
**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПРИБОРОВ
И ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ МЕТОДИК**

УДК 539.216.2; 543.51

© А. С. Гладчук, Е. Г. Батоцыренова, Е. П. Подольская, 2020

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА
СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ
КОМБИНАЦИИ МАЛДИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСЛОЕВ ЛЕНГМЮРА**

Предложена оптимизация методики анализа свободных жирных кислот (СЖК) в биологических образцах методом МАЛДИ-масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС) с использованием технологии Ленгмюра на стадии нанесения образца на мишень. Для ранее разработанной методики профилирования СЖК в биологических образцах, включающей в себя следующие стадии: нанесение водной капли, содержащей соль бария и матрицу 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, в центр лунки мишени МАЛДИ; двукратное нанесение гексанового экстракта из биологического образца, содержащего СЖК; разрушение высушенного на лунке мишени монослоя 90 %-м водным ацетонитрилом и МАЛДИ-МС анализ — предложено выведение водно-органической капли за пределы лунки мишени и проведение масс-спектрометрического анализа в режиме автоматической регистрации спектров. Оптимизированный подход был апробирован в токсикологическом эксперименте и позволил выявить значимые ($p < 0.05$) изменения относительных концентраций ряда СЖК в плазме крови контрольной и опытной групп крыс.

Кл. сл.: свободные жирные кислоты, монокарбоксилаты бария, технология Ленгмюра, МАЛДИ-масс-спектрометрия

ВВЕДЕНИЕ

Жирные кислоты (ЖК) принимают участие во множестве ключевых метаболических процессов, являются неотъемлемым компонентом клеточных мембран [1–3]. В свою очередь свободные жирные кислоты (СЖК) могут выступать в качестве сигнальных молекул, тем самым участвуя в регуляции различных клеточных процессов [4], а изменение в их метаболизме связано с целым рядом заболеваний [5–7]. Современные подходы к анализу СЖК преимущественно основываются на хроматографическом разделении смеси аналитов с последующим масс-спектрометрическим детектированием, что позволяет достигать высокой селективности и чувствительности [8, 9]. В то же время данные методы сопряжены со значительными временными затратами, а также необходимостью проведения дериватизации аналитов, что требует высокой квалификации оператора. В связи с этим поиск новых способов анализа СЖК является актуальной задачей современной аналитической химии.

Технология Ленгмюра позволяет получать нерастворимые в воде мономолекулярные слои амфифильных молекул, к которым в первую очередь относятся ЖК [10]. При этом в случае, когда в органической фазе растворена смесь ЖК, монослой будет сформирован из смеси ЖК или их солей

[11]. Если в качестве водной фазы использовать раствор двухвалентного щелочноземельного металла, например бария, то при нанесении на ее поверхность смеси различных жирных кислот, растворенных в гексане, будет сформирован монослой на основе смеси монокарбоксилатов бария, причем его структура будет регулярной. Ранее нами была показана возможность анализа насыщенных СЖК в виде монокарбоксилатов бария методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) после растворения монослоев, полученных в установке Ленгмюра [12]. Позднее было выявлено, что при переносе технологии Ленгмюра с горизонтальной поверхности на выпуклую (каплю) удается получить монослой, сформированный из монокарбоксилатов бария как из насыщенных, так и ненасыщенных ЖК. При условии помещения капли непосредственно на ячейку МАЛДИ-мишени монослой из смеси монокарбоксилатов бария могут быть проанализированы методом МАЛДИ-МС [13]. Стоит отметить, что в образовании монослоя участвуют исключительно свободные жирные кислоты (СЖК), что выгодно отличает предложенный метод пробоподготовки. Таким образом, на основе технологии Ленгмюра была разработана новая методика анализа СЖК методом МАЛДИ-МС для идентификации и относительной количественной

оценки СЖК в биологических образцах, отличающаяся высокой чувствительностью и сходимостью. Однако стоит отметить, что для достижения высокой сходимости необходимо провести не менее 28 000–30 000 импульсов лазера по всей поверхности пятна монослоя, что при анализе большого количества образцов при нескольких повторях приводит к значительным временным затратам и требует высокой концентрации внимания оператора. Соответственно в данной работе было проведено усовершенствование ранее предложенной методики с целью автоматизации процесса регистрации масс-спектров при анализе СЖК методом МАЛДИ-МС с использованием технологии Ленгмюра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция липидной фракции из биологических образцов

1. Образцы плазмы крови крыс ($n = 7$) объемом 200 мкл смешивали с 200 мкл *n*-гексана, инкубировали при перемешивании на мультитротаторе RS-60 (Biosan, Латвия) с угловой скоростью 60 об/мин в течение 20 мин при 25 °С. Затем образцы центрифугировали в течение 30 мин (12 045 g, 25 °С) и отбирали органическую фазу объемом 100 мкл в другую микропробирку для последующего анализа.

2. Икра морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis*, выловленных у побережья Камчатского полуострова, после извлечения была заморожена (–20 °С), а затем подвергнута лиофильной сушке. К навескам икры *Strongylocentrotus droebachiensis* (15 мг, $n = 3$) добавляли 750 мкл *n*-гексана, растирали смесь пестиком для гомогенизации в пробирках в течение 2 мин и инкубировали при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали в течение 20 мин (12 045 g, 25 °С) и отбирали органическую фазу объемом 100 мкл в другую микропробирку для последующего анализа.

Нанесение образцов на МАЛДИ-мишень

1. На центр лунки стальной полированной МАЛДИ-мишени наносили 0.6 мкл водного раствора, содержащего 2.5-дигидроксибензойную кислоту (ДНВ) и ацетат бария (концентрация каждого компонента 0.25 мг/мл). Делали не менее трех нанесений (технических повторов) на различные лунки мишени.

2. На поверхность водной капли, содержащей 2.5-дигидроксибензойную кислоту и ацетат бария, наносили 0.6 мкл образца в *n*-гексане. При нанесении органической фазы необходимо, чтобы наконечник дозатора немного возвышался над поверх-

ностью водной фазы и не проникал в нее. При нанесении органической фазы происходило растекание ее по поверхности капли и затем в радиальном направлении от капли по поверхности лунки мишени. Дожидались полного испарения *n*-гексана. Наносили еще 0.6 мкл образца в *n*-гексане на поверхность водной капли.

3. После полного высыхания поверхности лунки мишени наносили на данную лунку 2 мкл 90 %-го (об. %) водного ацетонитрила. Повторяли данную процедуру после испарения растворителя. На данном этапе предпочтительным является формирование круглых симметричных капель.

4. Используя наконечник дозатора, переместили сформированную каплю на край лунки и дожидались испарения капли.

МАЛДИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Оборудование

Масс-спектры были получены с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия) на базе ресурсного центра "Развитие молекулярных и клеточных технологий" Научного парка СПбГУ. Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 250–550. Значения напряжений 1 и 2 на источнике составляли 20.0 и 17.9 кВ соответственно. Напряжения на линзах, отражателе и детекторе отражателя были равны 7.0, 21.1 и 2.422 кВ соответственно. Число лазерных импульсов при регистрации одного спектра составляло 30 000, частота выстрелов — 2000 Гц. Временная задержка импульсной экстракции ионов составляла 120 нс. Регистрацию и интерпретацию масс-спектров осуществляли с использованием программного обеспечения FlexControl 3.4 и FlexAnalysis 3.4. Регистрацию масс-спектров в автоматическом режиме проводили с помощью функции AutoXecute программного обеспечения FlexControl 3.4. Для этого создавали лист очередности проведения измерений и устанавливали параметры регистрации: мощность лазера — 90 %; диапазон m/z 250–550; число импульсов лазера — 30 000; ограничение диаметра области регистрации сигналов — 2000 мкм; траектория облучения лунки мишени — random walk (complete sample).

Тандемные масс-спектры были получены в режиме LIFT для низких масс (LIFT 1 и 2 равны 19.0 и 4.5 кВ соответственно); селекция иона предшественника — 1 Да, время импульсной экстракции ионов — 90 нс. Напряжения 1 и 2 на источнике, напряжение на линзах были равны 7.5, 6.8 и 3.5 кВ соответственно. Для калибровки были использо-

ваны следующие значения m/z : 290.924; 365.106; 393.137; 421.169; 441.138.

Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистическую обработку масс-спектров, полученных при исследовании экстрактов из плазмы крови крыс, проводили с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2 (Nonlinear Dynamics, Великобритания) при следующих настройках в каждом из разделов: Pre-processing the spectra (Noise Filter — 2; Smooth Factor — 0.005; Segments — 200; Estimation points — 100), Alignment (Search Area — 5; Iterative cycles — 5), Peak Detection (Threshold — 2000; m/z : 350–550), Statistics measurement (Normalized Peak Height m/z 419.16).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее разработанная методика профилирования СЖК в биологических образцах включает следующие стадии: нанесение водной капли, содержащей соль бария и матрицу ДНВ, в центр лунки стальной полированной МАЛДИ-мишени; дву-

кратное нанесение на поверхность водной капли гексанового экстракта из биологического образца, содержащего СЖК; разрушение высушенного на лунке мишени монослоя 90 %-м (об. %) водным ацетонитрилом и МАЛДИ-МС анализ. Однако стоит отметить, что, кроме разрушения структуры монослоя, раствор ацетонитрила смывает с поверхности образца излишки матрицы и другие гидрофильные полярные примеси, которые затрудняют масс-спектрометрический анализ монокарбоксилатов бария, входящих в состав монослоя. При этом в процессе испарения растворителя на гидрофобной поверхности монослоя капля водно-органической фазы обретает симметричную округлую форму и высыхает в виде пятна диаметром 1–2 мм. Масс-спектры, полученные с этой области мишени, отличаются избыточным количеством примесных пиков, на фоне которых целевые сигналы могут отсутствовать (рис. 1, а). Соответственно, такие масс-спектры несут недостоверную информацию о составе СЖК в анализируемом образце и не могут быть приняты для дальнейшей количественной обработки. Для получения воспроизводимых достоверных результатов оператор во время проведения анализа не использует

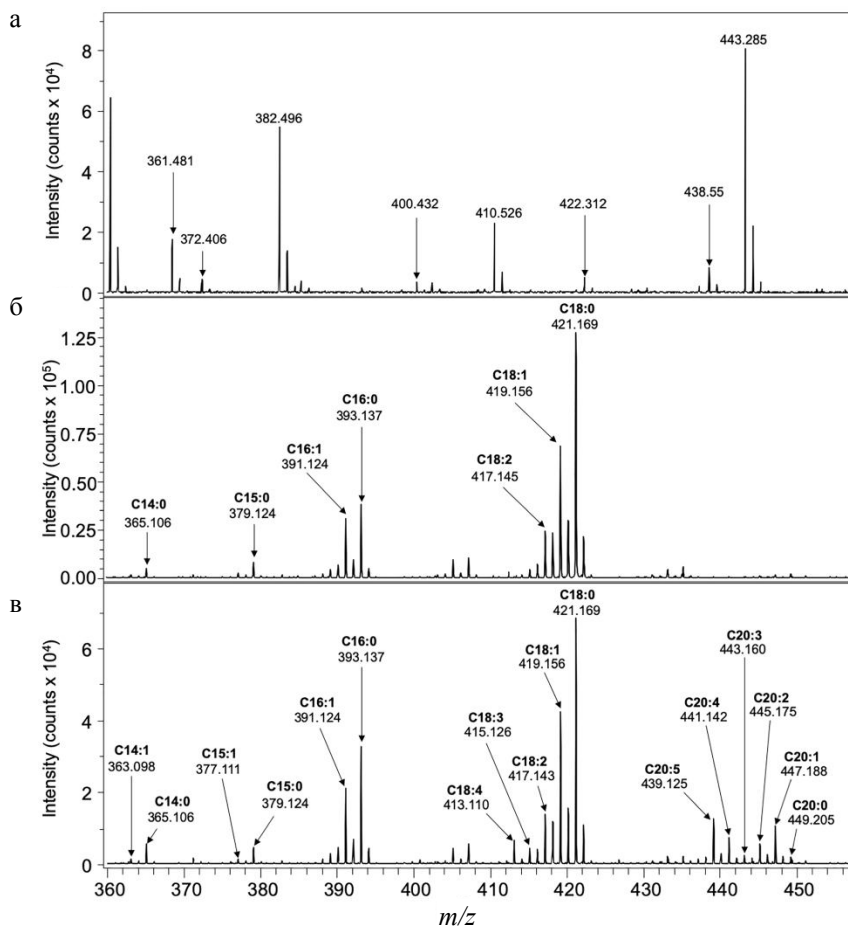


Рис. 1. Образцы МАЛДИ-масс-спектров.

а — масс-спектр, полученный при облучении лазером пятна, образующегося при испарении 90 %-го водного ацетонитрила, нанесенного на сформированные на лунке мишени монослои; б — масс-спектр экстракта из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3; в — масс-спектр экстракта икры *Strongylocentrotus droebachiensis*

эту область для работы. Автоматический анализ предполагает стохастическое лазерное облучение образца, что не позволяет избегать нежелательной области на лунке мишени. Поэтому мы предложили выталкивать каплю, образующуюся после обработки лунки мишени 90 %-м (об. %) водным ацетонитрилом, после приобретения ею ровной круглой формы за пределы лунки с помощью наконечника дозатора (рис. 2). При отсутствии гидрофильных примесей на поверхности образца водно-органическая капля достаточно легко переме-

щается по его поверхности и высыхает за границей лунки мишени, что исключает попадание лазерного импульса в область, содержащую нецелевые компоненты образца.

В качестве объекта исследования нами был выбран гексановый экстракт из штамма бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3. Масс-спектрометрический анализ показал (рис. 1, б; табл. 1), что в экстракте достоверно идентифицируются 7 СЖК, наиболее часто встречающиеся в биологических образцах (кластеры С14–С18).

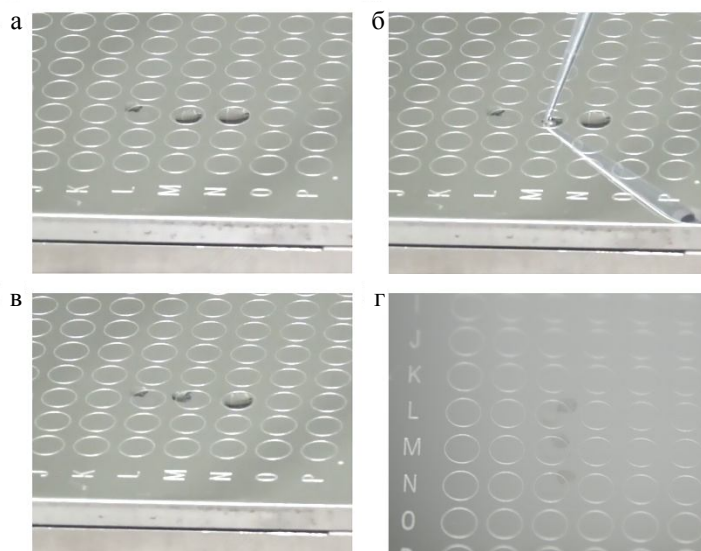


Рис. 2. Демонстрация процесса выведения капли раствора 90 %-го водного ацетонитрила за пределы лунки мишени.

а — капля раствора 90 %-го водного ацетонитрила нанесена на сформированные на лунке мишени монослои;

б — оператор, используя наконечник дозатора, проникает внутрь капли и перемещает ее на границу лунки мишени;

в — капля выведена на границу лунки мишени;

г — после полного испарения капли на ее месте образуется затемненная область

Табл. 1. Значения внутрисуточной сходимости результатов, полученные для экстракта из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3 при двух различных режимах регистрации спектров.

Интенсивность исследованных сигналов нормировали на интенсивность пика, соответствующего моноолеату бария m/z 419.16 (SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение)

Название СЖК	Обозначение СЖК	m/z [M-H+Ba] ⁺	Нормированная интенсивность			
			Регистрация спектров вручную		Автоматический режим регистрации спектров	
			Среднее ± SD	RSD, %	Среднее ± SD	RSD, %
Миристиновая	C14:0	365.106	0.086 ± 0.008	9.2	0.068 ± 0.004	6.2
Пентадекановая	C15:0	379.124	0.102 ± 0.009	8.8	0.095 ± 0.005	5.2
Пальмитолеиновая	C16:1	391.124	0.283 ± 0.016	5.8	0.372 ± 0.034	9.1
Пальмитиновая	C16:0	393.137	0.548 ± 0.031	5.6	0.531 ± 0.032	6.1
Линолевая	C18:2	417.145	0.381 ± 0.020	5.3	0.358 ± 0.024	6.7
Стеариновая	C18:0	421.169	1.661 ± 0.167	10.1	1.964 ± 0.114	5.8

Идентификация соединений осуществлялась как по значению m/z , так и по результатам tandem-масс-спектрометрического (МС/МС) анализа (рис. 3, а). В соответствии с методикой экстракт был нанесен на 3 лунки мишени, и с каждой лунки

оператор вручную получал 3 масс-спектра без облучения области высыхания капли 90 %-го (об. %) водного ацетонитрила. Затем процедуру нанесения экстракта на 3 лунки мишени провели повторно, но капля была выведена за пределы лунки.

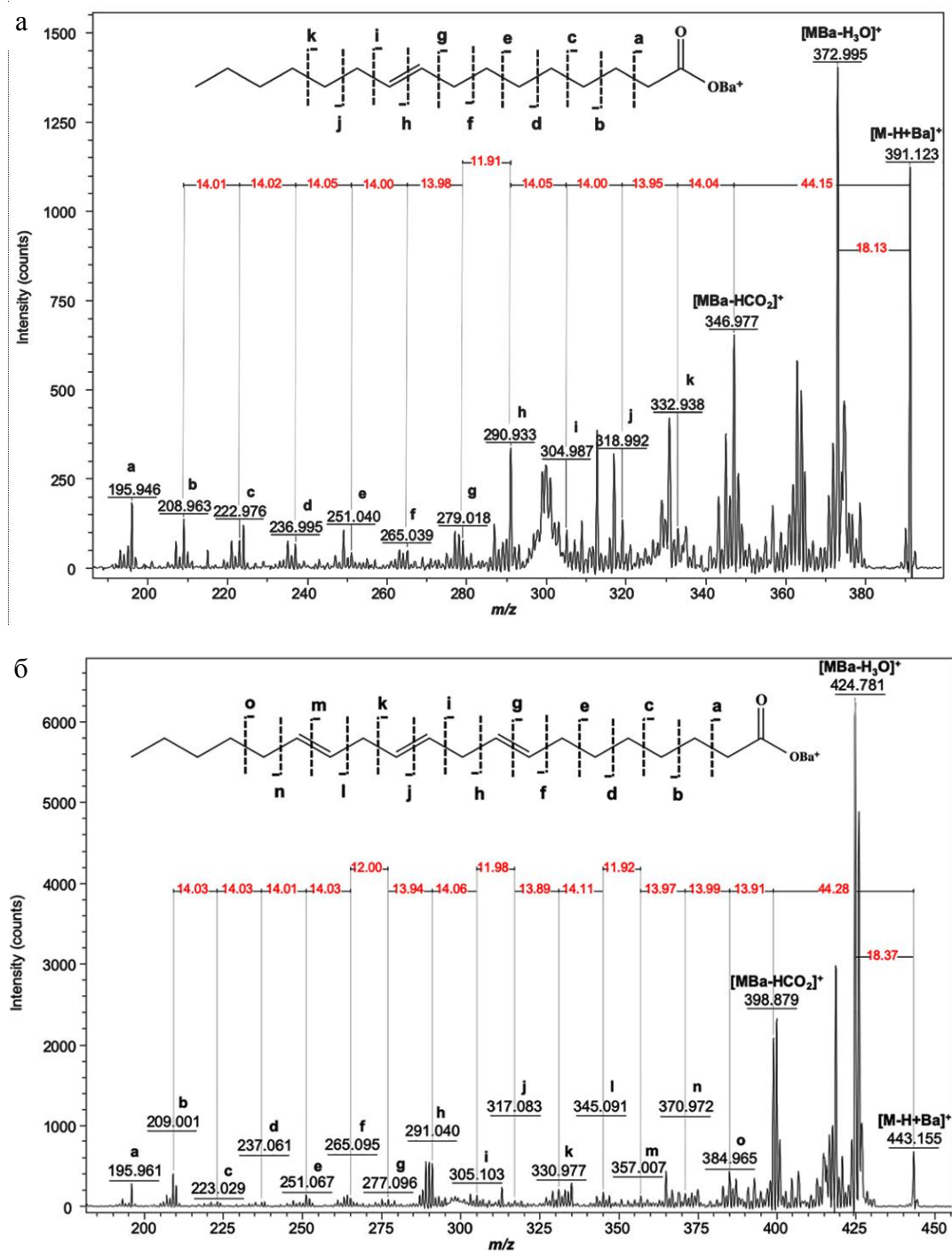


Рис. 3. Тандемные масс-спектры.

а — m/z 391.123 в составе экстракта из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3, соответствующий иону $[M-H+Ba]^+$ пальмитолеиновой кислоты; б — m/z 443.155 в составе экстракта из икры *Strongylocentrotus droebachiensis*, соответствующий иону $[M-H+Ba]^+$ дигомо-гамма-линоленовой кислоты

При этом регистрация масс-спектров в данном случае осуществлялась в автоматическом режиме с использованием функции AutoXecute, а число масс-спектров, получаемых с одной лунки, было таким же, как и в предыдущем случае. При оценке сходимости для каждой серии измерений интенсивности сигналов нормировали на значение интенсивности пика моноолеата бария m/z 419.16 (в соответствии с [13]), затем для нормированных интенсивностей рассчитывали стандартное отклонение (SD) и относительное стандартное отклонение (RSD). Как показано в табл. 1, результаты, полученные при двух различных режимах регистрации масс-спектров, хорошо согласуются между собой и при автоматическом режиме получения масс-спектров RSD не превышает 10 %. Таким образом, было показано, что регистрация масс-спектров в автоматическом режиме позволяет получать воспроизводимые результаты при экономии рабочего времени оператора, а оптимизированная методика может применяться для профилирования СЖК в биологических образцах.

Следует отметить, что информация о составе СЖК может иметь большое значение при поиске новых сырьевых источников для продуктов питания, а также при оценке качества пищевых продуктов. Особенно важным это является при оценке пищевой ценности источников, содержащих моно- и полиненасыщенные ЖК, в том числе и незаменимые ЖК. Соответственно, представлялось важным оценить применимость оптимизированной методики для анализа экстрактов из биологических материалов, имеющих в составе полиненасыщенные ЖК. Одним из примеров таких биоло-

гических объектов может служить икра зеленого морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis*, в которой исследователи отмечают большое разнообразие и высокое содержание полиненасыщенных ЖК [14–17]. По результатам МАЛДИ-МС профилирования гексанового экстракта из икры *Strongylocentrotus droebachiensis* было выявлено, что данный объект обладает богатым набором СЖК в своем составе: всего было достоверно идентифицировано 17 бариевых солей различных СЖК, большая часть из которых является ненасыщенными (рис. 1, в). Особый интерес среди обнаруженных в составе экстракта СЖК представляет кластер C20, т.к. его представители относятся к омега-3, -6 и -9 комплексам. При идентификации соединений, как и в случае с экстрактом из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3, мы опирались в том числе на результаты МС/МС анализа. Полученные МС/МС спектры были информативными и позволяли установить положение двойных связей в структуре СЖК (рис. 3, б). Также для экстракта из икры *Strongylocentrotus droebachiensis* была проведена оценка сходимости получаемых результатов. Для этого из образца икры было приготовлено 3 экстракта, каждый из которых был трижды нанесен на мишень МАЛДИ в соответствии с оптимизированной методикой, и с каждой лунки в автоматическом режиме было получено по 2 масс-спектра. Таким образом, для исследования сходимости в обработку были взяты данные 18 масс-спектров. Полученные результаты для основных представителей полиненасыщенных ЖК, продемонстрированные в табл. 2, оказались

Табл. 2. Значения внутрисуточной сходимости результатов, полученные для экстракта из икры *Strongylocentrotus droebachiensis*.

Интенсивность исследованных сигналов нормировали на интенсивность пика, соответствующего моноолеату бария m/z 419.16 (SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение)

Название СЖК	Обозначение СЖК	m/z [M-H+Ba] ⁺	Нормированная интенсивность	
			Среднее ± SD	RSD, %
Стиридовая	C18:4	413.110	0.135 ± 0.020	14.9
Тимнодоновая	C20:5	439.125	0.263 ± 0.054	20.6
Арахидоновая	C20:4	441.142	0.169 ± 0.032	18.9
Дигомо-гамма-линоленовая	C20:3	443.160	0.074 ± 0.015	19.9
Эйкозодиеновая	C20:2	445.175	0.170 ± 0.033	19.5
Гондоиновая	C20:1	447.188	0.313 ± 0.064	20.4

несколько хуже, чем в предыдущем эксперименте: для большей части СЖК значение RSD составило около 20 %. По всей видимости, это связано с неоднородностью исходного биологического материала, который представлял собой смесь икры нескольких особей. Тем не менее такой уровень схожести удовлетворяет требованиям для проведения метаболомных исследований [18] и позволяет предположить возможность использования оптимизированного подхода профилирования СЖК в гексановых экстрактах из биологических образцов при выполнении токсикологического эксперимента на животных при условии статистической обработки данных с помощью специализированной программы.

Оптимизированная методика была использована при исследовании хронического отравления крыс ацетатом ртути. Из самцов белых беспородных лабораторных крыс были сформированы опытная и контрольная группы по 7 животных в каждой. В соответствии с протоколом исследования животным из опытной группы вводили ацетат ртути в виде водного раствора перорально в дозе 4 мг/кг в течение 1 мес. СЖК были проана-

лизированы в гексановом экстракте из плазмы крови крыс. Каждый образец был нанесен на мишень МАЛДИ 3 раза. Регистрацию масс-спектров проводили в автоматическом режиме в соответствии с оптимизированной методикой, с каждой лунки было получено по 2 масс-спектра. Таким образом, для статистической обработки было использовано 42 масс-спектра для каждой из групп (7 экспериментальных повторов и 6 технических). Статистическую обработку полученных масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2. При оценке различий между группами нормирование проводили по интенсивности сигнала m/z 419.16, соответствующего моноолеату бария.

Результаты эксперимента, представленные на рис. 4, 5, свидетельствуют о наличии значимых ($p < 0.05$) изменений содержания ряда СЖК в плазме крови крыс, подвергшихся интоксикации, по сравнению с контрольной группой: наряду с понижением содержания миристиновой и пентадекановой кислот наблюдалось повышение относительной концентраций линолевой и арахидоновой кислот.

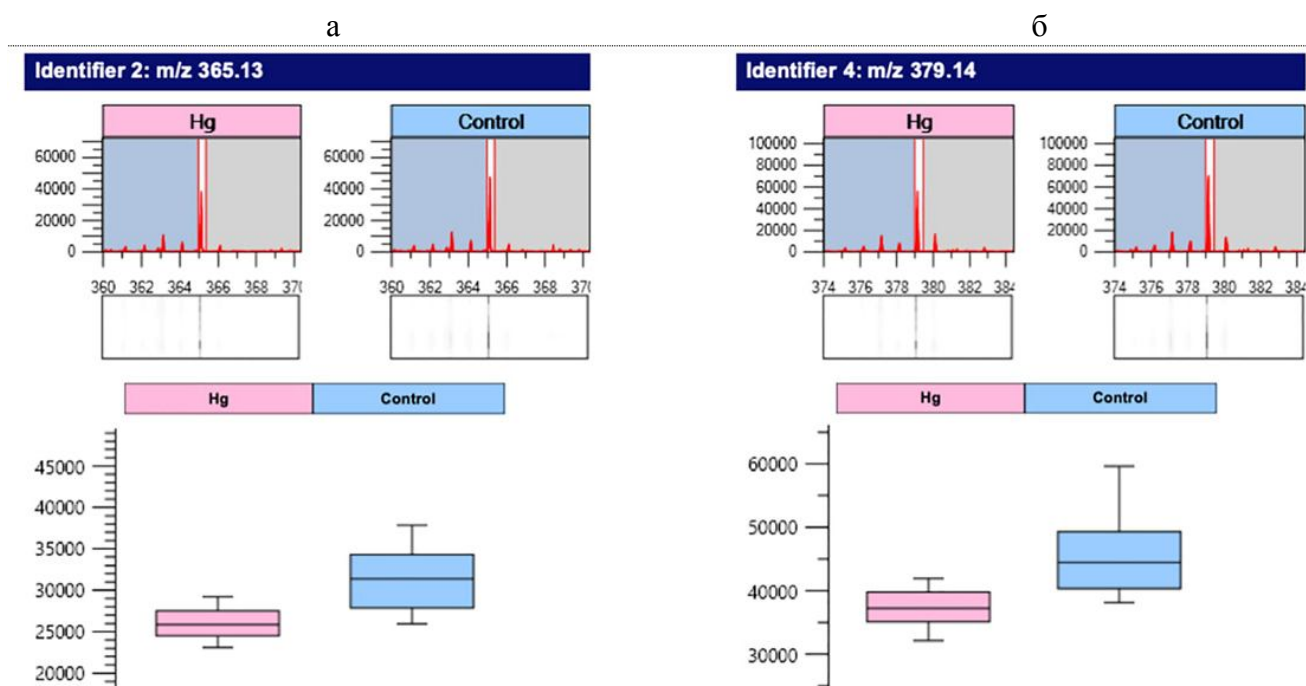


Рис. 4. Результаты статистической обработки данных (протокол программы Progenesis MALDI 1.2) для контрольной (Control) и опытной (Hg) групп крыс.
а — миристиновая кислота, б — пентадекановая кислота

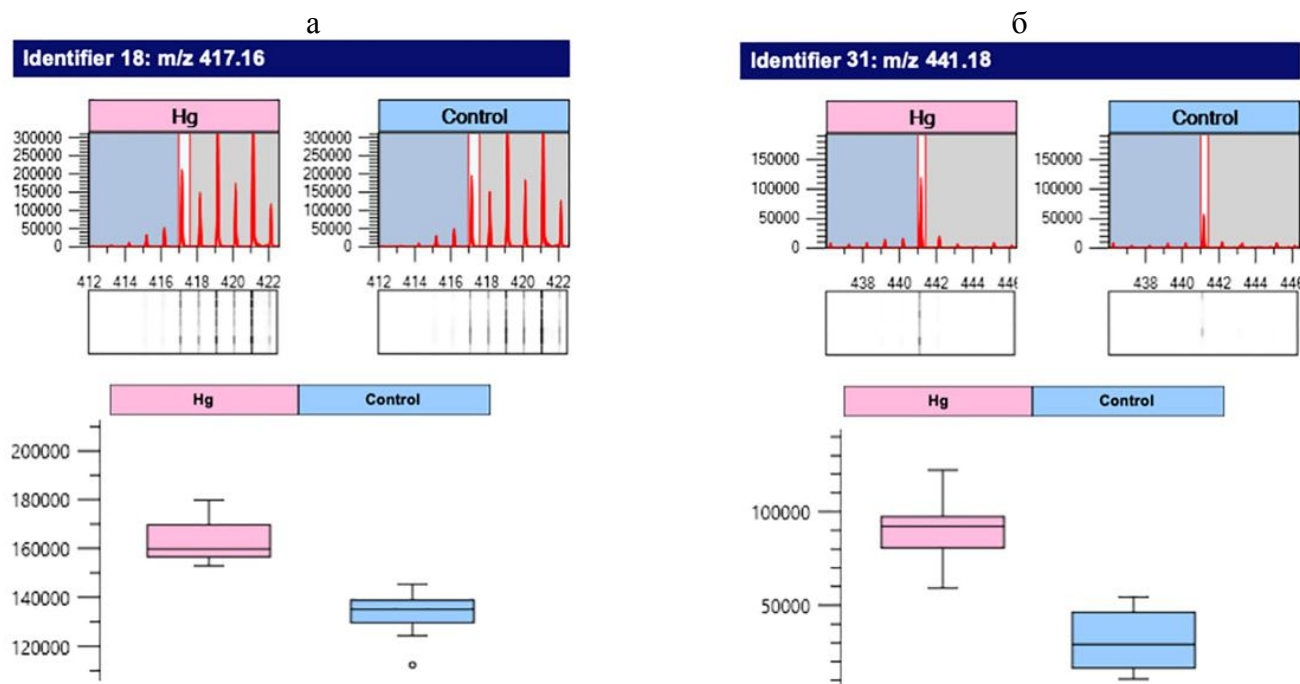


Рис. 5. Результаты статистической обработки данных (протокол программы Progenesis MALDI 1.2) для контрольной (Control) и опытной (Hg) групп крыс.
а — линолевая кислота, б — арахидоновая кислота

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы была оптимизирована методика анализа СЖК в биологических образцах методом МАЛДИ-МС с использованием технологии Ленгмюра на стадии нанесения образца на мишень. Проведение масс-спектрометрического анализа в режиме автоматической регистрации масс-спектров позволяет значительно снизить трудозатраты оператора и получить воспроизводимые результаты. Предложенный оптимизированный подход может быть эффективно использован в биологических экспериментах, требующих значительного количества как экспериментальных, так и технических повторов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры физиологии и биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета Кузнецовой А.В. и Шумилиной Ю.С. за предоставленные гексановые экстракты из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3; ведущему научному сотруднику ФГУП "НИИ ГПЭЧ" Бабакову В.Н. за предоставленную возможность использовать программное обеспечение Progenesis MALDI 1.2 для статистической обработки экспериментальных данных.

Работа частично выполнена в ИАП РАН в рамках НИР "Новые масс-спектрометрические подходы к медицинской диагностике и исследованию изотопных

эффектов в биологии; разработка принципиальных элементов масс-спектрометров для их решения" (№ ФАНО ИСГЗ 0074-2014-0012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Calder P.C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health // Journal of parenteral and enteral nutrition. 2015. Vol. 49. P. 18S–32S. DOI: 10.1177/0148607115595980
2. De Carvalho C., Caramujo M.J. The various roles of fatty acids // Molecules. 2018. Vol. 23, no. 10. E2583. DOI: 10.3390/molecules23102583
3. Ferreri C., Mais A., Sansone A., Giacometti G., Larocca A.V., Menounou G. et al. Fatty acids in membranes as homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: recent advancements in analytics and diagnostics // Diagnostics. 2017. Vol. 7, no. 11. E1. DOI: 10.3390/diagnostics7010001
4. Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S. et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40 // Nature. 2003. Vol. 422, no. 6928. P. 173–176. DOI: 10.1038/nature01478
5. Boden G. Obesity and free fatty acids // Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2008. Vol. 37, no. 3. P. 635–646. DOI: 10.1016/j.ecl.2008.06.007
6. Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S.,

- Adachi T., Yamada M. et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120 // *Nature Medicine*. 2005. Vol. 11, no. 1. P. 90–94. DOI: 10.1038/nm1168
7. *Novgorodtseva T.P., Karaman Y.K., Zhukova N.V., Lobanova E.G., Antonyuk M. V., Kantur T.A.* Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome // *Lipids in health and disease*. 2011. Vol. 10. E82. DOI: 10.1186/1476-511X-10-82
 8. *Akoto L., Vreuls R.J.J., Irth H., Pel R., Stellaard F.* Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography-massspectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1186, no. 1–2. P. 365–371. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.08.080
 9. *Johnson D.W.* Contemporary clinical usage of LC/MS: Analysis of biologically important carboxylic acids // *Clinical biochemistry*. 2005. Vol. 38, no. 4. P. 351–361. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.01.007
 10. *Stickland F.G.W.* The formation of monomolecular layers by spreading a copper stearate solution // *Journal of colloid and interface science*. 1972. Vol. 40, no. 2. P. 142–153. DOI: 10.1016/0021-9797(72)90003-3
 11. *Рожкова Е.А., Краснов И.А., Суходолов Н.Г., Иванов Н.С., Янкович А.И., Подольская Е.П., Краснов Н.В.* Исследование поверхностных свойств наноструктур (пленок Ленгмюра—Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии // *Научное приборостроение*. 2008. Т. 18, no. 4. С. 54–60. URL: <http://iairas.ru/mag/2008/abst4.php#abst9>
 12. *Podolskaya E.P., Serebryakova M.V., Krasnov K.A., Grachev S.A., Gzgzryan A.M., Sukhodolov N.G.* Application of Langmuir—Blodgett technology for the analysis of saturated fatty acids using the MALDI-TOF mass spectrometry // *Mendelev communications*. 2018. Vol. 28, no. 3. P. 337–339. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.05.037
 13. *Podolskaya E.P., Gladchuk A.S., Keltsieva O.A., Dubakova P.S., Silyavka E.S., Lukasheva E. et al.* Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by MALDI-TOF-MS // *Analytical Chemistry*. 2019. Vol. 91, no. 2. P. 1636–1643. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05296
 14. *Schram J.B., Kobelt J.N., Dethier M.N., Galloway A.W.E.* Trophic transfer of macroalgal fatty acids in two urchin species: digestion, egestion, and tissue building // *Frontiers in ecology and evolution*. 2018. Vol. 6. DOI: 10.3389/fevo.2018.00083
 15. *Kelly J.R., Scheibling R.E., Iverson S.J., Gagnon P.* Fatty acid profiles in the gonads of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* on natural algal diets // *Marine Ecology Progress Series*. 2008. Vol. 373. P. 1–9. DOI: 10.3354/meps07746
 16. *Liyana-Pathirana C., Shahidi F., Whittick A., Hooper R.* Lipid and lipid soluble components of gonads of green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) // *Journal of food lipids*. 2002. Vol. 9, no. 2. P. 105–126. DOI: 10.1111/j.1745-4522.2002.tb00213.x
 17. *González-Durán E., Castell J.D., Robinson S.M.C., Blair T.J.* Effects of dietary lipids on the fatty acid composition and lipid metabolism of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* // *Aquaculture*. 2008. Vol. 276, no. 1–4. P. 120–129. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.010
 18. *Parsons H.M., Ekman D.R., Collette T.W., Viant M.R.* Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics // *Analyst*. 2009. Vol. 134. P. 478–485. DOI: 10.1039/b808986h

**Институт токсикологии ФМБА России,
Санкт-Петербург** (Гладчук А.С., Батоцыренова Е.Г.,
Подольская Е.П.)

**Санкт-Петербургский государственный универси-
тет, Санкт-Петербург** (Гладчук А.С.)

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург** (Подольская Е.П.)

Контакты: Гладчук Алексей Сергеевич,
aleglad24@gmail.com

Материал поступил в редакцию 23.01.2020

OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR ANALYSIS OF FREE FATTY ACIDS USING THE COMBINATION OF MALDI MASS SPECTROMETRY AND LANGMUIR MONOLAYERS TECHNOLOGY

A. S. Gladchuk^{1,3}, E. G. Batotsyrenova¹, E. P. Podolskaya^{1,2}

¹*Institute of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russia*

²*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia*

³*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

Optimization of the method for analysis of free fatty acids (FFAs) in biological samples by MALDI-MS with the use of Langmuir technology at the stage of sample application on the target is proposed. Removal of the aqueous-organic drop from the target spot and automatic spectra registration during mass spectrometric analysis are proposed for the previously developed method for FFAs profiling in biological samples, that includes the following stages: application of an aqueous drop, containing barium salt and DHB matrix, to the center of a MALDI target well; double application of a hexane extract from a biological sample, containing FFAs; destruction of a monolayer dried on the target well with 90 % aq. acetonitrile and MALDI-MS analysis. The optimized approach was tested in a toxicological experiment and revealed significant ($p < 0.05$) changes in the relative concentrations of a number of FFAs in the blood plasma of the control and experimental groups of rats.

Keywords: free fatty acids; barium monocarboxylates; Langmuir film technology; MALDI mass spectrometry

REFERENCES

1. Calder P.C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 2015, vol. 49, pp. 18S–32S. DOI: 10.1177/0148607115595980
2. De Carvalho C., Caramujo M.J. The various roles of fatty acids. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 10, E2583. DOI: 10.3390/molecules23102583
3. Ferreri C., Mais A., Sansone A., Giacometti G., Larocca A.V., Menounou G. et al. Fatty acids in membranes as homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: recent advancements in analytics and diagnostics. *Diagnostics*, 2017, vol. 7, no. 11, E1. DOI: 10.3390/diagnostics7010001
4. Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S. et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 2003, vol. 422, no. 6928, pp.173–176. DOI: 10.1038/nature01478
5. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 2008, vol. 37, no. 3, pp. 635–646. DOI: 10.1016/j.ecl.2008.06.007
6. Hirasawa A., Tsumaya K., Awaji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M. et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*, 2005, vol. 11, no. 1, pp. 90–94. DOI: 10.1038/nm1168
7. Novgorodtseva T.P., Karaman Y.K., Zhukova N.V., Lobanova E.G., Antonyuk M. V., Kantur T.A. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome. *Lipids in health and disease*, 2011, vol. 10, E82. DOI: 10.1186/1476-511X-10-82
8. Akoto L., Vreuls R.J.J., Irth H., Pel R., Stellaard F. Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography-massspectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1186, no. 1-2, pp. 365–371. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.08.080
9. Johnson D.W. Contemporary clinical usage of LC/MS: Analysis of biologically important carboxylic acids. *Clinical biochemistry*, 2005, vol. 38, no. 4, pp. 351–361. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.01.007
10. Stickland F.G.W. The formation of monomolecular layers by spreading a copper stearate solution. *Journal of colloid and interface science*, 1972, vol. 40, no. 2, pp. 142–153. DOI: 10.1016/0021-9797(72)90003-3
11. Rozhkova E.A., Krasnov I.A., Sukhodolov N.G., Ivanov N.S., Yanklovich A.I., Podolskaya E.P., Krasnov N.V. [Surface behavior of nanostructures (Langmuir—Blodgett films), containing Fe(III) ions and their composition determination mass-spectrometry methods]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2008, vol. 18, no. 4, pp. 54–60. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/en/mag/2008/abst4.php#abst9>
12. Podolskaya E.P., Serebryakova M.V., Krasnov K.A., Grachev S.A., Gzgyan A.M., Sukhodolov N.G. Application of Langmuir—Blodgett technology for the analysis of saturated fatty acids using the MALDI-TOF mass spectrometry. *Mendeleev communications*, 2018, vol. 28, no. 3, pp. 337–339. DOI: 10.1016/j.mencom.2018.05.037
13. Podolskaya E.P., Gladchuk A.S., Keltsieva O.A., Dubakova P.S., Silyavka E.S., Lukasheva E. et al. Thin film

- chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by MALDI-TOF-MS. *Analytical Chemistry*, 2019, vol. 91, no. 2, pp. 1636–1643. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05296
14. Schram J.B., Kobelt J.N., Dethier M.N., Galloway A.W.E. Trophic transfer of macroalgal fatty acids in two urchin species: digestion, egestion, and tissue building. *Frontiers in ecology and evolution*, 2018, vol. 6, p. 83. DOI: 10.3389/fevo.2018.00083
15. Kelly J.R., Scheibling R.E., Iverson S.J., Gagnon P. Fatty acid profiles in the gonads of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* on natural algal diets. *Marine Ecology Progress Series*, 2008, vol. 373, pp. 1–9. DOI: 10.3354/meps07746
16. Liyana-Pathirana C., Shahidi F., Whittick A., Hooper R. Lipid and lipid soluble components of gonads of green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Journal of food lipids*, 2002, vol. 9, no. 2, pp. 105–126. DOI: 10.1111/j.1745-4522.2002.tb00213.x
17. González-Durán E., Castell J.D., Robinson S.M.C., Blair T.J. Effects of dietary lipids on the fatty acid composition and lipid metabolism of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 2008, vol. 276, no. 1-4, pp. 120–129. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.010
18. Parsons H.M., Ekman D.R., Collette T.W., Viant M.R. Spectral relative standard deviation: a practical benchmark in metabolomics. *Analyst*, 2009, vol. 134, pp. 478–485. DOI: 10.1039/b808986h

Contacts: Gladchuk Aleksei Sergeevich,
aleglad24@gmail.com

Article received by the editorial office on 23.01.2020