

На правах рукописи



Подольская Екатерина Петровна

**РАЗРАБОТКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ И МЕТОДОЛОГИИ
ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ФОРМАТЕ «ЛАБОРАТОРИЯ НА
МИШЕНИ» НА ОСНОВЕ НАНОСТРУКТУР СОДЕРЖАЩИХ
АТОМЫ МЕТАЛЛОВ**

Специальности

1.3.2. Приборы и методы экспериментальной физики

1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института аналитического приборостроения РАН и в Лаборатории химической и токсикологической диагностики – испытательном центре экологических исследований химико-аналитического отдела Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Официальные оппоненты: **Столярова Валентина Леонидовна**

Доктор химических наук, академик РАН, профессор, почетный профессор СПбГУ, профессор кафедры общей и неорганической химии Санкт-Петербургского государственного университета

Ганеев Александр Ахатович

доктор физико-математических наук, профессор, руководитель группы Спектрометрии ООО «Люмэкс»

Егоров Владимир Валерьевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук

Защита состоится «30» июня 2023 г. в 14:00 ч. на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН) по адресу: 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31–33 лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте _____

Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31–33 лит. А., Институт аналитического приборостроения РАН, а/я 207.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



Буляница А.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Появление гипотез и открытий в биологических, медицинских, экологических и других науках в огромной степени определяется разработкой новых аналитических инструментов и поддерживающих технологий. Масс-спектрометрия в сочетании с эффективными методами разделения в большинстве случаев позволяет собирать обширные базы данных как для идентификации индивидуальных соединений, так и для нецелевого профилирования биомолекул.

В течение последних 30 лет масс-спектрометрия (MS) зарекомендовала себя как основной метод анализа большеразмерных молекул и молекулярных комплексов, в частности полимеров и природных биомолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Лазерная десорбция/ионизация с использованием матрицы (MALDI) и связанная с ней лазерная десорбция/ионизация без матрицы (LDI) особенно удобны для высокопроизводительного анализа биологических образцов, и (MALDI) MS является идеальной платформой для чувствительного, высокопроизводительного и экономически эффективного определения не только интактных белков, но и широкого спектра других аналитов.

Однако MALDI MS является типичным автономным методом, не позволяющим проводить анализ образцов в режиме on-line. В большинстве случаев перед самым MALDI MS анализом становится необходимой трудоемкая и многоэтапная пробоподготовка. Это приводит к нивелированию основных достоинств метода, а именно экспрессности (затраты времени на извлечение искомым аналитов могут достигать несколько дней) и чувствительности (за счет потерь аналита при многоэтапной пробоподготовке). Соответственно, в последнее время стали стремительно развиваться подходы, позволяющие проводить пробоподготовку непосредственно на MALDI мишени.

Недавно в MALDI масс-спектрометрии был создан новый формат анализа, включающий интеграцию этапов пробоподготовки непосредственно на планшетах-мишенях MALDI и LDI. Этот формат получил название «лаборатория на мишени».

Этапы пробоподготовки могут включать любые действия, выполняемые в дополнение к тем, которые необходимы для ионизации аналитов в процессе лазерной десорбции/ионизации, например: гомогенизацию, предварительное концентрирование, очистку, экстракцию, расщепление, дериватизацию, синтез, разделение, обнаружение с помощью дополнительных методов, хранение данных или другую соответствующую деятельность. В большинстве случаев формат «лаборатория на мишени» позволяет не только в разы снизить затраты на реактивы и сократить время эксперимента, но и заметно повысить чувствительность анализа, что имеет огромное значение при ограниченных количествах образца, как происходит при исследованиях в таких областях, как биохимия или биомедицина.

Формат «лаборатория на мишени», направленный на проведение химических реакций непосредственно на MALDI мишени, в первую очередь востребован при химических, биомедицинских и биохимических исследованиях. При этом реакции проводят как для получения новых продуктов с последующей идентификацией, так и с целью дериватизации для повышения чувствительности масс-спектрометрического анализа. Не менее важным направлением для использования формата «лаборатория на мишени» является специфичная, например металл-аффинная, экстракция аналитов непосредственно на сорбенте, нанесенном на мишень.

Значительная часть подходов, используемых в формате «лаборатория на мишени», реализуется за счет функционализации поверхности подложки. Причем, успешность

решения каждой из конкретных задач напрямую зависит не только от свойств функционализированной поверхности, но и от дисперсного состояния покрытия. Использование (или формирование) нанодисперсных материалов, содержащих атомы металлов, при функционализации поверхности мишени позволяет, с одной стороны, увеличить удельную поверхность материала и, следовательно, итоговое количество аналита, попадающего под импульс лазера при MALDI MS анализе, а с другой - придать уникальные специфические свойства поверхности мишени. Разработка комплекса процессов специализации функциональных свойств поверхности MALDI мишени, в результате которых не только повышается чувствительность, но и становится возможной проведение исследований новых классов соединений (например, аддуктов белков с ксенобиотиками), является, безусловно, актуальной задачей масс-спектрометрии.

Тем самым, актуальной является **Цель данной работы:** «Разработка специализированных высокопроизводительных инструментальных решений и аналитических подходов, интегрированных в формат «лаборатория на мишени», с использованием наноструктур, содержащих атомы металлов» для расширения аналитических возможностей метода МАЛДИ-МС. Для достижения поставленной цели следовало решить следующие задачи:

- Систематизировать данные по составу, структурам и способам нанесения функционализирующих покрытий, содержащих атомы металла и обладающих металл-аффинными свойствами, на твердую подложку.
- Разработать ряд новых металл-аффинных и металл-оксидных нанодисперсных материалов, и провести их характеризацию: определить состав и структуру, исследовать физико-химические характеристики, оценить сорбционные свойства. Исследовать специфические и селективные свойства разработанных структур, как металл-аффинных сорбентов.
- Разработать методы функционализации поверхности MALDI мишени с использованием разработанных материалов и провести характеризацию покрытий. При невозможности или затрудненности переноса готового материала на подложку разработать способ формирования покрытия непосредственно на ней.
- Разработать методические подходы в формате «лаборатория на мишени», позволяющие проводить металл-аффинную экстракцию непосредственно на поверхности мишени с последующим MALDI MS анализом. Провести сравнение специфических и селективных свойств разработанных покрытий.
- Разработать методические подходы в формате «лаборатория на мишени», позволяющие проводить дериватизацию жирных кислот с помощью металлсодержащих реагентов с целью увеличения выхода ионов при MALDI и повышения эффективности масс-спектрометрического анализа.

Научная новизна исследования

- Установлено, что метод электрораспыления в нормальных условиях в бескапельном режиме с динамическим делением потока распыляемой жидкости позволяет проводить функционализацию поверхности MALDI мишени нанодисперсными оксидами металлов без предварительной и дополнительной подготовки поверхности мишени.
- Разработан подход к функционализации поверхности MALDI мишени на основе технологии Ленгмюра, перенесенной с плоской поверхности на поверхность капли, позволяющий формировать металл-аффинный сорбент в ячейке мишени непосредственно перед проведением эксперимента с возможностью варьирования состава сорбентов зависимости от поставленной задачи, без дополнительной подготовки и последующей регенерации поверхности мишени.

- Доказано, что при переносе технологии Ленгмюра с плоской поверхности на поверхность капли, на MALDI мишени формируются мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных монослоев Ленгмюра, сохраняющих свойства металл-аффинных сорбентов.

- Доказана возможность использования нанодисперсных оксидов переходных металлов, синтезированных золь-гель методом, и монослоев Ленгмюра на основе стеаратов металлов в качестве металл-аффинных сорбентов как в режиме пакетной хроматографии, так и в формате «лаборатория на мишени».

- Разработана оригинальная методика MALDI MS анализа свободных жирных кислот, основанная на переходе кислоты в соль на поверхности водной капли, содержащей ионы бария, в формате «лаборатория на мишени».

- Идентифицированы аддукты глобина человека с галогенсодержащими соединениями ряда хлорацетамидов по С-93 и С-112 бета-субъединицы и С-104 альфа-субъединицы, и продуктами окисления диклофенака и амодиахина по С-112 бета-субъединицы, которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации, и показана возможность их специфичной экстракции методом металл-аффинной хроматографии в формате «лаборатория на мишени».

- Показано, что добавление перфтороктановой сульфокислоты к элюентам при проведении металл-аффинной хроматографии увеличивает степень экстракции аналитов на 10-30%.

Теоретическая значимость

Установлено, что электрораспыление водно-ацетонитрильной суспензии нанодисперсных оксидов в бескапельном режиме с динамическим делением потока жидкости при нормальном давлении позволяет создавать покрытия, прочно сцепленные с подложкой из нержавеющей стали, без дополнительной подготовки поверхности.

В рамках исследования модели формирования тонкоплёночных сорбентов на искривлённой поверхности доказано, что технология Ленгмюра, перенесённая с плоской поверхности на поверхность капли, позволяет формировать на твердой подложке мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев стеаратов металлов по механизму самопроизвольного перемещения монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести.

Выявлено, что структуры на основе оксидов металлов и монослоев стеаратов металлов способны специфично связывать хлорсодержащие соединения, в том числе и аддукты глобина человека с хлорсодержащими ксенобиотиками.

Впервые идентифицированы аддукты глобина человека с хлорсодержащими ксенобиотиками на примере соединений ряда хлорацетамидов, продуктов окисления диклофенака и амодиахина.

Практическая значимость

Разработаны методики для использования нанодисперсных оксидов металлов, полученных золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, и монослоев стеаратов металлов в качестве высокоэффективных металл-аффинных сорбентов, позволяющих специфично экстрагировать органические и биоорганические соединения с функциональными группами, содержащими атомы неметаллов (O, Cl, N и пр.). Разработаны методы функционализации поверхности MALDI мишени, придающие ей свойства металл-аффинных сорбентов. Продемонстрировано, что покрытия на основе нанодисперсных оксидов металлов и мо-

нослоев стеаратов металлов сохраняют свойства металл-аффинных сорбентов в течение года. Разработан метод анализа фосфор- и хлорсодержащих аддуктов белков крови в формате «лаборатория на мишени», позволяющий значительно уменьшить количество анализируемого образца, повысить чувствительность и экспрессность анализа. Идентифицированные аддукты глобина человека с галогенсодержащими соединениями могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации. Разработана методика полуквантитативного MALDI MS анализа свободных жирных кислот, отличающаяся простотой, воспроизводимостью, высокой чувствительностью и экспрессностью.

Разработанные методики для специфичной экстракция аддуктов белков крови с применением монослоев Ленгмюра (АКТ о внедрении № 2/22 от 14.11.22) и анализа жирных кислот в виде их многокарбоксилатов бария (АКТ о внедрении № 3/22 от 14.11.22) используются в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии и лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования, соответственно, ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России. Кроме того, методику анализа жирных кислот успешно применяют в ВРТ ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (АКТ о внедрении № 2-22 от 24.11.22).

Полученные результаты могут быть использованы в фармацевтических компаниях и научно-исследовательских учреждениях при моделировании окислительной биотрансформации и доклинической оценке потенциальной токсичности биологически активных веществ, для разработки аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с долгоживущими белками при ретроспективной диагностике интоксикаций, а также при контроле качества лекарственных средств, биологически активных добавок и продуктов питания.

Положения, выносимые на защиту

1. Метод электрораспыления в нормальных условиях в бескапельном режиме с динамическим делением потока распыляемой жидкости позволяет функционализировать химически чистую поверхность MALDI мишени нанодисперсными оксидами металлов без предварительной и дополнительной подготовки поверхности.
2. Технология получения монослоев Ленгмюра, адаптированная к полусферической поверхности (капле), применима для функционализации поверхности MALDI мишени наноструктурами на основе стеаратов металлов без предварительной подготовки и последующей регенерации поверхности мишени.
3. Структуры на основе полученных золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, нанодисперсных оксидов металлов и монослои стеаратов металлов являются эффективными металл-аффинными сорбентами.
4. При переносе технологии Ленгмюра с плоской поверхности на поверхность капли, на MALDI мишени формируются мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных монослоев Ленгмюра, сохраняющих свойства металл-аффинных сорбентов.
5. Сорбенты на основе нанодисперсных оксидов металлов и монослоев стеаратов металлов могут быть использованы для селективной экстракции ксенобиотиков и аддуктов белков крови с их остатками (или метаболитами) как в условиях пакетной хроматографии, так и в формате «лаборатория на мишени».
6. Методика, основанная на формировании регулярного монослоя монокарбоксилатов бария в формате «лаборатория на мишени», позволяет осуществлять профилирование свободных жирных кислот методом MALDI MS с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается корректностью методов, применяемых для решения поставленных задач; большим объемом экспериментальных данных, подтверждающих основные выводы и научные положения, полученных с применением современных инструментальных средств; использованием стандартных образцов известного состава для разработки как инструментальных решений, так и аналитических подходов; контролем условий экспериментов; воспроизводимостью результатов; сходимостью полученных результатов с известными экспериментальными данными, а также результатами практической апробации разработанных подходов и методик.

Личный вклад автора заключается в разработке плана и обосновании направления исследований. Автор лично разработала метод функционализации поверхности структурами на основе монослоев Ленгмюра, методические подходы металл-аффинной экстракции аддуктов белков крови с ксенобиотками в формате «лаборатория на мишени», методику анализа свободных жирных кислот в виде монокарбоксилатов бария, непосредственно участвовала в проведении экспериментальных измерений, обработке и систематизации экспериментальных данных, обсуждении полученных результатов, а также формулировала основные выводы.

Апробация работы

Результаты работы представлены на следующих конференциях: 3th European Meeting on Environmental Chemistry, Moscow, 2012; 11th International meeting on cholinesterases, Kazan, 2012; Proceedings of 38th FEBS Congress, St. Petersburg, 2013; Proceedings 11th international symposium on protection against chemical and biological warfare agents, Stockholm, 2013; Вторая российская конференция с международным участием «Физика – наукам о жизни». г. Санкт-Петербург, 2017 г.; Третий съезд аналитиков России, г. Москва, 2017 г.; Proceedings of 43rd FEBS Congress, Prague, 2018; IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений - основа создания растений будущего», г. Казань, 2019 г.; Третья международная конференция «Физика – наукам о жизни», г. Санкт-Петербург, 2019 г.; Международная научно-практическая конференция «Системы контроля окружающей среды», г. Севастополь, 2016-2022 гг.; Республиканская конференция с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины», г. Минск, 2019-2022 гг.

Публикации

По результатам работы опубликованы 42 статьи (среди которых 18 статей в журналах, входящих в базы данных Web of Science или Scopus; и 24 в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций). Личный вклад автора в работы, опубликованные в соавторстве с другими исследователями, заключался в разработке идеи и постановке задач исследования, проведении экспериментальных измерений, обработки экспериментальных данных, обсуждении полученных результатов, формулировании выводов и подготовке материалов для опубликования.

Структура и объём работы

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы (7 приложений).

Работа изложена на 411 страницах машинописного текста, содержит 97 рисунков и 26 таблиц. Библиографический список включает 667 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во ВВЕДЕНИИ сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы актуальность, научная новизна и практическая значимость работы, сформулированы основные научные положения, выносимые на защиту.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ состоит из разделов: «Обзор литературы» (1 глава), «Материалы и методы» (2 глава) и «Результаты и обсуждение» (3 глава).

В первой главе приведен обзор литературы, который состоит из 5 разделов. В первом разделе рассматриваются механизмы ионообразования при электрораспылении (ESI) и лазерная десорбция/ионизация в присутствии матрицы (MALDI). Во втором представлены основные области применения MALDI масс-спектрометрического анализа. Третий раздел посвящен описанию принципа металл-аффинной (хелатной/оксидной) хроматографии (IMAC/МОАС) и материалов, используемых в качестве металл-аффинных (оксидных) сорбентов. В четвертом подробно рассмотрен новый формат подготовки к анализу «лаборатория на мишени», предполагающий интеграцию нескольких стадий подготовки образца в рамках одной платформы на основе MALDI мишени, в том числе с предварительной функционализацией ее поверхности. В пятом разделе приведена информация о методе получения монослоев стеаратов металлов (монослой Ленгмюра) и механизме их коллапсирования.

Во второй главе перечислены экспериментальные методы и подходы, разработанные или использованные в работе. В том числе: получение наноструктур, содержащих атомы металлов (синтез нанодисперсных оксидов металлов золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, и формирование монослоев стеаратов металлов методом Ленгмюра); физико-химические методы анализа, использованные для характеристики полученных структур; разработанные методы функционализации поверхности MALDI мишени; инструментальные и физико-химические методы, использованные для исследования нанесенных на поверхность мишени структур; методики получения аддуктов белков с ксенобиотиками и/или их метаболитами; методики пробоподготовки для металл-аффинной экстракции аналитов из водных и биологических образцов с применением разработанных структур и, затем адаптированные к формату «лаборатория на мишени» и т.д. Кроме того, в главе приведены методы хроматографического (HPLC-UV, GC) и масс-спектрометрического анализа (HPLC-ESI MS(MS), GC MS, MALDI MS(MS)), с помощью которых проводили детекцию, идентификацию и количественное определение аналитов как для характеристики полученных структур, так и при разработке методов экстракции органических и биоорганических соединений с функциональными группами, содержащими атомы неметаллов – доноров электронной пары (O, Cl, N и пр.), из образцов различной природы.

Третья глава, состоящая из 3 разделов, посвящена полученным результатам и их обсуждению.

Раздел «**Разработка и исследование структур для функционализации поверхности MALDI мишени**» включает в себя разработку и характеристику наноструктур, содержащих атомы металлов и обладающих металл-аффинными свойствами.

Металл-аффинные сорбенты, содержащие такие переходные металлы, как Zr(IV), Fe(III), Ni(II) и Cu(II), достаточно часто используют в биоорганическом анализе. Особый интерес представляют пористые металл-оксидные структуры на основе этих металлов, образующиеся при синтезе золь-гель методом, зарекомендовавшим себя, как способ получения высокодисперсных оксидов металлов. В связи с этим нанодисперсные оксиды

металлов успешно используют для функционализации поверхности MALDI мишени. Соответственно, материалами для создания покрытия на основе металл-оксидных сорбентов (MeOx) были выбраны оксиды вышеперечисленных металлов (ZrOx, FeOx, NiOx и CuOx), синтезированные золь-гель методом, усовершенствованным микроволновой обработкой (рис. 1).

По результатам седиментационного анализа в среднем размер диспергированных частиц FeOx составил примерно 10 нм, ZrOx, NiOx и CuOx – около 20 нм. С помощью энергодисперсионной рентгеновской (EDX) спектроскопии было определено, что во всех образцах присутствуют только кислород и соответствующий металл и содержание металла соответствует расчетному с отклонением в пределах точности измерения для Fe₂O₃, ZrO₂, NiO и CuO. Величины удельной поверхности, определенной методом БЭТ, и пористости, вычисленной по методу Хорвата-Кавазое, составили для FeOx 60,0±6,0 м²/г и 0,17±0,03 см³/г, для ZrOx 45±4,5 м²/г и 0,0020±0,0004 см³/г, для NiOx 31,0±3,2 м²/г и 0,07±0,02 см³/г и для CuOx 2,5±0,3 м²/г и 0,012±0,002 см³/г, соответственно. Значение изоэлектрической точки, вычисленное по результатам измерения электрокинетического потенциала, составило 5,5±0,2, 6,9±0,2, 6,5±0,2 и 5,5±0,2 ед. pH для FeOx, ZrOx, NiOx и CuOx, соответственно. Сорбционную емкость FeOx (0,019 мкмоль/г) и ZrOx (0,020 мкмоль/г) оценивали по фосфорилированному пептиду SSNGHVYpEKLSSI методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (HPLC-UV), для NiOx (0,057 мкмоль/г) и CuOx (0,067 мкмоль/г) по глубину крысы (RHb) с использованием метода Бредфорд. При этом все структуры проявили хорошую химическую устойчивость как в стандартных водных элюентах, так и в органических, используемых при металл-аффинной хроматографии.

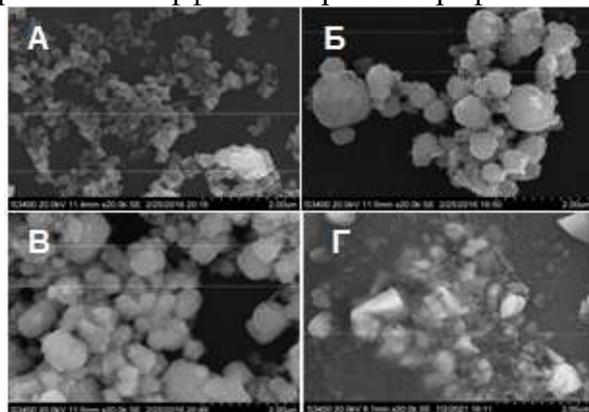


Рисунок 1 – Микрофотографии FeOx (А), NiOx (Б), CuOx (В) и ZrOx (Г), перенесенных на кремниевую подложку (Hitachi S-3400N). Увеличение в 20000 раз

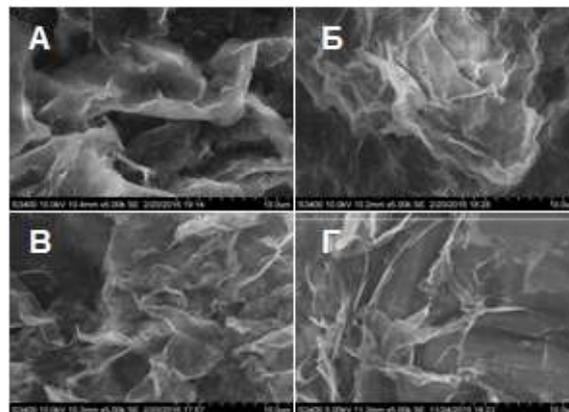


Рисунок 2 – Микрофотографии FFe (А), FNi (Б), FCu (В) и FLA (Г), перенесенных на кремниевую подложку (Hitachi S-3400N). Увеличение в 5000 раз

Отдельной задачей был выбор материала для создания покрытия на основе металл-хелатных сорбентов. Монослой Ленгмюра, формирующиеся на границе раздела фаз при нанесении гексанового раствора стеариновой кислоты (HSt) на поверхность водной субфазы, содержащей ионы металла, могут рассматриваться как металл-аффинные сорбенты благодаря одной из поверхностей, полностью состоящей из атомов металла. Известно, что монослой Ленгмюра обладают высокой адгезией к твердым подложкам, что также делает их перспективным материалом (FMe) для функционализации поверхности MALDI мишени. Однако, если монослой на основе стеаратов Fe(III), Ni(II) и Cu(II) (FFe, FNi, FCu) достаточно легко формируются, то в случае Zr(IV) образование таких структур невозможно ввиду амфотерных свойств циркония. Поэтому при исследовании

структур на основе стеаратов металлов вместо циркония был использован La(III) (FLa). С одной стороны, лантан, в отличие от циркония, не образует устойчивых во времени оксидов, а с другой – из-за большего радиуса иона и протяженных диффузных валентных орбиталей ионы La(III) имеют широкие возможности для координации. Образование монослоя происходит на границе раздела двух фаз: водной и органической. Характерное расположение амфифильной молекулы на границе раздела фаз (в этой работе в качестве амфифильного соединения, как основы сорбента, рассматривается HSt, благодаря ее способности формировать жесткие нерастворимые в воде и во многих полярных растворителях монослои) обеспечивает процесс образования соли за счет диссоциации полярной карбоксильной группы, погруженной в водную фазу, содержащую ионы металлов. Если рассматривать основные требования, предъявляемые к сорбентам, монослои Ленгмюра соответствуют большинству из них. Во-первых, структура монослоя стеарата металла гарантирует не только наличие ионов металла на поверхности сорбента, но и благодаря совершенно плоской структуре обеспечивает полную доступность активных центров для молекул аналита, независимо от размеров его молекулы. Во-вторых, включение металла в состав нерастворимой в водных и водно-органических растворителях соли исключает продуцирование иона металла в образец после элюирования аналита с сорбента. В-третьих, жесткая структура монослоя обеспечивает механическую прочность сорбента. И наконец, крайне простая технология получения и возможность последующего коллапсирования монослоя позволяют быстро нарабатывать этот функциональный материал и помещать в устройство для проведения экстракции в необходимом количестве непосредственно перед экспериментом.

Монослои стеаратов металлов получали в специальной ванне, заполненной раствором соли соответствующего металла (нитрата или хлорида) в концентрации 10^{-4} моль/л при pH 5, в таких условиях практически полностью исключается физическая сорбция ионов металла на поверхности монослоя. На водную подложку добавляли концентрированный раствор HSt до образования однородной опалесцирующей пленки на поверхности водной субфазы. Монослой оставляли на водной подложке на 2 минуты для полного прохождения реакции солеобразования, затем с помощью подвижных барьеров коллапсировали в одном направлении (1D-коллапсирование), и при помощи плоского шпателя собирали для переноса в спиновую колонку или другое устройство, в зависимости от целей эксперимента, осуществляя коллапсирование в перпендикулярном направлении (2D-коллапсирование). Такой способ обеспечивал распад монослоя большой площади на множество маленьких пленок по границам слома первоначального слоя. Процесс слипания исключали путем обработки коллапсированных монослоев 100% ацетонитрилом.

В соответствии с особенностями получения материала, количество сорбента, используемого при проведении анализа, оценивали по площади первоначально сформированного монослоя (площадь поверхности водной фазы в ванне, ограниченной барьерами, дм^2). Отношение массы FMe к площади было определено, как $0,028 \pm 0,001$, $0,029 \pm 0,003$, $0,022 \pm 0,003$ и $0,018 \pm 0,002$ мг/ дм^2 , при этом влажность составила $63 \pm 2\%$, $61 \pm 2\%$, $63 \pm 2\%$ и $60 \pm 2\%$ для FFe, FLa, FNi и FCu, соответственно. С помощью MALDI MS было установлено, что основным структурным звеном FMe являются дистеараты ($\text{Fe}(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO})_2^+$, $\text{La}(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO})_2^+$, $\text{Ni}(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO})_2$ и $\text{Cu}(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO})_2$). По результатам исследования методом сканирующей электронной микроскопии (SEM) (рис. 2) можно сделать вывод, что для всех FMe сохраняется доступность поверхности для взаимодействия с аналитом, притом что монослой при коллапсировании сжимается более чем в 100 раз. Значение удельной поверхности было рассчитано по результатам измерений

размера частиц после диспергирования пленок при условии, что полученные частицы не обладают пористостью. Размер частиц, как и значения изоэлектрической точки, вычисленные по данным измерения электрокинетического потенциала, определяли с помощью Zetasizer NANO ZC. Значения удельной поверхности и изоэлектрической точки составили для FFe $15,0 \pm 1,5$ м²/г и $3,6 \pm 0,2$ ед. рН, для FLa $34,5 \pm 3,5$ м²/г и $3,3 \pm 0,2$ ед. рН, для FNi $20,0 \pm 2,1$ м²/г и $3,5 \pm 0,2$ ед. рН и для FCu $14,0 \pm 1,5$ м²/г и $3,9 \pm 0,2$ ед. рН. Исследование устойчивости структур в условиях проведения металл-аффинной хроматографии показало, что все сорбенты проявляют устойчивость как в стандартных водных элюентах, так и в полярных органических, за исключением FLa, который устойчив в 100% ацетонитриле только в течение 5 минут. Сорбционную емкость FMe оценивали по аналогии с MeOx. Было показано, что FFe способно удерживать $0,035$ мкмоль/г и FLa $0,013$ мкмоль/г пептида SSNGHVYpEKLSSI, FNi $0,168$ мкмоль/г и FCu $0,198$ мкмоль/г RНb, соответственно.

Таким образом, по результатам исследований можно сделать вывод, что все разработанные структуры соответствуют требованиям, предъявляемым к металл-аффинным сорбентам: устойчивы в элюентах; имеют достаточную поверхность для взаимодействия с аналитом; обладают высокой сорбционной емкостью и при этом просты в получении и использовании.

Исследование специфичных и селективных свойств разработанных структур

Металл-аффинные свойства FFe и FeOx исследовали на примере задач фосфопротеомики. Процесс обогащения фосфопептидов с использованием FFe и FeOx оптимизировали на примере синтетического модельного пептида SSNGHVYpEKLSSI. В процессе оптимизации было показано, что трехступенчатая процедура экстракции с последовательным применением $0,4$ М водного аммиака, $0,5\%$ водного пиперидина и $0,015\%$ перфторсульфооктановой кислоты (PFOS) в $0,5\%$ водном пиперидине позволяет значительно увеличить степень извлечения пептида. Оптимизированную процедуру применяли для извлечения фосфорилированных пептидов из триптического гидролизата казеина в сравнении с эталонным коммерческим материалом - PHOS-SelectTM Iron Affinity Gel (IAG) (Sigma Aldrich GmbH, ФРГ). Наиболее высокая степень экстракции (до 90%) трех триптических фосфорилированных пептидов FQSpEEQQQTEDELQDK, YKVPQLEIVPNSpAEER и TVDMESpTEVFTK была достигнута при соотношении гидролизат/сорбент $1:310$ (мас./мас.). Следует отметить, что при таких условиях более 50% каждого пептида не связывалось с IAG, что указывает на его более низкую емкость по сравнению с FFe и FeOx. Примечательно, что даже при соотношении гидролизат/сорбент $1:8000$ (мас./мас.) 10% пептида FQSpEEQQQTEDELQDK наблюдали в несвязанной фракции из IAG. Для всех трех пептидов выход фракций элюата был значительно выше как для FFe, так и для FeOx по сравнению с коммерческой фазой IAG ($70\text{--}95\%$ против $5\text{--}10\%$). Затем было проведено обогащение фосфорилированных пептидов в триптических гидролизатах, полученных из лизатов клеток HeLa. С помощью FFe было идентифицировано 55% от общего количества найденных фосфорилированных белков, в то время как для FeOx, IAG и наночастиц TiO₂ это значение составляло только 34 , 10 и 29% , соответственно. Таким образом, применение FFe привело к увеличению покрытия фосфопротеома в $2\text{--}5$ раз по сравнению с коммерчески доступными аналогами. При извлечении синтетических стандартных пептидов из лизата клеток HeLa VAVVRTpPPKSPSSAK и VAVVRTpPPKSpSSAK, добавленных в количествах от $0,1$ нг до 10 нг было выявлено, что наблюдается хорошая линейность отклика детектора ($R^2 = 0,98$) для обоих пептидов. Кроме того, как FFe, так и FeOx отличаются чрезвычайно низкой степенью неспецифического связывания.

В процессе оптимизации процедуры металл-аффинной хроматографии было выявлено, что добавка PFOS к элюенту значительно повышает эффективность десорбции фосфорсодержащих пептидов с сорбентов. Проверку универсальности похода проводили с использованием сорбента $mSiO_2/Ni$ (мезопористые частицы кремнезема, содержащие на поверхности пор ионы никеля (0,77% масс. по данным рентгенофлуоресцентного анализа)), отличающегося по составу и характеристикам, как от FMe, так и от MeOx, и диклофенака (DCL) в качестве аналита.

Результаты, представленные в таблице 1, свидетельствуют об эффективности добавки PFOS к стандартному элюенту. Особого внимания заслуживает элюент, включающий в состав одновременно воду, ацетонитрил, пиперидин и PFOS. При его применении степень экстракции в одной стадии (30 мин) достигла 88%. В процессе исследования зависимости степени экстракции от количества DCL, нанесенного на сорбент, с использованием двухэтапной процедуры элюирования для каждого элюента (табл. 1) по линейному виду зависимости был сделан вывод, что предлагаемые методы десорбции показывают воспроизводимые результаты. Степень экстракции, достигающая величин 82-97%, свидетельствует об универсальности и эффективности элюентов, содержащих PFOS, для металл-аффинной хроматографии.

Таблица 1 – Степень извлечения DCL с $mSiO_2/Ni$ для различных элюентов

№	Элюент (все растворы элюентов водные)	Степень извлечения (%), t = 30 мин, n=3
1	0,1% PFOS	2,90±0,43
2	5% аммиак	30,4±1,6
3	5% аммиак + 0,1% PFOS	60,6±4,4
4	50% ацетонитрил	44,3±2,3
5	50% ацетонитрил + 0,1% PFOS	72,3±3,7
6	1% имидазол	67,9±2,5
7	1% имидазол + 0,1% PFOS	80,3±3,6
8	0,5% пиперидин	47,1±5,6
9	0,5% пиперидин + 0,1% PFOS	79,0±6,4
10	50% ацетонитрил + 0,5% пиперидин + 0,1% PFOS	88,1±2,4

Таблица 2 – Результаты исследования специфичных свойств сорбентов, содержащих медь и никель

Сорбент	Вещество (гетероатом)	Матрица	Степень извлечения, %
FNi/NiOx	глифосат (N,O)	вода	93 / 70
	аминометилфосфоновая кислота (N,O)	вода	96 / 82
	феназепам (N)	вода	65 / 53
		плазма крови крыс	51 / 55
	пиримикарб (N)	вода	76 / 72
		плазма крови крыс	42 / 40
дильдрин (Cl)	вода	87 / 85	
	плазма крови крыс	76 / 72	
FCu/CuOx	глифосат (N,O)	вода	93 / 85
	аминометилфосфоновая кислота (N,O)	вода	85 / 82

Водный 0,5% пиперидин с 0,1% PFOS был использован при исследовании обогащения фосфонилированного пептида – аддукта сывороточного альбумина человека (HSA) с 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутаном (PFMP) на FLа. Было показано, что FLа можно рассматривать как перспективный металл-аффинный сорбент для селектив-

ного обогащения аддуктов фосфорорганических соединений (ОР) в биологических образцах.

При исследовании возможности металл-аффинной экстракции пестицидов и лекарственных средств с использованием разработанных структур были получены следующие результаты: степень экстракции дильдрина на FNi из воды составила 86,7%, 91,4% и 76,1% из молока коровы и плазмы крови крыс, соответственно, при минимальных потерях вещества на сорбенте; степень экстракции диазинона из водных растворов на ZrOx достигала 86,1%. Другие полученные результаты представлены в таблице 2.

Таким образом, полученные структуры проявляют высокий уровень специфичности по отношению к гетероатомам – основаниям Льюиса, входящим в состав аналитов при извлечении их из матриц различной природы.

Раздел «Функционализация поверхности MALDI мишени MeOx и FMe для проведения металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени» посвящен разработке способов функционализации поверхности мишени с последующим исследованием свойств покрытий в формате «лаборатория на мишени».

В последние годы значительные усилия исследователей в области металл-аффинной хроматографии были направлены на уменьшение количества образца, требуемого для анализа, и снижение потерь на сорбенте при проведении металл-аффинной хроматографии. Соответственно, все чаще появляются работы, в которых предлагается подход, называемый «лаборатория на мишени», который позволяет манипулировать очень малыми объемами проб, а также сводить обработку проб к нескольким простым этапам. Покрытая или функционализированная слоем сорбента мишень может использоваться для прямого обогащения образца *in situ* с последующим анализом методом MALDI MS.

Функционализация поверхности MALDI мишени MeOx методом электрораспыления в бескапельном режиме

Чаще всего для получения покрытий в результате электрораспыления частиц оксидов требуется тщательная подготовка поверхности мишени, например обработка кислородной плазмой и/или нагрев самой пластины до 170-200°C для обеспечения адгезии частиц к поверхности. По всей видимости, такие жесткие условия для получения покрытий из частиц оксидов металлов необходимы по причине образования микрокапель при распылении с использованием классического варианта источника ионов «электроспрей». Ранее на базе ИАП РАН был создан узел, позволяющий проводить электрораспыление в бескапельном режиме (БЭ) с динамическим делением потока жидкости при нормальном давлении (рис. 3), с помощью которого удалось распылять достаточно крупные объекты, например, клетки эпидермоидной карциномы человека A431. Соответственно, было сделано предположение, что с помощью такого узла электрораспыления наночастицы разработанных MeOx также могут быть нанесены на MALDI мишень. Для того чтобы полевая десорбция заряженных частиц была бескапельной, необходим стабильный поток суспензии, а также необходимо подобрать оптимальное напряжение на электродах для осуществления стабильного потока парогазовой смеси, откачиваемой из области мениска, которая состоит из воздуха, паров растворителя и частиц сорбента (на примере FeOx). Контроль бескапельного электрораспыления проводился по форме мениска на торце капилляра. На рисунке 4А изображен мениск, форма которого характерна для бескапельного распыления. Главным условием такого распыления является отсутствие струи микрокапель с поверхности мениска. В случае, когда форма мениска не соответствовала бескапельному режиму электрораспыления, переноса сорбента на MALDI мишень не осуществлялось, так как перенесенный вместе с каплями растворителя сорбент не закрепляется на поверхности мишени после высыхания жидкости.

Параметрами, которые влияют на получение бескапельного режима, являются: высокостабильное высоковольтное напряжение на элементах узла электрораспыления, постоянная подобранная скорость откачки избытка парогазовой смеси. После правильного подбора этих параметров поток остается стабильным весь период нанесения сорбента. Для получения одного пятна сорбента диаметром 5 мм на поверхности мишени требуется около 20 минут. Используемое напряжение между электродами менялось в пределах 4300-4800 В, а расстояние между ними – 10 мм. Расход жидкости составлял 100-150 мкл/мин. Суспензию предварительно обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. При распылении в сосуд с суспензией опускали барботер, чтобы предотвратить слипание частиц сорбента в объеме и их оседание на стенках сосуда, либо помещали магнитный якорь, приводимый в движение магнитной мешалкой (рис. 3(21)).

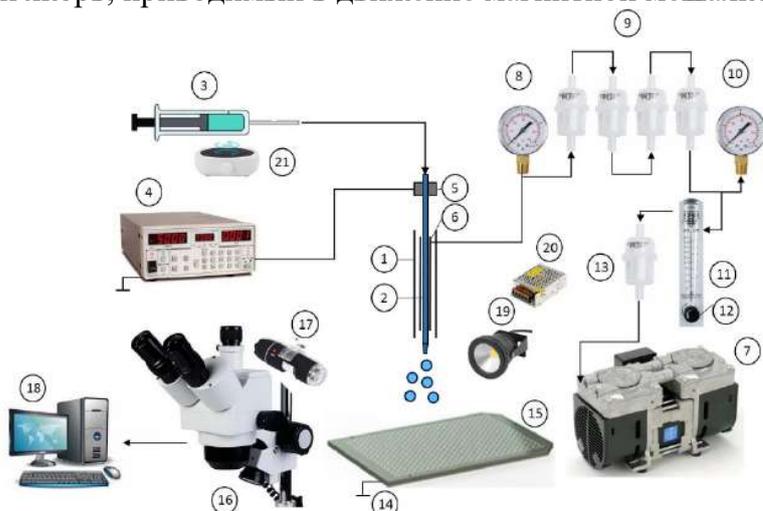


Рисунок 3 – Схема экспериментальной установки для нанесения MeOx на поверхность мишени: 1 – устройство десорбции заряженных частиц; 2 – металлический капилляр; 3 – шприц; 4 – блок питания; 5 – высоковольтный контакт; 6 – капилляр-изолятор; 7 – воздушный мембранный насос; 8 – входной механический манометрический датчик; 9 – автомобильный топливный фильтр TS07T; 10 – выходной механический манометрический датчик; 11 – механический ротаметр; 12 – ручной механический клапан; 13 – автомобильный топливный фильтр TS03T; 14 – противoelectрод; 15 – MALDI мишень; 16 – микроскоп; 17 – цифровая видекамера; 18 – компьютер; 19 – светодиодный узел; 20 – источник питания светодиодов; 21 – магнитная мешалка.

В процессе распыления дисперсии наночастиц на поверхность металлической пластины (рис. 4Б) или MALDI мишени (рис. 4В) формировалось пятно сорбента. Пятно представляет собой круг с явным уплотнением нанесенного слоя в его центре. Такое напыление устойчиво к воздействию различных растворителей, которые применяются в металл-аффинной хроматографии, и к стиранию. Главной особенностью покрытия является его хорошая адгезия к поверхности основного металла подложки. Так как причиной адгезии являются сильные межмолекулярные взаимодействия, которые являются короткодействующими, то есть наиболее сильное взаимодействие наблюдается при расстояниях в несколько ангстремов, подложка, на которую наносится растворитель, должна быть металлически чистой. Наибольшая прочность сцепления наблюдается в том слу-

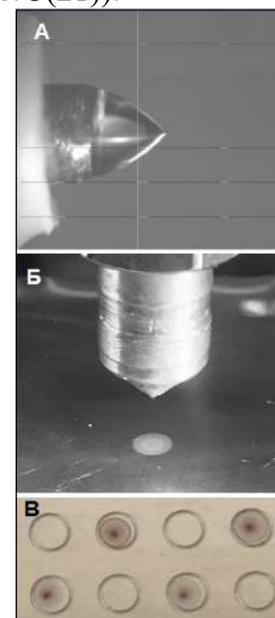


Рисунок 4 – Нанесение FeOx на подложку: А – форма мениска в режиме БЭ; Б – вид пятна FeOx на подложке (диаметр пятна ~5 мм); В – поверхность мишени, функционализированная FeOx (диаметр пятна ~2,5 мм)

чае, когда параметры решетки материала подложки и наносимого материала отличаются не более, чем на 12,5%. В таком случае происходит воспроизведение кристаллической решетки металлической подложки атомами нанесенного материала.

При варьировании растворителей и соотношения объемов растворителей, был подобран состав, который проявляет универсальные свойства и подходит для электрораспыления широкого перечня оксидов металлов, в том числе FeOx, CuOx, NiOx и ZrOx. Состав для 11 мл расходуемого объема суспензии представляет собой: 5 мл ацетонитрила; 5 мл дистиллированной воды; 100 мкл муравьиной кислоты; 400 мкл суспензии нанопорошка MeOx (200 мг MeOx в 1 мл дистиллированной воды). Для получения пятна сорбента диаметром 1,5 мм распыление проводили при следующих условиях: время работы автоматического поршня 10 минут, расходуемый объем раствора 500 мкл, скорость подачи раствора 50 мкл/мин; напряжение, подаваемое на противоэлектрод и внешний капилляр 4000 В; расстояние между противоэлектродом и внутренним капилляром 7 мм; напряжение воздушного микронасоса 8,1 В; расстояние между внешним и внутренним капиллярами 0,35 см. В этих условиях FeOx, CuOx, NiOx формировали устойчивые пятна, хорошо сцепленные с подложкой. При этом со стандартной полированной мишени пятна ZrOx легко удалялись при незначительном механическом воздействии. Соответственно, для функционализации наночастицами ZrOx поверхность мишени предварительно покрыли слоем диоксида титана, имеющего близкие параметры кристаллической решетки, толщиной около 50 нм, (ООО "ЭЛКОМ" Беларусь). Выбор диаметра пятна сорбента, составляющего 1,5 мм, был обусловлен удобством дальнейшей работы с мишенью при напылении сорбента в центр ячейки мишени до ее границ остается примерно 1 мм чистой подложки, обеспечивающее формирование водной капли образца даже в условиях высокой гидрофильности распыленной твердой фазы.

Металл-аффинная экстракция на MALDI мишени, функционализированной MeOx в формате «лаборатория на мишени»

Для оценки сорбционных свойств нанесенных на мишень MeOx процедура проведения металл-аффинной хроматографии была адаптирована к формату «лаборатория на мишени». На пятно сорбента наносили каплю водной фазы объемом 4-5 мкл (в зависимости от объекта исследования это мог быть кислый, нейтральный или слабощелочной водный раствор), инкубировали 2-3 минуты, каплю удаляли. Затем каплю наносили повторно, к ней добавляли 1 мкл образца и оставляли на 20 минут под пластиковой крышкой, чтобы уменьшить испарение жидкой фазы. Затем несвязавшуюся фракцию переносили на соседнюю ячейку, сорбент дважды промывали водным раствором и высушивали на воздухе. Для обеспечения десорбции к сорбенту добавляли 2-3 мкл 30% или 50% водного раствора ацетонитрила и 2 мкл матрицы (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота, CHCA) в 70% или 50% растворе ацетонитрила, соответственно. После полного высыхания жидкой фазы мишень помещали в масс-спектрометр и проводили MALDI MS анализ.

С помощью оптимизированной процедуры в формате «лаборатория на мишени» (сорбция при pH 2,5) была успешно проведена металл-аффинная экстракция фосфорилированных и фосфонилированных пептидов на пятнах FeOx и ZrOx. Кроме того, при экстракции аддуктов глобина человека (HGb) с N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамидом (CCAn) было показано, что при экстракции на пятнах CuOx, FeOx и ZrOx сигнал аддукта LLGNVLVCC_{An}VLANHFGK с соотношением сигнал/шум ≥ 3 детектировался при соотношении модифицированной формы к немодифицированной 1:500, а в случае NiOx – 1:1000.

Функционализация поверхности MALDI мишени FMe

Сорбенты на основе стеаратов переходных металлов хорошо проявили себя при проведении металл-аффинной хроматографии в спиновых колонках. В связи с высоким уровнем адгезии этих структур к твердым подложкам было сделано предположение, что они являются перспективными материалами для функционализации поверхности MALDI мишени. Однако невозможность адаптации классической технологии Ленгмюра для такой малой площади твердой подложки (диаметр ячейки MALDI мишени, производимой фирмой Bruker, составляет 3,1 мм) привело к необходимости разработки нового метода формирования сорбентов непосредственно на мишени. Было предложено органическую фазу, содержащую HSt, наносить на каплю водного раствора соли металла, которая будет расположена в центре ячейки мишени. Соответственно, потребовалась разработка модели формирования плёнок, подобных коллапсированным монослоям, на субфазе в геометрии, отличной от плоской поверхности ванны Ленгмюра. Можно было ожидать, что, с одной стороны, искривление поверхности, характерное для капли, изменяет ее механо-химические свойства, что по всей вероятности, может обеспечить более быстрый и полный переход HSt в соль с образованием упорядоченной структуры, содержащей ионы металла. С другой, быстрое испарение гексана при перемещении пленки с поверхности капли к ее основанию должно привести к формированию складчатой структуры с развитой поверхностью.

Как упоминалось выше, ионы La(III) имеют широкие возможности для координации. Соответственно, сорбенты, содержащие лантан, представляют особый интерес. В связи с тем, что катион лантана обладает способностью к комплексообразованию, характерному для переходных металлов, что может значительно осложнить исследование процесса самосборки стеаратов на полусферической поверхности водной субфазы, в качестве модельной системы были выбраны тонкие плёнки стеарата бария (FBa), который координирует только воду. Основным объектом исследования стала структура, сформированная на ячейке MALDI мишени при нанесении насыщенного раствора HSt в гексане на поверхность капли водной субфазы, содержащей ионы бария ($C = 10^{-2}$ М). Концентрация соли была увеличена по сравнению с используемой при классическом формировании монослоев Ленгмюра в связи с изменившимся соотношением объемов водной субфазы и гексанового раствора HSt. Эта же концентрация была использована и при дальнейших исследованиях. Ожидалось, что на выпуклой поверхности так же, как и на горизонтальной будет происходить самоорганизация молекул стеарата бария. При этом пленка при формировании на поверхности капли будет передвигаться вниз под воздействием силы тяжести, что приведет к образованию сначала конденсированной, а затем и коллапсированной структуры на ячейке мишени за пределами водной субфазы.

Методом оптической тензиометрии был исследован процесс формирования плёнки на поверхности капли. На рисунке 5А-В представлены результаты измерения угла смачивания в системе субфаза-подложка-воздух в момент перед нанесением раствора HSt в гексане, в момент нанесения раствора HSt, и спустя пять секунд. При нанесении раствора HSt в гексане угол смачивания значительно уменьшается (с 64° (рис. 5А) до 31° (рис. 5Б)) за счет образования на поверхности пленки поверхностно-активного вещества, что и приводит к снижению поверхностного натяжения, и следовательно угла смачивания. Однако, через 5 секунд после нанесения раствора HSt в гексане капля принимает первоначальный вид, и значение угла смачивания возвращается к исходному значению (рис. 5В). На основании этого можно сделать вывод о том, что образовавшаяся пленка перемещается с поверхности капли на подложку и накапливается за пределами капли водной субфазы. Образование и перемещение плёнки

по поверхности водной капли также было зафиксировано при исследовании процесса методом световой микроскопии в отраженном свете (рис. 5Г).

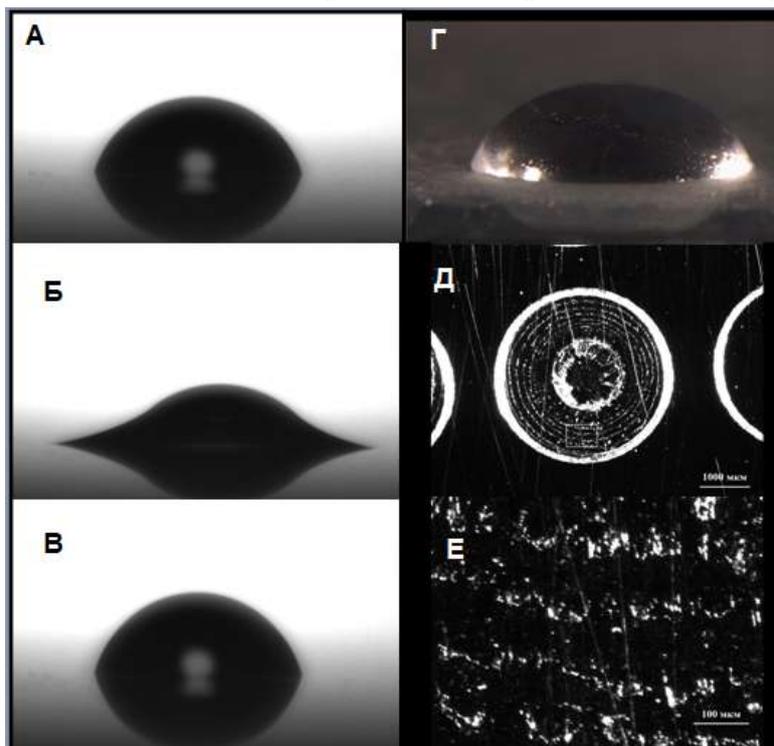


Рисунок 5 – Формирование пленки стеарата бария на твердой подложке: А – капля перед нанесением гексанового раствора; Б – капля сразу после нанесения гексанового раствора; В, Г – капля после испарения гексана; Д, Е – изображение ячейки MALDI мишени после высыхания водной капли

Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света была исследована поверхность ячейки мишени после формирования пленки, удаления капли субфазы и промывки полученной структуры водой для избавления от избытка нитрата бария. Как показано на рисунке 5Д,Е, структура нанесенного на ячейку мишени материала состоит из упорядоченных концентрических кругов яркосветящегося материала, их скопление наблюдается по периметру водной капли. Подобное распределение вещества позволяет предположить волнообразный характер формирования пленки вследствие комплекса процессов, связанных с перемещением образовавшейся пленки по поверхности водной субфазы и испарением слоя гексана. Промывка материала водой обеспечивает отсутствие исходной соли в полученных структурах, соответственно, можно сделать вывод о том, что наблюдаемые скопления вещества являются продуктом взаимодействия HSt с ионами бария.

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния (RS) были проанализированы коллапсированные монослои стеарата бария, полученные в ванне Ленгмюра, плёнки, нанесённые на подложку по классической технологии Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ), и пленка моностеарата бария, сформированная на твердой подложке. Спектры RS, представленные на рисунке 6, одинаковы для трех рассмотренных структур вне зависимости от способа получения материала. На основании этого можно сделать вывод, что на капле формируется структура, подобная классическим ПЛБ, образующимся при многократном наслаивании одного монослоя на другой, или при

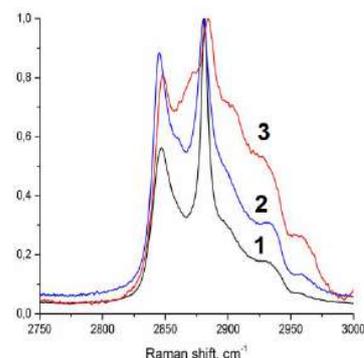


Рисунок 6 – Спектры комбинационного рассеяния, полученные при исследовании: 1 – классические пленки Ленгмюра-Блоджетт стеарата бария на кремниевой подложке; 2 – монослой стеарата бария, коллапсированный в ванне Ленгмюра; 3 – структура, сформированная у периметра водной капли, после испарения гексана

коллапсировании одного монослоя. То есть пленка, образующаяся на поверхности капли водной субфазы, является монослоем моностеарата бария, который при передвижении на подложку коллапсируется, образуя мультиструктуру. Это предположение подтвердило дополнительное исследование, проведенное в режиме реального времени с помощью микроскопической приставки.

Для подтверждения перехода HSt в соль бария было проведено исследование методом инфракрасной (IR) спектроскопии HSt; объёмного стеарата бария; монослоя стеарата бария, коллапсированного в ванне Ленгмюра; пленки, сформированной на капле субфазы с нитратом бария. В IR спектрах синтезированного стеарата бария, коллапсированного монослоя стеарата бария и плёнки, полученной на капле, отсутствовала или практически отсутствовала полоса поглощения C=O неионизированной карбоксильной группы в области 1700 см^{-1} , в отличие от свободной HSt. Однако во всех спектрах, кроме спектра HSt, присутствовали полосы в области 1513 см^{-1} , которые характерны для асимметричных валентных колебаний ионизированной группы COO⁻. Соответственно, был сделан вывод о практически полном переходе HSt в бариевую соль во всех трёх случаях. Также наличие бария в составе пленки, сформированной на капле и промытой водой, было подтверждено методом EDX на базе сканирующего электронного микроскопа.

Для исследования структурного звена пленки был проведен MALDI MS анализ полученных структур. Для этого к пленке, сформированной на ячейке мишени, добавляли матрицу 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB, 10 мг/мл в 70% водном ацетонитриле). В полученном масс-спектре присутствовал сигнал с m/z 421,169, соответствующий положительно заряженному иону моностеарата бария $[M-H+Ba]^+$, и имеющий характерное для соединения, содержащего этот металл, изотопное распределение. При этом сигналов, которые можно было бы интерпретировать, как принадлежащие остатку стеариновой кислоты (m/z 283,263), или катионированному дистеарату бария (m/z 705,440), обнаружено не было. Последующий tandemный масс-спектрометрический (MS/MS) анализ также подтвердил эту структуру. Результаты MALDI MS анализа позволяют утверждать, что основным структурным звеном пленок, сформированных на твердой подложке путем нанесения насыщенного раствора HSt в гексане на полусферическую поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария, является моностеарат бария.

Таким образом, комплекс исследований на модельном стеарате бария, показал, что при нанесении раствора HSt в гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы металла, образуется монослой на основе моностеарата бария, который при передвижении вниз под действием силы тяжести самопроизвольно коллапсируется на подложке, формируя мультиструктуры, аналогичные ПЛБ или коллапсированным монослоям, полученным в ванне Ленгмюра. Соответственно, можно ожидать, что при нанесении гексанового раствора HSt на водную каплю, содержащую ионы лантана также будет формироваться мультиструктура на основе стеарата лантана. Действительно, EDX-спектр, полученный с пленок, сформированных на водной субфазе, содержащий ионы лантана, на поверхности MALDI мишени, подтвердил их наличие в структуре. MALDI MS анализ пленок, показал, что основным структурным звеном монослоя является дистеарат лантана с одной свободной валентностью. Присутствующий в масс-спектре сигнал с m/z 705,439 соответствует иону $(C_{17}H_{35}COO)_2La^+$, что полностью согласуется с результатами, полученными на этапе разработки сорбентов. Последующий фрагментный анализ также подтвердил эту структуру.

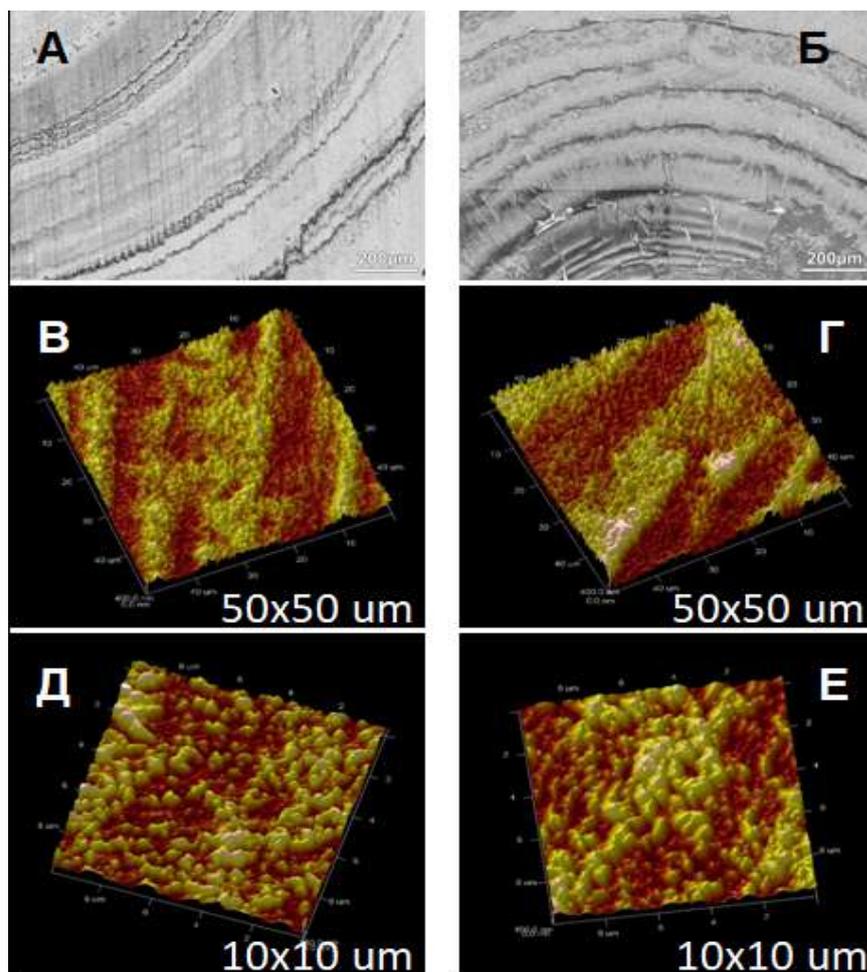


Рисунок 7 –
Изображения FBa и
FLa, сформиро-
ванных на твердой
подложке:
А, Б – изображения
FBa и FLa, соответ-
ственно, сформиро-
ванных на стальной
подложке, получен-
ные методом SEM;
В, Г – трехмерное
изображение FBa и
FLa (50x50 мкм),
сформированных на
графитовой подло-
жке, полученное
методом AFM;
Д, Е – трехмерное
изображение FBa и
FLa (10x10 мкм),
сформированных на
графитовой
подложке,
полученное методом
AFM.

Исследование морфологии сформированных на капле FBa и FLa методом SEM показало, что так же, как и в случае стеарата бария, пленка стеарата лантана формируется в виде упорядоченных концентрических кругов (рис. 7А,Б). По всей видимости, процесс самопроизвольного коллапсирования не ограничивается пространством близким к периметру водной капли, а распространяется на всю область растекания гексана. Неравномерная яркость затемненных участков на изображениях свидетельствует о различном количестве монослоев, образующих мультиструктуру. Методом атомно-силовой микроскопии (AFM) была исследована морфология структур, сформированных на графитовой подложке, в области близкой к границе испарения гексана (рис. 7В-Е). Образцы характеризуются развитой поверхностью с формированием структур различных масштабов. Наиболее крупным структурным элементом поверхности является волнообразный рельеф с перепадом высот 300-500 нм (FBa) и 350-600 нм (FLa) (рис. 7В,Г), а также периодом около 10 мкм для FBa и 15 мкм для FLa, соответственно, сформированный в результате макроскопического коллапса пленки. Тонкая структура пленок представлена зернистой структурой с размером агрегатов 300-500 нм в плоскости изображения и высотой до 150 нм в случае FBa (рис. 7Д). FLa структурно аналогичны по морфологии FBa, но отличаются более плотной упаковкой агрегатов, которые имеют несколько большие размеры (размер в плоскости изображения 350-600 нм, высота около 200 нм) (рис. 7Е). Такая морфология обеспечивает высокую удельную поверхность пленок на периферии капли. Следует отметить, что эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом

SEM. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что процесс самопроизвольного коллапсирования, начинающийся у периметра водной капли, затем распространяется на всю область растекания гексана. Причем наибольшая высота агрегатов отмечается ближе к границе испарения неполярного растворителя.

При исследовании формирования мультимолекулярных структур путем неоднократного нанесения раствора HSt на каплю водной субфазы было показано, что с точки зрения количества материала FMe (где Me = Cu, Ni, Co, Fe, In, Ga, Eu, La), сформированного в пределах одной ячейки на мишени, наиболее предпочтительным является сорбент, сформированный из 6 монослоев FLA.

Металл-аффинную хроматографию на пятнах сорбентов проводили в тех же условиях, что и с MeOx, за исключением того, что объемы растворов для инкубации были увеличены до 8-10 мкл вследствие более высокой гидрофобности FMe.

Исследование свойств FLA, сформированных на мишени, в формате «лаборатория на мишени» проводили на примере поиска пептидов, модифицированных OP, в образцах плазмы крови человека, инкубированной с PFMP. Концентрации бутирилхолинэстеразы (BChE) и HSA в плазме человека значительно различаются – 5 и 40000 мкг/мл соответственно. Поэтому из плазмы крови человека, инкубированной с PFMP в концентрации 1 и 10 нг/мл, BChE (степень ингибирования BChE составила менее 5% и 40%, соответственно) выделяли на прокаинамидном геле, а поиск аддуктов HSA с OP проводили в пептическом гидролизате суммарного белка плазмы крови. По результатам IMAC-MALDI MS (сорбция при pH>8) анализа был сделан вывод, что предложенная процедура позволяет экстрагировать достаточное для MALDI MS детектирования количество аддуктов, как HSA, так и BChE, что может позволить идентифицировать аддукты HSA и BChE с PFMP в реальных образцах плазмы крови при низких концентрациях с использованием небольшого количества биоматериала.

Для определения условий металл-аффинной экстракции галогенсодержащих аддуктов NHb в формате «лаборатория на мишени» были получены образцы белка, модифицированные N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамидом (CC2An), N1-(4-дихлорфенил)-2-хлорацетамидом (CCAn), продуктами окисления диклофенка (DCL) и продуктами окисления амодиахина (AQ). Было установлено, что производные хлорацетамидов модифицируют NHb по C-93 и C-112 бета-субъединицы и C-104 альфа-субъединицы, а продукты окисления DCL и AQ по C-112 бета-субъединицы.

При исследовании сорбции триптического гидролизата NHb, модифицированного CC2An, при различных значениях pH на сорбентах, содержащих в составе атомы Cu, Ni, Co, Fe, In, Ga, Eu, La было показано, что достигнуть наилучших результатов с точки зрения специфичности и селективности можно при проведении сорбции в нейтральной среде для всех исследуемых сорбентов. При оценке чувствительности на примере триптических гидролизатов NHb, инкубированных с CCAn и CC2An в соотношениях ксенобиотик/белок, как 10 мкг/1 мг, 1 мкг/1 мг, 100 нг/1 мг, 10 нг/1 мг, 1 нг/1 мг в 1 мл образца, было выявлено, что к модифицированному пептиду LLGNVLVC₁₁₂VLANHFGK бета-субъединицы NHb чувствительность анализа оказалась гораздо выше, чем к другим цистеинсодержащим аддуктам. Пептиды LLGNVLVC_{CAн}VLANHFGK (m/z 1886,986) и LLGNVLVC_{CC2An}VLANHFGK (m/z 1920,947) были обнаружены при мольном соотношении алкилирующего агента и белка 1:12000 и 1:1500, соответственно. Кроме того, на примере экстракции аддуктов NHb с метаболитами амодиахина, полученных при УФ-индуцированном фотокаталитическом окислении в присутствии наночастиц TiO₂ (UV/TiO₂-PCO), было продемонстрировано, что стадия металл-аффинной экстракции на FLA может быть успешно интегрирована в более масштабный формат с использованием

микрореакторного устройства, совмещенного с мишенью. FLa остаются надежно связанными с поверхностью на протяжении всех стадий эксперимента: UV/TiO₂-PCO ксенобиотика, инкубация метаболитов с белком, ферментативный гидролиз, IMAC-MALDI MS анализ.

Таким образом, можно сделать вывод, что формат «лаборатория на мишени» позволяет успешно решать задачи аддуктомики как в случае фосфонилирующих, так и хлорсодержащих алкилирующих агентов.

Сравнение форматов «лаборатория на мишени» на основе MeOx и FMe

В первую очередь было необходимо определить сохранность сорбентов на мишени и возможность их использования спустя продолжительное время после нанесения. Исследование проводили для сорбентов, содержащих Cu, Ni и Fe. MALDI мишени, функционализованные как наночастицами оксидов металлов, так и монослоями стеаратов металлов, были использованы для экстракции пептида LLGNVLC₁₁₂VLANHFGK, модифицированного CC2An, из триптического гидролизата глобина человека (соотношение CC2An/белок при инкубации 1 мкг/1 мг). После проведения масс-спектрометрического анализа мишени были убраны в контейнеры и оставлены на 1 год при комнатной температуре. По истечении указанного срока на неиспользованных ранее пятнах сорбентов была проведена повторная экстракция аналита в тех же условиях из образца, приготовленного аналогичным способом. Результаты MALDI MS анализа, представленные на рисунке 8, свидетельствуют о хорошей сохранности сорбентов на мишени: во всех случаях пептид LLGNVLC_{CC2An}VLANHFGK был надежно детектирован с сопоставимым соотношением S/N до и после хранения.

Сравнительное исследование специфичных и селективных свойств сорбентов в формате «лаборатория на мишени» проводили на примере триптического гидролизата HNb, модифицированного метаболитами DCL, полученными при UV/TiO₂-PCO. Металл-аффинную экстракцию проводили в соответствии с процедурами, разработанными на предыдущих этапах исследования для MeOx и FMe, на сорбентах, содержащих Cu, Ni и Fe. После проведения металл-аффинной хроматографии на пятнах всех сорбентов в соответствии с представленной выше процедурой, в масс-спектрах сигнал с m/z 1998,947 детектировался с хорошим соотношением S/N, при этом ΔM с сигналом интактного пептида составлял 279 Да, что соответствует остатку декарбоксилированного DCL. Сорбенты FMe, в целом, проявили более высокий уровень, как специфичности, так и селективности по сравнению с MeOx.

Одним из основных достоинств обоих разработанных способов получения металл-аффинных покрытий является отсутствие необходимости сложной предварительной подготовки поверхности подложки. Достаточно обработать поверхность предварительно вымытой мишени ацетоном перед распылением MeOx, или гексаном перед формированием FMe. Однако процесс функционализации поверхности мишени достаточно неравнозначен. Для получения покрытия на основе MeOx требуется предварительный синтез сорбента, затем использование уникальной установки (узел бескапельного электрораспыления) для нанесения сорбента на мишень. Это приводит к усложнению и удорожанию процесса функционализации поверхности, а также требует значительных временных затрат (напыление одного пятна сорбента занимает около 15 минут).

FMe формируются непосредственно на мишени, причем способ формирования позволяет получать параллельно несколько пятен сорбента. При этом для функционализации поверхности мишени требуется гораздо меньшее количество реактивов, что позволяет получать сорбенты даже с использованием дорогостоящих солей металлов, например некоторых лантаноидов.

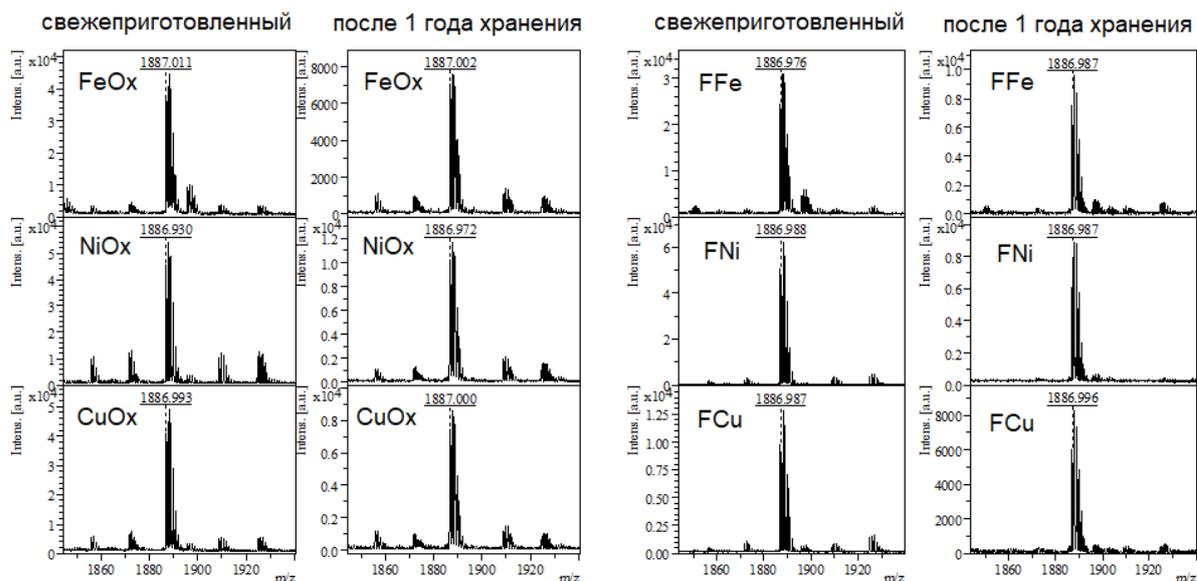


Рисунок 8 – Результаты IMAC-MALDI MS анализа аддукта LLGNVLVC_{C_{An}}VLANHFGK до и после хранения MALDI мишени с функционализированной поверхностью

Еще одним преимуществом способа получения FMe является возможность варьирования состава водной субфазы в процессе функционализации поверхности мишени, что позволяет формировать сорбенты, содержащие различные металлы, без временных затрат, в отличие от распыления, когда требуется разобрать установку, сменить суспензию MeOx, заново собрать и настроить узел распыления. Однако в границах одной ячейки мишени можно сформировать достаточно ограниченное количество сорбента FMe, в то время как при распылении возможности варьирования количества сорбента гораздо шире. Оба вида сорбентов в условиях, разработанных для функционализации поверхности, демонстрируют высокий уровень адгезии к поверхности мишени. Особенно это относится к первому слою покрытия. Но если распыленные наночастицы MeOx благодаря плотной упаковке хорошо удерживаются независимо от размера пятна, то при формировании FMe каждый последующий слой увеличивает рыхлость всего пятна, что может привести к потере сорбента при попытке сформировать большое количество монослоев в пределах ячейки. Кроме того, сами монослои стеаратов металлов обладают достаточно хрупкой структурой, что, с одной стороны, приводит к их коллапсированию и, как следствие увеличению рабочей поверхности сорбента, а с другой – значительно повышает требования к аккуратности проведения эксперимента. Следует отметить, что как MeOx, так и FMe устойчивы во всех растворителях, применяемых при металл-аффинной хроматографии, и остаются на мишени все время проведения экстракции. В силу того, что в обоих случаях атом металла входит в состав молекул, из которых состоит сорбент, продуцирование ионов металла в образец практически полностью исключено. MeOx с мишени удаляется при механическом воздействии, однако практически полное отсутствие повреждения поверхности позволяет наносить новые пятна сорбентов взамен использованных в тех же условиях. В случае FMe удаление отработанного сорбента эффективнее всего проводить путем растворения монослоев стеаратов металлов в гексане или хлороформе. После стандартной процедуры для мытья MALDI мишеней и обработки поверхности гексаном можно формировать новые пятна сорбентов.

Таким образом, на основании вышесказанного можно заключить, что в зависимости от целей и задач эксперимента оба типа сорбентов могут быть с успехом использованы, а подход «лаборатория на мишени» для специфичной экстракции и идентифи-

кации пептидов, модифицированных ксенобиотиками, может найти применение при решении многих задач медицины, экологии и фармакологии.

Раздел «**Формат «лаборатория на мишени» для анализа свободных жирных кислот»** посвящен разработке подхода, позволяющего проводить дериватизацию свободных жирных кислот (FFAs) непосредственно на поверхности MALDI мишени.

Как было приведено выше, подход «лаборатория на мишени» основывается на интеграции нескольких стадий пробоподготовки для анализа определенных компонентов в составе сложных образцов в рамках одной платформы на основе MALDI мишени. К такому подходу можно отнести и пробоподготовку, осуществленную непосредственно на ячейке мишени и приводящую к значительному повышению эффективности анализа за счет увеличения выхода ионов, и, в первую очередь, дериватизацию с образованием аддуктов или конъюгатов, способность к ионизации которых выше, чем у исходных аналитов. Примером соединений, анализ которых чаще всего осуществляется после дериватизации, являются FFAs.

Исследование самоорганизации солей HSt на полусферической поверхности водной субфазы при формировании металл-аффинных сорбентов на MALDI мишени показало, что на границе раздела фаз достигается практически количественная диссоциация FFAs с переходом кислоты в соль. Соответственно, было сделано предположение, что нанесение на водную фазу смеси FFAs, растворенной в гексане, приведет к образованию монослоя Ленгмюра, состоящего из солей FFAs, входящих в состав смеси. При этом барий, ввиду его большого ионного радиуса и сильных ионных свойств, должен способствовать эффективной ионизации карбоксилатов при энергиях лазера, применяемых в MALDI масс-спектрометрах за счет легкого отщепления второго кислотного остатка с образованием положительно заряженного иона в виде монокарбоксилата бария.

Следует отметить, что воспроизводимое образование твердых монослоев (то есть карбоксилатных монослоев, которые могут быть сколлапсированы на поверхности водной фазы) требует наличия насыщенных алкилацильных фрагментов, содержащих по меньшей мере 14 атомов углерода. С другой стороны, потенциал ненасыщенных (особенно короткоцепочечных) FFAs для образования твердых пленок Ленгмюра мал, и поэтому такие структуры не могут быть коллапсированы и перенесены в микропробирку для последующего анализа (рис. 9А). Для решения этой проблемы была использована ранее разработанная технология для формирования сорбентов на мишени, когда образование монослоев происходит непосредственно на ячейке MALDI мишени. Действительно, использование объема раствора ацетата (или другой растворимой соли) бария менее 1 мкл и нанесении на него образца такого же объема в гексане обеспечило надежную локализацию пленок Ленгмюра в пределах одной ячейки на MALDI мишени. Использование водных растворов без добавления органических является одной из важнейших особенностей предложенного подхода, так как это обеспечивает высокие константы диссоциации FFAs и солеобразования. Оптимальное формирование монослоя наблюдалось в случае, когда на каплю водной фазы объемом 0,5 – 0,75 мкл наносили образец в гексане такого же объема. После испарения органической фазы, на поверхности мишени образовывалась тонкая пленка, представляющая собой монослой. Кроме того, часть монослоя оставалась на кристаллах соли после высыхания водной субфазы, что, однако не приводило к ухудшению качества масс-спектра. Нанесение органической фазы в объемах больших 0,75 мкл приводило к растеканию образца за границы ячейки для его нанесения. В тоже время, использование объемов органической фазы меньших 0,5 мкл вело к недостаточному распределению гексанового раствора по поверхности водной капли, что, в свою очередь, негативно сказывалось на высыхании и формировании монослоев с

организованной структурой. Результатом переноса процедуры формирования монослоев непосредственно на мишени стала надежная идентификация шести сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария, в масс-спектре, полученном для смеси стандартов FFAs (табл. 3, рис. 9Б). Кроме того, при таком подходе отдельные аналиты могут быть аутентифицированы по трём параметрам (значению m/z , характерному изотопному распределению и результатам MS/MS анализа), а расход образца и время его подготовки к анализу значительно сокращаются. В сочетании с обогащением, которое проводится непосредственно на ячейке мишени, предложенный подход значительно увеличил чувствительность метода, доводя его до значений, близких для методов на основе MS/MS, при этом одновременно, по меньшей мере, со стократным уменьшением количества образца, необходимого для анализа (до 250 нг/мл каждой кислоты).

Следующим этапом исследования была апробация предложенного метода анализа FFAs для биологических образцов. В качестве объекта исследования были выбраны бурые водоросли вида *Fucus vesiculosus*, в тканях которых отмечено высокое содержание FFAs. Результаты MALDI MS анализа, проведенного для экстрактов из *F. vesiculosus*, выявили значительные различия в масс-спектрах, которые были получены в присутствии матрицы и её отсутствии для образцов биологической природы и стандартных растворов соответственно. Эксперименты показали, что даже при условии полного разрушения монослоев, ионизация монокарбоксилатов бария проходила в достаточно жестких условиях, и ацетат бария не обеспечивал эффективного перераспределения энергии лазера в кристаллах с образцом. Было сделано предположение, что добавление к образцу подходящей матрицы может улучшить перенос энергии. Было выявлено, что добавление ДНВ к водной субфазе в незначительной концентрации (0,25 г/л) перед формированием монослоя позволяет проводить анализ при мощности лазерного излучения, меньшей примерно на 20-25%, чем при использовании в качестве матрицы только ацетата бария. При этом в масс-спектре образца были представлены сигналы, соответствующие исключительно монокарбоксилатам бария. По всей видимости, в этом случае высокая гомогенность водных и гексановых растворов обеспечивает хорошо упорядоченную структуру монослоев со статистическим распределением отдельных FFAs в соответствии с их молярным отношением в исходном растворе гексана и однородную кристаллизацию образцов на MALDI мишени.

Таким образом, анионы дигидроксibenзоата могут быть встроены в структуру монослоя или могут быть распределены по его поверхности. Хотя концентрация ДНВ составляла не более 5% от традиционно используемой, это количество было достаточным для хорошего распределения энергии и получения интенсивных сигналов монокарбоксилатов бария. Это объясняет наличие высоких значений соотношений сигнал/шум и неожиданно высокую чувствительность MALDI MS анализа.

Пределы обнаружения (LOD) и количественного определения (LOQ) метода были определены для пяти стандартов FFAs с использованием монослоев, полученных с применением в качестве водной фазы смеси 0,5 г/л ацетата бария и 0,25 г/л ДНВ. Полученные LOD составляли от 10 (миристиновая, пентадекановая, и пальмитиновая кислоты) до 130 фмоль (лауриновая кислота), в то время как значения LOQ находились в диапазоне сотни фемтомоль – единицы пикомоль (табл. 3). При расчете параметров линейности и точности метода за основу были выбраны относительные интенсивности сигналов соответствующих монокарбоксилатов бария. Для этого растворы стандартов ЖК были смешаны в различных пропорциях и затем последовательно разбавлены. Для корректировки данных на возможную неопределенность, связанную с режимом излучения лазера, гомогенностью кристаллов и переносом энергии, интенсивности отдельных аналитов

были нормированы на значение интенсивности сигнала m/z 393,138 (теоретическая моноизотопная масса), соответствующего иону монопальмитата бария. Линейный динамический диапазон (LDR) для компонентов смеси FFAs определяли в соответствии с графиками нормированных интенсивностей сигналов аналитов от отношений концентраций, отложенных в логарифмическом масштабе. Для всех исследованных аналитов LDR составил как минимум три порядка. В тоже время значения коэффициента детерминации (R^2) были не ниже 0,95, а точность находилась в диапазоне от 99,6 до 101,7 % (табл. 3).

Таблица 3 - Чувствительность и параметры линейности MALDI MS метода для анализа FFAs

Обозначение	m/z [M-H+Ba] ⁺	LOD, пмоль	LOQ, пмоль	LDR	Угловой ко- эффициент	Точка пересечения с осью ординат	Коэффициент. Детерминации R^2	Точность (%)
C12:0	337,075	0,05	0,50	1 x 10 ⁴	1,60E-02	4,80E-02	0,95	99,6
C13:0	351,091	0,05	0,47	1 x 10 ⁴	2,20E-02	6,54E-02	0,98	99,7
C14:0	365,106	0,01	0,04	1 x 10 ⁴	9,41E-02	2,60E-01	0,99	101,7
C15:0	379,122	0,01	0,04	1 x 10 ⁴	1,15E-01	3,35E-01	0,99	100,6
C16:0	393,138	0,01	0,09	-	-	-	-	-
C18:0	421,169	0,01	0,08	-	-	-	-	-

Исследование внутричечной, внутрисуточной и междневной сходимостей проводили с использованием экстрактов из *F. vesiculosus*. Результаты свидетельствуют об относительно высокой внутричечной сходимости: для большинства исследуемых FFAs относительное стандартное отклонение (RSD), определенное для отношений интенсивностей как описано выше, не превышало 10,0 %, достигая значения 13,1% только для миристиновой кислоты (табл. 4).

Значения RSD для внутрисуточной сходимости лишь незначительно превышали 10%, в то время как значения RSD для междневной сходимости достигали 17,5% (C16:1). При оценке сходимости результатов в экспериментах с экстрактами из других биологических образцов, межчечная сходимость, выраженная через RSD, составила менее 15% в большинстве экспериментов, причем в большинстве случаев значения RSD не превосходили 10%.

Таблица 4 – Исследование внутричечной, внутрисуточной и междневной сходимостей результатов, полученных для экстракта из *F. vesiculosus*

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

Выше было упомянуто о том, что изотопное распределение бария может значительно упростить качественное определение и идентификацию соединений, в состав которых входит этот элемент. Однако в случае присутствия в образце семейств FFAs, отличающихся по значению m/z на 2–4 единицы, интерпретация масс-спектров и возможность проведения количественной оценки усложняется. Например, при наложении масс-спектров моностеарата бария (C18:0) и моноолеата бария (C18:1) можно отметить незначительное (примерно 5%) перекрывание сигналов третьего по интенсивности изотомера насыщенной кислоты и моноизотопного сигнала соответствующей моновенесыщенной кислоты. Однако, анализ масс-спектрометрических данных, полученных для смеси стеариновой и олеиновой кислот с известным их содержанием, показал, что отношения интенсивностей моноизотопных пиков в достаточной степени соответствуют отношению количеств соответствующих FFAs в образце. Соответственно, можно сделать вывод, что изотопное распределение бария не вносит существенных искажений для того, чтобы разработанная методика могла быть использована в целях метаболического скрининга.

Анализ серий разбавлений выбранных стандартов (табл. 3) показал, что выход ионов оказался на один или два порядка выше, чем для большинства других MALDI MS методов. Значения LOD, полученные с использованием этого подхода (десятки или сотни фемтомолей), больше соответствуют чувствительности методов, основанных на HPLC с масс-спектрометрическим детектированием (HPLC MS). Нормализация интенсивности сигналов аналитов к интенсивности сигнала FFA, присутствовавшей во всех образцах (пальмитиновая кислота), с последующим логарифмированием полученных отношений привела к неожиданно широкому LDR величиной в три-четыре порядка (табл. 3). Таким образом, с точки зрения линейности подход может быть сравним с методами на основе газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (GC MS). Кроме того, при сравнении результатов анализа гексанового экстракта из *F. vesiculosus* с помощью разработанной процедуры и GC MS был сделан вывод о хорошей согласованности между собой данных, полученных с помощью двух различных аналитических платформ.

Однако если с помощью GC MS было идентифицировано 14 FFAs, то предложенный подход позволил определить 20 FFAs. Кроме того, результаты MS/MS анализа показали, что в составе *F. vesiculosus* присутствует именно альфа-линоленовая кислота, а не её изомер по положению двойной связи – гамма-линоленовая кислота, что не было определено при GC MS анализе.

На завершающем этапе исследования оценивали применимость разработанного метода для анализа жидкостей организма млекопитающих. Для этого были получены MALDI MS спектры экстрактов из плазмы крови кролика и человека. Для экстрактов из плазмы крови кролика и человека различным оказалось не только количество идентифицированных сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария (13 и 20 соответственно), но и общий вид паттернов сигналов (рис. 10). Во-первых, в масс-спектрах экстрактов из плазмы крови человека надежно детектируются сигналы, соответствующие бариевым солям FFAs семейств C20 и C22, при этом сигналы C20:4 и C20:5 кислот имеют интенсивность, сопоставимую с C18:0, несмотря на то, что по литературным данным содержание свободной HSt в плазме крови человека в несколько раз выше, чем представителей семейства C20.

Это является показателем высокой чувствительности метода к полиненасыщенным FFAs. Во-вторых, в отличие от плазмы кролика в образцах плазмы человека детектируются сигналы, которые можно отнести к семейству C21, а именно C21:3 и C21:4 (m/z 457,134 и 455,115 соответственно). Наконец, в масс-спектрах образцов плазмы крови

человека практически полностью отсутствуют сигналы, соответствующие монокарбоксилатам бария короткоцепочечных FFAs ($C < 16$), за исключением минорного пика, соответствующего мономиристанату бария m/z 365,106 (рис. 10).

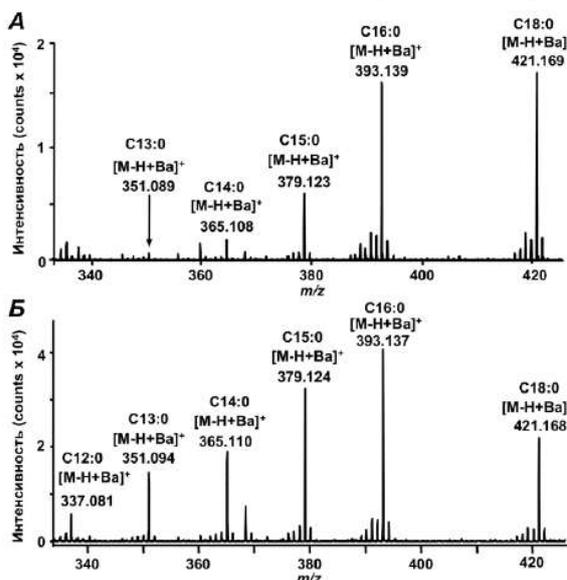


Рисунок 9 - Масс-спектры смеси стандартов FFAs при формировании монослоев в чашке Петри (А) и непосредственно на MALDI мишени (Б)

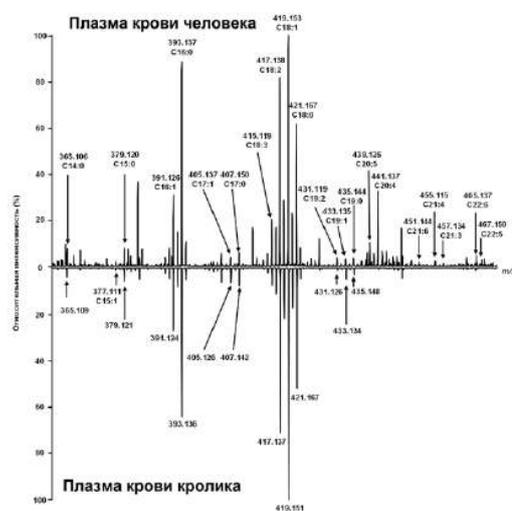


Рисунок 10 – Масс-спектры гексановых экстрактов из плазмы крови кролика и человека

К достоинствам предложенного метода можно отнести его высокую робастность. В самом деле, внутрилабораторная сходимости, которая характеризовалась значениями RSD, была ниже 10%, в то время как значения внутридневной и междневной сходимости были схожи и не превышали 15%. Эти значения согласуются с литературными данными по MALDI MS- и HPLC MS-методам, и превышают аналогичные показатели для метода профилирования FFAs, основанного на GC MS. Высочайшая чувствительность и широкий LDR в совокупности с хорошей точностью и прецизионностью делают данный метод отличным инструментом для скрининга биологических образцов различной природы. На практике анализ только двух разбавлений образца позволит расширить суммарный динамический диапазон до $10^6 - 10^8$, что может оказаться достаточным для охвата большей части диапазона концентраций FFAs, встречаемого в природе и продукции, на основе сырья природного происхождения. Также, как и традиционные GC MS методы, разработанный подход характеризуется высокой чувствительностью, точностью и сходимостью, что во многом определяется регулярностью монослоев из монокарбоксилатов бария, сформированных на MALDI мишени. При этом в свою очередь использование технологии Ленгмюра в комбинации с MALDI MS позволяет анализировать большие группы образцов, число которых ограничено числом ячеек MALDI мишени (обычно 384), что было продемонстрировано при исследовании отравления крыс ацетатом ртути, когда количество повторов составляло 42 для каждой группы животных. Такая высокая производительность не может быть достигнута при использовании GC MS, которая, очевидно, менее применима при скрининге большого числа проб.

Соответственно, по результатам проведенной работы можно сделать вывод, что разработан надежный метод идентификации FFAs по принципу «отпечатка пальцев» для быстрого профилирования биологических образцов различной природы. Благодаря высокой чувствительности, точности и широкому линейному динамическому диапазону он может быть применим не только при качественном, но и при полуколичественном срав-

нении больших серий образцов. Очевидно, что метод обладает универсальностью и может быть применён в клинической диагностике, при анализе состава и качества пищевой продукции, а также в экспериментальной биологии, например для скрининга мутантов или широкомасштабных экологических исследований.

В ЗАКЛЮЧЕНИИ обобщены основные результаты и выводы:

1. Разработаны специализированные высокопроизводительные инструментальные решения и аналитические подходы, интегрированные в формат «лаборатория на мишени», с использованием наноструктур, содержащих атомы металлов.
2. Установлено, что метод электрораспыления в нормальных условиях в бескапельном режиме с динамическим делением потока распыляемой жидкости позволяет функционализировать химически чистую поверхность MALDI мишени нанодисперсными оксидами металлов без предварительной и дополнительной подготовки поверхности. Полученное покрытие обладает механической устойчивостью и сохраняется на поверхности мишени все время выполнения эксперимента в формате «лаборатория на мишени».
3. Разработан новый подход к функционализации поверхности MALDI мишени, основанный на технологии Ленгмюра, перенесенной с плоской поверхности на поверхность капли, позволяющий формировать наноструктуры на основе стеаратов металлов непосредственно на поверхности мишени перед проведением эксперимента без дополнительной подготовки и последующей регенерации поверхности мишени.
4. Обосновано использование нанодисперсных оксидов металлов, полученных золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, и монослоев стеаратов металлов в качестве высокоэффективных металл-аффинных сорбентов, позволяющих специфично экстрагировать органические и биоорганические соединения с функциональными группами, содержащими атомы неметаллов (O, Cl, N и пр.), доноры электронной пары, из образцов различной природы.
5. Показано, что технология Ленгмюра, адаптированная к поверхности капли, позволяет формировать мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных монослоев стеаратов металлов в пределах ячейки MALDI мишени с сохранением металл-аффинных свойств этих структур. Структуры обладают высоким уровнем адгезии к подложке, механической устойчивостью и развитой поверхностью, что позволяет использовать их в формате «лаборатория на мишени».
6. Продемонстрировано, что нанодисперсные оксиды металлов и монослои стеаратов металлов, нанесенные на поверхность MALDI мишени, при использовании в формате «лаборатория на мишени» проявляют равноценный уровень специфичности, однако сорбенты на основе коллапсированных монослоев проявляют более высокую селективность при экстракции аддуктов белков с ксенобиотиками из многокомпонентных образцов.
7. Доказано, что хлорсодержащие органические соединения и белковые соединения, модифицированные их остатками или метаболитами, могут быть селективно экстрагированы из многокомпонентных образцов методом металл-аффинной хроматографии на нанодисперсных оксидах металлов и монослоях стеаратов металлов как в условиях пакетной хроматографии, так и в формате «лаборатория на мишени».
8. Выявлено, что формирование монослоев Ленгмюра на поверхности водной капли, содержащей ионы бария, при нанесении смеси свободных жирных кислот в гексане позволяет получить регулярный монослой монокарбоксилатов бария. На основании этого разработана новая методика, позволяющая осуществлять профилирование свободных жирных кислот методом MALDI MS с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК**

1. Краснов И.А., **Подольская Е.П.**, Гончаров Н.В., Бабаков В.Н., Глашкина Л.М., Ермолаева Е.Е., Дубровский Я.А., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Смолихина Т.И., Поляков Н.Б., Радилов А.С., Краснов Н.В. Идентификация алкилированного аддукта сывороточного альбумина человека методами масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 4. С. 46-53.
2. **Подольская Е.П.**, Бабаков В.Н. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в токсикологическом анализе // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 4. С. 5-12.
3. Рожкова Е.А., Краснов И.А., Суходолов Н.Г., Иванов Н.С., Янклович А.И., **Подольская Е.П.**, Краснов Н.В. Исследование поверхностных свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра-Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 4. С. 54-60.
4. Краснов И.А., Корнев Д.И., Краснов Н.В., **Подольская Е.П.**, Мурадымов М.З. Источник ионов наноэлектроспрей для масс-спектрометра mx 5310 // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 108-113.
5. Краснов Н.В., Лютвинский Я.И., **Подольская Е.П.** Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 5-20.
6. Дубровский Я.А., **Подольская Е.П.**, Войтенко Н.Г., Краснов И.А., Гладилович В.Д., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В., Краснов Н.В. Идентификация алкилированных аддуктов глобина крысы методами масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 77-83.
7. Гладилович В.Д., Краснов И.А., **Подольская Е.П.**, Дубровский Я.А., Войтенко Н.Г., Фиронов С.В., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В., Краснов Н.В. Идентификация пептидов сывороточного альбумина, модифицированных фосфорорганическими соединениями, с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 84-92.
8. Дубровский Я.А., Гладилович В.Д., Краснов И.А., **Подольская Е.П.**, Мурашко Е.А., Бабаков В.Н. Металл-аффинная хроматография для выделения алкилированных аддуктов гемоглобина крысы // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 1. С. 52-57.
9. Мурашко Е.А., Дубровский Я.А., **Подольская Е.П.**, Бабаков В.Н. Идентификация аддуктов фосфорорганических отравляющих веществ с белками крови методами фосфопротеомики // Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12. № 3. С. 77-79.
10. Кельдиева О.А., Гладилович В.Д., Прусаков А.Н., Колоницкий П.Д., Суходолов Н.Г., Селютин А.А., Краснов Н.В., Бонитенко Е.Ю., **Подольская Е.П.** Регулярные мультимолекулярные сорбенты (РММС). Получение, изучение поверхностных и сорбционных свойств // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 4. С. 50-55.
11. Jiang W., Masson P., Schopfer L.M., Lockridge O., Murashko E.A., Dubrovskii Y.A., Babakov V.N., **Podolskaya E.P.**, Mikler J., Nachon F. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase // Analytical Biochemistry. 2013. V. 439. № 2. P. 132-141.
12. Гладилович В.Д., Шрейнер Е.В., Дубровский Я.А., Колоницкий П.Д., Краснов К.А., Бабина Е.В., Мурашко Е.А., Бабаков В.Н., Кельдиева О.А., Краснов И.А., Ануров М.С.,

- Русских Я.В., Чернова Е.Н., Жаковская З.А., Суходолов Н.Г., Селютин А.А., Александрова М.Л., **Подольская Е.П.** Исследование специфичных свойств регулярного мультимолекулярного сорбента Fe(III) // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 106-114.
13. Суходолов Н.Г., Гладилович В.Д., Колоницкий П.Д., Шрейнер Е.В., Янклович А.И., Селютин А.А., Краснов Н.В., **Подольская Е.П.** Исследование электрокинетических свойств регулярных мультимолекулярных сорбентов на основе стеаратов трехвалентных металлов // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 123-129.
14. Селютин А.А., Колоницкий П.Д., Суходолов Н.Г., Шрейнер Е.В., Краснов Н.В., **Подольская Е.П.** Синтез и характеристика нанорегулярных сорбентов на основе оксида циркония // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 115-122.
15. Кельциева О.А., Гладилович В.Д., **Подольская Е.П.** Металл-аффинная хроматография. основы и применение // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 74-85.
16. Суходолов Н.Г., Иванов Н.С., **Подольская Е.П.** Новые материалы, полученные методом Ленгмюра—Блоджетт и их применение в нанотехнологии и приборостроении (Ч.1. Гибридные материалы) // Научное приборостроение. 2013. Т.23. №1. С.86-105.
17. Дубровский Я.А., Мурашко Е.А., **Подольская Е.П.**, Бабаков В.Н., Краснов Н.В., Радилев А.С. Оптимизация условий проведения металл-аффинной хроматографии для выделения фосфонированных пептидов // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 3. С. 13-19.
18. Гладилович В.Д., Федорова А.В., **Подольская Е.П.** Металл-оксидный сорбент на основе Fe₂O₃. Получение, изучение поверхностных и сорбционных свойств // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 4. С. 63-65.
19. Jiang W., Dubrovskii Y.A., Murashko E.A., Babakov V., **Podolskya E.**, Nachon F., Masson P., Schopfer L.M., Lockridge O. Phos-select iron affinity beads enrich peptides for the detection of organophosphorus adducts on albumin // Chemical Research in Toxicology. 2013. V. 26. № 12. P. 1917–192.
20. Суходолов Н.Г., Кельциева О.А., Федорова А.В., Селютин А.А., **Подольская Е.П.** Поверхностные свойства пленок Ленгмюра-Блоджетт и нанодисперсных оксидов, содержащих никель и медь // Журнал общей химии. 2015. Т. 85. № 8. С. 1387-1388.
21. Шрейнер Е.В., Гладилович В.Д., Кельциева О.А., Колоницкий П.Д., Ефремов Т.А., Струков М.К., Александрова М.Л., Селютин А.А., Суходолов Н.Г., **Подольская Е.П.** Металл-аффинная хроматография как метод специфичной экстракции вредных химических веществ и их производных из объектов окружающей среды и биологических сред // Medline.ru. 2015. Т. 16. № 2. С. 350-356.
22. Дубровский Я.А., Мурашко Е.А., Бельтюков П.П., **Подольская Е.П.**, Бабаков В.Н. Масс-спектрометрическая идентификация аддуктов бутирилхолинэстеразы с фосфорорганическими соединениями с помощью концентрирования иммунопреципитацией из плазмы крови // Medline.ru. 2015. Т. 16. № 2. С. 481-488.
23. Колоницкий П.Д., Шустов В.Э., Мозгушин И.А., **Подольская Е.П.** Синтез оксида никеля методом микроволнового синтеза и исследование его поверхностных свойств // Научное приборостроение. 2015. Т. 25. № 2. С. 102-107.
24. Шрейнер Е.В., Кельциева О.А., Шустов В.Э., Суходолов Н.Г., Шиловских В.В., Ширкин А.Ю., Александрова М.Л., Жаковская З.А., **Подольская Е.П.** Разработка металл-хелатного сорбента на основе стеарата никеля(II) // Научное приборостроение. 2015. Т. 25. № 4. С. 19-24.

25. Gladilovich V., Greifenhagen U., Sukhodolov N., Selyutin A., Singer D., Thieme D., Majovsky P., Shirkin A., Hoehenwarter W., Bonitenko E., **Podolskaya E.**, Frolov A. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed langmuir-blodgett iron(iii) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics // *Journal of Chromatography A*. 2016. V. 1443. P. 181–190.
26. Shreyner E.V., Alexandrova M.L., Sukhodolov N.G., **Podolskaya E.P.**, Selyutin A.A. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography // *Mendeleev Communications*. 2017. V. 27. № 3. P. 304-306.
27. Kurdyukov D.A., Eurov D.A., Sokolov V.V., Golubev V.G., Chernova E.N., Russkikh Y.V., Bykova A.A., Shilovskikh V.V., Ubyivovk E.V., Anufrikov Y.A., Fedorova A.V., Selyutin A.A., Sukhodolov N.G., Keltsieva O.A., **Podolskaya E.P.**, Golubev V.G. Ni-Functionalized submicron mesoporous silica particles as a sorbent for metal affinity chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2017. V. 1513. P. 140-148.
28. **Podolskaya E.P.**, Sukhodolov N.G., Serebryakova M.V., Krasnov K.A., Grachev S.A., Gzgzryan A.M. Application of Langmuir–Blodgett technology for the analysis of saturated fatty acids using the MALDI-TOF mass spectrometry // *Mendeleev Communications*. 2018. V. 28. № 3. P. 337-339.
29. Кельциева О.А., Колпакова Ю.Д., Краснов М.Н., Мурадымов М.З., Суходолов Н.Г., Краснов Н.В., **Подольская Е.П.** Модификация MALDI-мишени наночастицами при электрораспылении суспензии оксида железа(III) в нормальных условиях // *Научное приборостроение*. 2019. Т. 29. № 2. С. 5-11.
30. **Podolskaya E.P.**, Gladchuk A.S., Keltsieva O.A., Dubakova P.S., Silyavka E.S., Lukasheva E., Zhukov V., Lapina N., Makhmadaliev M.R., Gzgzryan A.M., Sukhodolov N.G., Krasnov K.A., Selyutin A.A., Frolov A. Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Analytical Chemistry*. 2019. V. 91. № 2. P. 1636-1643.
31. Babakov V.N., Shreiner E.V., Keltsieva O.A., Dubrovskii Y.A., Shilovskikh V.V., Zorin I.M., Sukhodolov N.G., Zenkevich I.G., **Podolskaya E.P.**, Selyutin A.A. Application of lanthanum stearate monolayers as a metal-affinity sorbent for the selective sorption of soman adducts to human serum albumin // *Talanta*. 2019. V. 195. P. 728-731.
32. Гладчук А.С., Батоцыренова Е.Г., **Подольская Е.П.** Оптимизация методики анализа свободных жирных кислот с помощью комбинации МАЛДИ-масс-спектрометрии и технологии получения монослоев Ленгмюра // *Научное приборостроение*. 2020. Т. 30. № 1. С. 39–49.
33. Gladchuk A., Shumilina J., Kusnetsova A., Bureiko K., Billig S., Tsarev A., Alexandrova I., Leonova L., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A., Birkemeyer C., **Podolskaya E.**, Frolov A. High-Throughput Fingerprinting of Rhizobial Free Fatty Acids by Chemical Thin-Film Deposition and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry // *Methods and Protocols*. 2020. V. 3. P. 36.
34. Шрейнер Е.В., Кельциева О.А., Гафт С.С., Суходолов Н.Г., Рейнюк В.Л., Александрова М.Л., **Подольская Е.П.** Применение металл-оксидных сорбентов для извлечения диазинона из воды // *Научное приборостроение*. 2020. Т. 30. №. 2. С. 27-32.
35. Gorbunov A.Y., Krasnov K.A., Bardin A.A., Keltsieva O.A., Babakov V.N., Podolskaya E.P. TiO₂-modified MALDI target for in vitro modeling of the oxidative biotransformation of diclofenac // *Mendeleev Communications*. 2020. V. 30. P. 220-222.
36. Gladchuk A.S., Krasnov K.A., Keltsieva O.A., Kalninia Y.K., Alexandrova M.L., Ivanov N.S., Muradymov M.Z., Krasnov N.V., Reynyuk V.L., Sukhodolov N.G., **Podolskaya E.P.** A

new approach for analysis of polyprenols by a combination of thin film chemical deposition and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2021. V. 35. № 21. P. e9185.

37. Горбунов А.Ю., Зорин И.М., Ильюшонок С.К., Бардин А.А., Кельциева О.А., Краснов Н.В., Бабаков В.Н., **Подольская Е.П.** Применение электрофоретически модифицированной TiO₂ МАЛДИ-мишени для масс-спектрометрии с поверхностно-активированной лазерной десорбцией-ионизацией // *Научное приборостроение*. 2021. Т. 31. № 1. С. 44-58.

38. Gladchuk A.S., Silyavka E.S., Shilovskikh V.V., Bocharov V.N., Zorin I.M., Tomilin N.V., Stepashkin N.A., Alexandrova M.L., Krasnov N.V., Gorbunov A.Yu., Babakov V.N., Sukhodolov N.G., Selyutin A.A., **Podolskaya E.P.** 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 // *Thin Solid Films*. 2022. V. 756. P. 139374.

39. Gorbunov A., Bardin A., Ilyushonok S., Kovach J., Petrenko A., Sukhodolov N., Krasnov K., Krasnov N., Zorin I., Osborne A., Babakov V., Radilov A., **Podolskaya E.** Multiwell photocatalytic microreactor device integrating drug biotransformation modeling and sample preparation on a MALDI target // *Microchemical Journal*. 2022. V. 178. P. 107362.

40. Ladikan O., Silyavka E., Mitrofanov A., Laptenkova A., Shilovskikh V., Kolonitskii P., Ivanov N., Remezov A., Fedorova A., Khripun V., Pestova O., **Podolskaya E.P.**, Sukhodolov N.G., Selyutin A.A. Thin Films of Lanthanide Stearates as Modifiers of the Q-Sense Device Sensor for Studying Insulin Adsorption // *ACS Omega*. 2022. V. 7. P. 24973-24981.

41. Горбунов А.Ю., **Подольская Е.П.** Формирование наноразмерных мультимолекулярных структур стеарата лантана с использованием монослоев Ленгмюра для масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией // *Письма в ЖТФ*. 2022. Т. 48, вып. 21. С. 35-39.

42. Babakov V.N., Gorbunov A.Y., Gladchuk A.S., Kalninya Y.K., Shilovskikh V.V., Tomilin N.V., Sukhodolov N.G., Radilov A.S., **Podolskaya E.P.** Identification of phosphonylated peptides using a MALDI target functionalized with lanthanum stearate // *Extreme Medicine*. 2023. V. 1. P. 11-19.

Патенты

1. Патент 2608529. Российская Федерация, МПК В01J 20/28. Регулярные мультимолекулярные сорбенты для металл-аффинной хроматографии, содержащие лабильную ковалентную связь: № 2012117536: заявл. 18.04.2012: опубл. 27.10.2013 / В.Д. Гладилович, **Е.П. Подольская**, А.А. Селютин, Н.Г. Суходолов – 10 с.

2. Патент 2733530. Российская Федерация, МПК Н01J 27/00. Устройство для нанесения наночастиц оксидов металлов на металлическую поверхность при нормальных условиях: № 2019120320: заявл. 27.06.2019: опубл. 05.10.2020 / **Е.П. Подольская**, О.А. Кельциева, Н.В. Краснов, М.З. Мурадымов, М.Н. Краснов – 11 с.

Благодарности

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