

УДК 543.06; 543.7.79

© Н. Г. Суходолов, А. А. Селютин, Е. П. Подольская, 2024

МОНОСЛОИ ЛЕНГМЮРА — НОВЫЙ ТИП СОРБЕНТОВ ДЛЯ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Посвящение. Светлой памяти профессора Лидии Николаевны Галль.

В обзоре представлены все этапы разработки новых металл-аффинных сорбентов на основе коллапсированных монослоев стеаратов металлов (монослоев Ленгмюра), от идеи до практической реализации.

Кл. сл.: металл-аффинная хроматография, сорбент, монослои Ленгмюра, коллапсированные монослои стеаратов металлов, МАЛДИ-МС

ВВЕДЕНИЕ

Ни для кого не секрет, что научные интересы Лидии Николаевны Галль отличались выдающейся широтой. Ее многолетняя научная деятельность была неразрывно связана с развитием методов масс-спектрометрического анализа и разработкой масс-спектрометрического оборудования. Под ее руководством создано огромное количество новаторских приборов, некоторые из которых до сих пор используются в различных лабораториях. Именно ей принадлежит одно из наиболее выдающихся достижений XX в. в области аналитического приборостроения — разработка метода экстракции ионов из растворов при атмосферном давлении (ЭРИ АД) [1], на основе которого разрабатываются и создаются масс-спектрометры по сегодняшний день. Сложно переоценить ее вклад в развитие современной биофизики, заключающийся в создании революционной концепции живых систем и исследовании влияния слабых и сверхслабых полей и излучений на живые организмы [2].

Однако была еще одна область, в развитии которой Лидия Николаевна принимала участие, и практически никогда не упоминающаяся в этом контексте, а именно разработка сорбционных систем для селективной экстракции среднеразмерных пептидов и ряда метаболитов из плазмы крови [3, 4]. Так совпало, что к концу первого десятилетия XXI в. наша группа, работающая в составе Лаборатории экологической и биомедицинской масс-спектрометрии Института аналитического приборостроения, была привлечена к разработке методики специфичной экстракции фосфонилированных пептидов из биологических образцов, основой которой был на тот момент относительно новый метод экстракции — металл-аффинная хроматография. Искренняя убежденность Лидии Никола-

евны в необходимости иметь собственные российские разработки, а не полагаться на импортные приборы и материалы, которой она заряжала и окружающих ее специалистов, во многом направила наши изыскания на путь разработки собственных сорбционных материалов. Все последующие годы Лидия Николаевна пристально следила за ходом нашей работы и оказывала всеобъемлющую поддержку развитию этого направления, и во многом работа, представленная в этом обзоре, стала успешной благодаря именно ей.

МОНОСЛОИ ЛЕНГМЮРА И ПЛЕНКИ ЛЕНГМЮРА – БЛОДЖЕТТ. ПРЕДЫСТОРИЯ

Монослои органических веществ на водной поверхности были известны достаточно давно, однако систематическое их изучение началось в начале XX в. с работ И. Ленгмюра, показавшего, что при нанесении раствора амфифильного поверхностно-активного вещества (ПАВ) в легколетучем растворителе на поверхность водной субфазы образуется структурированная пленка толщиной в одну молекулу ПАВ, обладающая уникальными свойствами [5]. Настоящий бум в исследовании таких структур начался в 30-х гг. XX в. после опубликования работ Ленгмюра и Блоджетт, показавших возможность переноса ориентированных монослоев ПАВ на твердую подложку. Пленки Ленгмюра – Блоджетт (ПЛБ) представляют собой регулярные мультимолекулярные структуры (ММС), сформированные путем последовательного переноса на твердую подложку монослоев нерастворимых ПАВ с поверхности водной субфазы [6], и являются примером наноструктурированных систем. Возможность изменения их состава и свойств от слоя к слою, относительная простота их получения

обусловили их широкое применение как в фундаментальных исследованиях, так и в различных областях практического применения. В начале 70-х гг. в связи с развитием инструментальных методов анализа возникла проблема получения дифракционных решеток для анализаторов рентгеновского спектра ультралегких элементов (от бериллия до натрия). С этой целью в Ленинградском государственном университете была создана группа по изучению коллоидно-химических свойств ПЛБ с целью создания таких анализаторов [7]. Именно эти работы положили начало всестороннему изучению ПЛБ с целью их применения в различных областях техники в СССР. В начале 90-х гг. были сформированы наноразмерные структуры фталоцианинов, используемые для разработки химических сенсоров [8]. Позднее на основе пленок октадециламина были получены ДНК-датчики [9].

В начале 2000-х гг. на Химическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета начали изучать магнитные свойства тонких, практически двумерных структур для создания новых носителей информации. С этой целью были сформированы ПЛБ на основе стеарата трехвалентного железа [10]. Результаты исследования показали, что в зависимости от структуры пленка может проявлять как ферромагнитные, так и диамагнитные свойства. Это привело к необходимости детального изучения строения монослоев стеарата Fe(III). На основе исследований их поверхностных свойств было высказано предположение, что геометрические ограничения, накладываемые на положение ионов металла, таковы, что возможно образование только моно- и дистеаратов, где ион металла находится непосредственно на поверхности пленки и, таким образом, должен проявлять высокую химическую активность из-за наличия лабильной валентности, заполненной протоионом, который легко может быть замещен в процессе последующей обработки.

НАШ СТАРТ. РОЖДЕНИЕ КОНЦЕПЦИИ

Именно для подтверждения этой гипотезы мы начали детальное изучение структуры и состава монослоев Ленгмюра и ПЛБ с привлечением масс-спектрометрических методов, в процессе которого доказали, что основным структурным звеном монослоев, полученных при нанесении раствора стеариновой кислоты в гексане на водную субфазу, содержащую ионы Fe^{3+} , является дистеарат железа с одной лабильной валентностью [11]. То есть действительно образуется структура, одна из поверхностей которой при определенных условиях полностью состоит из ионов металла.

Параллельно в те годы Институт аналитического приборостроения принимал участие в создании методик специфичной экстракции фосфорилированных и фосфонилированных пептидов из триптических гидролизатов белков крови с использованием коммерческих металл-аффинных сорбентов. Наилучшие результаты были получены при экстракции на Fe^{3+} -содержащем геле (PHOS-Select Iron Affinity Gel, Sigma, IAG), который проявляет специфичность к P=O группе, когда впервые удалось выделить и идентифицировать аддукты сывороточного альбумина крысы с параоксоном [12]. Несмотря на высокую стоимость и высокие требования к условиям хранения, этот сорбент выгодно отличался от других доступных материалов отсутствием продуцирования ионов железа в элюаты, что значительно облегчало дальнейшую пробоподготовку образцов для масс-спектрометрического анализа.

Такое пересечение двух, казалось бы, не связанных между собой научных направлений и привело к появлению идеи исследовать монослой Ленгмюра как структуру, обладающую металл-аффинными свойствами.

Действительно, если рассматривать основные требования, предъявляемые к сорбентам, монослой Ленгмюра соответствует большинству из них. Во-первых, структура монослоя стеарата металла не только гарантирует наличие ионов металла на поверхности сорбента, но и благодаря совершенно плоской структуре обеспечивает полную доступность активных центров для молекул аналита независимо от размеров 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 относительную 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. К сожалению, по методу Ленгмюра невозможно получить монослой из солей амфотерных металлов, которые в водных средах входят в состав аниона соли, и из исследований пришлось исключить такие металлы, как Ti(IV) и Zr(IV), которые являются активными центрами значительного количества известных металл-аффинных сорбентов. Однако простота формирования монослоев обеспечивает возможность быстро наработать и исследовать сорбенты, содержащие атомы любых металлов, существующих в растворах в виде катионов.

К недостаткам такого материала можно отнести процесс слипания монослоев при коллапсировании, которое может происходить по механизму образования ПЛБ. Однако, как было показано нами позже экспериментально, обработка коллапсированных монослоев ацетонитрилом перед выполнением металл-аффинной экстракции нарушает взаимодействия между слипшимися слоями, позволяет сорбенту равномерно распределиться по всему объему образца в виде небольших тонких пленок, образующихся при коллапсировании мономолекулярного слоя. Вторым недостатком этой структуры как металл-аффинного сорбента можно считать невозможность плотной упаковки монослоями колонки или картриджа для проведения экстракции, как следствие того же слипания монослоев. При этом материал удобен в использовании при проведении пакетной (batch) металл-аффинной хроматографии — методе, который на сегодняшний день является одним из наиболее востребованных при пробоподготовке в биоорганическом анализе [13], особенно с появлением таких коммерчески доступных устройств для batch-экспериментов, как спиновые колонки. В отличие от большинства сорбционных материалов, тонкие пленки монослоев стеаратов металлов способны равномерно распределяться по всему объему образца при проведении экстракции, что в полной мере обеспечивает как доступ аналита к активным центрам сорбента, так и качественную промывку от мешающих компонентов с последующим беспрепятственным элюированием аналита с сорбента.

КОЛЛАПСИРОВАННЫЕ МОНОСЛОИ ЛЕНГМЮРА — СОРБЕНТЫ ДЛЯ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Сорбент на основе монослоев стеарата железа

Вся вышепредставленная информация об особенностях использования монослоев Ленгмюра в качестве металл-аффинных сорбентов была нами получена в процессе многолетней экспериментальной работы, а начинали мы в 2009 г. с исследований поверхностных и сорбционных свойств монослоев на основе стеарата железа (III) (FFe).

Монослои получали классическим методом Ленгмюра путем нанесения раствора стеариновой кислоты в гексане на водную субфазу, содержащую ионы Fe^{3+} , а затем коллапсировали в двух направлениях с последующим переносом в спиновую колонку. Понимая, что пленки обладают двумерной структурой и доступны для взаимодействия поверхность ограничивается площадью полученного монослоя, мы не ожидали, что у FFe будут большая удельная поверхность и высокая

сорбционная емкость. Однако в процессе экспериментальной работы было установлено, что при действительно небольшой удельной поверхности ($15.0 \pm 1.5 \text{ м}^2/\text{г}$) FFe обладает гораздо более высокой сорбционной емкостью (0.035 мкмоль/г по пептиду SSNGHVYpEKLSSI) [14, 15], чем многие известные коммерческие сорбенты, в том числе и IAG. Тестирование полученного сорбента на более сложных образцах, таких как триптический гидролизат казеина быка и гидролизат лизированных клеток линии *HeLa*, показало, что, кроме более высокой сорбционной емкости, FFe проявляют более выраженные как специфичные, так и селективные свойства по отношению к фосфорилированным пептидам, чем IAG, нанопорошок оксида железа (FeOx) и нанопорошок оксида титана (TiO_2). С помощью FFe было идентифицировано 55% от общего количества найденных фосфорилированных белков, в то время как для FeOx , IAG и TiO_2 это значение составляло только 34, 10 и 29% соответственно [16]. Также в рамках других исследований специфичных и селективных свойств нового сорбента было показано, что с помощью металл-аффинной хроматографии на FFe кроме фосфорилированных пептидов могут быть успешно экстрагированы и проанализированы другие типы фосфорсодержащих соединений (фосфонилированные пептиды, пестициды), фторкислоты (перфтороктановая сульфокислота), токсины цианобактерий (микроцистин-RR) [17, 18], т.е. спектр применения FFe оказался достаточно широким. Таким образом, коллапсированные монослои стеарата железа (III) были первой исследованной нами структурой, которая нашла применение как металл-аффинный сорбент [19].

Новые металл-аффинные сорбенты для экстракции азот- и хлорсодержащих органических соединений

Кроме Fe(III) , еще ряд переходных металлов представляют интерес в качестве активных центров сорбентов, и в первую очередь это Ni(II) и Cu(II) , которые способны проявлять специфичность к таким гетероатомам, как азот и галогены [20]. Вследствие относительно высокого сродства этих металлов к эпиптопу, содержащему шесть или более остатков гистидина, имеющего в составе несколько атомов азота [21], металл-аффинные сорбенты, содержащие атомы Ni(II) и Cu(II) , традиционно используют при очистке рекомбинантных полигистидин-меченых белков [22]. При этом на момент начала исследований мы не нашли информацию о другом применении сорбентов, содержащих медь и никель. Уже имея опыт в характеризации структур на основе монослоев Ленгмюра, мы достаточно быстро провели оценку

работоспособности структур, содержащих медь (FCu) и никель (FNi). Удельная поверхность и сорбционная емкость оказались сравнимыми с FFe, так же как и общие принципы проведения анализа, а основным структурным звеном были определены дистеараты обоих металлов [23, 24]. С точки зрения применения FCu и FNi особый для нас интерес представляла возможность их использования для экстракции и анализа экотоксикантов и лекарственных препаратов (или их метаболитов), т.к. большинство из них содержит функциональные группы, имеющие в составе азот или галогены. На примере экстракции глифосата, аминотилфосфоновой кислоты, пиримикарба, феназепам на FCu и FNi из водных растворов и плазмы крови крыс нами было показано, что эти сорбенты могут быть использованы для эффективной пробоподготовки при количественном анализе водорастворимых токсичных веществ, обладающих активными функциональными группами [25].

Отдельного внимания заслуживает работа, посвященная разработке методики экстракции дильдрина из образцов различной природы. Именно при его анализе нами впервые было продемонстрировано, что металл-аффинная хроматография позволяет специфично экстрагировать хлорсодержащие соединения из биологических образцов. Дильдрин относится к особо устойчивым сильнодействующим токсичным хлорсодержащим инсектицидам, слабо растворимым в воде, но хорошо в таких средах, как молоко и плазма крови [26]. На сегодняшний день постоянным источником дильдрина является его разрешенный предшественник — альдрин, способный метаболизироваться до дильдрина в кислой среде. Использование FNi для экстракции дильдрина из воды, молока и плазмы крови крыс позволило повысить степени извлечения этого токсиканта до 86.7, 91.4 и 76.1% соответственно, которые при сравнении с другими известными методиками оказались значительно выше [27].

Коллапсированные монослои стеарата лантана как эффективный металл-аффинный сорбент

Стоит отметить, что атомы и ионы Fe(III), Ni(II) и Cu(II) достаточно часто включаются в состав металл-аффинных сорбентов в качестве активных центров. Имеется множество коммерческих продуктов в виде как расфасованных материалов, так и готовых колонок или картриджей. Поэтому мы обратили внимание на металл, который не был представлен в составе коммерческих сорбентов, а в исследовательских работах предлагались очень трудоемкие способы получения таких структур, а именно лантан [28]. Лантан как родоначальник группы лантаноидов среди редкоземельных металлов является наиболее электроположительным

элементом, в соединениях представлен трехвалентным катионом, образует преимущественно ковалентные соединения и считается очень жестким акцептором с высоким сродством к кислородсодержащим анионам, в том числе и к группе P=O [29]. Благодаря большому размеру катиона и протяженным диффузным орбиталям, сорбент на основе дистеарата лантана (FLa) стал для нас находкой для разработки эффективных методик специфичной экстракции фосфонилированных пептидов из биологических образцов. Жесткая и упругая структура монослоя обеспечивала большую удельную поверхность сорбента ($34.5 \pm 3.5 \text{ м}^2/\text{г}$), нежели у Fe(III), Ni(II) и Cu(II), и обеспечивала равномерное распределение тонких пленок в объеме образца, чего не всегда удавалось добиться для других структур. Результатом работы стала методика экстракции пептических фосфонилированных пептидов сывороточного альбумина человека [30].

Таким образом, разрабатывая сорбенты на основе монослоев Ленгмюра и методики их использования, мы получили очень интересный опыт. С одной стороны, отлаженные процедуры получения и наработки сорбентов не представляли сложностей. Была сконструирована и изготовлена ванна для получения сорбентов, откалибрована и стандартизирована площадь формирующихся монослоев, подобрано оптимальное количество материала, помещающегося в спиновую колонку и распределяющегося по объему образца, отлажен процесс коллапсирования и переноса монослоев в спиновую колонку. С другой, в связи с выраженным положительным зарядом на той поверхности монослоя, которая состоит из атомов металла, что и приводит к высокому уровню специфичности сорбентов, мы на всех этапах разработки аналитических методик столкнулись с затруднениями с десорбцией аналитов. Все на тот момент известные элюенты для металл-аффинной хроматографии не обеспечивали высокой степени десорбции. И если сначала мы прилагали усилия для создания более эффективного элюента (так, для усиления донорной силы готовили растворы, содержащие пиперидин, имидазол и впервые — перфтороктановую сульфокислоту [31]), то затем основные усилия были направлены на разработку методик, при которых элюирование аналита с сорбента не требуется.

"ЛАБОРАТОРИЯ НА МИШЕНИ"

Первые попытки

В случае масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) такие методики возможны, если

пробоподготовка проводится на химически модифицированной поверхности мишени с последующим селективным связыванием аналитов с поверхностью [32]. В этом случае экстракция на мишени может осуществляться путем поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации под воздействием лазерного импульса. Чаще всего экстракцию на поверхности мишени проводят в формате твердофазной микроэкстракции при функционализации поверхности мишени различными сорбентами [33]. Такой подход получил название "лаборатория на мишени", и некоторое количество работ было посвящено металл-аффинным сорбентам [34].

Мы предприняли множество попыток функционализировать поверхность МАЛДИ-мишени монослоями стеаратов различных металлов. Перенос монослоев на подложку классическим методом Ленгмюра — Блоджетт не смог обеспечить достаточной поверхности сорбента для взаимодействия с аналитом. Не хватало чувствительности даже такого метода, как МАЛДИ-МС. Также мы пытались переносить монослои, коллапсированные в одном направлении, и диспергированные монослои на мишень (благодаря высокой адгезии этих структур к металлическим поверхностям, монослои достаточно хорошо прилипали к поверхности). В этом случае из-за разной толщины покрытия нам не удалось получить воспроизводимые результаты анализа, хотя в этих случаях регистрация МАЛДИ-масс-спектров свидетельствовала об экстракции аналитов с поверхности сорбента. Соответственно, невозможность адаптации классической технологии Ленгмюра (образование монослоя на горизонтальной водной поверхности) к такой задаче привела к необходимости разработки метода функционализации МАЛДИ-мишени путем формирования сорбентов непосредственно на поверхности.

Адаптация технологии Ленгмюра к полусферической поверхности капли

Было предложено органическую фазу, содержащую стеариновую кислоту, наносить на каплю водного раствора соли металла, которая будет расположена в центре ячейки мишени. Соответственно, потребовалась разработка модели формирования пленок, 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 механохимические свойства [35], что, по всей вероятности, может обеспечить более быстрый и полный переход стеариновой кислоты в соль с образованием упорядоченной структуры, содер-

жащей ионы металла. С другой, быстрое испарение н-гексана при перемещении пленки с поверхности капли к ее основанию должно привести к формированию складчатой структуры с развитой поверхностью. Наконец, такие структуры обладают достаточно высокой адгезионной способностью к поверхности твердой подложки, и, следовательно, сформированный материал будет хорошо удерживаться на мишени.

В то время монослои стеарата лантана представляли для нас наибольший интерес. В связи с тем, что катион лантана обладает способностью к комплексообразованию, характерному для переходных металлов, что может значительно осложнить исследование процесса формирования пленки на полусферической поверхности водной субфазы, в качестве модельной системы были выбраны тонкие пленки стеарата бария, который координирует только воду, но размер иона бария близок к лантану. И действительно, после нанесения насыщенного раствора стеариновой кислоты в гексане на водную каплю, содержащую ионы бария, вокруг капли мы увидели тонкую опалесцирующую пленку, которая достигала границ ячейки мишени и обладала неравномерной структурой. Нам предстояло доказать, что полученная пленка и есть коллапсированный монослой стеарата бария. Следует отметить, что при таком подходе количество образующегося вещества крайне мало и нам потребовались крайне чувствительные физико-химические методы анализа, чтобы подтвердить гипотезу.

Пленка на поверхности мишени — коллапсированные монослои стеарата металла

Сначала следовало установить химический состав получившейся пленки. Методом инфракрасной спектроскопии мы подтвердили переход стеариновой кислоты в соль. С помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии установили наличие бария в составе пленки, а методом МАЛДИ-МС доказали, что основное структурное звено пленки — это стеарат бария. При изучении процесса формирования пленки и ее структуры мы использовали различные оптические методы исследования. Так, с помощью методов оптической тензиометрии и световой микроскопии в отраженном свете нам удалось зафиксировать сам процесс образования пленки и перемещение ее на поверхность мишени. Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) мы показали, что структура нанесенного на ячейку мишени материала состоит из упорядоченных концентрических кругов. Подобное распределение вещества позволило предположить волнообразный

характер формирования пленки вследствие комплекса процессов, связанных с ее перемещением по поверхности водной субфазы и испарением слоя гексана с образованием мультиструктур из различного количества пленок. Наиболее крупным структурным элементом поверхности был волнообразный рельеф с перепадом высот до 500 нм, что было установлено методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Но самой главной нашей задачей было показать, что пленка, образующаяся на поверхности мишени, аналогична коллапсированным монослоям, которые мы использовали в спинных колонках. Для этого мы привлекли метод спектроскопии комбинационного рассеяния, с помощью которого было доказано, что тонкая пленка, формирующаяся на поверхности капли, является монослоем стеарата бария (FBa), который при перемещении на подложку самопроизвольно коллапсируется с образованием мультиструктур, подобных классическим ПЛБ, получаемых при многократном наслаивании одного монослоя на другой или при коллапсировании одного монослоя [36].

Ряд экспериментов по установлению состава и структуры пленок, сформированных на мишени, когда это было возможно, мы провели и для стеарата лантана. Так же как и для FBa, методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии показали, что лантан входит в состав пленки, а методом тандемной МАЛДИ-МС установили, что основное структурное звено пленки — это дистеарат лантана. Далее методами СЭМ и АСМ мы определили, что FLа, сформированные на поверхности мишени, также распределяются на поверхности подложки в виде упорядоченных концентрических кругов и структурно аналогичны по морфологии FBa, но отличаются более плотной упаковкой агрегатов, которые имеют несколько большие размеры (перепад высот до 600 нм). Такая морфология обеспечивает высокую удельную поверхность пленок на периферии капли. На основании полученных результатов мы сделали вывод, что в связи с постоянным передвижением сформированной пленки по мишени за счет непрерывного образования монослоя на свободной поверхности водной капли и с неравномерным осцилляторным испарением гексана процесс самопроизвольного коллапсирования, начинающийся у периметра водной капли, затем распространяется на всю область растекания гексана и в случае FLа, причем наибольшая высота агрегатов отмечается ближе к границе испарения неполярного растворителя.

Далее, нам предстояло доказать, что сформированные на мишени FLа обладают такими же сорбционными свойствами, как и в спинной колонке. Для нас оказалось полной неожиданностью, что даже один сформированный монослой стеарата

лантана способен удерживать количество вещества, достаточное для детектирования при МАЛДИ-МС-анализе. Это было показано на примере экстракции триптического фосфонилированного пептида бутирилхолинэстеразы человека и хлорсодержащего аддукта глобина человека, что подтвердило специфичное взаимодействие активных центров FLа с фосфор- и хлорсодержащими функциональными группами соединений [36].

Разработка методик экстракции в формате "лаборатория на мишени"

Ввиду крайне малого количества образующегося вещества, мы не могли взвесить получившиеся коллапсированные монослои и, как следствие, определить удельную поверхность и сорбционную емкость напрямую. Мы постарались сделать это косвенными методами. Сначала было определено, что при последовательном формировании монослоев FLа на ячейке мишени процедуру можно провести не более 6 раз. При увеличении количества монослоев материал начинал формироваться за пределами ячейки, а в процессе удаления избытка соли с пятна сорбента терялось значительное количество материала. Пятно, состоящее из 6 монослоев FLа, было достаточно устойчиво как к механическим воздействиям, так и к влиянию растворителей. При этом нами с помощью световой микроскопии в рассеянном свете было показано, что процедура формирования 6 слоев FLа на ячейке достаточно воспроизводима. Условную сорбционную емкость мы оценивали при экстракции пептического фосфонилированного пептида сывороточного альбумина человека. Зная процент модификации белка и обеспечив полное прохождение гидролиза в присутствии пепсина, мы могли рассчитать количество модифицированного пептида в образцах, полученных путем разбавления фосфонилированного образца нефосфонилированным. В процессе МАЛДИ-МС-анализа оценивали наличие сигнала целевого пептида в масс-спектре несвязавшейся фракции. Таким образом мы смогли определить, что 6 монослоев FLа в формате "лаборатория на мишени" способны удерживать 0.012 мкг (8 пмоль) пептида, что при средних пределах обнаружения современного МАЛДИ-МС-оборудования от единиц фмоль до сотни амоль свидетельствовало о достаточной для выполнения большинства биологических задач сорбционной емкости сформированного сорбента. Это и было нами показано на примере пептического фосфонилированного пептида сывороточного альбумина человека, когда удалось его экстрагировать и достоверно определить при 0.05% модификации белка [37].

После максимально возможной характеристики сформированного на поверхности мишени сорбента мы перешли к разработке подходов специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов белков в формате "лаборатория на мишени". Разработка таких методик нам представлялась очень важной задачей, т.к. огромное число ксенобиотиков (пестициды, лекарственные средства, устойчивые загрязнители окружающей среды и т.д.), обладающих токсическим воздействием и способных алкилировать белки напрямую или после биотрансформации, относятся к этому классу соединений. Ковалентное связывание белка с ксенобиотиком или его метаболитом может привести к потере функциональных свойств белка и, как следствие, нанести вред здоровью человека. Была проделана огромная работа для определения чувствительности, специфичности и селективности методики экстракции триптических пептидов глобина человека, модифицированных хлорсодержащими соединениями. Отдельного внимания заслуживает результат, полученный нами при исследовании аддуктов глобина человека с галогенметилароматическими веществами, содержащими один или два атома хлора в составе бензольного кольца и являющимися алкилирующими агентами прямого действия. В этом эксперименте мы проводили инкубацию глобина с алкилирующими агентами в различных мольных соотношениях с последующим гидролизом белка в присутствии трипсина и экстракцией аддуктов на 6 монослоях FLA. В случае аддукта, содержащего два атома хлора, нам удалось увидеть целевой сигнал в масс-спектре образца после инкубации 1 мг глобина с 10 нг ксенобиотика, что в мольном соотношении составило 1500 : 1, что прекрасно согласовывалось с данными, полученными в работе с фосфонилированными пептидами. Но в случае монозамещенного аддукта такой же результат был получен для образца, где мольное соотношение белок — ксенобиотик = 12 000 : 1 (инкубировали 1 мг глобина с 1 нг ксенобиотика), что свидетельствовало о высочайшей чувствительности аналитического подхода, сочетающего металл-аффинную хроматографию на коллапсированных монослоях стеарата лантана в формате "лаборатория на мишени" с МАЛДИ-МС-анализом [38], который может стать основой для разработки методик по установлению факта интоксикации хлорсодержащими соединениями.

В качестве еще одного практического применения разработанного подхода мы предложили методику определения реактивных метаболитов хлорсодержащих ксенобиотиков. Как упоминалось выше, модификация белка может происходить после биотрансформации ксенобиотика с образованием реакционноспособного метаболита. На сего-

дняшний день существует несколько методов моделирования процесса биотрансформации, из которых мы предпочли УФ-индуцированное фотокалитическое окисление в присутствии наночастиц TiO_2 [39], не требующее сложного оборудования, например, электрохимической ячейки для проведения электрохимического окисления [40] и значительных временных затрат, в отличие от микросомального окисления [41]. Объектами исследования мы выбрали два лекарственных средства, содержащих один и два атома хлора в составе бензольного кольца, как и в случае модельных галогенметилароматических соединений, а именно амодиахин и диклофенак. Экстракцию аддуктов глобина человека с метаболитами ксенобиотиков на FLA в формате "лаборатория на мишени" проводили после получения метаболитов, инкубации их с глобином и гидролиза в присутствии трипсина, и в обоих случаях нами были обнаружены аддукты белка не только с известными реакционноспособными метаболитами, но и с ранее не изученными [38, 42].

Достоинства формата "лаборатория на мишени" на основе монослоев стеаратов металлов

Нельзя не отметить основные достоинства формата "лаборатория на мишени" на основе коллапсированных монослоев Ленгмюра. Во-первых, процесс функционализации поверхности не требует большого количества реактивов и значительных временных затрат. Для получения одного пятна сорбента в зависимости от количества требуемого материала требуется 1–2 мкл 10^{-2} М раствора соли металла и не более 10 мкл насыщенного раствора стеариновой кислоты в гексане. За один раз можно формировать до 6 пятен сорбента, и это занимает примерно 5 мин, и еще столько же времени требуется для подготовки сорбента к анализу. Во-вторых, для успешного анализа нужно незначительное количество пробы. Объем образца, требующегося для анализа, не превышает 10 мкл, капля такого объема способна удерживаться на поверхности пятна сорбента. Практически во всех исследованиях в формате "лаборатория на мишени" мы использовали 1 мкл образца с концентрацией белка 0.3–1 мг/мл в 7–8 мкл раствора для сорбции. Общее время экстракции, которую также можно проводить на нескольких пятнах сорбента параллельно, включая стадии сорбции, промывки и высушивания, не превышало 1 ч. И наконец, как мы показали на завершающих этапах исследования, металл-аффинная экстракция на коллапсированных монослоях стеарата лантана обеспечивает высочайшую чувствительность дальнейшего МАЛДИ-МС-анализа. Соответственно, разработанный подход мы вполне обоснованно можем

предложить к использованию в научно-исследовательских учреждениях фармацевтического и медицинского направлений для создания аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с долгоживущими белками для ретроспективной диагностики интоксикаций, а также моделирования окислительной биотрансформации и доклинической оценки потенциальной токсичности биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод, что монослои Ленгмюра являются уникальным материалом с огромным потенциалом для дальнейших исследований и применения. На сегодняшний день эти структуры с разнообразным составом и свойствами используются в качестве элементов микро- и оптоэлектроники, при конструировании химических сенсоров, фото- и электронорезистов высокого разрешения, тонких диэлектриков в системе "металл – диэлектрик – полупроводник", био- и иммуносенсоров, ультратонких пленочных электродов в фотохимических устройствах и устройствах хранения информации и т.п. Нам посчастливилось предложить еще один способ использования монослоев Ленгмюра, имеющий огромные перспективы при решении многих аналитических задач для медицины, биохимии и фармацевтики. И, конечно, мы безмерно благодарны Лидии Николаевне Галль за многолетнюю поддержку развития этого направления и высокую оценку полученных нами результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Шкуров В.А. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении – новый метод масс-спектрометрического анализа // Доклады Академии наук СССР. 1984. Т. 277, № 2. С. 379–383. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=9290237>
2. Юбилей Лидии Николаевны Галль, д-ра физ.-мат. наук, профессора // Научное приборостроение. 2019. Т. 29, № 3. С. 69–72. URL: <http://iairas.ru/mag/2019/abst3.php#abst8>
3. Подосенова Н.Г., Галль Л.Н., Меленевская Е.Ю., Романенко С.М., Шаронова Л.В., Крюкова Е.Г. Влияние фуллерена на адсорбционные свойства силикагеля по отношению к среднемолекулярным пептидам // Эффективная терапия. 2009. Т. 15, № 3–4. С. 8–13. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=15457977>
4. Галль Л.Н., Малахова М.Я., Меленевская Е.Ю., Подосенова Н.Г., Шаронова Л.В. Влияние воды на адсорбцию компонентов плазмы крови силикагелем // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57, № 6. С. 635–641. URL: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/article-ru/PBMC-2011-57-6-635/>
5. Langmuir I., Schaefer V.J. Composition of fatty acid films on water containing calcium or barium salts // Journal of the American Chemical Society. 1936. Vol. 58, no. 2. P. 284–287. DOI: 10.1021/ja01293a028
6. Blodgett K. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface // Journal of the American Chemical Society. 1935. Vol. 57, no. 6. P. 1007–1022. DOI: 10.1021/ja01309a011
7. Янклович А.И., Чернобережский Ю.М. Перенос монослоев на твердую поверхность и образование регулярных мультиструктур. Механизм образования мультислойной структуры // Вестник ЛГУ. 1980. № 16. С. 84–90.
8. Roberts G.G. An applied science perspective of Langmuir-Blodgett films // Advances in Physics. 1985. Vol. 34, no. 4. P. 475–512. DOI: 10.1080/00018738500101801
9. Karymov M.A., Kruchinin A.A., Tarantov Y.A., Balova I.A., Remisova L.A., Sukhodolov N.G., Yanklovich A.I., Yorking A.M. Langmuir-Blodgett film based membrane for DNA-probe biosensor // Sensors & Actuators B: Chemical. 1992. Vol. 6, no. 1–3. P. 208–210. DOI: 10.1016/0925-4005(92)80057-5
10. Bobrysheva N.P., Ivanov N.S., Selyutin A.A., Yanklovich A.I., Sukhodolov N.G. Magnetic properties of Langmuir-Blodgett films with iron ions // Reviews on Advanced Materials Science. 2014. Vol. 37, no. 1–2. P. 48–52. URL: https://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_13714/07_13714_sukhodolov.pdf
11. 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 Ленгмюра-Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18, № 4. С. 54–60. URL: <http://iairas.ru/mag/2008/abst4.php#abst9>
12. Гладилович В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П., Дубровский Я.А., Войтенко Н.Г., Фионов С.В., Бабарков 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. URL: <http://iairas.ru/mag/2010/abst4.php#abst9>
13. Heikaus L., Hidayah S., Gaikwad M., Kotasinska M., Richter V., Kwiatkowski M., Schlüter H. Sample displacement batch chromatography of proteins // Methods in Molecular Biology. 2021. Vol. 2178. P. 285–299. DOI: 10.1007/978-1-0716-0775-6_19
14. Кельцеева 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. URL: <http://iairas.ru/mag/2012/abst4.php#abst7>

15. Суходолов Н.Г., Гладилевич В.Д., Колоницкий П.Д., Шрейнер Е.В., Янлович 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. URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst13>
16. 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. Vol. 1443. P. 181–190. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044
17. Гладилевич В.Д., Шрейнер Е.В., Дубровский Я.А., Колоницкий П.Д., Краснов К.А., Бабина Е.В., Мурашко Е.А., Бабаков В.Н., Кельцьева 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. URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst11>
18. Чернова Е.Н., Кельцьева О.А., Гладилевич В.Д., Русских Я.В., Суходолов Н.Г., Селютин А.А., Никифоров В.А., Жаковская З.А., Подольская Е.П. Применение хромато-масс-спектрометра высокого разрешения LTQ Orbitrap для определения перфторкислот в природной воде с использованием традиционного твердофазного и металл-аффинного сорбентов: разработка и оптимизация метода // Научное приборостроение. 2013. Т. 23, № 1. С. 30–37. URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst3>
19. Гладилевич В.Д., Подольская Е.П., Селютин А.А., Суходолов Н.Г. Регулярные мультимолекулярные сорбенты для металл-аффинной хроматографии, содержащие лабильную ковалентную связь. Патент РФ RU2608529C2, 27.10.2013. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2608529C2/ru>
20. Кельцьева О.А., Гладилевич В.Д., Подольская Е.П. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение // Научное приборостроение. 2013. Т. 23, № 1. С. 74–85. <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst9>
21. Mateo C., Fernandez-Lorente G., Pessela B.C., Vian A., Carrascosa A.V., Garcia J.L., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions // Journal of Chromatography A. 2001. Vol. 915. P. 97–106. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00626-4
22. Lingg N., Öhlknecht C., Fischer A., Mozgovicz M., Scharl T., Oostenbrink C., Jungbauer A. Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: Influence of ligand and metal ions // Journal of Chromatography A. 2020. Vol. 1633. Id. 461649. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461649
23. Суходолов Н.Г., Кельцьева 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. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23883908>
24. Шрейнер Е.В., Кельцьева 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. URL: <http://iairas.ru/mag/2015/abst4.php#abst2>
25. Шрейнер Е.В., Гладилевич В.Д., Кельцьева 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. С. 350–356. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23556242>
26. Avancini R.M., Silva I.S., Rosa A.C., Sarcinelli Pde N., de Mesquita S.A. Organochlorine compounds in bovine milk from the state of Mato Grosso do Sul-Brazil // Chemosphere. 2013. Vol. 90, no. 9. P. 2408–2413. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.069
27. 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. Vol. 27, no. 3. P. 304–306. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030
28. Cheng G., Liu Y.L., Zhang J.L., Sun D.H., Ni J.Z. Lanthanum Silicate Coated Magnetic Microspheres as a Promising Affinity Material for Phosphopeptide Enrichment and Identification // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012. Vol. 404, no. 3. P. 763–770. DOI: 10.1007/s00216-012-6150-0
29. Pink M., Verma N., Polato F., Bonn G.K., Baba H.A., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. Precipitation by Lanthanum Ions: A Straightforward Approach to Isolating Phosphoproteins // Journal of Proteomics. 2011. Vol. 75, no. 2. P. 375–383. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.08.001
30. 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. Vol. 195. P. 728–731. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.11.103
31. 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 sub-micron mesoporous silica particles as a sorbent for metal affinity chromatography // Journal of Chromatography A. 2017. Vol. 1513. P. 140–148. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.043

32. Zeng Z., Wang Y., Shi S., Wang L., Guo X., Lu N. On-plate selective enrichment and self-desalting of peptides/proteins for direct MALDI MS analysis // *Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 84, no. 5. P. 2118–2123. DOI: 10.1021/ac203378q
33. Reyes-Garcés N., Gionfriddo E., Gómez-Ríos G.A., Alam M.N., Boyaci E., Bojko B., Singh V., Grandy J., Pawliszyn J. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions // *Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 90, no. 1. P. 302–360. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04502
34. Urban P.L., Amantonico A., Zenobi R. Lab-on-a-plate: Extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets // *Mass Spectrometry Reviews*. 2011. Vol. 30, no. 3. P. 435–478. DOI: 10.1002/mas.20288
35. Wei Z., Li Y., Cooks R.G., Yan X. Accelerated Reaction Kinetics in Microdroplets: Overview and Recent Developments // *Annual Review of Physical Chemistry*. 2020. Vol. 71. P. 31–51. DOI: 10.1146/annurev-physchem-121319-110654
36. 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. Vol. 756. Id. 139374. DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374
37. Бабаков В.Н., Горбунов А.Ю., Гладчук А.С., Калниния Я.К., Шиловских В.В., Томилин Н.В., Суходолов Н.Г., Радилов А.С., Подольская Е.П. Идентификация фосфонированных пептидов с применением МАЛДИ-мишени, функционализированной стеаратом лантана // *Медицина экстремальных ситуаций*. 2023. Т. 1. С. 21–30. URL: https://mes.fmba.press/files/issues/mes.fmba.press/2023/1/2023-1-1186_ru.pdf?lang=ru
38. Kalninia Y.K., Viskov M.A., Gladchuk A.S., Afanasyeva A.A., Keltsieva O.A., Slyusarenko M.A., Frolov A.S., Krasnov K.A., Sukhodolov N.G., Reinyuk V.L., Podolskaya E.P. MALDI target functionalization with deposited thin films of lanthanum stearate – An efficient tool for in situ enrichment of human globin adducts of chlorinated organic compounds // *Microchemical Journal*. 2024. Vol. 205. Id. 111300. DOI: 10.1016/j.microc.2024.111300
39. Gawlik M., Skibiński R., Trawiński J., Komsta Ł. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies – a review // *Acta Chromatographica*. 2018. Vol. 30, no. 1. P. 1–8. DOI: 10.1556/1326.2016.00202
40. Tahara K., Makii E., Iijima S., et al. On-line liquid chromatography and circular dichroism detection of stereoisomers of alpha-tocopherol derivatives generated by an electrochemical reaction // *Analytical Sciences*. 2008. Vol. 24. P. 935–938. DOI: 10.2116/analsci.24.935
41. Pelkonen O., Turpeinen M., Raunio H., et al. Prediction of drug metabolism and interaction on the basis of *in vitro* investigations // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2005. Vol. 96, no. 3. P. 167–175. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960305.x
42. 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 журнал технической физики*. 2022. Т. 48, № 21. С. 35–39. DOI: 10.21883/PJTF.2022.21.53711.19320

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

**Санкт-Петербургский государственный
университет (Суходолов Н.Г., Селютин А.А.)**

Контакты: Суходолов Николай Геннадьевич,
sng196505@mail.ru

Материал поступил в редакцию 14.10.2024

LANGMUIR MONOLAYERS — A NEW TYPE OF SORBENTS FOR METAL-AFFINITY CHROMATOGRAPHY

N. G. Sukhodolov^{1,2}, A. A. Selyutin², E. P. Podolskaya¹

¹*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia*

²*St. Petersburg State University, Saint Petersburg*

From conception to actualization, the paper covers every phase of the creation of novel metal-affinity sorbents based on collapsed metal stearate monolayers (Langmuir monolayers).

Keywords: metal-affinity chromatography, sorbent, Langmuir monolayers, collapsed metal stearate monolayers, MALDI-MS

REFERENCES

- Alexandrov M.L., Gall L.N., Krasnov N.V., Nikolaev V.I., Shkurov V.A. [Extraction of ions from solutions at atmospheric pressure - a new method of mass spectrometric analysis]. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Reports of the Academy of Sciences of the USSR], 1984, vol. 277, no. 2, pp. 379–383. (In Russ.).
URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=9290237>
- [Anniversary of Lydia Nikolaevna Gall, Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2019, vol. 29, no. 3, pp. 69–72. DOI: 10.18358/np-29-3-i6972 (In Russ.).
- Podosenova N.G., Gall L.N., Melenevskaya E.Yu., Romanenko S.M., Sharonova L.V., Krukova E.G. [The influence of fullerene on adsorption properties of silica gel with respect to medium "molecular" mass peptides]. *Ehfferentnaya terapiya* [Efferent therapy], 2009, vol. 15, no. 3-4, pp. 8–13. (In Russ.).
URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=15457977>
- Gal L.N., Malachova M.Ya., Melenevskaya E.Yu., Podosenova N.G., Sharonova L.V. [Effect of water on silica gel adsorption with respect to human blood plasma components]. *Biomeditsinskaya Khimiya* [Biomedical chemistry], 2011, vol. 57, no. 6, pp. 635–641. (In Russ.). URL: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/article-ru/PBMC-2011-57-6-635/>
- Langmuir I., Schaefer V.J. Composition of fatty acid films on water containing calcium or barium salts. *Journal of the American Chemical Society*, 1936, vol. 58, no. 2, pp. 284–287. DOI: 10.1021/ja01293a028
- Blodgett K. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *Journal of the American Chemical Society*, 1935, vol. 57, no. 6, pp. 1007–1022. DOI: 10.1021/ja01309a011
- Yanklovitch A.I., Chernoberezhsky Y.M. [Transfer of monolayers to a solid surface and formation of regular multilayers. Mechanism of multilayer structure formation]. *Vestnik LGU* [Bulletin of LSU], 1980, no. 16, pp. 84–90. (In Russ.).
- Roberts G.G. An applied science perspective of Langmuir-Blodgett films. *Advances in Physics*, 1985, vol. 34, no. 4, pp. 475–512. DOI: 10.1080/00018738500101801
- Karymov M.A., Kruchinin A.A., Tarantov Y.A., Balova I.A., Remisova L.A., Sukhodolov N.G., Yanklovich A.I., Yorking A.M. Langmuir-Blodgett film based membrane for DNA-probe biosensor. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 1992, vol. 6, no. 1-3, pp. 208–210. DOI: 10.1016/0925-4005(92)80057-5
- Bobrysheva N.P., Ivanov N.S., Selyutin A.A., Yanklovich A.I., Sukhodolov N.G. Magnetic properties of Langmuir-Blodgett films with iron ions. *Reviews on Advanced Materials Science*, 2014, vol. 37, no. 1-2, pp. 48–52.
URL: https://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_13714/07_13714_sukhodolov.pdf
- 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/mag/2008/abst4.php#abst9>
- Gladilovich V.D., Krasnov I.A., Podolskaya E.P., Dubrovsky Ya.A., Voitenko N.G., Fironov S.V., Babakov V.N., Goncharov N.V., Krasnov N.V. [Identification of serum albumin peptides, modified by organophosphorus compounds, using methods of chromatography and mass-spectrometry]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2010, vol. 20, no. 4, pp. 84–92. URL: <http://iairas.ru/mag/2010/abst4.php#abst9> (In Russ.).
- Heikaus L., Hidayah S., Gaikwad M., Kotasinska M., Richter V., Kwiatkowski M., Schlüter H. Sample displacement batch chromatography of proteins. *Methods in Molecular Biology*, 2021, vol. 2178, pp. 285–299. DOI: 10.1007/978-1-0716-0775-6_19
- Keltsieva O.A., Gladilovich V.D., Prusakov A.N., Kolonitsky P.D., Sukhodolov N.G., Selyutin A.A., Krasnov N.V., Bonitenko E.Yu., Podolskaya E.P. [Regular multimolecular sorbents (RMMS). The obtaining and the study of surface and sorption properties]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2012, vol. 22, no. 4, pp. 50–55. (In Russ.).
URL: <http://iairas.ru/mag/2012/abst4.php#abst7>
- Sukhodolov N.G., Gladilovich V.D., Kolonitskiy P.D., Shreyner E.V., Yanklovich A.I., Selyutin A.A., Krasnov N.V.,

- Podolskaya E.P. [Study of electrokinetic properties of regular multimolecular sorbent based on trivalent metals stearates]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2013, vol. 23, no. 1, pp. 123–129. URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst13> (In Russ.).
16. 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, vol. 1443, pp. 181–190. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044
 17. Gladilovich V.D., Shreyner E.V., Dubrovsky Ya.A., Kolonitsky P.D., Krasnov K.A., Babina E.V., Murashko E.A., Babakov V.N., Keltsieva O.A., Krasnov I.A., Anurov M.C., Russkikh Ya.V., Chernova E.N., Zhakovskaya Z.A., Sukhodolov N.G., Selyutin A.A., Alexandrova M.L., Podolskaya E.P. [Study of the specific properties of multimolecular regular sorbent Fe(III)]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2013, vol. 23, no. 1, pp. 106–114. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst11>
 18. Chernova E.N., Keltsieva O.A., Gladilovich V.D., Russkikh Ya.V., Sukhodolov N.G., Selutin A.A., Nikiforov V.A., Zhakovskaya Z.A., Podolskaya E.P. [Application of chromato-mass-spectrometer of high resolution LTQ orbitrap for determination of perfluorinated acids in natural water with the traditional solid-phase and metall-affine sorbents: method development and optimization]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2013, vol. 23, no. 1, pp. 30–37. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst3>
 19. Gladilovich V.D., Podolskaya E.P., Selutin A.A., Sukhodolov N.G. *Regulyarnye mul'timolekulyarnye sorbenty dlya metall-affinnoi khromatografii, soderzhashchie labil'nyuyu kovalentnyuyu svyaz'* [Regular multimolecular sorbents for metal-affinity chromatography containing labile covalent bonding]. Patent RF no. RU2608529C2. Prioritet 27.10.2013. (In Russ.). URL: <https://patents.google.com/patent/RU2608529C2/ru>
 20. Keltsieva O.A., Gladilovich V.D., Podolskaya E.P. [Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Principle and applications]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2013, vol. 23, no. 1, pp. 74–85. URL: <http://iairas.ru/mag/2013/abst1.php#abst9> (In Russ.).
 21. Mateo C., Fernandez-Lorente G., Pessela B.C., Vian A., Carrascosa A.V., Garcia J.L., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 915, no. 1–2, pp. 97–106. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00626-4
 22. Lingg N., Öhlknecht C., Fischer A., Mozgovicz M., Scharl T., Oostenbrink C., Jungbauer A. Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: Influence of ligand and metal ions. *Journal of Chromatography A*, 2020, vol. 1633, Id. 461649. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461649
 23. Sukhodolov N.G., Keltsieva O.A., Fedorova A.V., Selutin A.A., Podolskaya E.P. [Surface properties of Langmuir–Blodgett films and nanodispersed oxides containing nickel and copper]. *Zhurnal obshchei khimii* [Russian Journal of General Chemistry], 2015, vol. 85, no. 8, pp. 1387–1388. (In Russ.). URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23883908>
 24. Shreyner E.V., Keltsieva O.A., Shustov V.E., Sukhodolov N.G., Shilovskikh V.V., Shirkin A.Yu., Alexandrova M.L., Jakovskaya Z.A., Podolskaya E.P. [Development of new metal-chelate sorbent based on stearate nickel(II)]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 4, pp. 19–24. DOI: 10.18358/np-25-4-i1924 (In Russ.).
 25. Shreyner E.V., Gladilovich V.D., Keltsieva O.A., Kolonitsky P.D., Efremov T.A., Strukov M.K., Alexandrova M.L., Selutin A.A., Sukhodolov N.G., Podolskaya E.P. [Metal-affinity chromatography as a method specificity extraction of harmful chemicals and their derivatives from environmental objects and biological solution]. *Medline.ru*, 2015, vol. 16, pp. 350–356. (In Russ.). URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=23556242>
 26. Avancini R.M., Silva I.S., Rosa A.C., Sarcinelli Pde N., de Mesquita S.A. Organochlorine compounds in bovine milk from the state of Mato Grosso do Sul-Brazil. *Chemosphere*, 2013, vol. 90, no. 9, pp. 2408–2413. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.069
 27. 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, vol. 27, no. 3, pp. 304–306. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030
 28. Cheng G., Liu Y.L., Zhang J.L., Sun D.H., Ni J.Z. Lanthanum Silicate Coated Magnetic Microspheres as a Promising Affinity Material for Phosphopeptide Enrichment and Identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, vol. 404, no. 3, pp. 763–770. DOI: 10.1007/s00216-012-6150-0
 29. Pink M., Verma N., Polato F., Bonn G.K., Baba H.A., Rettenmeier A.W., Schmitz-Spanke S. Precipitation by Lanthanum Ions: A Straightforward Approach to Isolating Phosphoproteins. *Journal of Proteomics*, 2011, vol. 75, no. 2, pp. 375–383. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.08.001
 30. Babakov V.N., Shreyner 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, vol. 195, pp. 728–731. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.11.103
 31. 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, vol. 1513, pp. 140–148. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.043

32. Zeng Z., Wang Y., Shi S., Wang L., Guo X., Lu N. On-plate selective enrichment and self-desalting of peptides/proteins for direct MALDI MS analysis. *Analytical Chemistry*, 2012, vol. 84, no. 5, pp. 2118–2123. DOI: 10.1021/ac203378q
33. Reyes-Garcés N., Gionfriddo E., Gómez-Ríos G.A., Alam M.N., Boyaci E., Bojko B., Singh V., Grandy J., Pawliszyn J. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. *Analytical Chemistry*, 2018, vol. 90, no. 1, pp. 302–360. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04502
34. Urban P.L., Amantonico A., Zenobi R. Lab-on-a-plate: Extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011, vol. 30, no. 3, pp. 435–478. DOI: 10.1002/mas.20288
35. Wei Z., Li Y., Cooks R.G., Yan X. Accelerated Reaction Kinetics in Microdroplets: Overview and Recent Developments. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2020, vol. 71, pp. 31–51. DOI: 10.1146/annurev-physchem-121319-110654
36. 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, vol. 756, Id. 139374. DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374
37. Babakov V.N., Gorbunov A.Yu., Gladchuk A.S., Kalnina Ya.K., Shilovskikh V.V., Tomilin N.V., Sukhodolov N.G., Radilov A.S., Podolskaya E.P. [Identification of phosphorylated peptides using a MALDI target functionalized with lanthanum stearate]. *Meditsina ehkstremaal'nykh situatsii* [Medicine of extreme situations], 2023, vol. 25, no. 1, pp. 21–30. (In Russ.). URL: https://mes.fmba.press/files/issues/mes.fmba.press/2023/1/2023-1-1186_ru.pdf?lang=ru
38. Kalnina Ya.K., Viskov M.A., Gladchuk A.S., Afanasyeva A.A., Keltsieva O.A., Slyusarenko M.A., Frolov A.S., Krasnov K.A., Sukhodolov N.G., Reinyuk V.L., Podolskaya E.P. MALDI target functionalization with deposited thin films of lanthanum stearate – An efficient tool for in situ enrichment of human globin adducts of chlorinated organic compounds. *Microchemical Journal*, 2024, vol. 205, Id. 111300. DOI: 10.1016/j.microc.2024.111300
39. Gawlik M., Skibiński R., Trawiński J., Komsta Ł. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies – a review. *Acta Chromatographica*, 2018, vol. 30, no. 1, pp. 1–8. DOI: 10.1556/1326.2016.00202
40. Tahara K., Makii E., Iijima S., et al. On-line liquid chromatography and circular dichroism detection of stereoisomers of alpha-tocopherol derivatives generated by an electrochemical reaction. *Analytical Sciences*, 2008, vol. 24, pp. 935–938. DOI: 10.2116/analsci.24.935
41. Pelkonen O., Turpeinen M., Raunio H., et al. Prediction of drug metabolism and interaction on the basis of *in vitro* investigations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2005, vol. 96, no. 3, pp. 167–175. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960305.x
42. Gorbunov A.Yu., Podolskaya E.P. [Fabrication of nanoscale multimolecular structures of lanthanum stearate using Langmuir monolayers for laser desorption/ionization mass spectrometry]. *Pis'ma v zhurnal tekhnicheskoi fiziki* [Technical Physics Letters], 2022, vol. 48, no. 21, pp. 35–39. (In Russ.). DOI: 10.21883/PJTF.2022.21.53711.19320

Contacts: *Sukhodolov Nikolay Gennad'evich*,
sng196505@mail.ru

Article received by the editorial office on 14.10.2024

INTRODUCTION

It is no secret that the scientific interests of Lidiya Nikolaevna Gall were distinguished by their outstanding breadth. Her many years of scientific activity were inextricably linked with the development of methods of mass spectrometric analysis and the development of mass spectrometric equipment. Under her leadership, a huge number of innovative devices were created, some of which are still used in various laboratories. It was she who made one of the most outstanding achievements of the 20th century in the field of analytical instrumentation — the development of the method of extraction of ions from solutions at atmospheric pressure (EIS AP) [1], on the basis of which mass spectrometers are developed and created to this day. Her contribution to the development of modern biophysics is hardly to overestimate and consists in the creation of a revolutionary concept of living systems and the study of the influence of weak and ultra-weak fields and radiation on living organisms [2].

However, there was another area in the development of which Lidiya Nikolaevna took part and which is almost never mentioned in this context, namely the development of sorption systems for the selective extraction of medium-sized peptides and a number of metabolites from blood plasma [3, 4]. It so happened that by the end of the first decade of the 21st century, our group, working as part of the Laboratory of Ecological and Biomedical Mass Spectrometry of the Institute of Analytical Instrumentation, was involved in the development of a method for the specific extraction of phosphonylated peptides from biological samples, the basis of which was a relatively new extraction method at that time — metal affinity chromatography. Lidiya Nikolaevna's sincere conviction in the need to have domestic Russian developments, rather than rely on imported devices and materials inspired the specialists around her and largely directed our research towards the creation of our own sorption materials. In all subsequent years, Lidiya Nikolaevna closely followed the progress of our work and provided comprehensive support for the development of this area, and in many ways the work presented in this review became successful thanks to her.

LANGMUIR MONOLAYERS AND LANGMUIR-BLODGETT FILMS. BACKGROUND

Monolayers of organic substances on an aqueous surface have been known for a long time, but their systematic study began at the beginning of the 20th century from the works of I. Langmuir, who showed that when a solution of an amphiphilic surfactant (surfactant) in a volatile solvent is applied to the surface of an aqueous subphase, a structured film with

a thickness of one surfactant molecule is formed, possessing unique properties [5]. A real boom in the study of such structures began in the 1930s. after the publication of the works of Langmuir and Blodgett, which demonstrated the possibility of transferring oriented monolayers of surfactants onto a solid substrate. Langmuir-Blodgett films (LBFs) are regular multimolecular structures (MMS) formed by successive transfer of monolayers of insoluble surfactants from the surface of an aqueous subphase to a solid substrate [6], and are an example of nanostructured systems. The possibility of changing their composition and properties from layer to layer, and the relative simplicity of their production determined their wide application both in fundamental research and in various areas of practical application. In the early 1970s, in connection with the development of instrumental methods of analysis, the problem of obtaining diffraction gratings for analyzers of the X-ray spectrum of ultra-light elements (from beryllium to sodium) arose. For this purpose, a group was created at the Leningrad State University to study the colloidal-chemical properties of LBFs with the aim of creating such analyzers [7]. These works laid the foundation for a comprehensive study of LBFs with the aim of using them in various fields of technology in the USSR. In the early 1990s, nanosized structures of phthalocyanines were formed, used to develop chemical sensors [8]. Later, DNA sensors were obtained based on octadecylamine films [9].

In the early 2000s, the Faculty of Chemistry of St. Petersburg State University began studying the magnetic properties of thin, almost two-dimensional structures to create new information carriers. For this purpose, LBFs were formed based on trivalent iron stearate [10]. The results of the study showed that, depending on the structure, the film can exhibit both ferromagnetic and diamagnetic properties. This led to the need for a detailed study of the structure of Fe(III) stearate monolayers. Based on studies of their surface properties, it was suggested that the geometric restrictions imposed on the position of metal ions are such that only mono- and distearates can be formed, where the metal ion is located directly on the surface of the film and, thus, should exhibit high chemical activity due to the presence of a labile valence filled with a counterion, which can easily be replaced during subsequent processing.

OUR START. BIRTH OF THE CONCEPT

To confirm this hypothesis, we began a detailed study of the structure and composition of Langmuir monolayers and LBF using mass spectrometric methods. As a result, we proved that the main structural element of the monolayers obtained by applying a solution of stearic acid in hexane to an

aqueous subphase containing Fe^{3+} ions is iron distearate with one labile valence [11].

That is, a structure is indeed formed, one of the surfaces of which, under certain conditions, consists entirely of metal ions.

In parallel, in those years, the Institute of Analytical Instrumentation took part in the creation of methods for the specific extraction of phosphorylated and phosphonylated peptides from tryptic hydrolysates of blood proteins using commercial metal-affinity sorbents. The best results were obtained for extraction using a Fe^{3+} -containing gel (PHOS-Select Iron Affinity Gel, Sigma, IAG), which exhibits specificity for the P=O group; it was the first time when adducts of rat serum albumin with paraoxon were isolated and identified [12]. Despite the high cost and high requirements for storage conditions, this sorbent differed favorably from other available materials by the absence of production of iron ions in the eluates, which significantly facilitated further sample preparation for mass spectrometric analysis.

This intersection of two seemingly unrelated scientific fields led to the idea of studying Langmuir monolayers as a structure with metal-affinity properties.

Indeed, Langmuir monolayers meet most of the main requirements for sorbents. Firstly, the structure of the metal stearate monolayer guarantees not only the presence of metal ions on the sorbent surface but also, due to its completely flat structure, ensures full accessibility of the active centers for analyte molecules regardless of the molecule size. Secondly, the inclusion of the metal in the composition of the salt insoluble in aqueous and aqueous-organic solvents eliminates the production of the metal ion in the sample after the elution of the analyte from the sorbent. Thirdly, the rigid structure of the monolayer ensures the relative mechanical strength of the sorbent. And, finally, the extremely simple technology of production and the possibility of subsequent collapse of the monolayer allow this functional material to be quickly produced and placed in the device for extraction in the required amount immediately before the experiment. Unfortunately, the Langmuir method does not allow one to obtain monolayers from salts of amphoteric metals that are part of the salt anion in aqueous media; such metals as Ti(IV) and Zr(IV), which are active centers of a significant number of known metal-affinity sorbents, had to be excluded from the studies. However, the simplicity of forming monolayers makes it possible to quickly produce and study sorbents containing atoms of any metals that exist in solutions as cations.

The disadvantages of such a material include the process of adhesion of monolayers during collapse, which can occur according to the mechanism of formation of LBF. However, as we showed later experimentally, the treatment of collapsed monolayers with

acetonitrile before performing metal-affinity extraction disrupts the interactions between the adhered layers, allowing the sorbent to be uniformly distributed throughout the entire volume of the sample in the form of small thin films formed during the collapse of the monomolecular layer. The second disadvantage of this structure as a metal-affinity sorbent can be considered the impossibility to densely pack a column or cartridge in monolayers for extraction as a consequence of the adhesion of monolayers. However, the material is convenient to use when performing batch metal affinity chromatography, a method that is currently one of the most popular in sample preparation in bioorganic analysis [13], especially taking into account the advent of commercially available devices for batch experiments, such as spin columns.

Unlike most sorption materials, thin films of metal stearate monolayers are capable of being evenly distributed throughout the entire volume of the sample during extraction. This fully ensures both access of the analyte to the active centers of the sorbent and high-quality washing for removing interfering components with subsequent unimpeded elution of the analyte from the sorbent.

LANGMUIR COLLAPSED MONOLAYERS— SORBENTS FOR METAL-AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Sorbent based on iron stearate monolayers

All the above information about the features of using Langmuir monolayers as metal-affinity sorbents was obtained by us in the course of many years of experimental work. We began in 2009 to study the surface and sorption properties of monolayers based on iron (III) stearate (FFe).

The monolayers were obtained by the classical Langmuir method by applying a solution of stearic acid in hexane to an aqueous subphase containing Fe^{3+} ions and then collapsed in two directions, followed by the subsequent transfer to a spin column. Realizing that the films have a two-dimensional structure and the surface accessible for interaction is limited by the area of the resulting monolayer, we did not expect that FFe would have a large specific surface area and high sorption capacity. However, in the course of the experimental work, it was revealed that FFe had a really small specific surface area $15.0 \pm 1.5 \text{ m}^2/\text{g}$ but a much higher sorption capacity ($0.035 \text{ } \mu\text{mol/g}$ for the SSNGHVYpEKLSSI peptide) [14, 15] than many known commercial sorbents, including IAG. Testing of the obtained sorbent on more complex samples, such as tryptic hydrolysate of bovine casein and hydrolysate of lysed *HeLa* cells, showed that, in addition to higher sorption capacity, FFe exhibits more pronounced both specific and selective properties with

respect to phosphorylated peptides than IAG, iron oxide nanopowder (FeOx) and titanium oxide nanopowder (TiO₂). With the help of FFe, 55% of the total number of phosphorylated proteins found were identified, while for FeOx, IAG and TiO₂ this value was only 34, 10 and 29%, respectively [16]. Also, in the framework of other studies of the specific and selective properties of the new sorbent, it was shown that with the help of FFe metal affinity chromatography, in addition to phosphorylated peptides, other types of phosphorus-containing compounds (phosphorylated peptides, pesticides), fluoroacids (perfluorooctane sulfonic acid), cyanobacterial toxins (microcystin-RR) can be successfully extracted and analyzed [17, 18], i.e., the range of application of FFe turned out to be quite wide. Thus, collapsed monolayers of iron (III) stearate were the first structure studied by us, which found application as a metal affinity sorbent [19].

New metal affinity sorbents for the extraction of nitrogen- and chlorine- containing organic compounds

In addition to Fe(III), a number of transition metals are of interest as active centers of sorbents, primarily Ni(II) and Cu(II), which are capable of exhibiting specificity to heteroatoms such as nitrogen and halogens [20]. Due to the relatively high affinity of these metals for an epitope containing six or more histidine residues containing several nitrogen atoms [21], metal-affinity sorbents containing Ni(II) and Cu(II) atoms are traditionally used in the purification of recombinant polyhistidine-labeled proteins [22]. However, at the time of the beginning of the studies, we did not find information on other applications of sorbents containing copper and nickel. Already having experience in characterizing structures based on Langmuir monolayers, we fairly quickly assessed the performance of structures containing copper (FCu) and nickel (FNi). The specific surface area and sorption capacity were comparable with FFe, as were the general principles of the analysis, and the main structural unit was determined to be distearates of both metals [23, 24]. From the point of view of the application of FCu and FNi, of particular interest to us was the possibility of their use for the extraction and analysis of ecotoxicants and drugs (or their metabolites), since most of them contain functional groups containing nitrogen or halogens.

Using the example of the extraction of glyphosate, aminomethylphosphonic acid, pirimicarb, and FCu and FNi phenazepam from aqueous solutions and rat blood plasma, we showed that these sorbents can be used for effective sample preparation in the quantitative analysis of water-soluble toxic substances with active functional groups [25].

The work devoted to the development of a method for extracting dieldrin from samples of various natures

is worthy of special attention. It was during its analysis that we demonstrated for the first time that metal affinity chromatography allows for the specific extraction of chlorine-containing compounds from biological samples. Dieldrin is a particularly stable, highly toxic chlorine-containing insecticide, poorly soluble in water but well in environments such as milk and blood plasma [26]. To date, a permanent source of dieldrin is its permitted precursor, aldrin, which can be metabolized to dieldrin in an acidic environment. The use of FNi for the extraction of dieldrin from water, milk, and rat blood plasma made it possible to increase the degrees of extraction of this toxicant to 86.7, 91.4 and 76.1%, respectively, which, when compared with other known methods, turned out to be significantly higher [27].

Collapsed monolayers of lanthanum stearate as an effective metal-affinity sorbent

It is worth noting that Fe(III), Ni(II) and Cu(II) atoms and ions are quite often included in metal-affinity sorbents as active centers. There are many commercial products, both in the form of packaged materials and ready columns or cartridges. Therefore, we turned our attention to a lanthanum [28] — metal that was not present in the composition of commercial sorbents. In research papers, only labor-intensive methods for obtaining such structures were proposed. Lanthanum, as the progenitor of the lanthanide group among rare earth metals, is the most electropositive element; in compounds it is represented by a trivalent cation, forms predominantly covalent compounds, and is considered a very hard acceptor with a high affinity for oxygen-containing anions, including the P=O group [29]. Due to the large size of the cation and extended diffuse orbitals, the sorbent based on lanthanum distearate (FLa) became a godsend for us in developing effective methods for the specific extraction of phosphonylated peptides from biological samples. The rigid and elastic structure of the monolayer provided a larger specific surface area of the sorbent (34.5 ± 3.5 m²/g) than that of Fe(III), Ni(II) and Cu(II), and ensured a uniform distribution of thin films in the sample volume, which was not always possible to achieve for other structures. The result of the work was a method for extracting peptic phosphonylated peptides of human serum albumin [30].

Thus, by developing sorbents based on Langmuir monolayers and methods for their use, we gained very interesting experience. On the one hand, the debugged procedures for obtaining and producing sorbents were not difficult. A trough for obtaining sorbents was designed and manufactured, the area of the forming monolayers was calibrated and standardized, the optimal amount of material placed in the spin column and distributed over the sample volume was selected, and the process of collapsing and transferring

monolayers into the spin column was debugged. On the other hand, due to the pronounced positive charge on the surface of the monolayer that consists of metal atoms, which leads to a high level of sorbent specificity, we encountered difficulties with analyte desorption at all stages of developing analytical methods. All eluents known at that time for metal affinity chromatography did not provide a high degree of desorption. And if at first we made efforts to create a more effective eluent (we prepared solutions containing piperidine, imidazole, and for the first time, perfluorooctane sulfonic acid [31] to enhance the donor force), then the main efforts were directed at developing methods that do not require elution of the analyte from the sorbent.

"LABORATORY ON THE TARGET"

First attempts

In the case of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS), such methods are possible if sample preparation is carried out on a chemically modified target surface with subsequent selective binding of analytes to the surface [32]. In this case, extraction on the target can be carried out by surface-activated laser desorption/ionization under the influence of a laser pulse. Most often, extraction on the target surface is carried out in the format of solid-phase microextraction coupled with functionalization of the target surface with various sorbents [33]. This approach was called "laboratory on a target", and a number of works were devoted to metal-affinity sorbents [34].

We made many attempts to functionalize the surface of the MALDI target with monolayers of stearates of various metals. Transfer of monolayers to the substrate by the classical Langmuir-Blodgett method could not provide sufficient sorbent surface for interaction with the analyte. Even a MALDI-MS method was not sensitive enough. We also tried to transfer monolayers collapsed in one direction and dispersed monolayers to the target (due to the high adhesion of these structures to metal surfaces, the monolayers stuck to the surface quite well). In this case, due to the different coating thicknesses, we were unable to obtain reproducible analysis results, although the registration of MALDI mass spectra indicated the extraction of analytes from the sorbent surface. Accordingly, the impossibility of adapting the classical Langmuir technology (formation of a monolayer on a horizontal water surface) to such a task led to the need to develop a method for functionalizing the MALDI target by forming sorbents directly on the surface.

Adaptation of the Langmuir technology to the hemispherical surface of a droplet

It was proposed to apply an organic phase containing stearic acid to a droplet of an aqueous solution of a metal salt, which would be located in the center of the target cell. Accordingly, it was necessary to develop a model for the formation of films similar to collapsed monolayers on a subphase in a geometry different from the flat surface of the Langmuir trough. It could be expected that, on the one hand, the curvature of the surface characteristic of a droplet changes its mechanochemical properties [35], which is likely to provide a faster and more complete transition of stearic acid into a salt followed by the formation of an ordered structure containing metal ions. On the other hand, the rapid evaporation of n-hexane during the movement of the film from the surface of the droplet to its base should lead to the formation of a folded structure with a developed surface. Finally, such structures have a fairly high adhesive capacity to the surface of a solid substrate, and, therefore, the formed material will be well retained on the target.

At that time, monolayers of lanthanum stearate were of the greatest interest to us. Due to the fact that the lanthanum cation has the ability to complexation, characteristic of transition metals, which can significantly complicate the study of film formation on the hemispherical surface of the aqueous subphase, thin films of barium stearate were chosen as a model system, which coordinates only water, but the size of the barium ion is close to lanthanum. Indeed, after applying a saturated solution of stearic acid in hexane to a water drop containing barium ions, we saw a thin opalescent film around the drop, which reached the boundaries of the target cell and had an uneven structure. We had to prove that the resulting film was a collapsed monolayer of barium stearate. It should be noted that with this approach, the amount of the substance formed is extremely small, and we needed extremely sensitive physicochemical methods of analysis to confirm the hypothesis.

Film on the target surface — collapsed monolayers of metal stearate

First, it was necessary to establish the chemical composition of the resulting film. Using infrared spectroscopy, we confirmed the transition of stearic acid to salt. Using energy-dispersive X-ray spectroscopy, we established the presence of barium in the film, and using the MALDI-MS method, we proved that the main structural unit of the film is barium stearate. When studying the film formation and its structure, we used various optical research methods. Thus, using optical tensiometry and light microscopy in reflected light, we managed to record the process of film formation itself and its movement to the target surface. Us-

ing light microscopy with scattered light and scanning electron microscopy (SEM), we showed that the structure of the material applied to the target cell consists of ordered concentric circles. Such a distribution of the substance made it possible to assume a wave-like nature of film formation due to a complex of processes associated with its movement along the surface of the aqueous subphase and evaporation of the hexane layer followed by the formation of multistuctures from a different number of films. The largest structural element of the surface was a wave-like relief with a height difference of up to 500 nm, which was determined using atomic force microscopy (AFM).

But our most important task was to show that the film formed on the target surface is similar to the collapsed monolayers that we used in spin columns. For this purpose, we used the method of Raman spectroscopy, which proved that the thin film formed on the droplet surface is a monolayer of barium stearate (FBa), which spontaneously collapses when transferred to the substrate, forming multistuctures similar to classical LBFs obtained by multiple layering of one monolayer on another or by the collapse of one monolayer [36].

A number of experiments to establish the composition and structure of the films formed on the target, when possible, were also carried out for lanthanum stearate. As in the case of FBa, energy-dispersive X-ray spectroscopy showed that lanthanum is a component of the film, and tandem MALDI-MS determined that the main structural unit of the film is lanthanum distearate. Further, using SEM and AFM, we determined that FLa formed on the target surface are also distributed on the substrate surface in the form of ordered concentric circles and are structurally similar in morphology to FBa, but differ in a denser packing of aggregates, which have somewhat larger dimensions (height difference up to 600 nm). Such morphology provides a high specific surface area of films on the droplet periphery. Based on the obtained results, we concluded that, due to the constant movement of the formed film over the target caused by the continuous formation of a monolayer on the free surface of the water droplet and the uneven oscillatory evaporation of hexane, the process of spontaneous collapse, which begins at the perimeter of the water droplet, then spreads to the entire region of hexane spreading in the case of FLa usage; the greatest height of the aggregates is observed closer to the evaporation boundary of the non-polar solvent.

Next, we had to prove that FLa formed on the target has the same sorption properties as in a spin column. It turned out to be a complete surprise to us that even one formed monolayer of lanthanum stearate is capable of retaining an amount of substance sufficient for detection in MALDI-MS analysis. This was demon-

strated using the example of the extraction of a tryptic phosphonylated peptide of human butyrylcholinesterase and a chlorine-containing adduct of human globin, which confirmed the specific interaction of FLa active centers with phosphorus- and chlorine-containing functional groups of compounds [36].

Development of extraction methods in the "laboratory on target" format

Due to the extremely small amount of the formed substance, we could not weigh the resulting collapsed monolayers and, as a consequence, determine the specific surface area and sorption capacity directly. We tried to do this by indirect methods. At first, it was determined that sequential formation of FLa monolayers on the target cell lets the procedure be performed no more than 6 times. With an increase in the number of monolayers, the material began to form outside the cell, and during the process of removing excess salt from the sorbent spot, a significant amount of material was lost. A spot consisting of 6 FLa monolayers was sufficiently stable both to mechanical effects and to the influence of solvents. Using light microscopy in scattered light, we showed that the procedure for forming 6 FLa layers on a cell is sufficiently reproducible. We estimated the conditional sorption capacity during the extraction of a peptic phosphonylated peptide of human serum albumin. Knowing the percentage of protein modification and ensuring complete hydrolysis in the presence of pepsin, we could calculate the amount of modified peptide in samples obtained by diluting the phosphonylated sample with the non-phosphonylated one. During MALDI-MS analysis, the presence of the target peptide signal in the mass spectrum of the unbound fraction was assessed. In this way, we were able to determine that 6 FLa monolayers in the "lab-on-target" format are capable of retaining 0.012 μg (8 pmol) of the peptide. Taking into account the average detection limits of modern MALDI-MS equipment from units of fmol to hundreds of amol, this indicated that the sorption capacity of the formed sorbent was sufficient to perform most biological tasks. This was demonstrated by us using the example of the peptic phosphonylated peptide of human serum albumin: it was possible to extract and reliably determine it with 0.05% protein modification [37].

After the maximum possible characterization of the sorbent formed on the target surface, we moved on to the development of approaches to the specific extraction of chlorine-containing protein adducts in the "laboratory on target" format. The development of such methods seemed to us to be a very important task, since a huge number of xenobiotics (pesticides, drugs, persistent environmental pollutants, etc.) with a toxic effect and capable of alkylating proteins directly or after biotransformation belong to this class of com-

pounds. Covalent binding of a protein to a xenobiotic or its metabolite can lead to the loss of the functional properties of the protein and, as a consequence, harm human health. A huge amount of work was done to determine the sensitivity, specificity, and selectivity of the extraction method for tryptic peptides of human globin modified with chlorine-containing compounds. The result obtained by us in the study of human globin adducts with halogenated methyl aromatic substances containing one or two chlorine atoms in the benzene ring and being direct-acting alkylating agents deserves special attention. In this experiment, we incubated globin with alkylating agents in various molar ratios, followed by protein hydrolysis in the presence of trypsin and adduct extraction on 6 FLA monolayers. In the case of an adduct containing two chlorine atoms, we were able to see the target signal in the mass spectrum of the sample after incubation of 1 mg of globin with 10 ng of xenobiotic, which in a molar ratio was 1500:1, which was in excellent agreement with the data obtained in the work with phosphonylated peptides. But in the case of a monosubstituted adduct, the same result was obtained for a sample with a protein-to-xenobiotic molar ratio of 12 000 : 1 (1 mg of globin was incubated with 1 ng of the xenobiotic), indicating the highest sensitivity of the analytical approach combining metal affinity chromatography on collapsed lanthanum stearate monolayers in a "laboratory on target" format with MALDI-MS analysis [38], which can form the basis for developing methods for establishing the fact of intoxication with chlorine-containing compounds.

As another practical application of the developed approach, we proposed a method for determining reactive metabolites of chlorine-containing xenobiotics. As mentioned above, protein modification can occur after biotransformation of the xenobiotic with the formation of a reactive metabolite. To date, there are several methods for biotransformation modeling; we preferred UV-induced photocatalytic oxidation in the presence of TiO₂ nanoparticles [39], which does not require complex equipment, such as an electrochemical cell for electrochemical oxidation [40], and significant time costs, in contrast to microsomal oxidation [41]. As objects of study, we chose two drugs containing one and two chlorine atoms in the benzene ring, as in the case of model halogenated aromatic compounds, namely, amodiaquine and diclofenac. Extraction of human globin adducts with xenobiotic metabolites on FLA in the "laboratory on target" format was carried out after obtaining the metabolites, incubating them with globin, and hydrolyzing them in the presence of trypsin, and in both cases we detected protein adducts not only with known reactive metabolites but also with previously unstudied ones [38, 42].

Advantages of the "lab-on-target" format based on metal stearate monolayers

It is impossible not to note the main advantages of the "lab-on-target" format based on collapsed Langmuir monolayers. Firstly, the surface functionalization does not require a large number of reagents and significant time consumption. To obtain one sorbent spot, depending on the amount of required material, 1–2 µL of a 10⁻² M metal salt solution and no more than 10 µL of a saturated solution of stearic acid in hexane are required. Up to 6 sorbent spots can be formed at a time, and this takes about 5 min, and the same amount of time is required to prepare the sorbent for analysis. Secondly, a small amount of sample is needed for successful analysis. The volume of the sample required for analysis does not exceed 10 µL, a drop of this volume can be retained on the surface of the sorbent spot. In almost all studies in the "lab-on-target" format, we used 1 µL of sample with a protein concentration of 0.3–1 mg/mL in 7–8 µL of the sorption solution. The total extraction time, which can also be carried out on several sorbent spots in parallel, including the stages of sorption, washing, and drying, did not exceed 1 h. And finally, as we showed at the final stages of the study, metal affinity extraction on collapsed lanthanum stearate monolayers provides the highest sensitivity of subsequent MALDI-MS analysis. Accordingly, we can quite reasonably propose the developed approach for use in research institutions in the pharmaceutical and medical fields for the creation of analytical methods for identifying metabolites and their adducts with long-lived proteins for retrospective diagnostics of intoxications, as well as modeling oxidative biotransformation and preclinical assessment of the potential toxicity of biologically active substances.

CONCLUSION

Summarizing all of the above, we can conclude that Langmuir monolayers are a unique material with enormous potential for further research and application. Today, these structures with diverse compositions and properties are used as elements of micro- and optoelectronics, chemical sensors, high-resolution photo- and electron resistors, thin dielectrics in the "metal – dielectric – semiconductor" system, bio- and immunosensors, ultra-thin film electrodes in photochemical devices and information storage devices, etc. We were lucky to offer another way of using Langmuir monolayers, which has great potential for solving many analytical problems in medicine, biochemistry, and pharmaceuticals. And, of course, we are immensely grateful to Lidiya Nikolaevna Gall for her long-term support for the development of this area and her high assessment of the results we have obtained.