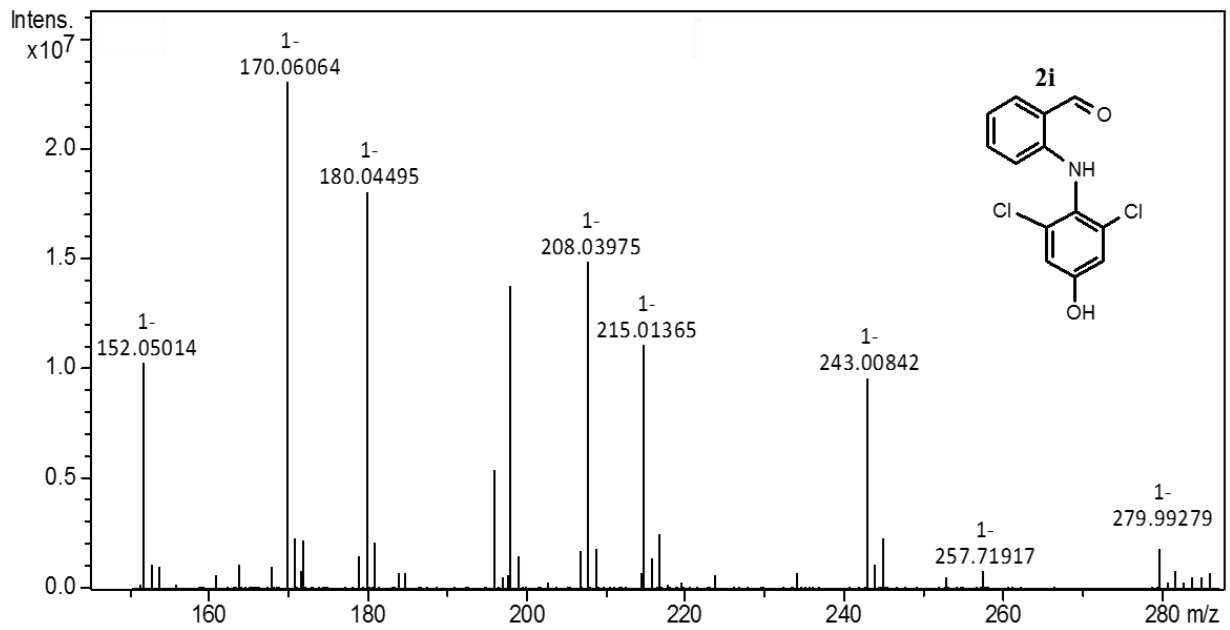


Рисунок 20 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 279,9927 и его структура

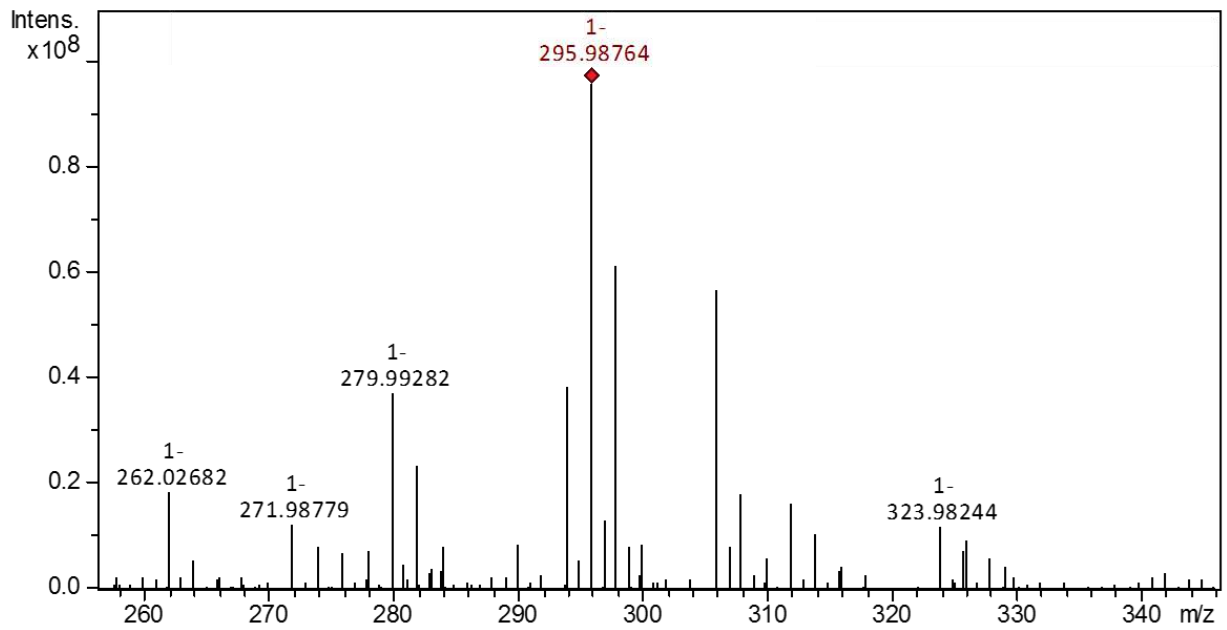


Рисунок 21 – Масс-спектр продукта окисления 2j (m/z 295,9876)

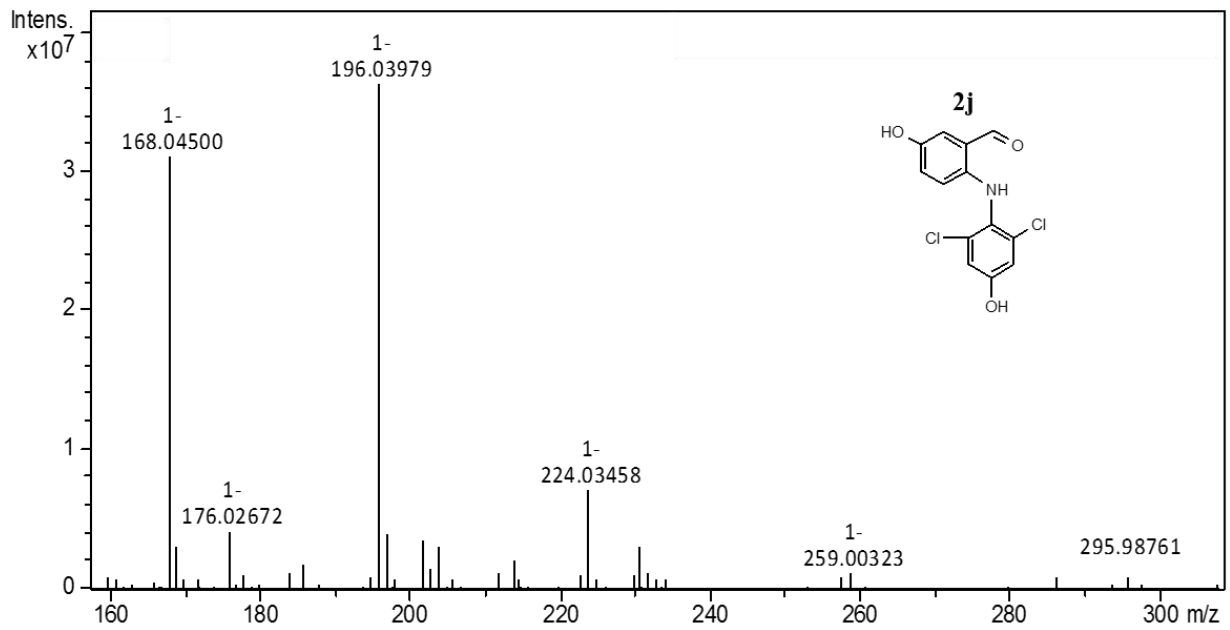


Рисунок 22 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 295,9876 и его структура

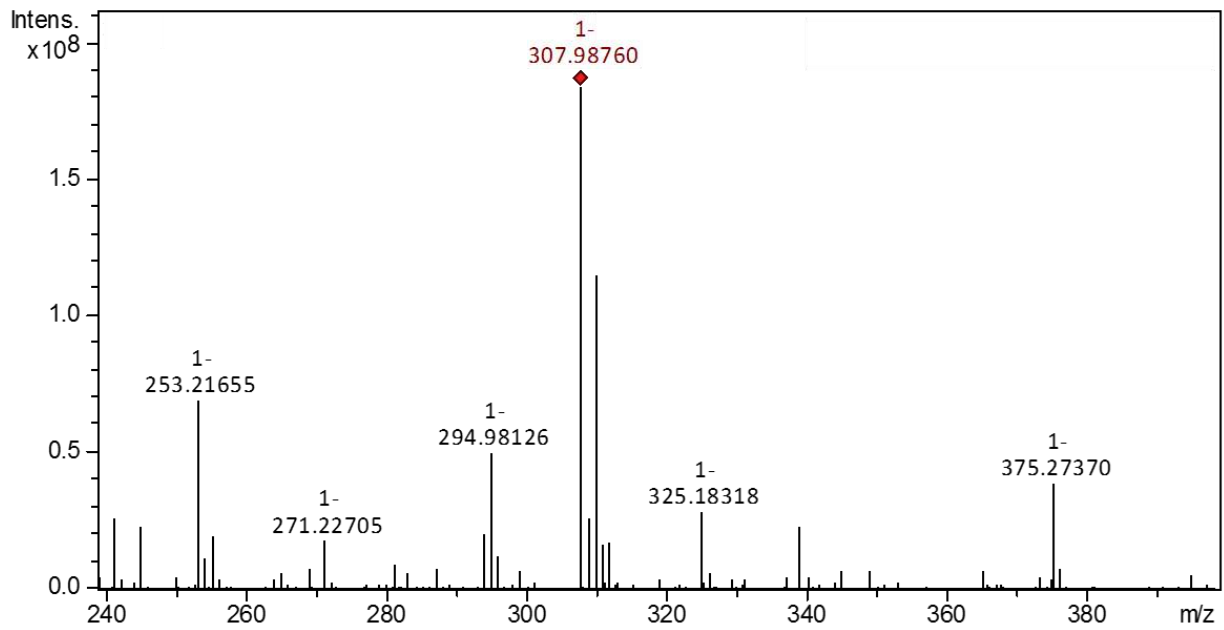


Рисунок 23 – Масс-спектр продукта окисления 3a (m/z 307,9876)

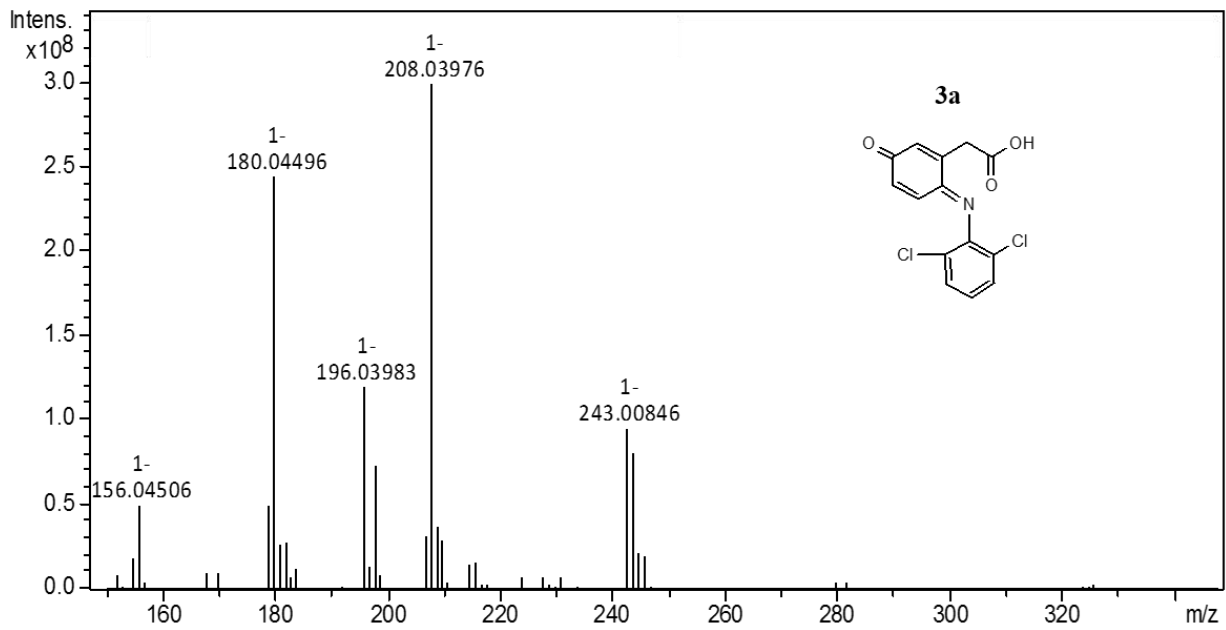


Рисунок 24 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 307,9876 и его структура

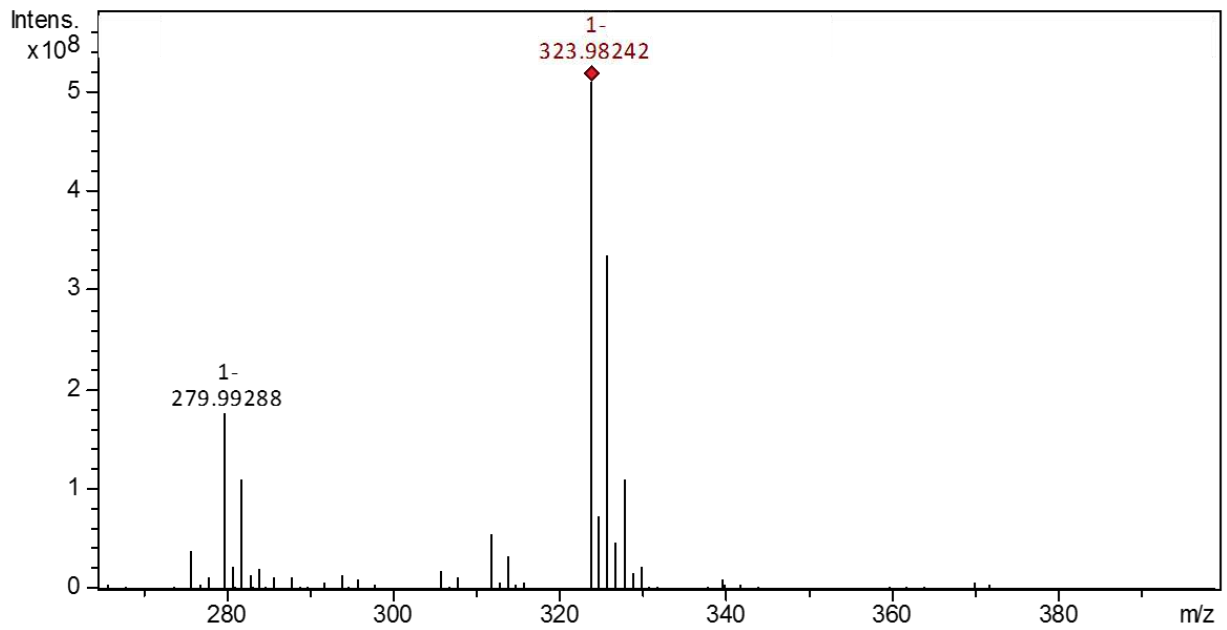


Рисунок 25 – Масс-спектр продукта окисления 3b (m/z 323,9824)

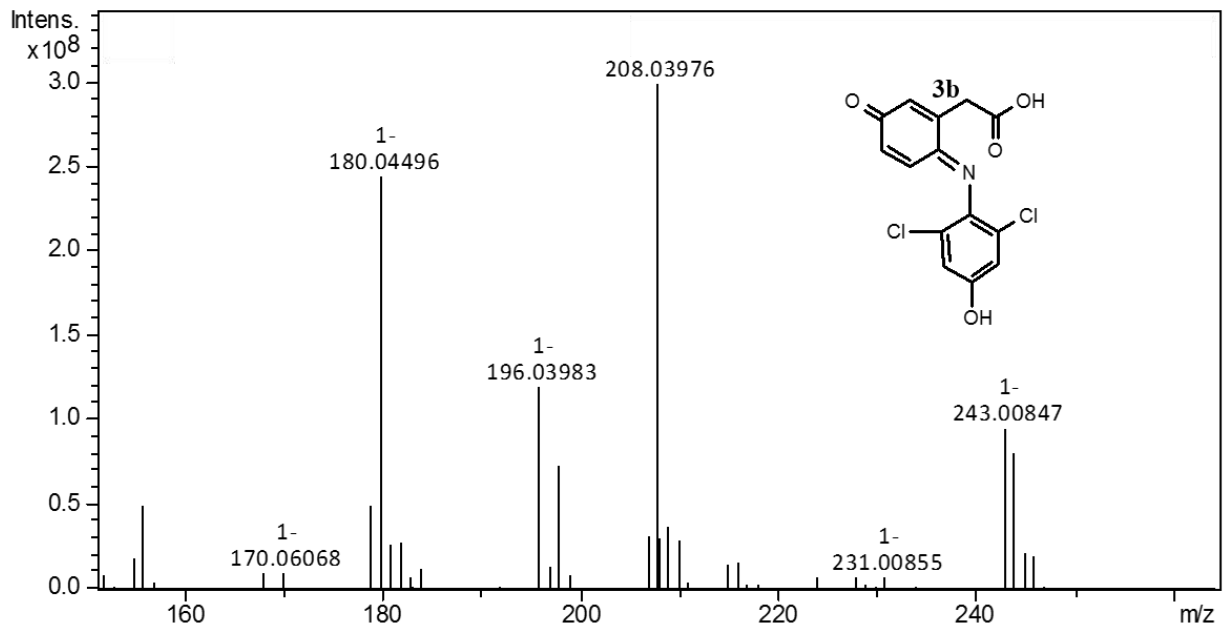


Рисунок 26 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 323,9824 и его структура

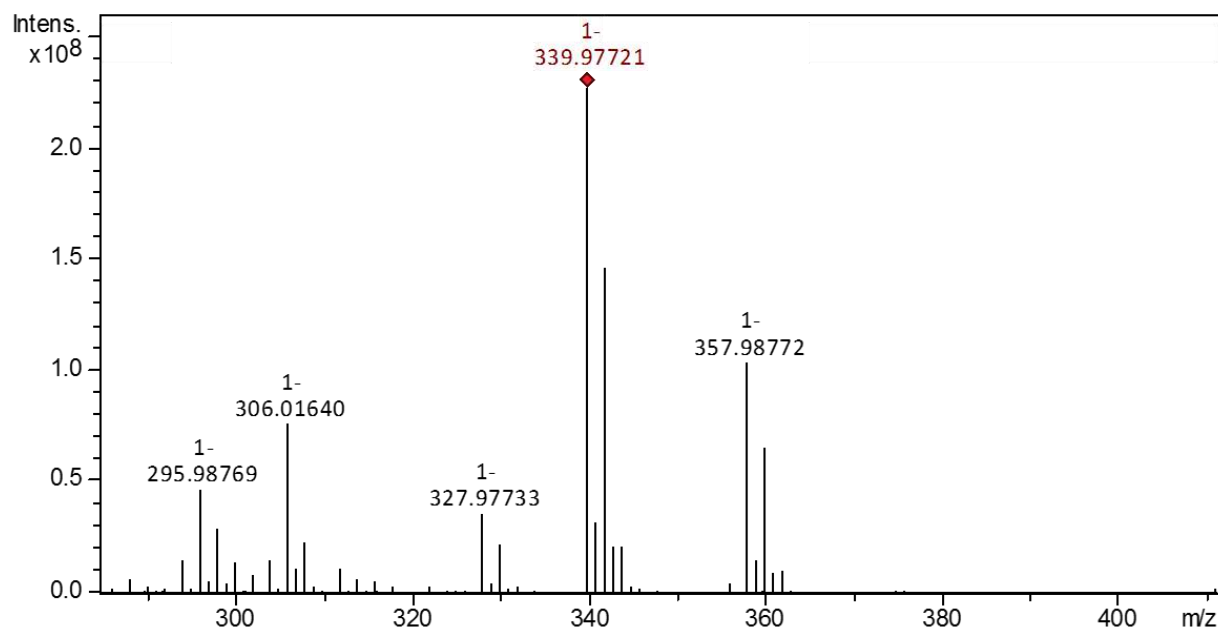


Рисунок 27 – Масс-спектр продукта окисления 3с (m/z 339,9772)

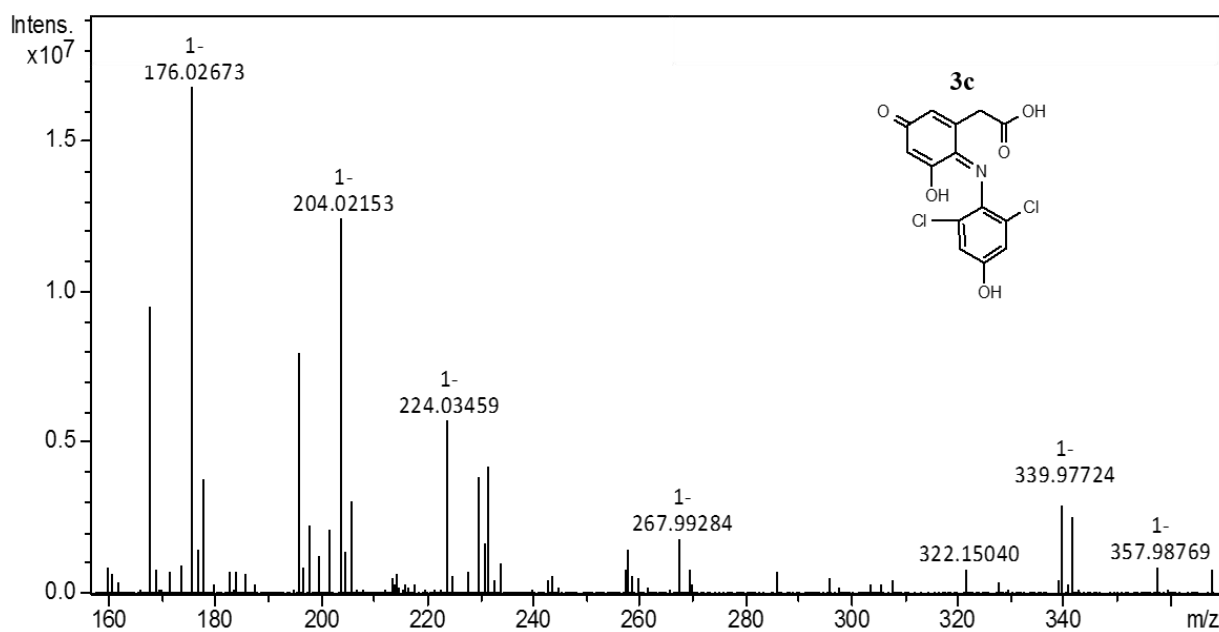


Рисунок 28 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 339,9772 и его структура

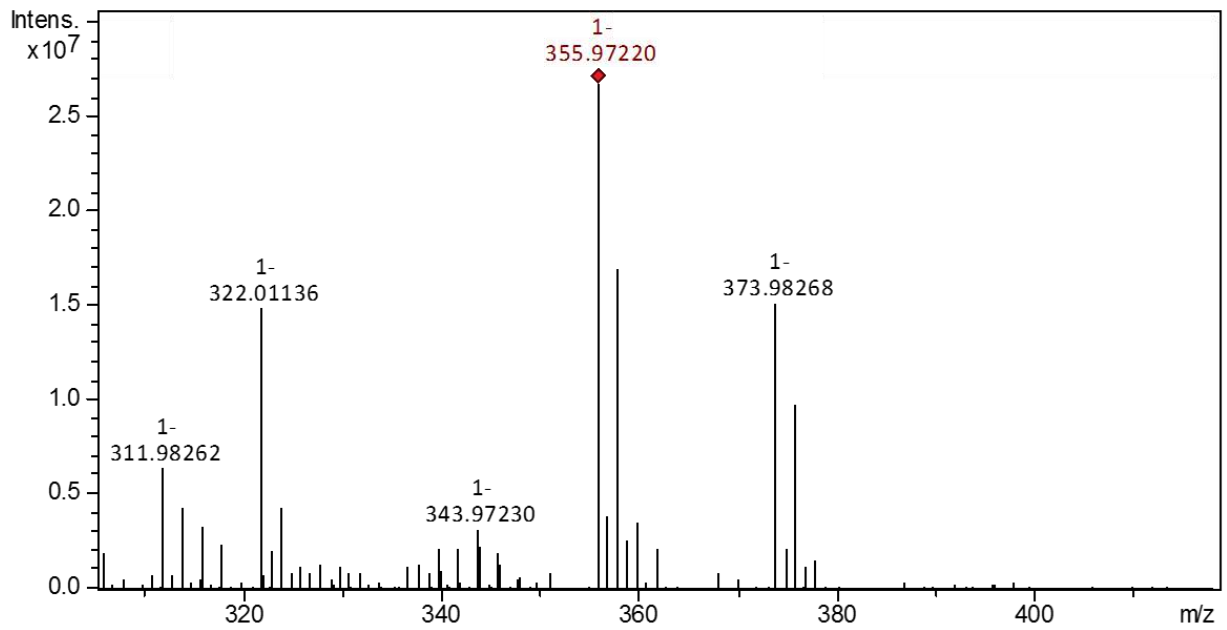


Рисунок 29 – Масс-спектр продукта окисления 3d (m/z 355,9722)

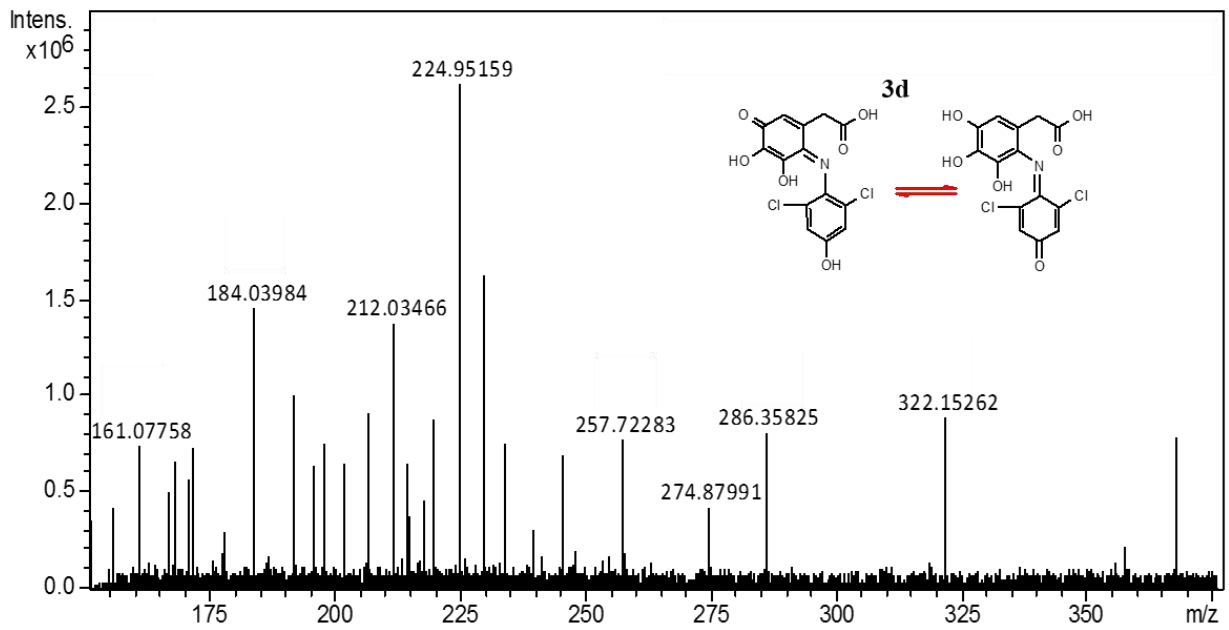
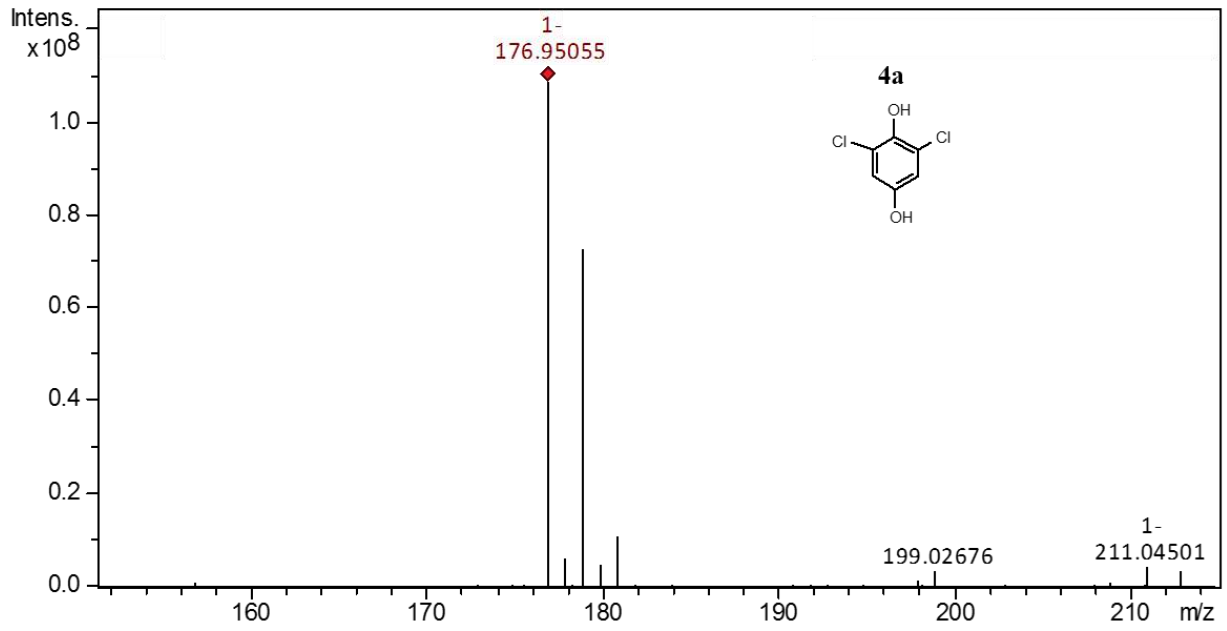
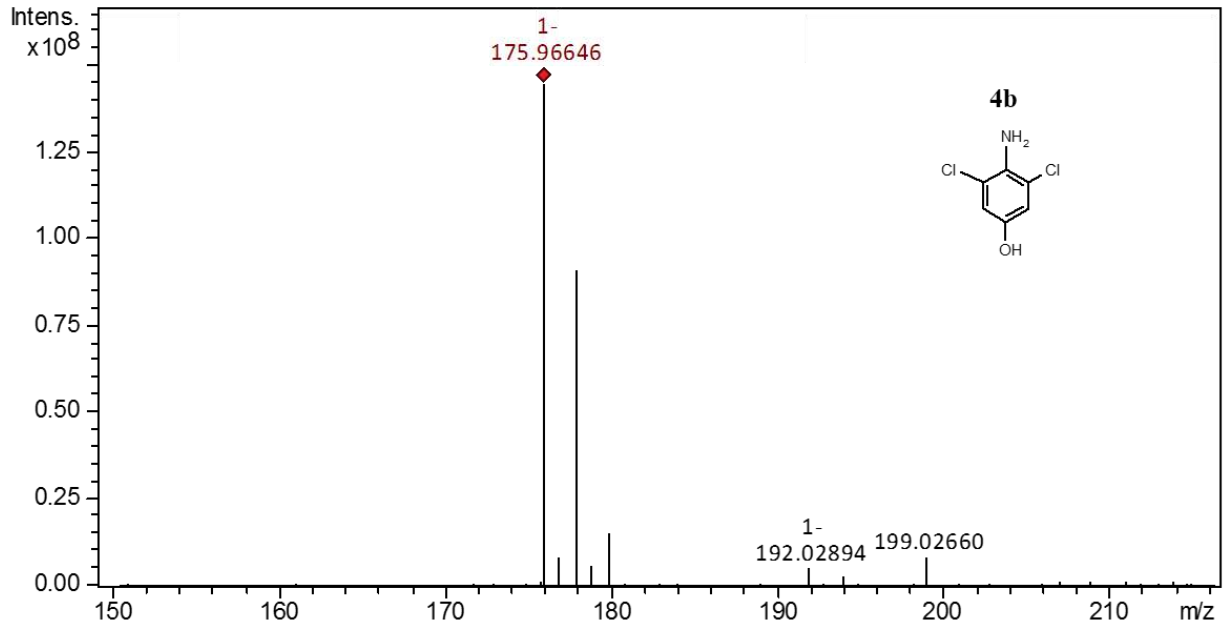


Рисунок 30 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 355,9722 и его структура

Рисунок 31 – Масс-спектр продукта окисления 4a (m/z 176,9505)Рисунок 32 – Масс-спектр продукта окисления 4b (m/z 175,9664)

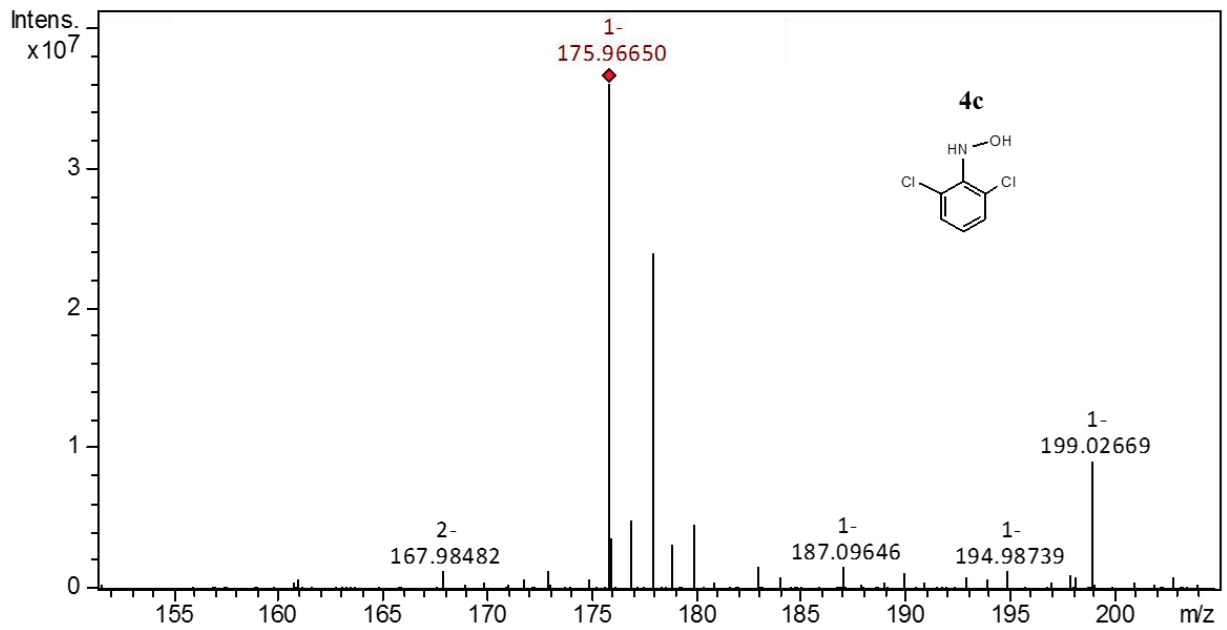


Рисунок 33 – Масс-спектр продукта окисления 4с (m/z 175,9665)

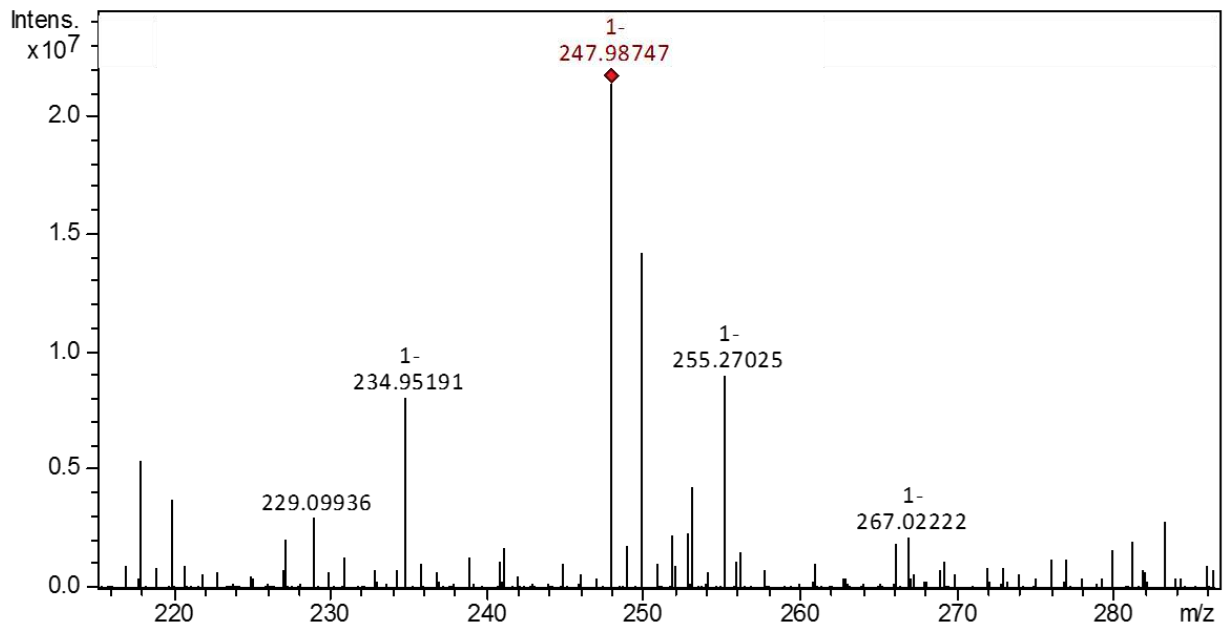


Рисунок 34 – Масс-спектр продукта окисления 4d (m/z 247,9874)

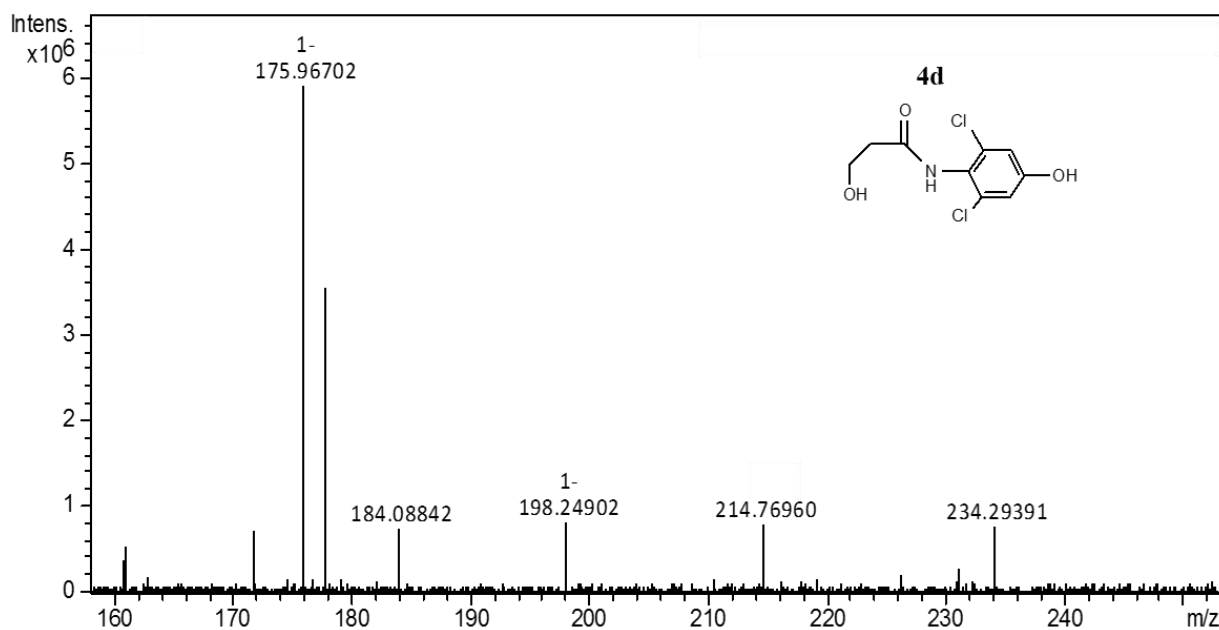


Рисунок 35 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 247,9874 и его структура

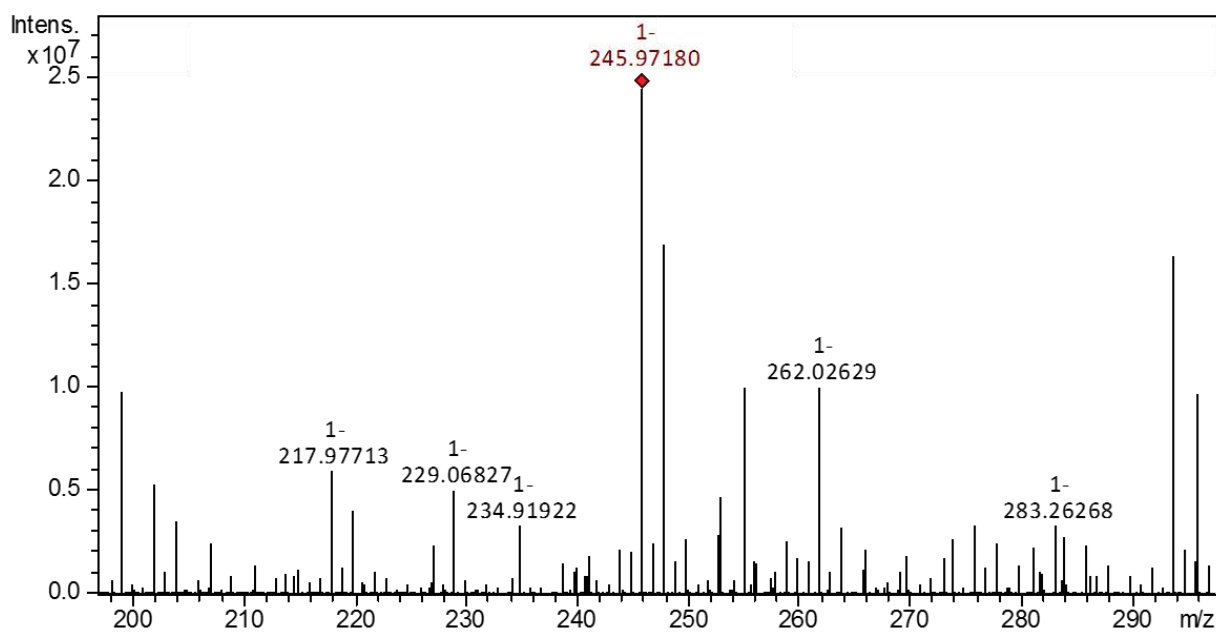


Рисунок 36 – Масс-спектр продукта окисления 4e (m/z 245,9718)

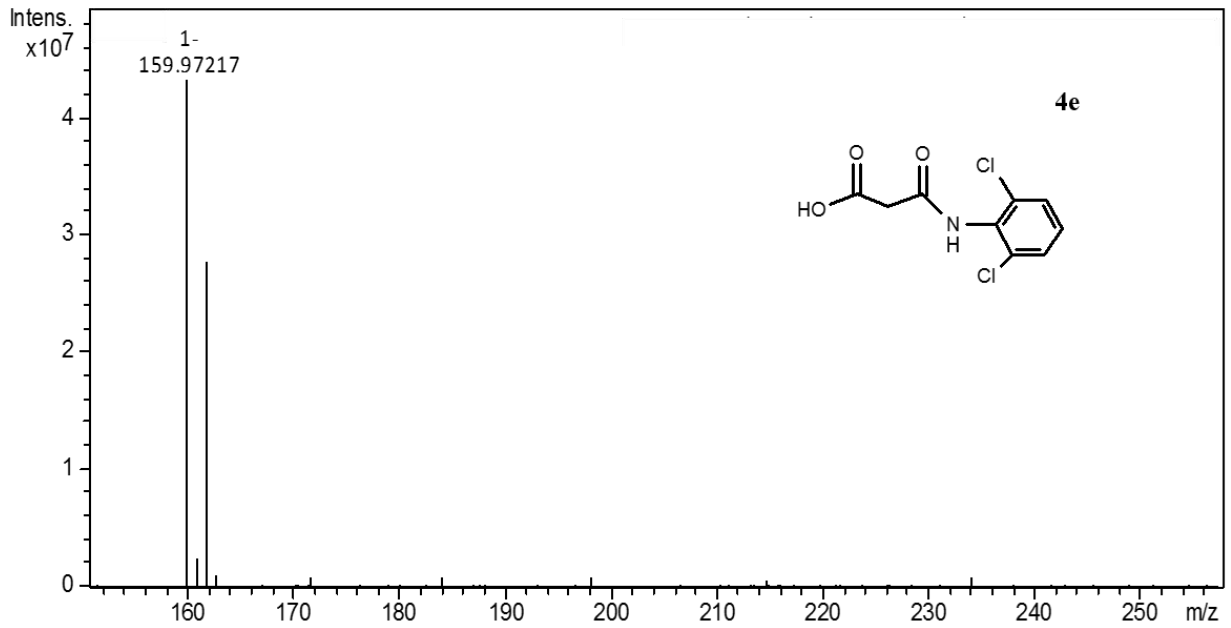


Рисунок 37 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 245,9718 и его структура

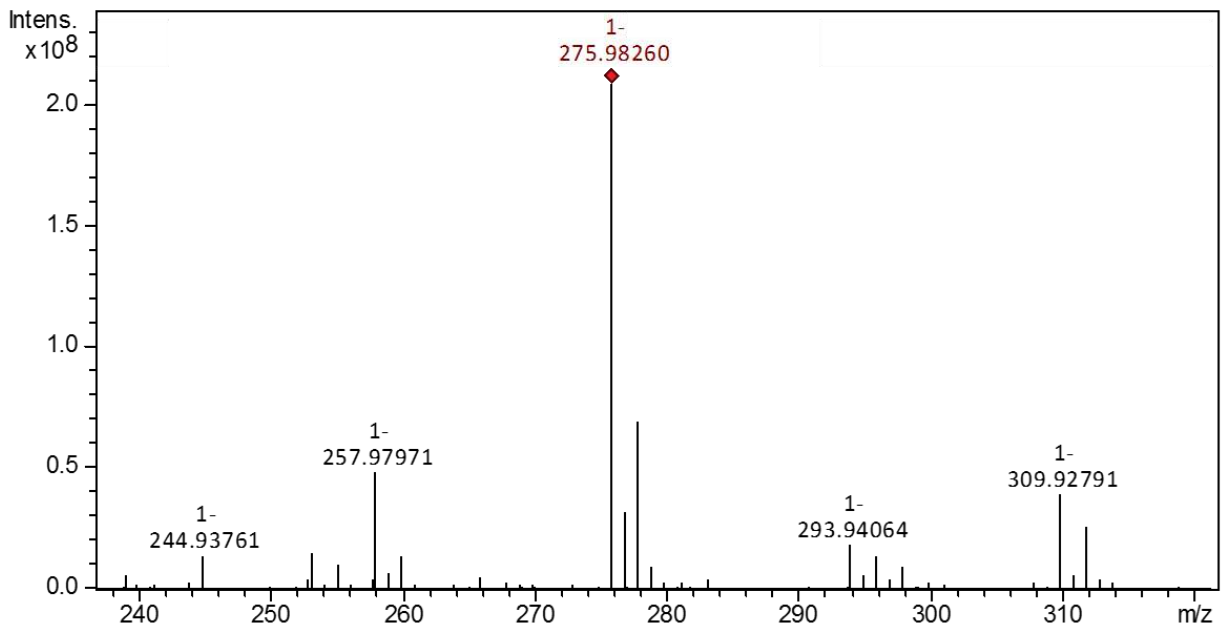


Рисунок 38 – Масс-спектр продукта окисления **4f** (m/z 275,9826)

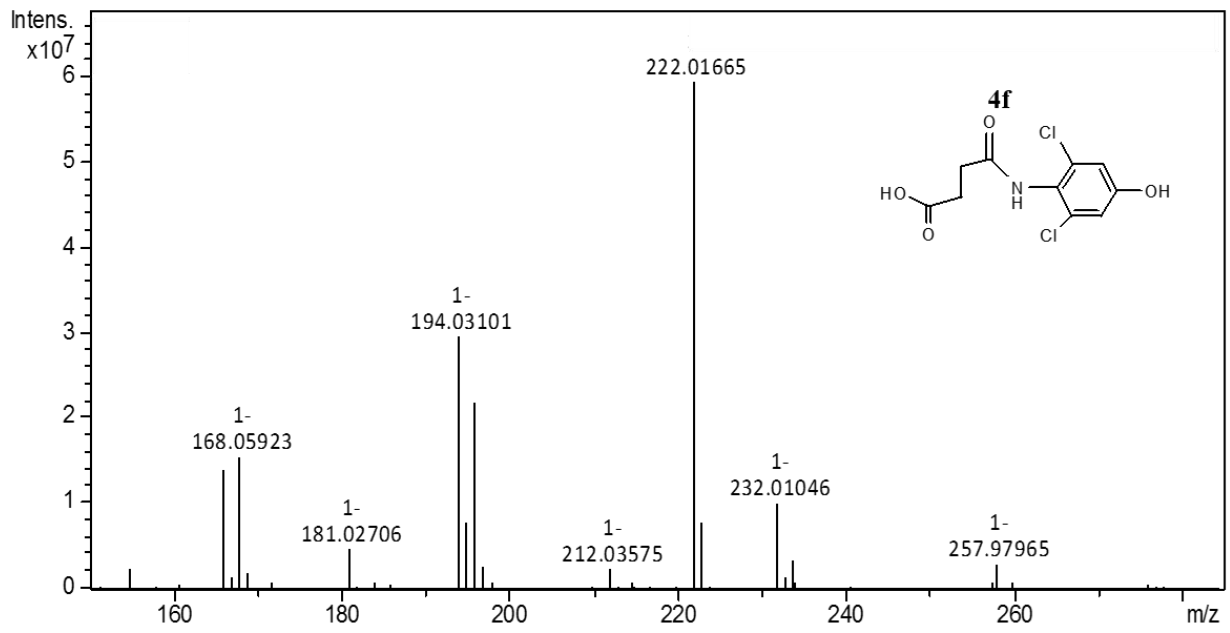


Рисунок 39 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 275,9826 и его структура

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

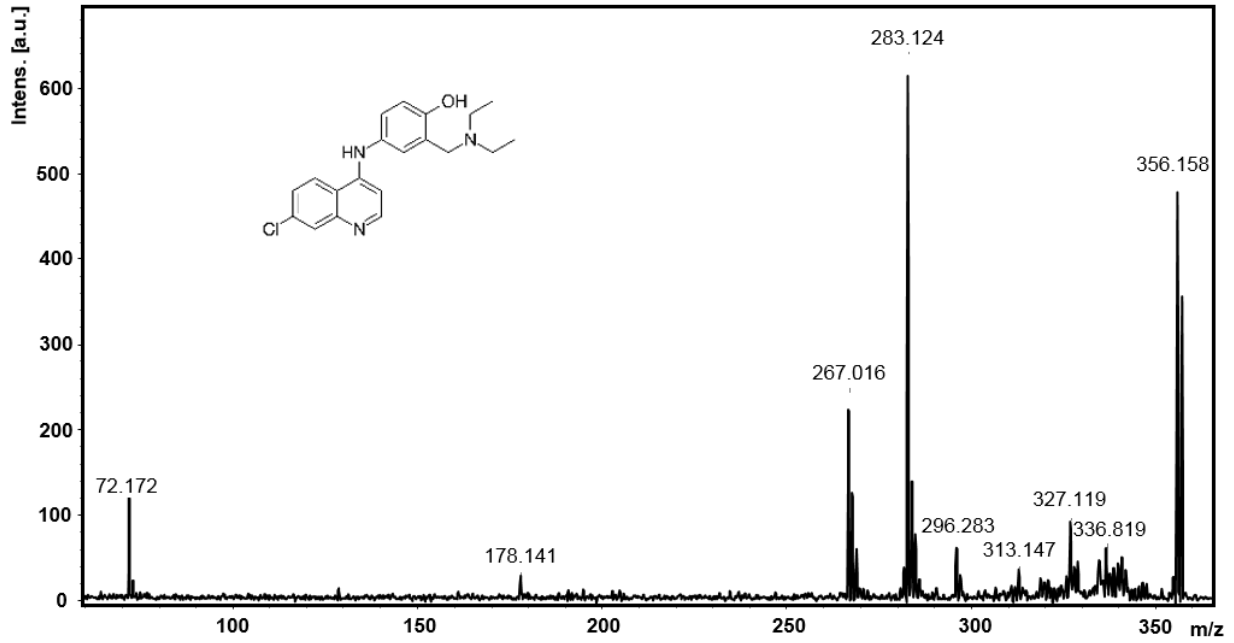


Рисунок 1 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 356,158 (амодиахин) и его структура

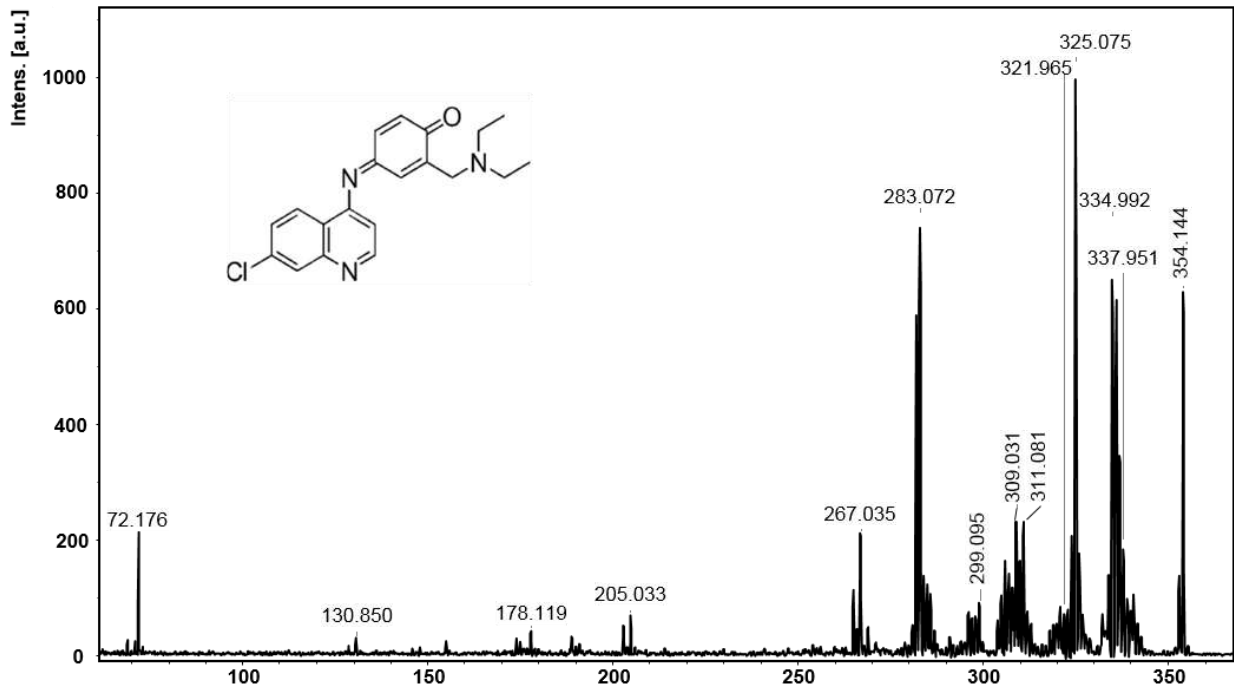


Рисунок 2 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 354,144 (M1) и его структура

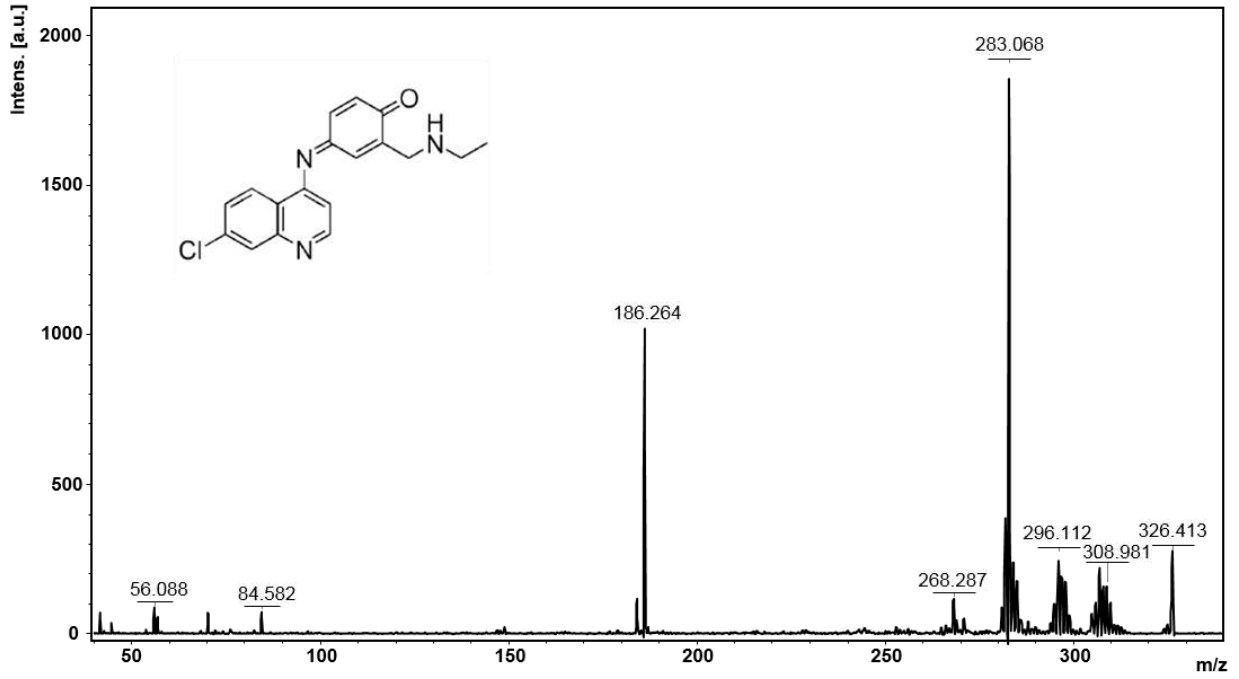


Рисунок 3 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 326,413 (M2) и его структура

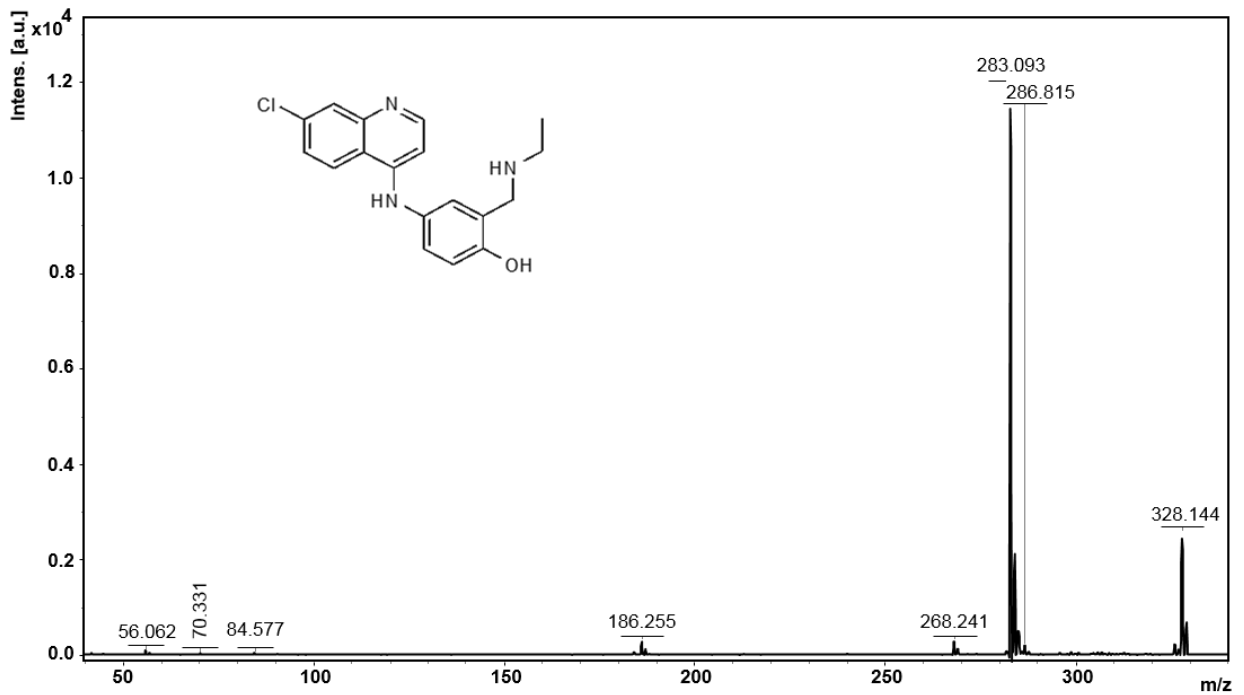


Рисунок 4 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 328,144 (M3) и его структура

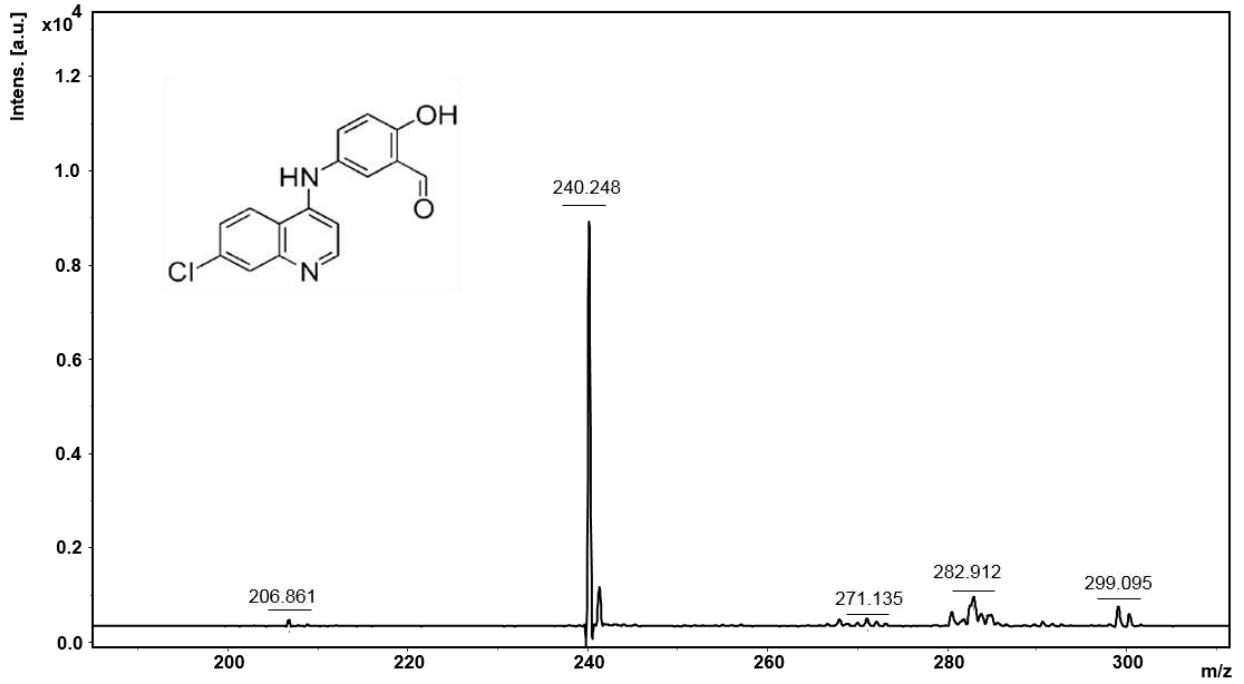


Рисунок 5 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 299,095 (M4) и его структура

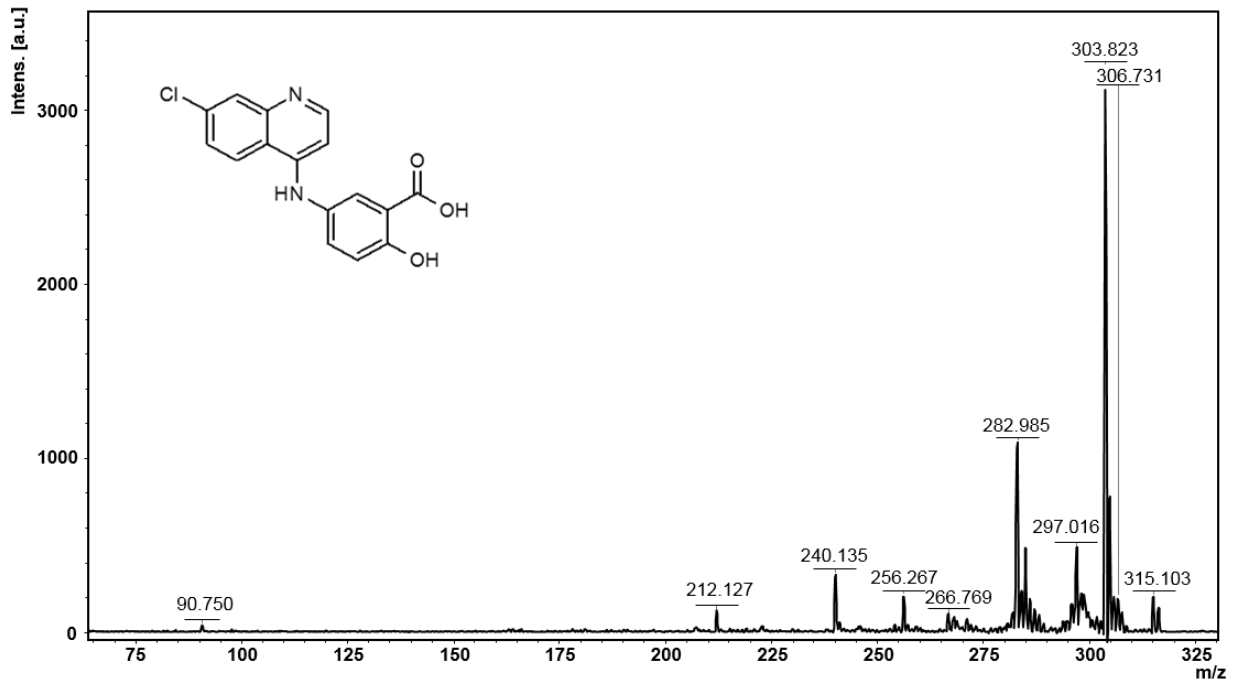


Рисунок 6 – Фрагментный масс-спектр иона-предшественника m/z 315,103 (M5) и его структура

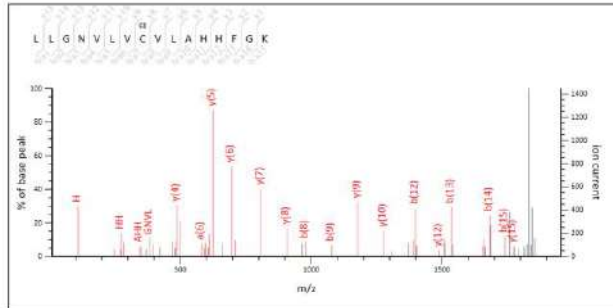
ПРИЛОЖЕНИЕ В

А

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LLGNVLVCVLAHHFGK**
 Found in **HBB_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 Match to Query 1: 1885.965724 from(1856.973000,1+) index(0)
 Data file DATA.TXT



Б

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LLGNVLVCVLAHHFGK**
 Found in **HBB_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 Match to Query 1: 1919.865724 from(1920.973000,1+) index(0)
 Data file DATA.TXT

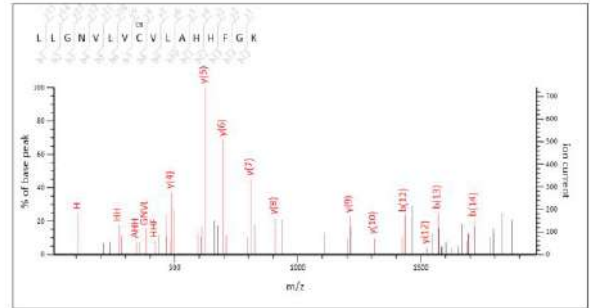


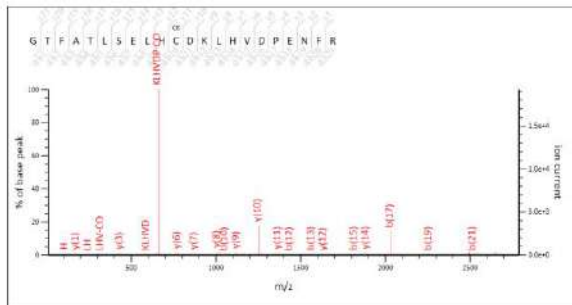
Рисунок 1 – Протокол идентификации пептида LLGNVLVC_XAnVLAHHFGK бета субъединицы глобина человека, модифицированного по C-112 Cl-1 (А), Cl-2 (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

А

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **GTFATLSELHC_XAnDKLHVDPENFR**
 Found in **HBB_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 Match to Query 1: 2698.224924 from(2696.232200,1+) index(0)
 Data file DATA.TXT



Б

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **GTFATLSELHC_XAnDKLHVDPENFR**
 Found in **HBB_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 Match to Query 1: 2729.186024 from(2730.193300,1+) index(0)
 Data file DATA.TXT

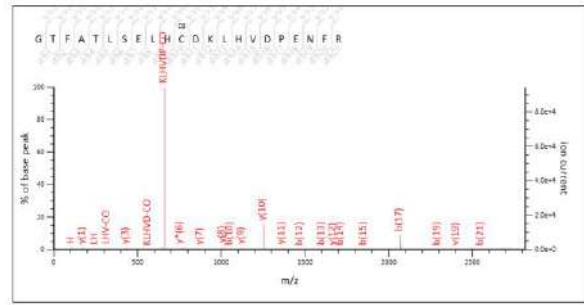


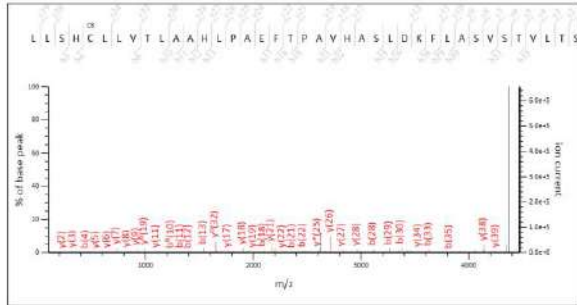
Рисунок 2 – Протокол идентификации пептида GTFATLSELHC_XAnDKLHVDPENFR бета субъединицы глобина человека, модифицированного по C-93 Cl-1 (А), Cl-2 (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

A

MASCOT SEARCH RESULTS

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LLSHC_αLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT_{SK}**
 Found in **HBA_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBA1 PE=1 SV=2
 Match to Query 30116: 4367.316870 from (874.470690,5+) intensity(1383828.0000) rtinseconds(333),23 rawscore(30260,30265) index(26373)
 Title: Cmpd 26382, -MS2(874.4706), 38.4eV, 55.5min, 1/K0=1.050, #30265
 Data file DATA.TXT



MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

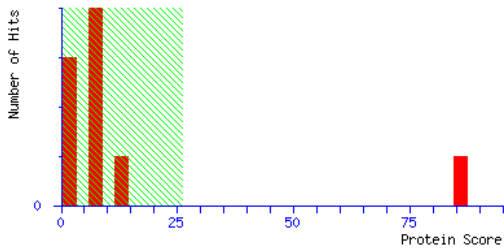
Database : SwissProt 2020_03 (562755 sequences; 202599198 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (20369 sequences)
 Protein hits: [HBB HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
[ZN137 HUMAN](#) Putative zinc finger protein 137 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF137P PE=5 SV=1
[ACSM3 HUMAN](#) Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACSM3 PE=1 SV=2
[SC5A2 HUMAN](#) Sodium/glucose cotransporter 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SLC5A2 PE=1 SV=1
[ELAP1 HUMAN](#) Endosome/lysosome-associated apoptosis and autophagy regulator 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAPOR1 PE=1 SV=2
[RNZ1 HUMAN](#) Zinc phosphodiesterase ELAC protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELAC1 PE=1 SV=2
[KPCD3 HUMAN](#) Serine/threonine-protein kinase D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRKD3 PE=1 SV=1
[ECHB HUMAN](#) Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HADHB PE=1 SV=3
[CSN4 HUMAN](#) COP9 signalosome complex subunit 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COP54 PE=1 SV=1

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : [AQ-M1-73 \(C\)](#)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 50 ppm
 Fragment Mass Tolerance : ± 0.5 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF
 Number of queries : 1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 26 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



1. [HBB HUMAN](#) Mass: 15988 Score: 86 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) ppm Miss Score Expect Rank Unique Peptide
 1 1999.9900 1998.9827 1999.0058 -11.53 0 86 5.5e-008 1 U R.LLGNVLVQVLAHHFGK.E + AQ-M1-73 (C)

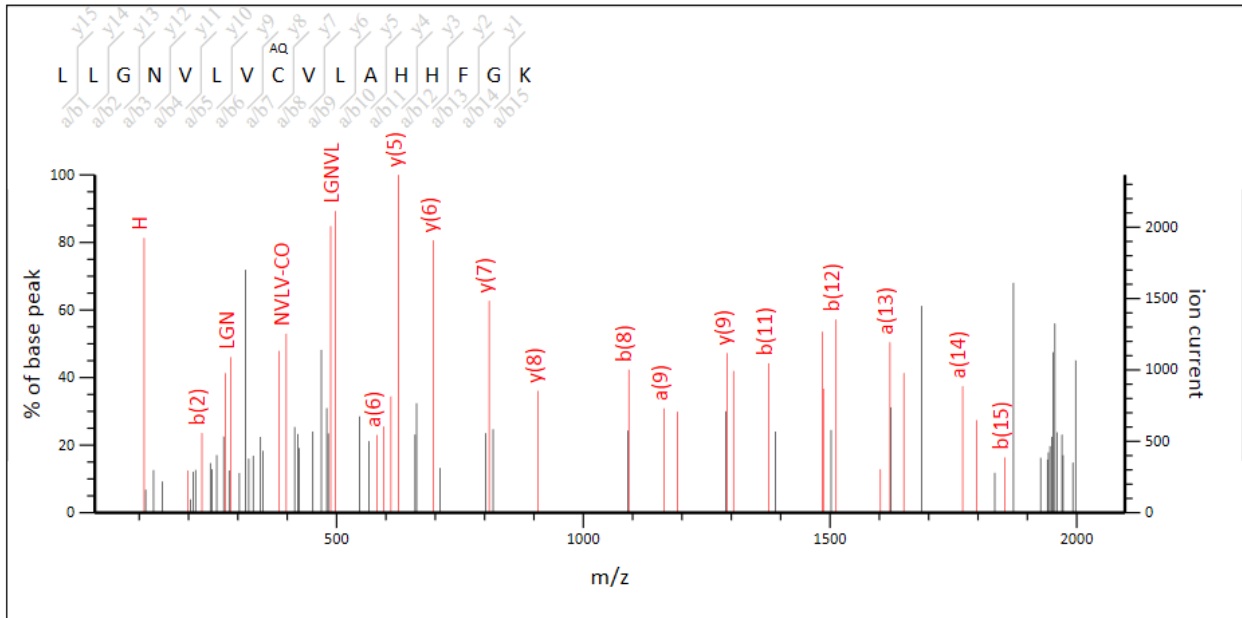
Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LLGNVLCVLAHHFGK**

Found in **HBB_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2

Match to Query 1: 1998.982724 from(1999.990000,1+) index(0)

Data file DATA.TXT



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1999.0058

Variable modifications:

C8 : AQ-M1-73 (C)

Ions Score: 86 Expect: 5.5e-008

Matches : 41/218 fragment ions using 47 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	b	b*	d	Seq.	v	w	y	y*	#
1	86.0964	86.0964		114.0913		44.0495	L					16
2	86.0964	199.1805		227.1754		157.1335	L	1828.8507	1827.8555	1886.9290	1869.9024	15
3	30.0338	256.2020		284.1969			G			1773.8449	1756.8184	14
4	87.0553	370.2449	353.2183	398.2398	381.2132	327.2391	N	1657.7863	1656.7911	1716.8234	1699.7969	13
5	72.0808	469.3133	452.2867	497.3082	480.2817	455.2976	V	1558.7179	1571.7383	1602.7805	1585.7540	12
6	86.0964	582.3974	565.3708	610.3923	593.3657	540.3504	L	1445.6339	1444.6386	1503.7121	1486.6856	11
7	72.0808	681.4658	664.4392	709.4607	692.4341	667.4501	V	1346.5654	1359.5858	1390.6280	1373.6015	10
8	356.0619	1064.5153	1047.4887	1092.5102	1075.4837	752.5029	C	963.5159	962.5207	1291.5596	1274.5331	9
9	72.0808	1163.5837	1146.5572	1191.5786	1174.5521	1149.5681	V	864.4475	877.4679	908.5101	891.4835	8
10	86.0964	1276.6678	1259.6412	1304.6627	1287.6361	1234.6208	L	751.3634	750.3682	809.4417	792.4151	7
11	44.0495	1347.7049	1330.6783	1375.6998	1358.6733		A	680.3263		696.3576	679.3311	6
12	110.0713	1484.7638	1467.7373	1512.7587	1495.7322		H	543.2674		625.3205	608.2940	5
13	110.0713	1621.8227	1604.7962	1649.8176	1632.7911		H	406.2085		488.2616	471.2350	4
14	120.0808	1768.8911	1751.8646	1796.8860	1779.8595		F	259.1401		351.2027	334.1761	3
15	30.0338	1825.9126	1808.8860	1853.9075	1836.8810		G			204.1343	187.1077	2
16	101.1073						K	74.0237	73.0284	147.1128	130.0863	1

Рисунок 4 – Данные идентификации модифицированного M1 триптического пептида глобина человека LLGNVLCVLAHHFGK (m/z 1999,971) с помощью программного обеспечения Mascot

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

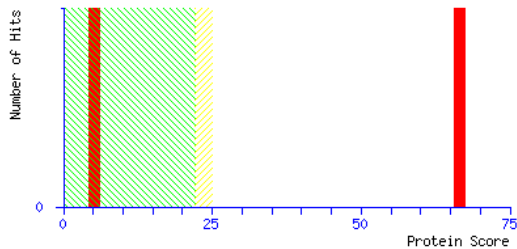
Database : SwissProt 2020_03 (562755 sequences; 202599198 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (20369 sequences)
 Protein hits : [HBB HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 : [SELB HUMAN](#) Selenocysteine-specific elongation factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EEFSEC PE=1 SV=4

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : [AQ-M4 \(C\)](#)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 50 ppm
 Fragment Mass Tolerance : ± 0.5 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF
 Number of queries : 1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 22 indicate peptides with significant homology.
 Individual ions scores > 25 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



1. [HBB HUMAN](#) Mass: 15988 Score: 66 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<u>1</u>	2015.9620	2014.9547	2015.0007	-22.80	0	66	4.1e-006	1	U	R.LLGNVLCVLAHHFGK.E + AQ-M4 (C)

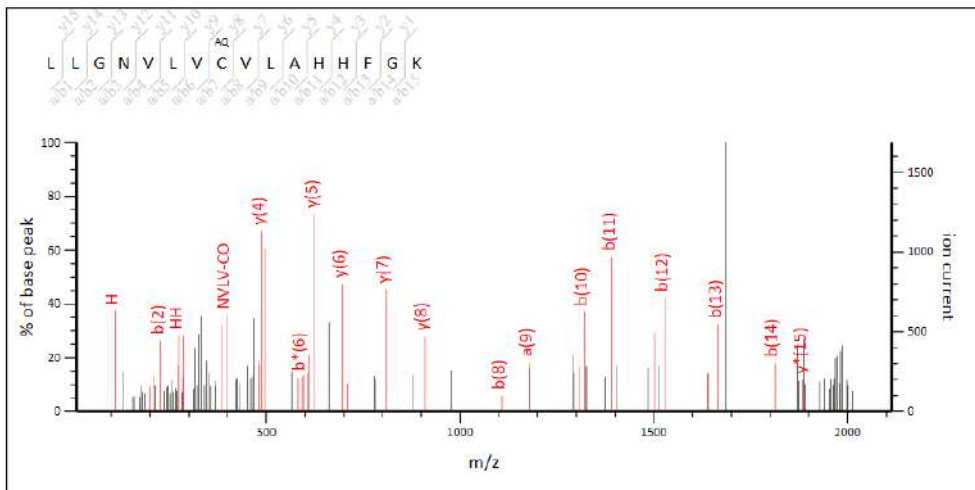
Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LLGNVLCVLAHHFGK**

Found in [HBB_HUMAN](#) in [SwissProt](#), Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2

Match to Query 1: 2014.954724 from(2015.962000,1+) index(0)

Data file DATA.TXT



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2015.0007
 Variable modifications:
 C8 : AQ-M4 (C)
 Ions Score: 66 Expect: 4.1e-006
 Matches : 43/215 fragment ions using 66 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	b	b*	d	Seq.	v	w	y	y*	#
1	86.0964	86.0964		114.0913		44.0495	L					16
2	86.0964	199.1805		227.1754		157.1335	L	1844.8456	1843.8504	1902.9239	1885.8973	15
3	30.0338	256.2020		284.1969			G			1789.8398	1772.8133	14
4	87.0553	370.2449	353.2183	398.2398	381.2132	327.2391	N	1673.7812	1672.7860	1732.8184	1715.7918	13
5	72.0808	469.3133	452.2867	497.3082	480.2817	455.2976	V	1574.7128	1587.7332	1618.7754	1601.7489	12
6	86.0964	582.3974	565.3708	610.3923	593.3657	540.3504	L	1461.6288	1460.6335	1519.7070	1502.6805	11
7	72.0808	681.4658	664.4392	709.4607	692.4341	667.4501	V	1362.5604	1375.5808	1406.6230	1389.5964	10
8	372.0568	1080.5102	1063.4837	1108.5051	1091.4786	752.5029	C	963.5159	962.5207	1307.5545	1290.5280	9
9	72.0808	1179.5786	1162.5521	1207.5735	1190.5470	1165.5630	V	864.4475	877.4679	908.5101	891.4835	8
10	86.0964	1292.6627	1275.6361	1320.6576	1303.6311	1250.6157	L	751.3634	750.3682	809.4417	792.4151	7
11	44.0495	1363.6998	1346.6733	1391.6947	1374.6682		A	680.3263		696.3576	679.3311	6
12	110.0713	1500.7587	1483.7322	1528.7536	1511.7271		H	543.2674		625.3205	608.2940	5
13	110.0713	1637.8176	1620.7911	1665.8125	1648.7860		H	406.2085		488.2616	471.2350	4
14	120.0808	1784.8860	1767.8595	1812.8810	1795.8544		F	259.1401		351.2027	334.1761	3
15	30.0338	1841.9075	1824.8810	1869.9024	1852.8759		G			204.1343	187.1077	2
16	101.1073						K	74.0237	73.0284	147.1128	130.0863	1

Рисунок 5 – Данные идентификации модифицированного M4 триптического пептида глобина человека LLGNVLCVLAHHFGK (m/z 2015,943) с помощью программного обеспечения Mascot

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

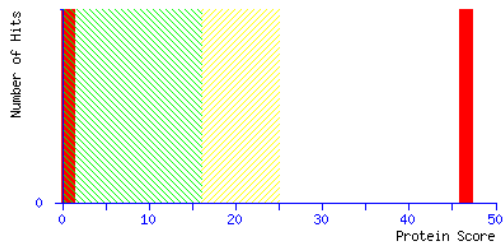
Database : SwissProt 2020_03 (562755 sequences; 202599198 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (20369 sequences)
 Protein hits : [HBB HUMAN](#) Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
[ZNF76 HUMAN](#) Zinc finger protein 76 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZNF76 PE=1 SV=2

Search Parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : [AQ-Mx \(C\)](#)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein Mass : Unrestricted
 Peptide Mass Tolerance : ± 50 ppm
 Fragment Mass Tolerance : ± 0.5 Da
 Max Missed Cleavages : 1
 Instrument type : MALDI-TOF-TOF
 Number of queries : 1

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 16 indicate peptides with significant homology.
 Individual ions scores > 25 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



1. [HBB HUMAN](#) Mass: 15988 Score: 47 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2
 Query Observed Mr(expt) Mr(calc) ppm Miss Score Expect Rank Unique Peptide
 1 2038.0000 2036.9927 2037.0425 -24.46 0 47 0.00043 1 U R.LLGNVLCVLAHHFGK.E + AQ-Mx (C)

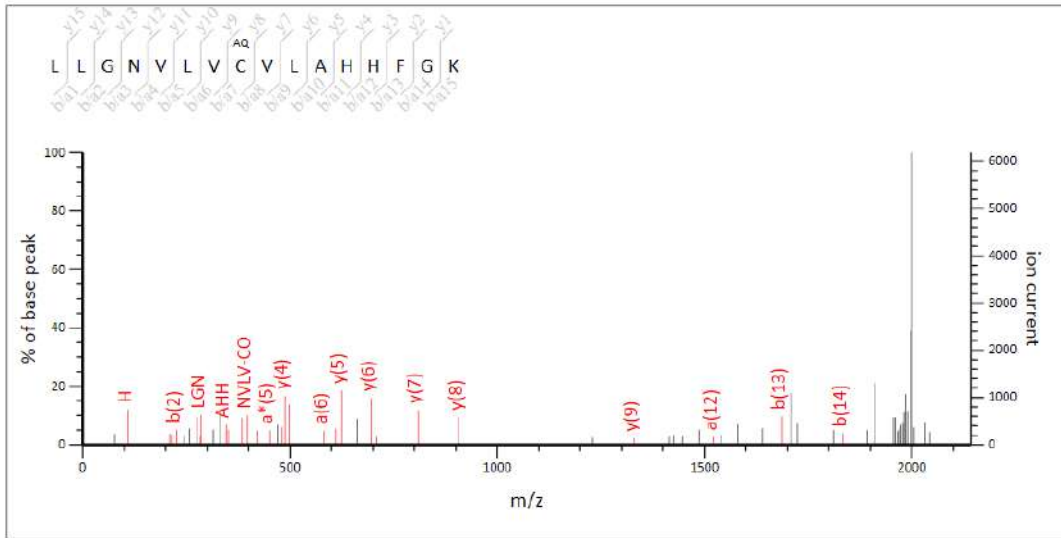
Peptide View

MS/MS Fragmentation of **LLGNVLCVLAHHFGK**

Found in **HBB_HUMAN** in **SwissProt**, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2

Match to Query 1: 2036.992724 from(2038.000000,1+) index(0)

Data file DATA.TXT



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2037.0425

Variable modifications:

C8 : AQ-Mx (C)

Ions Score: 47 Expect: 0.00043

Matches : 38/211 fragment ions using 57 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	b	b*	d	Seq.	v	w	y	y*	#
1	86.0964	86.0964		114.0913		44.0495	L					16
2	86.0964	199.1805		227.1754		157.1335	L	1866.8875	1865.8923	1924.9658	1907.9392	15
3	30.0338	256.2020		284.1969			G			1811.8817	1794.8551	14
4	87.0553	370.2449	353.2183	398.2398	381.2132	327.2391	N	1695.8231	1694.8279	1754.8602	1737.8337	13
5	72.0808	469.3133	452.2867	497.3082	480.2817	455.2976	V	1596.7547	1609.7751	1640.8173	1623.7907	12
6	86.0964	582.3974	565.3708	610.3923	593.3657	540.3504	L	1483.6706	1482.6754	1541.7489	1524.7223	11
7	72.0808	681.4658	664.4392	709.4607	692.4341	667.4501	V	1384.6022	1397.6226	1428.6648	1411.6383	10
8	394.0987	1102.5521	1085.5255	1130.5470	1113.5204	752.5029	C	963.5159	962.5207	1329.5964	1312.5699	9
9	72.0808	1201.6205	1184.5939	1229.6154	1212.5889	1187.6048	V	864.4475	877.4679	908.5101	891.4835	8
10	86.0964	1314.7046	1297.6780	1342.6995	1325.6729	1272.6576	L	751.3634	750.3682	809.4417	792.4151	7
11	44.0495	1385.7417	1368.7151	1413.7366	1396.7100		A	680.3263		696.3576	679.3311	6
12	110.0713	1522.8006	1505.7740	1550.7955	1533.7689		H	543.2674		625.3205	608.2940	5
13	110.0713	1659.8595	1642.8329	1687.8544	1670.8279		H	406.2085		488.2616	471.2350	4
14	120.0808	1806.9279	1789.9014	1834.9228	1817.8963		F	259.1401		351.2027	334.1761	3
15	30.0338	1863.9494	1846.9228	1891.9443	1874.9177		G			204.1343	187.1077	2
16	101.1073						K	74.0237	73.0284	147.1128	130.0863	1

Рисунок 6 – Данные идентификации модифицированного M7 триптического пептида глобина человека LLGNVLCVLAHHFGK (m/z 2037,977) с помощью программного обеспечения Mascot

ПРИЛОЖЕНИЕ Г



УТВЕРЖДАЮ
 Врио директора ФГБУ НКЦТ
 им. С.Н. Голикова
 ФМБА России
 В.Л. Рейнюк
 «16» сентября 2021 г.

Акт № 1-09

внедрения полезной модели

(изобретения, полезной модели, промышленного образца)

в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России от « 09 » сентября 2021 г.

Настоящий Акт составлен в том, что нижеуказанная полезная модель
 «Экспериментальная установка с 96-луночным УФ/TiO₂-
 фотокаталитическим микрореактором на основе МАЛДИ мишени»

(название объекта интеллектуальной собственности)

Автор(ы): Горбунов Александр Юрьевич

(ФИО каждого автора)

Патент РФ № _____ от _____

(дата регистрации в Государственном реестре)

Заявка № _____, дата приоритета _____

(указывается для изобретения, полезной модели, промышленного образца)

Правообладатель(и): Федеральное государственное унитарное предприятие
 «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии
 человека» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГПЭЧ»
 ФМБА России)

внедрено (а) с «01 марта 2021 г.

в Лаборатории химической и токсикологической диагностики химико-аналитического
 отдела,

и в Лаборатории медицинских проблем химической безопасности

(наименование структурного подразделения)

при выполнении

Государственного задания по теме «Мишень-2021»

для получения *in vitro* аддуктов белков с ксенобиотиками и продуктами их
 фотокаталитического окисления, с последующим ферментативным гидролизом
 модифицированных белков, концентрированием образцов на МАЛДИ мишени, и
 идентификацией полученных аддуктов путём ПАЛДИ / МАЛДИ-МС анализа.

(НИР, НИОКР, в учебном процессе, в инновационной деятельности)

в продукте / способе / изделии

Промежуточных отчетов по теме ГЗ «Мишень-2021» за 1-й и 2-й квартал 2021 г.

(указываются обозначения проектов, номера чертежей, другой технической документации, в которой реализованы
 признаки изобретения, полезной модели, промышленного образца)

Основания для объектов патентных прав (в соответствии со ст.1358 ГК РФ для
 изобретения, полезной модели, промышленного образца):

так как в указанном продукте / способе использован каждый признак

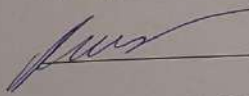
2

изобретения, приведенный в независимом пункте содержащейся в патенте формулы изобретения, либо признак эквивалентный ему и ставший известным в качестве такового в данной области техники до даты приоритета изобретения;

так как указанный продукт содержит каждый признак полезной модели, приведенный в независимом пункте содержащейся в патенте формулы полезной модели;

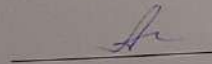
так как указанное изделие содержит все существенные признаки промышленного образца или совокупность признаков, производящую на информированного потребителя такое же общее впечатление, какое производит запатентованный промышленный образец, при условии, что изделия имеют сходное назначение.

Заведующий лабораторией медицинских проблем химической безопасности

 / Краснов К.А./

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

Заведующий лабораторией химической и токсикологической диагностики химико-аналитического отдела

 / Александрова М.А./

(заместитель директора по научной работе)



УТВЕРЖДАЮ
ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России
А. С. Радилов
2022 г.

Акт о внедрении результатов диссертационного исследования

Настоящим актом подтверждается, что результаты научно-исследовательской работы Горбунова Александра Юрьевича на тему: «Лаборатория на мишени» для моделирования окислительной биотрансформации ксенобиотиков с помощью УФ-индуцированного фотокаталитического окисления в присутствии наночастиц TiO_2 » на соискание ученой степени кандидата технических наук, используются в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

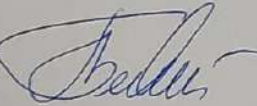
Изготовленная экспериментальная установка с 96-луночным УФ/ TiO_2 -фотокаталитическим микрореактором на основе МАЛДИ мишени, позволяет реализовать принцип «лаборатория на мишени» за счет интеграции всех стадий пробоподготовки при моделировании биотрансформации ксенобиотиков.

Применение экспериментальной установки позволяет последовательно осуществлять в микрореакторе фотокаталитическое окисление ксенобиотиков, получение аддуктов белков с продуктами фотокаталитического окисления, ферментативный гидролиз модифицированных белков и концентрирование образцов на МАЛДИ мишени для последующей идентификации полученных продуктов путём ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа.

для последующей идентификации полученных продуктов путём ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа.

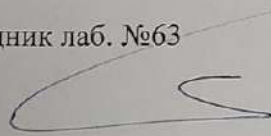
Ключевыми преимуществами предложенного подхода являются значительное увеличение производительности анализа и возможность параллельного моделирования окислительной биотрансформации множества различных ксенобиотиков при минимальных расходах реагентов, что особенно важно при доклинической оценки токсичности препаратов-кандидатов, а также для разработки аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с белками.

Заведующий лабораторией №63



Бельтюков П.П.

Ведущий научный сотрудник лаб. №63



Бабаков В.Н.