Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

На правах рукописи

ПОДОЛЬСКАЯ ЕКАТЕРИНА ПЕТРОВНА

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

Специальности:

1.3.2. «Приборы и методы экспериментальной физики»

1.4.2. «Аналитическая химия»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора технических наук

Санкт-Петербург – 2023

оглавление

ВВЕДЕНИЕ	8
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Источники мягкой ионизации	16
1.1.1 Электрораспыление при атмосферном давлении (ЭРИАД, ESI)	16
1.1.2 Лазерная десорбция/ионизация (LDI)	22
1.1.2.1 Матрицы для MALDI MS анализа	24
1.1.2.2 Механизмы ионообразования MALDI	27
1.1.2.3 Модели ионообразования	28
1.1.2.4 Электрохимические аспекты механизма ионообразования MALDI	31
1.2 Основные области применения MALDI MS анализа	38
1.2.1 MALDI MS при решении задач протеомики	39
1.2.2 MALDI MS для решения задач аддуктомики	42
1.2.3 MALDI MS профилирование микроорганизмов	44
1.2.4 MALDI MS в клинических исследованиях	48
1.2.5 (MA)LDI MS анализ низкомолекулярных соединений и метаболитов	50
1.2.5.1 MALDI MS анализ свободных жирных кислот	51
1.2.6 Молекулярная визуализация с использованием MALDI	53
1.3 Металл-аффинная хроматография	56
1.3.1 Принцип металл-аффинной хроматографии	56
1.3.2 Очистка белковых соединений методом металл-аффинной хроматографии	60
1.3.3 Металл-аффинная хроматография в фосфопротеомике	62
1.3.4 Разнообразие сорбентов для металл-аффинной хроматографии	64
1.3.4.1 Материалы для IMAC	65
1.3.4.2 Материалы для МОАС	67
1.3.4.3 Аффинные материалы, содержащие редкоземельные элементы	70
1.4 Формат «лаборатория на мишени»	73
1.4.1 Предварительное концентрирование образцов в формате «лаборатория на	
мишени»	74
1.4.1.1 Концентрирование при помощи внешних устройств	74
1.4.1.2 Концентрирование на поверхности MALDI мишени,	
функционализированной гидрофобными покрытиями	75
1.4.1.3 Концентрирование с помощью микроконструированных мишений	77
1.4.2 Очистка образцов в формате «лаборатория на мишени»	77
1.4.3 Экстракция на поверхности MALDI мишени	78
1.4.4 Металл-аффинная хроматография в формате «лаборатория на мишени»	79
1.4.5 Исследование межмолекулярных взаимодействий на поверхности MALDI	
мишени	83
1.4.6 Ферментативные реакции на поверхности MALDI мишени	83
1.4.7 Химические реакции и дериватизация на поверхности MALDI мишени	85
1.4.8 Многофункциональное применение MALDI мишеней в формате «лаборато	рия
на мишени»	87
1.5. Монослои Ленгмюра	88
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	97
2.1 Синтез наночастиц оксидов металлов (MeOx)	97
2.2 Определение удельной поверхности МеОх методом низкотемпературной	~
адсорбции азота	97

2.3 Определение электрокинетического потенциала и фазового состава MeOx 2.4 Определение сорбционной емкости FeOx и ZrOx по пептиду SSNGHVYpEKL	97 .SSI
	98
2.5 Определение сорбционной емкости CuOx и NiOx по глобину крысы	98
2.6 Исследование устойчивости FMe и MeOx в различных растворителях	99
2.7 Получение FMe	99
2.8 Определение влажности FMe	99
2.9 Стандартизация FMe	100
2.10 Определение удельной поверхности FMe	100
2.11 Определение электрокинетического потенциала FMe	100
2.12 Определение сорбшионной емкости FFe и FLa по пептилу SSNGHVYpEKLS	SI101
2.13 Опрелеление сорбшионной емкости FCu и FNi по глобину крысы	101
2.14 Исследование морфологии FMe и MeOx	102
2.15 Металл-аффинная хроматография фосфорилированного SSNGHVYpEKLSS	Г при
оптимизации процесса десорбнии с использованием FFe	102
2.16 Металл-аффинная хроматография триптического гидролизата казеина на	
сорбентах содержащих атомы железа	102
2 17 Металл-аффинная хроматография гидропизата клеточного лизата HeLa на	102
сорбентах содержащих атомы железа	103
2 18 Количественный хроматографический анализ метолом HPL C-UV	103
2.19 Количественный хромато-масс-спектрометрический анализ методом HPLC-	-MS
2.19 Rom for bombin xpomero made energomerph for an analis merodom in EC	104
2.20 Качественный хромато-масс-спектрометрический анализ методом nanoHPL	C-MS
2.21 Метаци-аффинная хроматография пецтического гидропизата белков плазмы	105
крови человека молифицированной РЕМР с использованием FL а	105
2 22 Канестренный масс-спектрометринеский анализ методом MAI DI MS FI а и	105
2.22 Качественный масс-спектрометрический анализ методом масс-спектрометрический анализ методом масс-спектрологизата белков плазмы крови целовека	106
2.23 Yanaktenuzahug hactuli mSi Ω_{2}/Ni	100
2.25 M apartephisading vacuum mSiO ₂ /Ni	100
2.24 Металл-аффинная хроматография DCL с использованием частиц $mSiO_2/Ni$.	109
2.25 Исследование изотерм сороции DCL с использованием частиц mSiO ₂ /Ni	100
2.20 Исследование скорости сороции DCL с использованием частиц пізто ₂ /тм	100
2.27 Исследование скорости десороции DCL с частиц ш5ю2/11	108
2.28 Исследование сороционной емкости частиц mSiO ₂ /Ni по DCL и высор	100
онтимального раствора для десороции	109
2.29 Исследование десороции DCL с частиц mSiO ₂ /Ni при двукратной обработке	100
ОДНИМ ЭЛЮЕНТОМ	109
2.30 Количественный хроматографический анализ DCL методом HPLC-UV	110
2.31 Расчет энтальпии адсорбции	110
2.32 Металл-аффинная хроматография дильдрина с использованием FN1	111
2.33 Количественный хроматографический анализ дильдрина методом GC-ECD	111
2.34 Металл-аффинная хроматография диазинона с использованием MeOx	112
2.35 Количественный хроматографический анализ диазинона методом GC-FID	112
2.36 Металл-аффинная хроматография пестицидов и лекарственных средств с	
использованием FNi и FCu	113
2.37 Металл-аффинная хроматография пестицидов или лекарственных средств с	
использованием NiOx и CuOx	113

методом HPLC-UV	
2.39 Количественный	анализ глифосата и АМРА методом атомно-эмиссионної
спектрометрии с инду	ктивно-связанной плазмой (ICP-AES)
2.40 Металл-аффинна	я экстракция фосфорилированных пептидов на поверхно
мишени, функционали	тзированнои FeOx и ZrOx
2.41 Качественный ма	сс-спектрометрическии анализ фосфорилированных пеп
методом MALDI MS	
2.42 Синтез алкилируі 2.42 D	ющих агентов
2.43 Выделение глоои 2.44 Па-тение глоои	на из гемолизата крови человека
2.44 Получение аддук 2.45 факуустратирии и	тов оелков крови с алкилирующими агентами
2.45 Ферментативный 2.46 Силтер на политика	тидролиз алкилированных ослков в присутствии трипси
2.40 Синтез поликрис: 2.47 Факуникарания на	таллического стеарата оария
2.4/ Формирование пл 2.49 Поличение молле	тенок лентмюра-влоджетт (LBF) стеарата оария
2.40 получение колла: Пентиора	псированных пленок стеариновой кислоты и ее солей в 1
лені мюра 2 40 Ирмарация урна а	νομμρομμα
2.49 измерение угла с 2.50 Сретород химиост	мачивания
2.50 Световая микросі	ония
2.51 CHERTPOCKOHNA KO 2.52 Инфракрасная (IE	Эмоинационного рассеяния
2.52 гинфракрасная (п 2.53 Сканирующая эле	с) спектроскопия
2.55 Сканирующая эло рештериовская (EDX)	спектроскопия (ЗЕМ) и энергодисперсионная
2 54 Атомио силорая и	микроскопия (АЕМ)
2.54 АТОМНО-СИЛОВАЯ 1 2.55 Масс, спектромет	микроскопия (АТМ)
	рический анализ структур на основе стеарата бария и ст
2 56 Функционализаці	ия поверхности MAI DI мишени структурами на основе
стеаратов метаплов	и поверхности инсерт мишени структурами на основе
2.57 Металл-аффинна	я экстракция аллуктов глобина человека с ССАп поверхн
MALDI мишени. фун	книонализированной олним коллапсированным моносло
стеарата пантана	
2.58 Опенка спенифич	ных и селективных свойств FMe. сформированных на я
MALDI мишени, на п	оимере галогенсолержащих аллуктов HHb с ксенобиоти
алкилирующего лейст	вия.
2.59 Оценка чувствите	ельности полхола лля металл-аффинной экстракции
галогенсолержаних а	ллуктов белков крови на FLa. сформированном на ячейк
MALDI мишени	¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬¬
2.60 Проведение UV/7	TiO ₂ -PCO DCL
2.61 Масс-спектромет	рический анализ продуктов UV/TiO ₂ -PCO DCL
2.62 Получение адлук	тов глобина человека с продуктами UV/TiO ₂ -PCO DCL
2.63 Металл-аффинна	я экстракция аддуктов глобина человека с продуктами U
PCO DCL на поверхно	ости MALDI мишени, функционализированной FMe или
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
2.64 Моделирование б	иотрансформации амодиахина с использованием
микрореакторного уст	ройства с последующей металл-аффинной экстракцией
аддуктов глобина чел	овека на поверхности MALDI мишени. функционализир

2.66 Получение монослоев на основе монокарбоксилатов бария на поверхности	
MALDI мишени	. 131
2.67 Оптимизация концентрации матрицы при формировании монослоев на MAL	DI
мишени	. 131
2.68 Формирование монослоев монокарбоксилатов бария на MALDI мишени в	
присутствии матрицы DHB	. 131
2.69 Экстракция FFA из биологических образцов различной природы	. 132
2.69.1 Экстракция из семян и клубеньков гороха Pisum sativum L	. 132
2.69.2 Экстракция из морских организмов	. 132
2.69.3 Экстракция из плазмы крови и фолликулярной жидкости	. 133
2.69.4 Экстракция из водоросли <i>Fucus vesiculosus</i>	. 133
2.70 Исследование изменения относительного содержания FFA в плазме крови кры	ыс
при интоксикации ацетатом ртути	. 133
2.71 Масс-спектрометрический анализ FFA в составе монослоев монокарбоксилат	ГОВ
бария методом MALDI MS	. 134
2.72 Анализ свободных жирных кислот методом GC MS в экстрактах водорослей	-
Fucus vesiculosus	.135
2.73 Сравнение профилей FFA в составе н-гексановых экстрактов из агробактерий	
Rhizohium leguminosarum by. viciae RCAM1026 и Sinorhizohium meliloti RCAM1021	136
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖЛЕНИЕ	.137
3.1 Разработка и исслелование структур для функционализации поверхности MAL	DI
мищени	.138
3.1.1 Разработка и станлартизация металл-аффинных пористых сорбентов на осн	нове
оксилов металлов (MeOx)	.139
3.1.1.1 Получение и стандартизация металл-аффинных пористых сорбентов на	a
основе оксилов металлов (MeOx)	. 139
3.1.1.2 Исслелование поверхностных свойств металл-аффинных сорбентов на	
основе оксилов металлов (MeOx)	. 142
3.1.2 Разработка и станлартизация металл-аффинных сорбентов на основе	
монослоев Ленгмюра (FMe)	. 144
3.1.2.1 Получение и станлартизация металл-аффинных сорбентов на основе	
монослоев Ленгмюра (FMe)	. 144
3.1.2.2 Исслелование физико-химических свойств металл-аффинных сорбентс)B
на основе монослоев Ленгмюра (FMe)	. 148
3.1.3 Исследование специфичных и селективных свойств MeOx и FMe	.150
3.1.3.1 Исследование специфичных и селективных свойств FFe и FeOx на	
примере задач фосфопротеомики	. 150
3.1.3.1.1 Оптимизация условий проведения ІМАС	. 150
3.1.3.1.2 Извлечение фосфорилированных пептилов из триптического	
гидролизата казеина	. 152
3.1.3.1.3 Анализ фосфопептидов в гидролизате лизированных клеткок лини	И
HeLa	. 154
3.1.3.1.4 Извлечение синтетических пептидов из триптического гидролизата	a
лизата клеток линии HeLa	.155
3.1.3.2 Монослои стеарата лантана - металл-аффинный сорбент для селективн	юй
сорбции аддуктов сывороточного альбумина человека с фосфорорганическим	ии
соединениями	. 157
3.1.3.3 Исследование эффективности элюентов, содержащих PFOS	. 160

3.1.3.4 Металл-аффинная хроматография, как способ экстракции экотоксикантов	3
на примере пестицидов и лекарственных препаратов 16	55
3.1.3.4.1 Извлечение хлорсодержащего инсектицида дильдрина из водных и	
биологических образцов методом металл-аффинной хроматографии на	
монослоях стеарата никеля16	56
3.1.3.4.2 Извлечение фосфорсодержащего инсектицида диазинона из водного	
образца17	70
3.1.3.4.3 Исследование специфичных свойств сорбентов, содержащих медь и	
никель17	73
3.2 Функционализация поверхности MALDI мишени MeOx и FMe для проведения	
металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени» 17	74
3.2.1 Функционализация поверхности MALDI мишени MeOx методом	
электрораспыления в бескапельном режиме17	75
3.2.1.1 Разработка метода нанесения наночастиц MeOx на поверхность MALDI	
мишени с помощью электрораспыления в бескапельном режиме с динамическим	Л
делением потока жидкости при нормальном давлении 17	76
3.2.1.2 Металл-аффинная экстракция на МеОх функционализированной	
поверхности MALDI мишени	31
3.2.1.2.1 Металл-аффинная экстракция фосфорилированных пептидов на	
пятнах FeOx и ZrOx в формате «лаборатория на мишени» 18	31
3.2.1.2.2 Металл-аффинная экстракция фосфонилированных пептидов на	
пятнах FeOx и ZrOx в формате «лаборатория на мишени» 18	34
3.2.1.2.3 Металл-аффинная экстракция аддуктов ННb с ксенобиотиками из	
группы хлорацетамидов на MeOx функционализированной MALDI мишени 18	35
3.2.2 Функционализация поверхности MALDI мишени FMe 19)]
3.2.2.1 Исследование самоорганизации солей жирных кислот на полусферическо	эй
поверхности водной субфазы для формирования металл-аффинных сорбентов на	a
MALDI мишени 19) 2
3.2.2.1.1 Исследование процесса формирования пленки стеарата бария на	
поверхности капли водной субфазы 19) 3
3.2.2.1.2 Исследование состава пленок, сформированных на ячейке MALDI	
мишени19) 8
3.2.2.1.3 Исследование морфологии пленок, сформированных на ячейке	
MALDI мишени)5
3.2.2.1.4 Исследование сорбционных свойств коллапсированного монослоя	
стеарата лантана, сформированного на ячейке MALDI мишени в формате	
«лаборатория на мишени»)7
3.2.2.2 Формирование мультимолекулярных структур FMe	0
3.2.2.3 Разработка методики металл-аффинной экстракции галогенсодержащих	
аддуктов HHb с ксенобиотиком алкилирующего действия в формате	
«лаборатория на мишени»	4
3.2.2.3.1 Оценка специфичных и селективных свойств FMe, сформированных	
на ячейке MALDI мишени, на примере галогенсодержащих аддуктов HHb с	
ксенобиотиком алкилирующего действия21	5
3.2.2.3.2 Оценка чувствительности подхода для металл-аффинной экстракции	
хлорсодержащих аддуктов ННb на FLa, сформированном на ячейке MALDI	
мишени	21

3.2.2.3.3 Оценка чувствительности подхода для металл-аффинной экстр	акции
фосфорсодержащих аддуктов белков крови на FLa, сформированном на	ячейке
MALDI мишени	225
3.2.3 Сравнение свойств FMe и MeOx	231
3.2.4 Интеграция стадии металл-аффинной экстракции в формат «лаборатор	оия на
мишени» на основе фотокаталитического микрореактора	238
3.3 Формат «лаборатория на мишени» для анализа свободных жирных кислот	
3.3.1 Формирование твердых монослоев на основе смеси насыщенных FFA.	248
3.3.2 Определение оптимальной концентрации матрицы для осуществления	MALDI
MS анализа монокарбоксилатов бария	251
3.3.3 Определение чувствительности и параметров линейности предложенно	ого
подхода	253
3.3.4 Исследование влияния изотопного распределения бария на проведение	
полуколичественной оценки содержания FFA в образце	257
3.3.5 Сравнение результатов, получаемых с помощью MALDI MS и GC MS.	
3.3.6 Исследование профилей FFA в биологических образцах различной при	роды
3.3.7 Профилирование FFA в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом	і ртути
3.3.8 Профилирование FFA в агробактериях Rhizobium leguminosarum bv. vio	iae
RCAM1026 и Sinorhizobium meliloti RCAM1021	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	
СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	
БЛАГОДАРНОСТИ	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	
ПРИЛОЖЕНИЕ А	359
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	
ПРИЛОЖЕНИЕ В	373
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	380
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	391
ПРИЛОЖЕНИЕ Е	393
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж	398

введение

Актуальность темы

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

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

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

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

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

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

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

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

9

• Систематизировать данные по составу, структурам и способам нанесения функционализирующих покрытий, содержащих атомы металла и обладающих металлаффинными свойствами, на твердую подложку.

• Разработать ряд новых металл-аффинных и металл-оксидных нанодисперсных материалов, и провести их характеризацию: определить состав и структуру, исследовать физико-химические характеристики, оценить сорбционные свойства. Исследовать специфичные и селективные свойства разработанных структур, как металл-аффинных сорбентов.

• Разработать методы функционализации поверхности MALDI мишени с использованием разработанных материалов и провести характеризацию покрытий. При невозможности или затрудненности переноса готового материала на подложку разработать способ формирования покрытия непосредственно на ней.

• Разработать методические подходы в формате «лаборатория на мишени», позволяющие проводить металл-аффинную экстракцию непосредственно на поверхности мишени с последующим MALDI MS анализом. Провести сравнение специфичных и селективных свойств разработанных покрытий.

• Разработать методические подходы в формате «лаборатория на мишени», позволяющие проводить дериватизацию свободных жирных кислот с помощью металлсодержащих реагентов с целью увеличения выхода ионов при MALDI и повышения эффективности масс-спектрометрического анализа.

Научная новизна исследования

• Установлено, что метод электрораспыления в нормальных условиях в бескапельном режиме с динамическим делением потока распыляемой жидкости позволяет проводить функционализацию поверхности MALDI мишени нанодисперсными оксидами металлов без предварительной и дополнительной подготовки поверхности мишени.

• Разработан подход к функционализации поверхности MALDI мишени на основе технологии Ленгмюра, перенесенной с плоской поверхности на поверхность капли, позволяющий формировать металл-аффинный сорбент в ячейке мишени непосредственно перед проведением эксперимента с возможностью варьирования состава сорбентов зависимости от поставленной задачи, без дополнительной подготовки и последующей регенерации поверхности мишени. • Доказано, что при переносе технологии Ленгмюра с плоской поверхности на поверхность капли на MALDI мишени формируются мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных монослоев Ленгмюра, сохраняющих свойства металлаффинных сорбентов.

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

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

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

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

Теоретическая значимость

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

В рамках исследования модели формирования тонкоплёночных сорбентов на искривлённой поверхности доказано, что технология Ленгмюра, перенесенная с плоской поверхности на поверхность капли, позволяет формировать на твердой подложке мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев стеаратов металлов по механизму самопроизвольного перемещения монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести. Выявлено, что структуры на основе оксидов металлов и монослоев стеаратов металлов способны специфично связывать хлорсодержащие соединения, в том числе и аддукты глобина человека с хлорсодержащими ксенобиотиками.

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

Практическая значимость

Разработаны методики для использования нанодисперсных оксидов металлов, полученных золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, и монослоев стеаратов металлов в качестве высокоэффективных металл-аффинных сорбентов, позволяющих специфично экстрагировать органические и биоорганические соединения с функциональными группами, содержащими атомы неметаллов (O, Cl, N и пр.). Разработаны методы функционализации поверхности MALDI мишени, придающие ей свойства металл-аффинных сорбентов. Продемонстрировано, что покрытия на основе нанодисперсных оксидов металлов и монослоев стеаратов металлов сохраняют свойства металл-аффинных сорбентов в течение года. Разработан метод анализа фосфор- и хлорсодержащих аддуктов белков крови в формате «лаборатория на мишени», позволяющий значительно уменьшить количество анализируемого образца, повысить чувствительность и экспрессность анализа. Идентифицированные аддукты глобина человека с галогенсодержащими соединениями могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации. Разработана методика полуколичественного MALDI MS анализа свободных жирных кислот, отличающаяся простотой, воспроизводимостью, высокой чувствительностью и экспрессностью.

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Метод электрораспыления в нормальных условиях в бескапельном режиме с динамическим делением потока распыляемой жидкости позволяет функционализировать химически чистую поверхность MALDI мишени нанодисперсными оксидами металлов без предварительной и дополнительной подготовки поверхности.

2. Технология получения монослоев Ленгмюра, адаптированная к полусферической поверхности (капле), применима для функционализации поверхности MALDI мишени наноструктурами на основе стеаратов металлов без предварительной подготовки и последующей регенерации поверхности мишени.

3. Структуры на основе полученных золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, нанодисперсных оксидов металлов и монослои стеаратов металлов являются эффективными металл-аффинными сорбентами.

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

5. Сорбенты на основе нанодисперсных оксидов металлов и монослоев стеаратов металлов могут быть использованы для селективной экстракции ксенобиотиков и аддуктов белков крови с их остатками (или метаболитами) как в условиях пакетной хроматографии, так и в формате «лаборатория на мишени».

6. Методика, основанная на формировании регулярного монослоя монокарбоксилатов бария в формате «лаборатория на мишени», позволяет осуществлять профилирование свободных жирных кислот методом MALDI MS с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью. Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается корректностью методов, применяемых для решения поставленных задач; большим объемом экспериментальных данных, подтверждающих основные выводы и научные положения, полученных с применением современных инструментальных средств; использованием стандартных образцов известного состава для разработки как инструментальных решений, так и аналитических подходов; контролем условий экспериментов; воспроизводимостью результатов; сходимостью полученных результатов с известными экспериментальными данными, а также результатами практической апробации разработанных подходов и методик.

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

Апробация работы

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

Публикации

По результатам работы опубликованы 42 статьи (среди которых 18 статей в журналах, входящих в базы данных Web of Science или Scopus; и 24 в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций).

Структура и объём диссертации

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

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

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Источники мягкой ионизации

В течение последних 20 лет масс-спектрометрия (MS) зарекомендовала себя как основной метод анализа большеразмерных молекул и молекулярных комплексов, в частности полимеров и природных биомолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты [1-3]. Это стремительное развитие частично основано на способности двух различных методов мягкой ионизации, а именно электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении (ESI, «Электроспрей», Electrospray Ionization, ЭРИАД [4,5]) и лазерной десорбции/ионизации (LDI) [6], переносить молекулы образца в виде интактных ионов либо из раствора, либо из твердого субстрата в газовую фазу. Особенностью использования таких источников ионизации является возможность получения молекулярных ионов термолабильных нелетучих соединений [7], что стало необходимостью с развити-ем таких наук как биохимия, биомедицина, протеомика.

1.1.1 Электрораспыление при атмосферном давлении (ЭРИАД, ESI)

Метод электроспрей был разработан в ИАП АН СССР в восьмидесятые годы XX века Л.Н. Галль с сотрудниками [4]. Этот метод основан на распылении образца под действием электрического поля (Рисунок 1). Анализируемое вещество в жидкой фазе пропускается через металлический капилляр с приложенным к нему высоким напряжением (обычно, в диапазоне от 2,5 до 4 кВ) относительно сопла прибора. Как правило, в качестве растворителей применяют такие полярные и относительно летучие растворители, как воду, метанол или ацетонитрил. Под действием электрического поля положительно заряженные частицы раствора скапливаются на срезе капилляра, образуя конус. При достаточно сильном приложенном поле образуется струя из вершины конуса, которая далее разлетается на мелкие капли в направлении противоэлектрода. За время движения капель от капилляра к соплу растворитель испаряется. В определенный момент силы кулоновского отталкивания начинают превышать силы поверхностного натяжения – капля распадется на множество более мелких заряженных капель и процесс повторяется многократно [8]. В конечном итоге может образоваться единичный ион.



Рисунок 1 – Механизм ионообразования при электрораспылении [9]

С помощью ESI могут быть получены ионы глобулярных белков и пептидов в газовой фазе в нативной форме. Белки в нативной форме проявляются в спектре как компактные серии сигналов, которые соответствуют молекулам белка в различных зарядовых состояниях в результате присоединения различного числа протонов (в режиме регистрации положительных ионов). Было показано [10], что образование ионов макромолекул происходит по, так называемой, «модели заряженного остатка» (Charged Residue Model, CRM). Эта модель утверждает, что заряженные ионы происходят из очень маленьких капель, содержащих одну макромолекулу. При полном испарении капли ее заряды переносятся на макромолекулу. В случае если эта модель верна, можно ожидать, что в конечных малых каплях будет находиться более одной молекулы и в спектрах будут сигналы мультимерных агрегатов макромолекул, что и наблюдалось при использовании квадрупольного масс-спектрометра с широким массовым диапазоном. Также было определено эмпирическое соотношение Z_{cp}=aM^b между молекулярной массой (М) и средним зарядом (Z_{cp}) ионов дендримеров (а и b – константы, b=0,53) [11,12]. Дендримеры являются разветвленными алкил-аминовыми полимерами, которые имеют относительно жесткие структуры и близки по форме к сфере. Эти соединения могут служить модельными объектами при исследовании поведения глобулярных белков. В дальнейшем, на основании предположений модели CRM было выведено математическое выражение Z=0,078·M^{1/2}, практически совпадающее с полученным ранее эмпирически данными [13,14]. Модель CRM является инструментом предсказания зарядового состояния белков в газовой фазе. Получаемые теоретически данные коррелируют с экспериментальными результатами анализа большого числа белков, за исключением белков с высокой молекулярной массой, что может быть объяснено большими объемами конечных капель. В работе [15] была предложена модификация CRM, включающая модель «экстракции ионов» на ранних стадиях эволюции распыляемых капель. Такой вариант возможен в присутствии таких солевых примесей как ацетат аммония или триэтил ацетат в милимолярных концентрациях в распыляемых растворах. При этом наблюдаемые зарядовые состояния нативных белков оказываются ниже при использовании аммонийного или триэтиламмонийного буферов. Авторы предполагают, что на стадии «экстракции ионов», предшествующей CRM, поверхностно активные ионы легко экстрагируются из заряженных капель, при этом захватывая молекулы растворителя и, в итоге, уменьшая общий заряд конечной капли.

Процесс ионообразования полностью происходит при атмосферном давлении, а непосредственно сам масс-анализ необходимо проводить при высоком вакууме (10⁻⁷ – 10⁻⁹ торр, 10⁻⁵ – 10⁻⁷ Па), следовательно, требуется система, транспортирующая ионный пучок от источника в пространство масс-анализатора. Такая система получила название "Газодинамический интерфейс".

В работах Доула [16-18] использовалась газодинамическая система типа Кантровица-Грея [19] для отбора ионного пучка из области ионообразования и транспортировки его в анализатор. Схема установки приведена на Рисунке 2. Аэрозоль заряженных капель подвергался испарению в камере с атмосферным давлением. Продукты испарения электрогидродинамической струи отбирались в энергоанализатор.

При постоянной работе источника ионов «электроспрей» в режиме эмиссии положительно заряженных ионов заряженные капли растворителя постоянно переносят положительный заряд. Необходимость баланса зарядов в продолжительно работающей электроустановке в сочетании с тем фактом, что только электроны могут передвигаться в металлических проводниках, создавая электрический потенциал на электродах, приводит к выводу, что процесс электрораспыления должен включать в себя электрохимическую конверсию ионов в электроны. Другими словами, электрораспылительное устройство может быть представлено как особая электролитическая ячейка. Особенность ее заключается в отсутствии ионного транспорта через растворитель в противоположность обычному электролизу. Здесь ионный транспорт частично происходит через газовую фазу.



19

Рисунок 2 – Схема установки «Electrospray» для получения пучка макроионов. 1 – капилляр, 2 – сопло, 3 – скиммер, 4 – коллектор с задерживающей сеткой, 5 – откачка, Q – подача раствора, У – моноскоростной пучок макроионов, U₃ – задерживающий потенциал, I_к – ток коллектора

Таким образом, при работе электроспрея в режиме положительных ионов, когда переносчиками зарядов являются положительно заряженные ионы в газовой фазе, реакция электрохимического окисления должна проходить на положительном электроде, т.е. на границе раздела фаз жидкость/металл капилляра. Эта реакция поставляет положительные ионы, что предотвращает увеличение дисбаланса зарядов. Природа этих ионов зависит от экспериментальных условий. В случае металлического капилляра ионы металла могут переходить в растворитель, высвобождая электроны в металлическом электроде (1). Другим вариантом образования положительных ионов является окислительная реакция, происходящая в водных растворах (2).

$$M(пов.) \rightarrow M^{2+}(раств.) + 2e$$
 (на поверхности металла) (1)

4OH⁻ (водн.)
$$\rightarrow$$
 O₂(газ) + 2H₂O + 4e (на поверхности металла) (2)

Доминирующей будет реакция с наименьшим редокс потенциалом. Доказательство электрохимического окисления на металле капилляра представлено в работе [20].

Ван Беркель с коллегами в серии публикаций описали последствия электрохимических процессов в ESI MS. К примеру, они продемонстрировали, что ионы, получаемые в результате электролиза (например, протоны), оказывают существенное воздействие на получаемые масс-спектры pH-чувствительных соединений, таких как не денатурированные белки [21].

В 1986 году Смит вывел уравнение для приблизительной оценки потенциала V_{on}, необходимого для электрораспыления [22] (3), где θ – половинный угол конуса Тейлора, ε₀ – электрическая постоянная в вакууме, γ – поверхностное натяжение растворителя, r_c – радиус капилляра. d – расстояние от капилляра до подложки:

$$V_{on} \approx \left(\frac{\gamma_c \gamma \cos\theta}{2\varepsilon_0}\right)^{1/2} \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right).$$
(3)

Подставляя значения $\varepsilon_0 = 8,854*10^{-12} \text{ } \Phi/\text{m}^{-1}$, $\theta = 49,3^{\circ}$ [23], получаем:

$$V_{on} = 2 \times 10^5 (\gamma r_c)^{1/2} \ln \left(\frac{4d}{r_c}\right) , \qquad (4)$$

где у выражена в Н/м и r_c в метрах.

Растворители с большими значениями поверхностного натяжения имеют высокие значения потенциалов инициации распыления. Экспериментальная проверка выражения (3) была проведена различными исследователями [20,22,24]. Было определено, что для стабильного распыления необходим потенциал на несколько сотен вольт выше расчетного.

Использование очищенной воды в качестве растворителя может привести к электрическому разряду между распылительным капилляром и соплом масс-спектрометра, особенно данный эффект ярко выражен в режиме получения отрицательных ионов, что может быть связано с эмиссией электронов в «отрицательном» режиме [20]. Показано, что электрический разряд при распылении сильно снижает производительность установок ESI MS [20] и приводит к увеличению капиллярного тока (I). Токи свыше 10⁻⁶ A обычно свидетельствуют о наличии разряда. Более специфическим признаком электроразряда является появление протонированных кластеров растворителя, таких как H₃O⁺(H₂O)_n для воды или CH₃OH₂⁺(CH₃OH)_n для метанола [20]. Подобные кластерные ионы в отсутствие разряда образуются только в случае подкисления, когда H_3O^+ и $CH_3OH_2^+$ присутствуют в растворе.

Наиболее подходящим газовым окружением для ESI является воздух, т.к. молекулы кислорода обладают существенным сродством к электронам и легко захватывают свободные электроны. Это предотвращает ионизацию газовых молекул разогнанными в электрическом поле электронами, следовательно, и электрический разряд. Также, для подавления разряда могут использоваться небольшие примеси газов, имеющих еще большее сродство к электрону, нежели O₂, например, SF₆ [24]. Однако при этом в спектре появляются сигналы, связанные с ионами, продуцируемыми этими газами, а также аддуктами этих ионов и компонентов исследуемой пробы.

Разработка ионного источника ESI при повышенных потоках жидкости позволила надежно стыковать масс-спектрометры с жидкостными хроматографами, что в свою очередь вызвало каскад фармацевтических приложений. Разработка микроэмиттеров и наноэлектроспрея открыла возможность для чувствительного анализа. Высокая чувствительность способствовала широкому внедрению ESI MS в биотехнологии и, в частности, протеомике.

Метод наноспрей был разработан Вильмом и Манном в 1994 году [25,26]. Основной целью при разработке такого источника было достижение минимальных расходов образца. Подобный источник ионов важен для биохимических исследований, где объемы образцов чрезвычайно малы. В классическом источнике ионов электроспрей большая часть пробы не попадает в анализатор, так как при большом диаметре распылительного капилляра, капли имеют большой диаметр. Для ионизации образца, содержащегося в таких каплях, требуется большое расстояние между распылительным капилляром и входным отверстием анализатора. В варианте наноспрея, конец капилляра имеет намного меньший диаметр, что ведет к более эффективной ионизации. Также становится возможным близкое расположение распылительной иглы к входу в транспортирующую систему масс-спектрометра, что намного уменьшает площадь основания факела распыления и ионов, не захватываемых транспортной системой. В общем случае, при распылении невязких растворов давление не прикладывается, в отличие от ESI, где проба вводится с помощью шприцов. Весь распыляемый раствор в источнике наноспрей содержится в открытой игле, поток жидкости создается благодаря воздействию электрического поля на жидкость в распылительном капилляре. Скорость потока в такой системе ограничивается диаметром отверстия на конце капилляра. Технические нюансы работы с такими капиллярами (внутренний диаметр – несколько микрометров) осложняют количественную оценку распыленного материала. Скорости потоков составляют 10-100 нл/мин. Из-за малых вводимых объемов пробы в распылительный капилляр (0,5-10 мкл), соотношение поверхность/объем велико, что делает значительным влияние примесей, вымываемых с поверхности капилляра (например, Na⁺), и эффектов сорбирования компонентов образца на поверхности капилляра [27].

В источниках типа «наноспрей» возможно применение в качестве растворителя чистой воды без возникновения электрических разрядов, что труднодостижимо в ESI. Вода является предпочтительным растворителем при анализе белков и пептидов, так как не вызывает нарушений их структур высокого порядка (денатурации) [27-29].

1.1.2 Лазерная десорбция/ионизация (LDI)

Впервые LDI было использовано для переноса крупных молекул в газовую фазу в виде интактных ионов в 1980-х годах (Рисунок 3) [30]. Впоследствии подход быстро превратился в важный метод мягкой ионизации для масс-спектрометрического анализа полимеров и биомолекул, таких как белки, пептиды, олигонуклеотиды и олигосахариды [31]. В настоящее время наиболее широко используемым методом LDI является матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), при котором органическая матрица, способная поглощать лазерную энергию, применяется для содействия ионизации молекул образца.

Концепция MALDI была разработана между 1984 и 1986 годами Карасом с соавт. [6], которые опубликовали краткое изложение своей методики в 1987 году. Также были разработаны альтернативные безматричные методы для LDI. Например, в 1987 в работе [30] были проанализировны белки и полимеры с помощью лазерной ионизации, с использованием глицерина в качестве растворителя и тонкого металлического порошка в качестве поглотителя энергии лазера. Первую действительно безматричную LDI, представленную в 1999 году [32], осуществляли при размещении образца на полупроводниковой подложке из кремния. Этот метод теперь известен как десорбция/ионизация на пористом кремнии (DIOS) [33]. Механизмы для LDI до сих пор еще не полностью поняты. Во время этого наносекундного фотоэлектрохимического процесса лазерное излучение создает шлейф образца, матрицы, электронов и радикалов. В этом шлейфе проходят ион-ионные реакции и ион-молекулярные реакции, в свою очередь генерирующие конечные продукты для MS анализа [34]. При сочетании LDI с времяпролетным массанализатором (TOF) вскоре после лазерного импульса для извлечения ионов прикладывается напряжение, а мишень действует как электрод [35].

PROTEIN AND POLYMER ANALYSES OF m/z 100000 BY LASER IONIZATION TOF-MS



Рисунок 3 – Схема масс-спектрометра с LDI и времяпролетным масс-анализатором по данным работы [30]

В MALDI MS анализе анализируемый образец вместе с органической матрицей наносится на проводящую пластину. При лазерном облучении происходит фотохимический процесс, объединяющий фотоабляцию и фотоионизацию, и полученные ионы ускоряются до масс-анализатора посредством приложения электрического поля между пластиной и детектором. Механизмы реакции, которые происходят во время процесса MALDI, являются предметом постоянных дискуссий, но широко распространено мнение, что матрица играет важную роль как во время десорбции, так и при ионизации. Матрицы, используемые для MALDI, обычно представляют собой органические вещества, которые могут поглощать энергию лазера и передавать молекулам образца. Некоторые распространенные матрицы, такие как 2,5-дигидроксибензойная кислота (DHB),

α-циано-4-гидроксикоричная кислота (CHCA) и синапиновая кислота (SA), являются универсальнами для N₂ (337 нм) и Nd:YAG (355 нм) лазеров [31].

1.1.2.1 Матрицы для MALDI MS анализа

На протяжении многих лет были предприняты значительные усилия, чтобы определить роль матрицы MALDI и разработать наиболее подходящую матрицу для конкретной аналитической задачи. Поиск подходящей матрицы обычно является процессом «проб и ошибок». Хорошо известно, что зачастую образцы можно легко анализировать при наличии одной определенной матрицы, но анализ становится невозможен при использовании других веществ. Матрицу можно считать подходящей, если ее использование позволят получить в масс-спектре хорошее соотношение сигнал/шум (S/N) и высокое разрешение, отсутствие фрагментации аналита, а также макисимально умеренному фону матричных сигналов, чтобы свести к минимуму интерференцию между матрицей и аналитом. Последнее является особой проблемой при анализе низкомолекулярных веществ [36]. Кроме вышеперечисленного матрица должна обладать следующими свойствами:

1. Матрица должна обладать сильным поглощением на длине волны излучения лазера в UV-диапазоне при 337 или 355 нм. Поэтому часто используемые органические матрицы содержат ароматическую кольцевую систему с делокализованными электронами, так как эффективность ионизации (и, следовательно, выход ионов) возрастает с увеличением коэффициента поглощения матрицы. Это основная причина, по которой среди различных изомеров дигидроксибензойной кислоты только изомер 2,5-DHB представляет собой эффективную матрицу MALDI [37]. Хотя коэффициенты экстинкции часто определяют в растворе, нужно подчеркнуть, что поглощающие свойства матриц MALDI следует определять в твердом состоянии, поскольку только этот подход имитирует условия при MALDI MS анализе. Поскольку область UV-поглощения, как правило, довольно широкая, оптимизированные матрицы для лазеров с длиной волны 337 нм можно использовать и на длине волны 355 нм.

2. Эффективная матрица должна обеспечивать образование ионов аналита. Поскольку часто используемые соединения, содержащие систему ароматических колец, плохо растворимы в полярных системах растворителей, они также имеют в составе карбоксильную группу (обычно это производные бензойной кислоты или коричной кислоты). Карбоксильная группа является одновременно полярной и кислотной, она обеспечивает растворимость матрицы в полярных растворителях [38] и протонирование аналита соответственно.

3. Матрица должна оставаться стабильной в условиях высокого вакуума длительный промежуток времени. Хотя это кажется тривиальным, существует значительное число многообещающих матриц MALDI (например, 4-нитроанилин или 2,6дигидроксиацетофенон), которые не удовлетворяют этому условию. Поскольку процесс ионизации MALDI происходит в условиях высокого вакуума (обычно около $10^{-8} - 10^{-9}$ бар, $10^{-3} - 10^{-4}$ Па), многие соединения подвергаются процессу сублимации. Это приводит к постоянному изменению соотношения матрица/аналит, и является одной из причин, по которой MALDI масс-спектры показывают изменения, зависящие от времени хранения образца на мишени.

4. Эффективная матрица должна изолировать образующиеся ионы друг от друга и предотвращать образование кластеров аналита, например, димеров или тримеров. Кластерообразование значительно усложняет интерпретацию масс-спектров и снижает чувствительность анализа. Исключение кластеров является основной причиной, по которой следует использовать значительный избыток матрицы по отношению к аналиту.

5. Сокристаллизация матрицы и аналита должна быть как можно более гомогенна. Однородность кристаллов очень важна, так как это определяет воспроизводимость полученных MALDI масс-спектров [39,40].

В целом, чем проще метод пробоподготовки, тем ниже гомогенность смеси матрица/аналит. Наиболее часто используемый метод «сухой капли», то есть последовательное осаждение матрицы и анализируемого вещества, обычно не подходит для количественного анализа, поскольку приводит к неоднородной сокристаллизации матрицы и аналита, особенно при использовании различных растворителей с различной летучестью для матрицы и анализируемого вещества. На первой стадии более летучий растворитель испаряется, оставляя соединение, которое легче растворяется в этом растворителе. Второе соединение кристаллизуется только при испарении менее летучего растворителя, что приводит к неоднородности кристаллов [41].

Хотя в качестве потенциальных матриц MALDI рассматривалось множество различных соединений, обычно используются лишь некоторые из них [42], в основном органические вещества, представленные на Рисунке 4.



Рисунок 4 – Структуры наиболее часто используемых органических матриц

для MALDI [43]

1.1.2.2 Механизмы ионообразования MALDI

Аналиты обычно растворяют в смеси матрица-растворитель (соотношение матрица-аналит 100 к 1 или более) и осаждают на мишени для кристаллизации. Было сделано предположение, что ионы предварительно образуются в матричном кристалле и затем десорбируются в виде ионных пар матрицы [44] в газовую фазу под действием лазерного излучения [34,45,46]. При этом также генерируются активные частицы, такие как электроны и радикалы, следовательно, в шлейфе могут происходить вторичные реакции между аналитами, матрицами и активными веществами, что в конечном итоге приводит к образованию ионов.

Отношение ион-нейтраль (выход ионов [47], или степень ионизации [48]) определяется как количество десорбированных ионов, деленное на количество десорбированных нейтральных молекул в процессе MALDI [49]. Для типичных образцов при анализе методом MALDI MS, содержащих как матрицу (М), так и аналит (А), отношение ионов к нейтральным молекулам можно подразделить на три категории. К первой категории относится отношение ионов к нейтрали матрицы γ (М), которое определяется как число десорбированных ионов матрицы I (М), деленное на количество нейтральных десорбированных молекул матрицы N (M); то есть γ (M) = I (M) / N (M). Вторая категория – отношение ионов аналита к нейтральным молекулам аналита у (А), которое определяется как число десорбированных ионов I (А) аналита, деленное на количество десорбированных нейтральных частиц аналита N (A). Третья категория – это соотношение всех ионов и нейтралей у (Т), которое определяется как общее количество десорбированных ионов (включая и матрицу, и ионы аналита) I (Т), деленное на общее количество десорбированных нейтралей (включая нейтрали матрицы и аналитов) N (T). Для образцов, содержащих только молекулы матрицы (т.е. без молекул аналита), которые часто используются в теоретических моделях и экспериментальных исследованиях механизма MALDI, отношение ион-нейтраль принимают как отношение ион-нейтраль для матрицы.

Типичные молярные отношения матрица-аналит в твердых образцах находятся в диапазоне от 100:1 для небольших молекул аналита и до 10000:1 для высокомолекулярных белков [49]. Когда молярное отношение аналита к матрице в твердом образце высокое, сигналы ионов матрицы в масс-спектре могут быть полностью подавлены, но чаще всего эффект подавления не наблюдается [50]. В MALDI масс-спектрах большинства биологических аналитов (A), таких как пептиды и белки, протонированные молекулы, то есть $[A+H]^+$, являются основными наблюдаемыми формами молекулярных ионов. Ожидается, что давление в шлейфе, создаваемом лазерной абляцией, изначально будет очень высоким, 1 атм или выше, даже через 10 нс после абляции [51]. Поэтому, в дополнение к первичному процессу образования ионов, могут также происходить вторичные процессы [52,53]. В зависимости от модели, $[A+H]^+$ может формироваться либо в первичном процессе, либо во вторичном, либо в обоих. Существует двухступенчатая модель, в которой $[A+H]^+$ создается путем переноса протона из $[M+H]^+$, где M обозначает матрицу, которая дает первичный ион:

$$[M+H]^{+} + A \rightarrow M + [A+H]^{+}.$$
 (5)

1.1.2.3 Модели ионообразования

В зависимости от электронного состояния М, участвующего в образовании [M+H]⁺, модели можно разделить на две группы: модели возбужденного и основного электронного состояния. Многофотонная ионизация (MPI), объединение экситонов и перенос протонов в возбужденном состоянии (ESPT) относятся к первой группе, тогда как перенос протонов в основном состоянии (автопротолиз), эмиссия предварительно сформированных ионов и кластерная модель относятся ко второй [34,52,53].

<u>Многофотонная ионизация (MPI).</u> Переход молекулы в высоковозбужденное электронное состояние путем многофотонного поглощения может привести к ее ионизации [54]. Эффективность этого процесса становится особенно высокой, когда каждый шаг фотовозбуждения усиливается резонансом. Поскольку энергия фотона на широко используемой длине волны лазера 337 нм составляет 3,68 эВ, а энергии ионизации молекул матрицы составляют ~ 8 эВ или выше [53], для ионизации матрица должна поглотить три фотона. Это затруднительно, потому что энергия лазерного импульса, используемая в MALDI, обычно очень мала (1 мкДж на импульс). Хотя некоторые авторы предполагали двухфотонную ионизацию матричных кластеров [55,56], никаких конкретных доказательств ее возникновения представлено не было.

<u>Экситон пул</u>. Эта модель была разработана для преодоления проблем модели MPI. В ней предполагается, что энергия фотона, передаваемая твердому образцу, остается квантом энергии возбужденного состояния или экситоном [57]. Когда три или более экситона локализованы в конкретной молекуле в твердом образце и объединены для перехода в электронное состояние выше предела ионизации, матрица может стать иони-

зированной [47]. Учитывая, что вероятность перехода из основного состояния в возбужденное при 337 нм очень высока для молекул, используемых в качестве матрицы, модель может объяснить генерацию значительного числа ионов матрицы при слабом флюенсе лазера. Посредством моделирования молекулярной динамики на основе этой модели в работах [58,59] было продемонстрировано, что можно воспроизвести различные экспериментальные особенности MALDI с использованием DHB в качестве матрицы. Характерной особенностью модели пула экситонов, которая является общей для моделей фотоионизации, является то, что процесс генерирует М⁺, а не [M+H]⁺ [58]:

$$\mathbf{M} \to \mathbf{M}^{\bullet} \to \mathbf{M}^{+\bullet} + \mathbf{e}^{-}.$$
 (6)

Затем в результате захвата атомарного водорода из M^{+} генерируется $[M+H]^+$ [60]. Однако модели фотоионизации не объясняют формирование $[M-H]^-$, который рассматривается как первичный ион в образовании отрицательных ионов в MALDI. Основное предположение состоит в том, что при захвате электронов образуется M^- [61,62], который превращается в $[M-H]^-$ в результате потери атома водорода [60].

<u>Перенос протонов в возбужденном состоянии</u>. В этом механизме ионизации основной является молекула матрицы в возбужденном электронном состоянии М[•]. Перенос протона из М[•] в А, а затем в М дает АН⁺ и МН⁺ соответственно [63]. Однако молекулы, демонстрирующие эффективный перенос протонов в возбужденном состоянии, не являются эффективными матрицами для MALDI [11].

<u>Автопротолиз.</u> Простейшая модель для генерации первичных ионов - это термический автопротолиз [52]:

$$M + M \rightarrow [M+H]^+ + [M-H]^-.$$
 (7)

Одновременное получение [M+H]⁺ и [M-H]⁻ путем автопротолиза является особенно интересным. Энтальпия этой реакции очень велика (~ 5 эВ для исследованных случаев [64]), что дает очень малую константу равновесия. Модель полярной жидкости, предложенную в работах [65,66], можно рассматривать как уточненную версию модели автопротолиза, где предполагается, что катионы и анионы диэлектрически стабилизированы матрицей.

<u>Предварительно сформированная ионная эмиссия</u>. Поскольку некоторые молекулы матрицы и аналита присутствуют в виде заряженных частиц в растворе, нельзя исключать возможность того, что некоторые из них остаются ионными веществами и в твердых образцах, после испарения растворителя [67,68]. Модель предварительно сфор-

мированной эмиссии ионов [69] предполагает, что при лазерном импульсе сублимируют уже [M+H]⁺ и [A+H]⁺ ионы. Поскольку образование [M+H]⁺ в растворе может сопровождаться образованием [M-H]⁻, эту модель можно рассматривать как частный случай автопротолиза.

<u>Кластерная модель</u>. Карас и его коллеги [34,35] первоначально предложили эту модель под названием «модель счастливого выжившего». В этой модели предполагается, что различные ионные и нейтральные кластеры, состоящие из молекул матрицы и аналита, присутствуют в образце и диссоциируют при лазерной абляции. Ионы, полученные из матрицы и аналита, образуются в результате газофазных реакций с участием этих частиц. Позднее был предложен более сложный механизм, в котором объединяется кластерная модель с моделью переносом протона в газовой фазе [70]. Одна из проблем, исследования кластерной модели, заключается в том, что нейтральные кластеры сложно обнаружить, и содержание сигналов кластерных ионов в MALDI масс-спектрах очень низкое по сравнению с сигналами ионов, полученных из аналита и матрицы [71].

На основании схожести масс-спектров, полученных при UV-MALDI и IR-MALDI, было сделано предположение, что электронное возбужденное состояние не играет основной роли в процессе ионизации UV-MALDI, так как при изменении длины волны UV-излучения масс-спектр остается в основном неизменным. Как было упомянуто выше, энергия двухфотонного поглощения на большой длине волны значительно ниже энергии ионизации матрицы в конденсированной фазе, что указывает на то, что двухфотонная ионизация, скорее всего, не является основным механизмом ионизации [65,66]. Было сделано предположение, что ионизация аналита должна быть вызвана термическим воздействием, и что полярная жидкость (расплав, образующийся при лазерном импульсе) снижает энергию ионизации матрицы и генерирует свободные протоны. В работе [72] отметили, что общее количество ионов не зависит от природы аналита, концентрации аналита и флюенса лазера, и масс-спектры имеют корреляцию с температурой в раннем шлейфе. Было сделано предположение, что [М+Н]⁺ является первичным ионом, а [А+Н]⁺ образуется в результате реакций теплового переноса протона от матрицы к аналиту. Также была разработана модель термического переноса протона, которая количественно описывает ионы, генерируемые при MALDI. После оценки спектров, полученных при контроле температуры, в работе [73] пришли к следующему простому термическому объяснению формирования спектра при MALDI:

1. [M+H]⁺ и [M-H]⁻ – это первичные ионы при MALDI большинства биологических молекул. Хотя различные термические процессы могут вносить вклад в первоначальное образование этих ионов, их конечные содержания определяются путем реакциии автопротолиза-рекомбинации, происходящей при очень высоких температурах.

2. Ионы аналита [A+H]⁺ и [A-H]⁻ получают реакциями переноса протона между первичными ионами и аналитом, которые находятся в квазиравновесном состоянии.

3. Деструкция комплексов матрицы и ионов аналита в источнике представляют собой тепловые реакции, происходящие быстро в раннем факеле.

4. Ионы в шлейфе остывают и выходят из источника. Деструкция комплексов матрицы и ионов аналита после источника обусловлена тепловыми реакциями, протекающими медленно при температуре позднего шлейфа.

1.1.2.4 Электрохимические аспекты механизма ионообразования MALDI

Большинство матриц имеют большую область UV-поглощения и низкие квантовые выходы излучения фотонов на длинах волн десорбционного лазера. Следовательно, большая часть энергии фотонов, поглощаемых молекулами матрицы, становится тепловой энергией, и температура в облучаемом лазером объеме быстро повышается. Повышение температуры приводит к тому, что образец плавится в коротком интервале времени между облучением каждого лазерного импульса и десорбцией (менее микросекунды). Это сопровождается термически индуцированными химическими реакциями в жидкости перед десорбцией. Фазовое равновесие во время процесса десорбции MALDI не существует. Так называемая жидкость не является жидкой фазой и представляет собой структуру материала матрицы, которая существует только в интервале между лазерным импульсом и десорбцией. В течение этого интервала молекулы имеют достаточно высокую энергию при вращательных и колебательных степенях свободы. Они многократно сталкиваются с другими молекулами и частично могут вращаться и вибрировать. Эти свойства аналогичны свойствам молекул в жидкой фазе [74].

Перенос протонов относится к реакциям с небольшим выделением теплоты. Эти реакции легко достигают теплового равновесия в жидкой фазе из-за высокой частоты столкновений и низких реакционных барьеров. После десорбции с поверхности молекулы генерируют плотный газовый шлейф, который впоследствии быстро расширяется в вакууме. Столкновения в шлейфе могут привести к реакциям и изменению отношения ионов к нейтралям. Однако частота столкновений быстро снижается по мере расшире-

31

ния шлейфа в вакууме, и реакции прекращаются. Из чего был сделан вывод, что в процессе MALDI десорбция, проходящая только при высокой температуре, необходима независимо от того, как генерируются первичные ионы [75-77], и термически индуцированный перенос протона должен играть решающую роль в процессе ионизации MALDI. Хотя другие механизмы ионизации не полностью исключены, их вклады могут быть незначительными или вообще отсутствовать. Например, в модели кластерной ионизации [34,35] описана генерация сольватированных противоионов в твердом состоянии (предварительно сформированные ионы) в процессе пробоподготовки. Лазерные импульсы побуждают ионы десорбироваться с твердой поверхности. Однако модель термического переноса протонов предполагает, что количество ионов, генерируемых при комнатной температуре, на несколько порядков меньше, чем при высокой температуре [74].

Хотя большое внимание было уделено реакциям переноса заряда в шлейфе, очень мало исследований посвящено изучению электродных реакций, происходящих на пластине-мишени, например, того факта, что матрицу можно рассматривать как протонный проводник [78]. Поскольку ионный ток возникает при приложении напряжения, на границе раздела металлической пластины и матрицы должна происходить электрохимическая реакция, чтобы обеспечить непрерывность тока (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Схематическое представление процесса MALDI, включающего восстановление в шлейфе и реакцию на пластинчатом электроде,

в режиме положительной ионизации [78]

Во время MALDI зачастую наблюдаются окислительно-восстановительные реакции аналитов. Сообщалось, что при ионизации нитротирозина часть групп NO₂ в источнике могут превращаться в NH₂ [79,80], и что остаток S-нитрозилированного цистеина может переходить в цистеин [66,81]. В подтверждение теории двухфотонной ионизации предполагается, что эти процессы восстановления инициируются фотоэлектронами, генерируемыми лазерным излучением при выходе из подложки, покрытой матрицей. Действительно, из-за присутствия фотоэлектронов в источнике ионов MALDI реакции восстановления часто происходят в шлейфе. В соответствии с их зарядом, часть продуктов восстановления извлекаются в направлении детектора, тогда как молекуды с противоположным зарядом отводятся обратно к мишени (Рисунок 5). Фотоэлектроны, генерируемые во время MALDI, могут возникать либо в результате фотоионизации самой матрицы, либо в результате фотоэжекции из металлической подложки, особенно в режиме отрицательной ионизации. В 2002 и 2003 годах был [82-84] разработан метод обнаружения электронов, генерируемых во время MALDI. Чтобы оценить количество электронов, авторы добавили в вакуумную камеру в качестве поглотителя электронов SF₆, который имеет большое (10⁻¹⁵ см²) поперечное сечение для захвата электронов низкой энергии. При сравнении четырех пластин с различными поверхностями (оголенная металлическая поверхность, металлическая поверхность, покрытая тонким или толстым слоем матрицы, и неметаллическая поверхность), было обнаружено, что металлические поверхности, покрытые тонким слоем матрицы, генерируют больше электронов, чем другие виды рассмотренных мишеней. Соответственно, был сделан вывод, что электроны образуются в основном на границе раздела металл-матрица в результате фотоэлектрохимического процесса [83]. Поскольку работа выхода электронов из металлов (для нержавеющей стали E = 4,2–4,7 эВ) больше энергии фотонов E = 3,68 эВ (при λ = 337 нм) или E = 3,49 эВ (при $\lambda = 355$ нм), было высказано предположение, что наличие тонкого слоя органического материала сдвигает уровень Ферми металла и снижает работу выхода электронов [82,85]. Дальнейшее доказательство этой гипотезы было получено путем сравнения энергии фотоэлектронов, испускаемых из золота (E = 5, 1 эB) и из нержавеющей стали: была получена разница кинетической энергии ~ 0,4 эВ, которая хорошо согласуется с разницей работы выхода электронов для этих металлов [82]. С точки зрения электрохимии, пластина-мишень действует в качестве анода в режиме положительной ионизации и в качестве катода в режиме отрицательной ионизации. Это означает, что в первом случае уровень Ферми снижается по мере того, как поверхность раздела металлматрица становится поляризованной (металл положительно заряжен по сравнению с матрицей [86]), и, следовательно, фотоэмиссия становится более энергозатратной. И, наоборот, в режиме отрицательной ионизации уровень Ферми возрастает, когда на поверхности металла имеются избыточные электроны, и фотоэмиссия облегчается. При этом интерфейс металл-матрица должен оставаться поляризованным после приложения импульса, а сдвиг уровня Ферми должен сохраняться до следующего лазерного импульса. Несмотря на то, что два импульса (лазера и электрического поля) не совпадают, процесс MALDI можно рассматривать как фотоэлектрохимический процесс.

Фотоэлектроны в ионизационном шлейфе могут быть захвачены электронноакцепторными элементами, вызывая восстановительные реакции в источнике. Поскольку молекулы нейтрального матрикса являются наиболее рапространенными в шлейфе, ожидается, что электроны будут реагировать в основном с матрицей, образуя тем самым анионы матрицы и протоны, которые могут вступать в реакцию с ионами образца. В результате переноса заряда при MALDI наблюдали множество реакций, например, нейтрализацию многозарядных ионов [87], восстановление Cu (II) и красителей [88,89] и распад пептида в источнике (ISD) [90].

Важной характеристикой MALDI является то, что в результате этого процесса генерируются в основном однозарядные ионы, особенно для образцов с низкой или средней молекулярной массой (<5000 Да). Как было показано выше, в 2000 году группа Караса [45] утверждала, что однозарядные молекулярные ионы – «счастливчики», выживпие после нейтрализации в струе электронами. Авторы предположили, что зарядовое состояние аналитов в матричных кристаллах примерно сохраняется и приобретается в растворе в зависимости от pH. Таким образом, ионы образцов, включая как однозарядные ионы, так и многие многозарядные ионы, в значительной степени предварительно формируются в твердой матрице на целевой пластине. Благодаря лазерному облучению кластеры молекул матрицы и образца вместе с зарядами генерируются и расширяются в шлейф. Из-за сильного электрического сродства считается, что многозарядные кластеры не могут существовать и претерпевают редукцию заряда до состояний один и ноль путем нейтрализации электронами или матричными анионами в положительном режиме и протонированными ионами матрицы в отрицательном режиме. Эта гипотеза была частично подтверждена Зеноби и коллегами [87], которые контролировали генерацию электронов во время процесса MALDI. Используя неметаллическую пластину для подавления образования фотоэлектронов, авторы обнаружили усиленные сигналы положительных ионов и более высокую интенсивность распределения многозарядных ионов.

Структурный анализ синтетических полимеров с помощью MALDI MS часто требует введения ионов металлов, таких как Cu (II), для улучшения ионизации [91]. Однако молекулы, катионизированные медью, всегда содержат значительное количество Cu (I), хотя к образцу добавляются только соли Cu (II). Также аддукты ионов многовалентных металлов обнаруживются как однозарядные ионы, образующиеся в результате депротонирования [92-95]. Восстановление Cu (II) в источнике наблюдалось много раз и подробно обсуждалось в работе [88]. Авторы этой статьи исследовали ионизационные свойства CuCl₂ и сравнили результаты при трех различных условиях: (а) нет матрицы и нет свободных электронов, (б) нет матрицы, но много свободных электронов, и (в) присутствует матрица, но нет свободных электронов. Результаты показали, что захват свободных электронов является доминирующим механизмом восстановления Cu (II), и что количество Cu (II) также снижается при отсутствии свободных электронов путем перезарядки в газовой фазе с помощью молекул матрицы.

Восстановление в источнике также наблюдалось для органических красителей [96]. С использованием MALDI [88] был проанализирован ряд красителей и было обнаружено, что изотопные пики для [M + 1] и [M + 2] относительно пика [M] были значительно увеличены в сравнении с теоретическим изотопным распределением. Этот восстановительный эффект коррелировал с восстановительными потенциалами аналитов. После добавления Cu (II) в образец, содержащий красители, скорость восстановления красителей была значительно замедлена, в то время как генерация Cu (I) ускорилась, в соответствии с относительно более низким потенциалом восстановления Cu (I). Однако был сделан вывод, что это происходило в результате переноса заряда между аналитом и матрицей, поскольку эффективность реакции повышалась при большем соотношении матрица/краситель, что, по-видимому, противоречит предыдущему объяснению.

Важным и аналитически полезным типом реакции при анализе пептидов является их распад (деструкция, фрагментация) в источнике (ISD). Хотя MALDI рассматривается как мягкой метод ионизации, при котором обычно образуются неповрежденные, однозарядные молекулярные ионы, может наблюдаться фрагментация белковых соединений как после источника (PSD), так и в нем (ISD). ISD впервые был применен для структурного анализа пептидов и белков в 1995 году [90]. Распад происходит менее чем через 100 нс после стадии десорбции/ионизации в источнике [97,98] и приводит к разрыву N-Сα-связи с образованием с- и z-фрагментов (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Схема образования различных серий ионов при фрагментации пептидов

[78]

Используемая матрица является ключевым фактором, влияющим на эффективность фрагментации. DHB обычно является подходящей матрицей для ISD, тогда как CHCA неэффективна. Кроме того, для этих целей рекомендуется проводить анализ в присутствии 1,5-диаминонафталина – матрицы, которая известна своей способностью продуцировать водородные радикалы [99].

По сравнению с PSD и другими методами фрагментации, такими как диссоциация, активируемая соударениями (CID), диссоциация с переносом электрона (ETD) и диссоциация с захватом электрона (ECD), преимущество ISD заключается в том, что оно теоретически не ограничено массой анализируемого образца. Таким образом, этот метод считали перспективным для секвенирования белков. Кроме того, лабильные посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование, могут быть сохранены во время процесса ISD [100,101]. Однако низкая эффективность распада при ISD существенно ограничивает его применение. Обычно считается, что фрагментация инициируется восстановлением карбонильной группы пептидной связи, однако остается неясным, происходит ли это из-за реакции переноса электрона или реакции переноса радикала водорода [102,103]. Учитывая, что водородный радикал является продуктом реакции между свободным электроном и молекулой нейтральной матрицы, в шлейфе могут наблюдаться электронно-индуцированные реакции.
Также для генерации ионов могут быть использованы полупроводниковые подложки, такие как кремний и TiO₂. В этом случае фотоэлектрохимические принципы более понятны, чем в системе, содержащей матрицу. Кроме того, безматричные методы LDI также полезны для анализа небольших молекул, которые не могут наблюдаться в присутствии матрицы. Подход DIOS является одним из наиболее развитых [104], но также были успешно использованы полупроводники, такие как TiO₂ [105,106], различные золь-гели [107], полимеры на основе углерода [108], и наноструктуры [109]. Так, например, при использовании TiO2-модифицированных мишений энергия лазера поглощается полупроводниковой структурой, и электроны могут переходить из валентной зоны в зону проводимости. То есть образуются окислительные дыры и восстановительные электроны [110,111]. Некоторые из этих дырок и электронов рекомбинируют либо в наноструктуре, либо на ее поверхности, тем самым высвобождая тепловую энергию для аналитов. Альтернативно, эти электроны и дырки могут реагировать с частицами вблизи подложки и вызывать окислительно-восстановительные реакции на мишени. В присутствии электронодонорных молекул может происходить окисление, и электроны могут мигрировать через слой мезопористого полупроводника в металлическую подложку. В присутствии электроноакцепторных молекул может происходить восстановление, и электроны могут переноситься с металлической подложки через пористый полупроводник. В обоих случаях подложку, модифицированную TiO₂, можно рассматривать как фотоэлектрод. Продукты таких реакций, затем, могут реагировать в источнике с аналитами с образованием различных ионов, либо непосредственно на поверхности мишени, либо в шлейфе, что может быть зафиксировано при MS анализе.

В отличие от MALDI, в LDI на основе полупроводников в шлейфе генерируется очень мало свободных электронов. Кроме того, большая часть энергии фотонов генерирует экситоны, образованные из окислительных дырок в валентной зоне и восстановительных электронов в зоне проводимости, которые, в свою очередь, могут реагировать с образцами, нанесенными на подложку. Возможность проведения окислительновосстановительной реакции в LDI источнике была продемонстирирована на примере онлайн-мечения цистеинсодержащих пептидов [110]. В этом исследовании гидрохинон осаждали вместе с пептидами на подложке, модифицированной нано-TiO₂. При лазерном импульсе генерировались дырки в валентной зоне, благодаря которым гидрохинон преобразовывался в бензохинон. Реактив Михаэля обеспечивал образование комплекса с

с меркаптогруппой на остатках цистеина, что приводило к селективному мечению пептида одновременно с ионизацией образца. Окисление гидрохинона происходит непосредственно на поверхности TiO₂ вследствие лазерного облучения, тогда как последующее образование аддукта происходит либо на поверхности мишени, либо как вторичная реакция в шлейфе. Другим применением восстановительных реакций в источнике на основе полупроводников является расщепление дисульфидной связи (типичный процесс восстановления, используемый в протеомике) [112]. Действительно, дисульфидный мост представляет собой посттрансляционную модификацию, которая стабилизирует трехмерную структуру белков, и его расщепление необходимо для установления аминокислотной последовательности белковых соединений. Традиционные подходы к пробоподнотовке белков, содержащих дисульфидные связи, предполагают предварительное восстановление –S-S- связи с последующим алкилированием. Однако, в присутствии матрицы 1,5-диаминонафталин [113] восстановление дисульфидной связи происходит в шлейфе.

Таким образом, MALDI мишени можно рассматривать как фотоэлектроды. В случае мезопористых пластин с полупроводниковым покрытием было показано, что фотоэлектрохимические реакции легче контролировать, чем во время типичного процесса MALDI, и что можно проводить реакции окисления и восстановления в фотоанодическом и фотокатодном процессах, соответственно [78].

1.2 Основные области применения MALDI MS анализа

В настоящее время MALDI стала универсальным и важным методом мягкой ионизации в масс-спектрометрии для определения молекулярных масс различных нелетучих термолабильных веществ, включая биополимеры [114], такие как белки [115], пептиды [116] и углеводы [117], и высокомолекулярные соединения, такие как полимеры [118], дендримеры [119], и другие макромолекулы [120]. Возможность быстрого получения точной информации о массе с высоким разрешением при относительной простоте пробоподготовки позволяет заключить, что MALDI MS является мощным инструментом для анализа почти всех типов органических молекул [49]. MALDI имеет некоторые сходные характеристики с ESI [121] как по относительной мягкости ионизации, так и по продуцируемым ионам. Однако при анализе ESI MS всегда регистрируются многозарядные ионы, в то время как MALDI MS чаще всего лишен этого недостатка. MALDI масс-спектр может быть получен, как с помощью отдельного лазерного импульса, так и при накоплении данных от нескольких лазерных импульсов [122]. Кроме TOF массанализаторов MALDI также сочетается с TOF/TOF MS (масс-спектрометр тандемного типа TOF/TOF) [123], Q-TOF MS (квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр) [124] или QIT-TOF MS (времяпролетный масс-спектрометр с квадрупольной ионной ловушкой) [125]. Использование PSD и CID для ионов, генерируемых источником ионов MALDI, помогает определить структуру ионов и расширяет аналитические возможности метода MALDI [126]. Сочетание источника MALDI с приборами TOF-MS позволяет контролировать «практически неограниченный» диапазон масс; поэтому приложения MALDI-TOF MS ранее были сконцентрированы на анализе больших биомолекул. Однако в последние десятилетия появились работы, посвященные анализу и низкомолекулярных соединений (LMWC) методом MALDI MS [127].

1.2.1 MALDI MS при решении задач протеомики

Протеомика – область науки, посвященная исследованиям белкового состава всего организма как единого целого. В протеомных исследованиях существует множество направлений, к которым относятся: субклеточная протеомика (определение местонахождения белков в клетке) [128], функциональная протеомика (установление функций белков [129] и межбелковых взаимодействий [130]), дифференциация белков (оценка экспрессии белков) [131], определение белков-мишеней (выявление белков, к которым способен присоединяться ксенобиотик) [132]. Все эти направления чрезвычайно важны как для получения фундаментальных знаний, так и для практического применения в медицине, экологии, фармакологии и пр. Еще десятилетие назад MALDI MS была одним из основных используемых методов при протеомных исследованиях для решения таких задач, как: идентификация белков [133], восстановление первичной аминокислотной последовательности белка [134], идентификация посттрансляционных модификаций [135]. Однако, при появлении высокоточных и высокоразрешающих систем на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (HPLC-ESI MS) в области протеомики MALDI MS стал применяться все реже и реже. В первую очередь это связано с тем, что в связи с ограничениями метода для идентификации белка требуется очень трудозатратная пробоподготовка. Для успешного решения задач протеомики с использованием MALDI MS необходимо максимально разделить белковые компоненты образца с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях, двумерного (2D) гель-электрофореза, жидкостной хроматографии, или других методов [136].

Одним из первых способов идентификации белка по данным масс-спектров стал метод «отпечатков пептидных масс» (peptide mass fingerprinting, PMF) [137]. PMF основан на сравнении состава продуктов ферментативного гидролиза белка с расчетными (набор пептидов, полученных в результате ферментативного гидролиза уникален для каждого белка, а в связи со специфичностью ферментативного гидролиза и воспроизводим). Соответственно, для каждого белка с известной аминокислотной последовательностью рассчитывают m/z пептидов – продуктов теоретического ферментативного гидролиза, с которыми, затем, сравнивают экспериментальный масс-спектр гидролизата определяемого белка. Идентификация проводится по максимальному соответствию экспериментального и расчетного масс-спектров. Для решения таких задач было разработано множество программных продуктов, таких как Mascot [138], Sequest [139], X!Tandem [140] и многие другие. Задача поисковых систем только соотнести полученные масс-спектры с аминокислотными последовательностями по соответствующему алгоритму и оценить степень соответствия экспериментальных и теоретических спектров. Оценка носит вероятностный характер и никогда не достигает 100%. Главный недостаток метода PMF – крайняя затрудненность или невозможность идентификации белка в составе смеси [141,142]. В случае невозможности разделить компоненты образца, белки идентифицируют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). Сначала происходит получение первичного масс-спектра и определяются ионы-предшественники, затем проводится фрагментация ионов-предшественников с образованием структурно значимых ионных фрагментов (ионов-продуктов). Для идентификации полученные масс-спектры также сравниваются с расчетными [143]. Следует отметить, что идентификация белков по результатам MS/MS анализа более достоверна, чем при PMF.

Среди множества методов предварительного разделения белковых компонентов особое место занимает 2D гель-электрофорез. Этот метод решает задачу не только разделения, но и визуализации, а также может быть использован для оценки количества определенных белков [144]. Метод основывается на последовательном использовании двух свойств белков: заряда и массы [145]. Первое направление (изоэлектрофокусирование) позволяет разделить белки по их заряду, при этом определяется изоэлектрическая точка белка (pI), значение которой зависит от аминокислотной последовательности и посттрансляционных модификаций. При втором направлении белки делятся по молекулярной массе. После окрашивания геля визуально наблюдается картина распределения белков в виде пятен. Далее каждое пятно иссекается из геля, проводится ферментативный гидролиз белков и извлечение пептидов. Как упоминалось ранее, метод MALDI MS обладает уникальной чувствительностью по отношению к количеству вещества, требуемого для анализа. Соответственно, при успешной пробоподготовке каждое пятно в геле может быть соотнесено с белком.

Как пример использования данного метода можно привести работу по исследованию венома детенышей, молодых и взрослых особей змеи *Bothrops atrox* [146]. На Рисунке 7 очень хорошо показано, как меняется состав венома в зависимости от возраста особи. Например, если обратить внимание на группу белковых пятен D, становится заметно, что белки практически отсутствующие у детенышей, у взрослых особей становятся мажорными компонентами венома и несут посттрансляционные модификации. Интенсивность окрашивания белковых пятен в геле может дать представление об относительном содержании белка в пробе.



Рисунок 7 – Двумерные электрофореграммы венома детенышей молодых особей и взрослых особей змеи *Bothrops atrox* и краткая таблица классов идентифицированных белков [146]

Таким образом, несмотря на уникальные возможности MALDI MS в протеомном анализе, из-за ограничений метода и крайне трудоемкой пробоподготовки в последние годы исследователи отдают предпочтение другим методам анализа. Тем не менее, MALDI MS остается очень востребованным методом в областях, представленных в следующих разделах.

1.2.2 MALDI MS для решения задач аддуктомики

Электрофильные токсиканты уже давно считаются причиной онкологических и многих хронических заболеваний. Реакционная способность этих соединений позволяет обнаруживать их по аддуктам, которые образуются при их ковалентном взаимодействии с белками или ДНК [147].

При исследовании белковых аддуктов чаще всего рассматривают взаимодействие нуклеофильных аминокислотных остатков в составе белка и электрофильных токсикантов. В качестве модельных белков наибольший интерес представляют глобин (HHb) и сывороточный альбумин человека (HSA). Основной толчок к развитию такой подход к исследованию воздействия токсичных веществ на организм человека, названный «аддуктомика», получил в 2012 [148] и с тех пор быстро прогрессирует [149].

ННЬ находится в эритроцитах, где выполняет функцию переносчика кислорода. Высокий уровень содержания в крови и реакционная способность делают его вероятной мишенью для присоединения электрофильных агентов, а его длительное время жизни in vivo (126 дней, время жизни эритроцита [150]) предположительно дает возможность накапливаться образующимся аддуктам. Основная форма HHb у взрослых, представляет собой тетрамер, состоящий из двух альфа-субъединиц и двух бета-субъединиц. Альфа- и бета-субъединицы имеют несколько общих аминокислотных остатков, в том числе Nконцевые остатки валина [151]. Альфа-аминогруппы этих концевых остатков являются нуклеофильными, и было обнаружено, что они реагируют с токсикологически значимыми ксенобиотиками [152]. Бета-субъединица ННb содержит остаток цистеина (С-93), для которого нет эквивалента в альфа-субъединице. Аддукты ННb по C-93 являются предметом как целенаправленного, так и, в меньшей степени, нецелевого поиска аддуктов. Например, целевой метод (то есть метод, включающий одновременный мониторинг нескольких известных/гипотетических аддуктов) был использован для идентификации аддуктов HHb с метаболитами 15 различных ароматических аминов в крови курильщиков табака [153,154].

HSA является основным белком плазмы крови человека. Его время жизни in vivo (около 60 суток), хотя и короче, чем у HHb, но достаточно велико для накопления аддуктов. In vivo HSA связывает жирные кислоты, улавливает ионы металлов и оказывает влияние на онкотическое давление [155]. При этом HSA широко используется для биологического мониторинга токсикантов [156]. НЅА содержит ряд нуклеофильных участков, включая остатки гистидина, лизина и один свободный остаток цистеина (С-34). Примечательно, что остатки гистидина в HSA, как и в HHb, являются мишенями для эпоксидных соединений [157,158]. Остатки лизина в сывороточных альбуминах являются известными мишенями для диальдегида афлатоксина В1 [159,160]. С-34 является единственным сайтом в HSA, для которого были разработаны методы нецелевой аддуктомики. Учитывая, что реагирующая частица представляет собой анион тиолата, а не собственно тиоловую группу [161], образованию аддукта должны способствовать щелочные условия и/или основные группы в локальном белковом окружении. В трехмерной структуре HSA, по данным рентгеноструктурного анализа, боковая цепь, содержащая С-34, частично экранирована [162]. На этом основании был сделан вывод, что может существовать ограничение на размер молекулы ксенобиотика, которые способны взаимодействовать с С-34. Однако было также признано, что динамичность третичной структуры HSA позволяет снижать экранирование при депротонировании тиоловой группы [163]. С-34 способен вступать в реакцию с различными токсикантами, включая иприт и метаболиты ароматических аминов [164,165].

Особый интерес представляют тирозиновые (Y) нуклеофильные участки HSA. Известно, что Y-411 способен присоединять большинство фосфорорганических соединених (OP), обладающих крайне высокой токсичностью [166,167]. Другие тирозины, а также серины также модифицируются при высоких концентрациях OP, но Y-411 является наиболее реакционноспособным аминокислотным остатком в составе HSA [168,169]. Тирозиновые аддукты альбумина, модифицированного OP, как биомаркеры интоксикации, имеют несколько преимуществ перед сериновыми аддуктами бутирилхолинэстеразы (BChE). Аддукт OP-тирозина на альбумине более стабилен, чем аддукт OP -серина на бутирилхолинэстеразе, и более долгоживущий, так как время жизни BChE не превышает 28 дней [170]. Кроме того, в отличие от холинэстеразных аддутов, остаток OP на альбумине не подвергается гидролизу (старению), что делает идентификацию исходного OP

более надежной [167]. Соответственно, стабильность тирозиновых аддуктов делает их подходящим биомаркером воздействия ОР [171].

МALDI MS достаточно часто используют для поиска и идентификации аддуктов белков с различными ксенобиотиками [172], в первую очередь, в модельных экспериментах. Еще в 2003 году была проведена большая работа по поиску белков-мишений для гидроксилсодержащих ненасыщенных альдегидов, образующихся в результате индуцированного свободными радикалами перекисного окисления липидов и полиненасыщенных жирных кислот [173]. В работе [174] было исследовано взаимодействие нескольких белков, таких как HHb, HSA и цитохром C, с метаболитами бисфенола A. Однако большая часть работ по использованию метода MALDI MS для определения белковых биомаркеров посвящена поиску и идентификации аддуктов белков крови с OP [175,176].

1.2.3 MALDI MS профилирование микроорганизмов

Идея использования масс-спектрометрии для быстрой идентификации микроорганизмов была впервые сформулирована Анхальтом и Фенселау в 1975 г. [177]. Однако долгое время эти разработки не выходили из стен исследовательских лабораторий вследствие недостаточной степени стандартизации процедуры экстракции белков и пептидов из бактериальных клеток. В начале этого века несколько групп авторов разработали и опубликовали простые и воспроизводимые методики, позволяющие использовать прямое белковое профилирование для идентификации бактерий в клинической микробиологии. Принцип этих методов заключается в одновременной инактивации микроорганизмов этанолом и экстракции преимущественно щелочных белков (рибосомных бактериальных белков) кислыми водно-ацетонитрильными растворами. Относительная толерантность MALDI MS к загрязнению солями и другими примесями позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ содержимого микробной клетки (прямое профилирование) без фракционирования и очистки отдельных компонентов. В общем случае метод предполагает анализ сложных смесей клеточных компонентов (белков, пептидов, липидов, нуклеиновых кислот). Однако состав экстрагирующих растворов и органических матриц, а также параметры снятия масс-спектров позволяют регистрировать преимущественно белковые молекулы, что наиболее ценно: в клетке содержится множество белков в различных количествах, которые при этом несут разнообразные посттрансляционные модификации [178].

В настоящее время прямое бактериальное профилирование активно используется для идентификации и классификации широкого спектра микроорганизмов [179].

Одной ИЗ первых, заявивших 0 возможности применения массспектрометрического профилирования бактерий в практических лабораториях, стала Выпускаемый компания Waters (CIIIA). компанией программный продукт MicrobeLynx^{тм} 4.0 предназначен для идентификации микроорганизмов по их уникальным MALDI масс-спектрам при доступе к обновляемым базам данных, которые на 2004 г. содержали идентификационные масс-спектры для более чем 3400 видов бактерий.

Вполне очевидно, что при подобных исследованиях для сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях, требуется выработка и соблюдение условий единой стандартной методики, желательно, одинаково эффективной для разных микроорганизмов. Сегодня на рынке масс-спектрометрического оборудования для профилирования видовой идентификации бактерий активно выступают компании Bruker Daltonics (Германия) и Shimadzu (Япония), каждая из которых предлагает оригинальные программные продукты обработки и хранения данных — MALDI Biotyper и SARAMIS соответственно. База данных SARAMIS была в дальнейшем приобретена фирмой bioMerieux, специализирующейся на клинической лабораторной диагностике, и была представлена на медицинском рынке под брендом Vitek MS. Обе эти системы позволяют одинаково эффективно, быстро и дешево осуществлять видовую идентификацию микроорганизмов в клинической практике [180].

Разработка и внедрение в практику масс-спектрометрического анализа такого метода мягкой ионизации как MALDI в комплексе с времяпролетной масс-спектрометрией привело к прорыву в области идентификации микроорганизмов. Данный метод позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки (прямое белковое профилирование) и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» [181].

Стоит отметить, что такой подход не предполагает идентификацию отдельных микробных белков, а позволяет использовать уникальный масс-профиль для характеристики микроорганизма по принципу "отпечатков пальцев". Однако, для проведения успешного анализа описанным методом необходим поиск по существующим белковым базам данных для сравнения полученного масс-спектра с характеристичными (Рисунок 8) При том, что не происходит идентификации каждого белка в образце, сравнение полученных спектров с характеристичным по числу совпадений позволяет выявить наибольшее соответствие [182]. Кроме того, для получения устойчиво воспроизводимого результата необходима стандартизация процессов получения исследуемых культур микроорганизмов, пробоподготовки и, непосредственно, массспектрометрического анализа.



Рисунок 8 – Схема процесса идентификации микроорганизмов с использованием баз данных: А – получение образца культуры; В – нанесение образца на подложку с матрицей; С – масс-спектрометрический анализ; D – получение аналитически специфичного масс-спектра; Е – идентификация с помощью баз данных [183]

Широкое распространение этот метод получил благодаря возможности быстрой и надежной идентификации микроорганизмов. Наличие коммерчески доступных баз данных приводит к интенсивному использованию данного метода при решении рутинных задач, в том числе, в клинической диагностике. Кроме того, существует биоинформационный метод профилирования бактерий, основанный на идентификации отдельных характеристичных компонент в белковых профилях с использованием геномных баз данных. Данный метод не требует ни специализированной базы данных, ни жесткой стандартизации процесса пробоподготовки и анализа [184]. Однако, масс-спектрометры, с помощью которых выполнение данного анализа становится осуществимым, должны обладать сверхвысокой разрешающей способностью.

Описанные подходы нашли свое применение для решения задач трех видов. Во первых – систематизация микроорганизмов, во вторых – их идентификация, и, наконец, поиск видовых и внутривидовых отличий (маркеров). Так, например, еще в 1999 году были успешно найдены биомаркеры, позволяющие отличить несколько видов *Bacillus* друг от друга. Причем, для анализа потребовалось менее чем 5000 клеток каждой бакте-

рии. Эксперимент был выполнен с помощью Kompact MALDI 4 времяпролетного массспектрометра (Kratos Analytical Instruments, Chestnut Ridge, N.Y.) [185]. А в 2009 проведена работа по созданию базы данных, содержащей уже 374 профиля *Bacillus* [186].

Метод идентификации микроорганизмов с помощью MALDI MS не уступает большинству известных методов по точности идентификации и дискриминационной способности, а некоторые из них заметно превосходит. Метод обладает большим потенциалом для идентификации на внутривидовом уровне, который будет реализовываться с усовершенствованием приборной базы, появлением более полных библиотек эталонных спектров и сиквенсов бактериальных геномов.

В работе [187] было проведено сравнение эффективности двух систем (Biflex III-Biotyper и Axima-SARAMIS) в идентификации клинически значимых дрожжевых патогенов из клинических изолятов на фоне конвенционального определения низших грибов с помощью хромогенных субстратов chromID (bioMerieux) В работе было продемонстрировано, что обе системы корректно определяют биопатоген в клинических изолятах. Из 312 изолятов патоген был выявлен в 272 (87,2%) и 258 (82,7%) случаях для систем Bruker Daltonics и Shimadzu, соответственно. В основном не были идентифицированы, или достоверность идентификации была недостаточной для видов, которые отсутствовали в базе данных, или были не представлены в базе на момент исследования. Число неверно идентифицированных дрожжей было низким (0,6% SARAMIS и 1,3 % BiflexIII-Biotyper) в сравнении с классическими методами (7,4%). Три из четырех ошибочных определений у SARAMIS было связано с идентификацией родственного вида, не представленного в базе данных. Основываясь на полученных результатах, авторы рекомендовали обе системы для использования в рутинной клинической практике, несмотря на некоторые различия в базах данных, пробоподготовке и анализе спектров.

В другой похожей работе [188] были опубликованы результаты сравнительного анализа трех систем в определении грамотрицательных возбудителей в изолятах пациентов с муковисцидозом. В сравнении использованы были три системы: Vitek MS SARAMIS, Vitek MS v.2.0 и Bruker Biotyper. Система Vitek MS SARAMIS позволила идентифицировать 171 бактериальный патоген в 2-3 клинических изолятах (84,2%), Vitek MS v.2.0 – идентифицировала 180 образцов (88,7%), Bruker Biotyper – 181 образец (89,2%). При повторном определении неопределенных проб процент достоверно иден-

тифицированных микрооганизмов повысился до 90,2% у Vitek MS SARAMIS; до 93,6% у Vitek MS v.2.0; до 96,6% у Bruker Biotyper.

Таким образом, система идентификации микроорганизмов с использованием белкового профилирования микроорганизма с помощью MALDI MS получила широкое распространение, в том числе и в Российской Федерации. К преимуществам подхода в сравнении с классическими конвенциальными микробиологическими методами можно отнести: быстроту анализа, низкую себестоимость анализа на одно определение, высокую производительность и пропускную способность систем, возможность добавлять собственные эталонные спектры в базу данных, низкие требования к квалификации персонала. Все эти преимущества и сильный интерес к ним микробиологов позволяет предположить активное внедрение таких систем в областях клинической лабораторной диагностики и организаций ветеринарного и санитарного контроля. В связи с этим клинические лаборатории стремятся расширить использование MALDI MS областях диагностики инфекционных заболеваний. Относительная простота выполнения анализа, низкая стоимость одного теста и быстрота получения результатов привели к разработке новых передовых методов диагностики, таких как восприимчивость к противомикробным препаратам, идентификация организма непосредственно из образца и ряд других методов.

1.2.4 MALDI MS в клинических исследованиях

В последние годы метод MALDI MS очень востребован при клинических исследованиях, так как помимо профилирования бактерий, его используют для определения микробных токсинов [189]; изучения устойчивости патогенов к антибиотикам [190,191]; детекции вирусов [192,193], паразитов [194,195], грибов [196,197]; исследований клеточных культур клеток человека [198] и растений [199].

Основные приложения MALDI MS в вирусологии обеспечивают не только идентификацию различных штаммов микроорганизмов, но и выявление мутаций в вирусах, что имеет огромное значение для быстрой и точной диагностики вирусных заболеваний [193]. Например, MALDI MS успешно используют для быстрого скрининга ряда респираторных вирусов (грипп А, грипп В, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа, аденовирус и риновирус) и их идентификации по белковому составу [200]. В настоящее время ведутся активные разработки MALDI MS методик для анализа и идентификации вируса SARS-CoV-2 [201-203]. Однако, быстрого решения ранней чувствительной диагностики COVID-19 пока не существует [204]. Также MALDI MS позволяет эффективно определять различные виды грибов, идентифицировать подвиды, сравнивать различия между различными грибами и выявлять резистентность культур к противогрибковым препаратам [205]. Например, в работе [206] MALDI MS был использован для оценки противогрибковой устойчивости *Candida glabrata* к анидулафунгину и флуконазолу. Кроме того, метод MALDI MS востребован в паразитологии, где его используют для обнаружения различных паразитов, таких как *Leishmania* [207], *Cryptosporidium parvum* [208], *Giardia lamblia* [209] и *Entamoeba histolytica* [210].

До недавнего времени для обнаружения бактерий в биологических образцах бактериологическими лабораториями применялись только фенотипические и генотипические методы [211]. В последние годы MALDI MS профилирование все чаще заменяет эти диагностические процедуры [212,213]. Метод MALDI-TOF MS позволяет идентифицировать различные типы бактерий, такие как грамположительные [214], грамотрицательные [215], микобактерии [216] и анаэробные бактерии [217], что позволяет проводить быструю диагностику бактериальных инфекций. В исследовании [218] MALDI MS была использована для идентификации видов Lactobacillus plantarum (грамположительных бактерий). 34 белка, которые были определены в качестве биомаркеров, затем использовали для идентификации Lactobacillus plantarum в биологических образцах. В качестве примера успешного применения MALDI MS в диагностических целях можно привести идентификацию источника одной из самых опасных глобальных инфекций бактерию Mycobacterium tuberculosis [219]. Наряду с установлением вида микроорганизма важной задачей является идентификация вырабатываемого им токсина [220]. Токсин является частью бактериальной структуры (эндотоксином) [221] или секретируется из клетки (экзотоксин) [222]. Например, Staphylococcus aureus угрожает здоровью людей, вырабатывая токсин, называемый лейкоцидином Пантона-Валентина [223]. Быстрое и точное обнаружение этого токсина методом MALDI MS имеет решающее значение для спасения жизни людей [224]. Также жизненно важным применением MALDI MS является быстрая оценка устойчивости микроорганизма к антибиотикам, которая вызвана чрезмерным потреблением лекарств и мутацией бактерий [225]. С одной стороны, метод позволяет выявить сам факт резистентности [226], а с другой – определять факторы, обуславливающие устойчивость бактерий к антибиотикам [227,228]. Среди этих бактерий можно отметить метициллин-резистентный золотистый стафилококк, одну из основных угроз для здоровья населения. Его быстрая MALDI MS идентификация жизненно важна для своевременного терапевтического вмешательства и борьбы с распространением инфекции [229].

1.2.5 (MA)LDI MS анализ низкомолекулярных соединений и метаболитов

При классическом MALDI MS анализе в масс-спектре в диапазоне низких значений m/z (m/z < 1000) преобладают сигналы низкомолекулярных матричных ионов. Следовательно, наиболее серьезной проблемой для MALDI MS при непосредственном анализе низкомолекулярных соединений являются помехи в масс-спектре, создаваемые сигналами матрицы. Однако были предложены способы подавления этих сигналов. Классический метод MALDI MS может быть успешно применен для анализа таких классов LMWC, как: микроцистины [230], сахара [231], фосфолипиды [232], желчные кислоты, стероидные конъюгаты, нейтральные стероиды [233] и пр. В работе [234] было предложено добавлять к стандартной матрице СНСА поверхностно-активное вещество бромид цетилтриметиламмония, что привело к существенному улучшению анализа LMWC. Также было предложено использовать матрицы, дающие меньшее количество матричиных сигналов, например, 4,20,40-тригидроксихалкон [235] применили для качественного и количественного анализа нейтральных олигосахаридов. Также для устранения или уменьшения интерференции сигналов матричных ионов при анализе MALDI MS [236] использовались порфирины, неорганические материалы, фуллерены, пористый кремний, углеродные нанотрубки [237], ионная жидкость [238] и наночастицы. Высокомолекулярная матрица мезо-тетракис(пентафторфенил)порфирин (МТРFPP) была использована для анализа лекарственных средств лопинавира и ритонавира [239], этоксилатов и нонилфенолов [240]. Интересные результаты были получены при использовании для анализа таких LMWC, как аминокислоты, полиамины, противораковые препараты, нуклеозиды и неполярные стероиды, графена в качестве матрицы [241]. Это позволило избежать фрагментации аналитов и обеспечило хорошую воспроизводимость и высокую солеустойчивость метода анализа. Кроме того, было показано, что анализ пептидов, аминокислот, жирных кислот, нуклеозидов и нуклеотидов возможен при LDI MS на графеновых хлопьях в режиме регистрации отрицательных ионов [242].

Еще одним подходом, позволяющим нивелировать интерференцию матричных сигналов в диапазоне низких значений m/z, является дериватизация. С одной стороны дериватизация позволяет «переместить» сигнал аналита в область более высоких масс, с

другой – избирательное введение в состав нейтральной молекулы хорошо ионизируемых групп позволяет значительно повысить чувствительность и селективность анализа. И наконец, введение изотопной метки во внутренний стандарт позволяет проводить количественный анализ. Дериватизация позволяет осуществлять MALDI MS анализ таких классов LMWC, как спирты, альдегиды и кетоны, карбоновые кислоты, кетокарбоновые кислоты, амины [243], аминокслоты и низкомолекулярные пептиды [244]. Было показано, что введение четвертичного аммониевого центра в состав молекулы анализа может привести к значительному повышению чувствительности MALDI MS анализа, что было продемонстрировано на примере холестерина, жирных спиртов, стероидов и углеводов [245-248].

1.2.5.1 MALDI MS анализ свободных жирных кислот

MALDI MS анализ свободных жирных кислот (FFA) является сложной задачей, которая требует постоянного поиска новых веществ, которые можно было бы использовать в качестве матрицы [249]. Наиболее серьезной проблемой является перекрывание сигналов FFA с матричными сигналами, которые особенно распространены в диапазоне малых масс и могут приводить к выраженному подавлению второстепенных пиков [250]. Это становится особенно важным, если необходимо анализировать FFA в низких концентрациях. Стандартные матрицы, такие как DHB или CHCA, не подходят для этой цели, однако было предложено несколько других соединений для успешной десорбции/ионизации FFA при MALDI MS.

При использовании в качестве матрицы МТРFPP [251], проблема перекрытия сигналов FFA и матрицы может быть частично преодолена. Эта матрица имеет относительно высокую молекулярную массу и не дает сигналов положительных ионов при m/z < 500 [252], что позволило детектировать FFA с молекулярными массами от 200 до 350 Да, как было показано, на примере смеси FFA, полученной из растительного масла после щелочного гидролиза [253]. При добавлении избытка ацетата натрия в режиме регистрации положительных ионов детектировались исключительно натривые аддукты натриевых солей FFA. При этом использование МТРFPP не позволяет проводить анализ FFA в режиме регистрации отрицательных ионов. Стоит отметить, что чувствительность анализа при использовании МТРFPP довольно низкая, и зачастую наблюдается окисление непредельных FFA [254]. FFA являются кислыми соединениями и поэтому должны легко обнаруживаться в виде отрицательных ионов, по крайней мере, если используется достаточно щелочная матрица. 9-аминоакридин (9-AA) считается особенно перспективной матрицей из-за ее достаточно высокой основности (pKa ~ 10) [255] и умеренного фона. При этом чувствительность анализа для FFA оказывается около сотни фемтомоль, а линейный отклик детектора составляет примерно 10² [256]. Также эффективной матрицей для MALDI MS анализа FFA является аминофталгидразид (известный как хемилюминесцентный усилитель света «люминол», 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-дион), превосходящий 9-AA в отношении чувствительности и фонового шума [257].

1,8-бис-(диметиламино)-нафталин (DMAN) - сверхосновное соединение (так называемая протонная губка) с pKa 12,21, которое позволяет обнаруживать FFA в пикомолярных количествах [258]. Особым преимуществом DMAN является то, что эта матрица не существует в депротонированной форме и не дает фона в режиме отрицательных ионов, что упрощает обнаружение FFA. Однако существенным недостатком DMAN является его неустойчивость в условиях высокого вакуума. Соответственно, из-за воздействия высокого вакуума MALDI MS анализ FFA с использованием большинства серийных масс-спектрометров становится плохо воспроизводимым [259], поскольку соотношение аналит/матрица непрерывно изменяется. Были попытки повысить вакуумную стабильность DMAN за счет введения более крупных органических остатков в структуру [260], однако на данном этапе эти матрицы еще не являются коммерчески доступным продуктом. Недавно был представлен еще более усовершенствованный метод анализа FFA [261] с использованием бинарной матрицы, содержащей DMAN и 9-AA [262].

FFA анализируют также при использовании неорганических матриц, таких как графит [263], оксид графена [264] или пористый кремний [265]. Хотя достижимая чувствительность оказалась невелика, FFA надежно детектировали в виде депротонированных ионов, а матричный фон был пренебрежимо мал. Кроме того, недавно были предложены в качестве матрицы, некоторые «бионаноструктуры» из микроводорослей [266] или крыльев насекомых [267]. Несмотря на то, что механизм ионизации в этих случаях не ясен, они успешно использовались для обнаружения и количественного определения FFA в многокомпонентных образцах. Следует отметить, что все предложенные подходы имеют свои специфические ограничения, и до сих пор не существует общепринятого «лучшего» способа анализа FFA методом MALDI MS.

1.2.6 Молекулярная визуализация с использованием MALDI

Широкий спектр заболеваний связан с различными тканями организма, на их анализе строится множество клинических исследований в целях диагностики. Изучение морфологических и молекулярных особенностей тканей является основой формирования знаний о клинико-патологических формах, диагностике и прогнозировании заболеваний. Большое значение имеет более глубокое понимание молекулярных основ болезней, которое дает важные сведения о механизме заболеваний [268].

Молекулярная визуализация с использованием MALDI (MALDI-IMS) вошла в область исследования тканей, предоставив уникальные преимущества для анализа образ-[269]. ЦОВ с беспрецедентной детализацией Благодаря тому, что массспектрометрический анализ проводится непосредственно с поверхности среза ткани, становится возможным определение широкого спектра аналитов: белков, пептидов, аддуктов белков с низкомолекулярными соединениями, лекарств и их метаболитов, а также фармацевтических компонентов, эндогенных клеточных метаболитов, липидов и других веществ, часть из которых ранее не могла быть оценена при гистологических исследованиях. Основным преимуществом MALDI-IMS является возможность получения информации не только о наличии определенных компонентов, но и о пространственной локализации аналитов после масс-спектрометрического измерения [270]. Этот метод не требует использования меток и позволяет одновременно проводить мультиплексный анализ сотен и тысяч веществ в одном и том же срезе ткани [271].

На сегодняшний день MALDI-IMS занимает лидирующие позиции в разработке биологических и клинических приложений и является одним из наиболее широко используемых методов при диагностике ряда заболеваний [272]. Объектами исследования могут быть все типы срезов тканей. Для извлечения молекул из образца ткани срезы обрабатывают раствором с матрицей, которая после кристаллизации способствуют десорбции/ионизации при дальнейшем MALDI-IMS анализе. В процессе ионизации импульс лазера проникает только в слой матрицы, в то время как нижележащая ткань остается неповрежденной, что позволяет проводить гистологическое исследование ткани в том же самом срезе ткани [273]. Путем выбора различных матриц и в зависимости от

используемой технологии (MALDI-TOF или масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения, например, MALDI с анализатором типа ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT-ICR)) можно варьировать классы исследуемых аналитов. При MALDI-IMS анализе образец ткани сканируется в растровом виде (с пространственным разрешением в диапазоне приблизительно от 200 мм до 5 мм) и регистрируется массспектр для каждой точки измерения [274]. Зарегистрированные сигналы затем визуализируются в виде карт интенсивности цвета, что позволяет обнаруживать закономерности, отражающие распределение аналитов в ткани [275].

В самом начале своего развития MALDI-IMS применялась для анализа пространственного распределения белковых соединений [272] и получения информации об изоформах белков, посттрансляционных модификациях, деградации и пр. Так, например, модификации гистонов достаточно сложно определить при иммуногистохимических подходах, а MALDI-IMS легко решает эту задачу [276]. В последние годы MALDI-IMS часто используют, как инструмент для обнаружения биомаркеров. Большинство этих исследований проводится с использованием свежезамороженных тканей, но также распространено исследование тканей, фиксированных формалином и залитых парафином [270]. Кроме того, создание микрочипов из тканей, зафиксированных парафином, позволяет проводить высокопроизводительный скрининг для определения молекулярных структур. Такой подход был использован при исследовании рака поджелудочной железы [277], опухолей легких [278], рака желудка [279], рака пищевода [280], рака простаты [281], почечно-клеточного рака [282] или рака мочевого пузыря [283]. Следует отметить, что для MALDI-IMS анализа требуется гораздо меньше ткани, чем при гистологических исследованиях, что позволяет оценивать состояние пациента как до, так и после терапевтического лечения [284].

Особый интерес представляет MALDI-IMS анализ липидных соединений. Липиды являются основными структурными компонентами всех клеточных мембран и играют решающую роль в клеточном метаболизме всех организмов [274], при этом ранее возможность их анализа *in situ* была ограничена. Определение липидов обычно проводят в свежезамороженных тканях, поскольку другие процессы консервации негативно сказываются на составе и содержании этого класса веществ. Одни из первых исследований липидов методом MALDI-IMS были проведены на тканях глаз телят для локализации фосфолипидов [285]. MALDI-IMS был также использован для создания липидных карт

ткани мозга и печени приматов, мышей и крыс или беспозвоночных [286-288]. В клинической диагностике в этой области MALDI-IMS востребован, например, при определении специфических для рака паттернов липидов [289].

Также метод MALDI-IMS занял особую нишу при исследовании распределения лекарственных средств в организме. Ранее требовалось использование радиоактивной метки, и в одном эксперименте можно было изучать только одно соединение. MALDI-IMS в этой области имеет большие преимущества. Благодаря мультиплексной технологии, не содержащей меток, теперь можно исследовать лекарство и его метаболиты в одном и том же эксперименте и изучать их распределение в ткани. Кроме того, метод является количественным, что позволяет изучать, например, фармакокинетику лекарств и каждого метаболита непосредственно в тканях [290,291]. Как правило, в этих исследованиях животным вводят лекарства, опухоли, органы или даже все тело животного нарезают и в срезах анализируют лекарства и их метаболиты [292,293], что дает важную информацию о метаболических путях и локализации препаратов после введения [294].

Появление метода MALDI-IMS привело к новому качеству результатов при исследовании клеточного метаболизма благодаря информации о пространственном распределении эндогенных метаболитов. По мере дальнейшего развития этой методики вскоре стало возможным обнаруживать большее разнообразие компонентов клеточного метаболизма. Например, на модели нарушения церебральной перфузии в мозге крыс было идентифицировано 430 метаболитов, а также показано их специфическое индивидуальное распределение [295]. На основании данных, полученных с помощью MALDI-IMS, была продемонстрирована координация между энергетическим метаболизмом и прогрессированием клеточного цикла раковых клеток в модели ксенотрансплантата [296].

Таким образом, MALDI-IMS позволяет проводить комплексное исследование непосредственно в срезах ткани. Такие исследования могут представлять большой интерес, например, для глубокого понимания механизмов действия лекарственных средств и индивидуальных реакций организма на действующие вещества. Объединение, например, информации о распределении лекарства и его метаболитов с лежащей в его основе клеточной, метаболической, протеомной, липидомной и другой информацией позволяет детальной изучать механизмы действия препаратов [297].

55

1.3 Металл-аффинная хроматография

1.3.1 Принцип металл-аффинной хроматографии

Концепция металл-аффинной хроматографии (IMAC) была сформулирована Поратом в 1975 году [298]. В его первой работе было введено понятие разделения белков на металлсодержащей подложке, основанное на их различном сродстве к иммобилизованному иону металла. Это различие является следствием образования координационных связей между ионом металла и природой аминокислот, которые располагаются на поверхности белковой молекулы в третичной структуре. В качестве хелатирующего лиганда, который применялся для удерживания металла, Порат использовал иминодиуксусную кислоту, которая до сих пор находит широкое применение во многих коммерческих металл-аффинных сорбентах.

Системой классификации в данной области является теория Пирсона [299], подразделяющая ионы металлов на три категории: жесткие кислоты Льюиса, промежуточной силы и мягкие – в зависимости от их активности по отношению к неметаллам. К группе жестких кислот Льюиса относят ионы Fe^{3+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , которые предпочтительно взаимодействуют с кислородом и фтором – жесткими основаниями Льюиса. Мягкие кислоты Льюиса, такие как Cu^+ , Hg^{2+} , Ag^+ реагируют с мягкими основаниями, например с серой. К кислотам Льюиса промежуточной силы относятся ионы Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Co^{2+} , координирующие по большей части азот и галогены. При ограниченном числе цистеиновых остатков на поверхности белка, гистидин является главной мишенью для взаимодействия с ионом металла. Карбоксил содержащие аминокислоты, также как тирозин или фосфолирированные серин и треонин, могут являться мишенями для жестких кислот.

Селективность жестких и промежуточных кислот Льюиса различна. При величинах pH для оптимальной сорбции (кислые или нейтральные соответственно) жесткие и промежуточные ионы металлов взаимодействуют с аминокислотными остатками, содержащими различные функциональные группы на поверхности молекулы белка. При этом, IMAC совместима с сильно денатурирующими реагентами, такими как мочевина, а также большим количеством неионных детергентов, что делает ее чрезвычайно полезной на начальной стадии пробоподготовки сразу же после проведения процедуры экстракции [300]. Соответственно, IMAC считается универсальным методом для разделения биомолекул. Выбор условий проведения IMAC, вспомогательной подложки, на которой нанесен лиганд, метода активации и иммобилизованного иона металла зависит от свойств биомолекул, которые следует разделить. Большое количество исследований посвящено изучению двухвалентных ионов, таких как Cu(II), Ni(II), Zn(II) и разработке методик выделения гистидинсодержащих белков.

Еще в 1986 году Fe³⁺ иммобилизованный иминодиацетат-агарозный гель был использован для экстракции фосфорилированных белков [301]. После чего аффинная хроматография с иммобилизованным ионом металла долгое время была широко используемой техникой обогащения в фосфопротеомике. Для IMAC наличие катионов металлов с незанятыми координационными орбиталями является обязательным условием, а основным механизмом обогащения является координационное взаимодействие между иммобилизованными катионами металлов и атомами кислорода в фосфатных группах фосфорилированных белков и пептидов. Соответственно классический аффинный материал для IMAC состоит из вспомогательной подложки, к которой привит хелатирующий агент, координирующий ион металла.

В настоящее время существует несколько коммерчески доступных хелатирующих агентов: иминодиуксусная кислота (IDA), нитрилотриуксусная кислота (NTA), метилкарбоксиаспаргиновая кислота (MA), трис-карбоксиметилэтилендиамин. Эти лиганды могут быть максимум три-(IDA), тетра-(NTA) и пента-(MA) дентатными при образовании комплексов с металлом (Таблица 1). Также синтезирован ряд других лигандов [302-305], которые успешно используются в IMAC и будут рассмотрены ниже. В зависимости от жёсткости используемого иммобилизованного металла селективность сорбции для одного и того же вещества будет различной.

Например, иммобилизованный ион Fe(III) будет адсорбировать определенный тип белков при низких значениях pH, в то время как эти же самые белки будут удерживаться ионом Cu(II) при нейтральном pH. Также известно, что селективность ионов металла изменяется при различных окружающих его условиях. Например, ионы металла, относящиеся к промежуточным кислотам Льюиса, начнут проявлять сродство к аминогруппам в N-концевых пептидах и белках, также как и к пептидным связям при значениях pH выше 8 [306,307].

Кроме факторов, которые легко поддаются контролю (ионная сила раствора и pH), на эффективность IMAC значительное влияние оказывает также наличие высоко-

или низкомолекулярных соединений в образце, которое трудно предугадать заранее. В связи с этим, требования к образцу в IMAC, безусловно, более строгие, чем в других схожих методах.

	D Y			
Название лиганда	Взаимодействие лиганда с ионом Fe ³⁺	Свойства		
Иминодиуксусная кислота		тридентатный лиганд, с металлом ко- ординируется через азот и два кар- боксильных кислорода, комплекс ме- талл-лиганд имеет 3 координацион- ных вакансии, которые заняты сла- босвязанной водой [308]		
Трис(карбоксимет ил)этилендиамин	о H2O - 0 H2O	образует очень стабильные пятичлен- ные циклы с ионом железа [309]		
Нитрилотриук- сусная кислота		четыре координационных вакансии Fe(III) заняты карбоксильными кисло- родами и аминогруппой, оставшиеся две координационные позиции заняты водой или гидроксил ионом в зависи- мости от величины pH [310]		

Таблица	1 - Xe	елатирующи	е лиганды,	использ	уемые в	IMAC
		1.2				

Основным является требование полного отсутствия сильных хелатирующих агентов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), при проведении анализа [311,312].

Наиболее широко используемые методы для элюирования связанных молекул с металл-аффинных сорбентов включают в себя: изменение pH; конкурентное элюирование [313]; элюирование растворами, содержащими ионы магния [314] или фосфатные ионы [315]. Элюирование с колонки может быть также осуществлено путем понижения градиента соли, так как при высокой концентрации некоторые белки могут связываться со стационарной фазой посредством гидрофобных взаимодействий [316].

Иммобилизованная IDA, используемая в качестве хелатирующего лиганда, без координированного иона металла, отрицательно заряжена и проявляет свойства относительно сильного катионита [317]. Было показано [316,318], что смесь белков может быть разделена с помощью хроматографии посредством связывания только лишь с IDA, при этом связывание усиливается в соответствии с увеличением значения изоэлектрической точки. Когда к IDA привит ион металла, комплекс приобретает положительный заряд (Таблица 1).

Для комплексов металлов очень важными являются электростатические взаимодействия. Если ионная сила буферного раствора увеличивается, то удерживание белков при pH выше значения их изоэлектрической точки, вероятно, будет снижаться из-за экранирования комплекса металл-лиганд. Белки со значением изоэлектрической точки от 4 до 11 связываются с комплексом Fe(III)-IDA при pH 6 и низкой ионной силе раствора [317]. Экспериментально было показано, что ионы металлов преимущественно формируют комплексы с хелатообразующими, а не с монодентатными лигандами, при условии, что оба типа лигандов образуют связи примерно одинаковой прочности (хелатный эффект) [319].

Металл-оксидная аффинная хроматография (МОАС) - еще одна широко используемая технология обогащения, используемая преимущественно в фосфопротеомике. Подобно IMAC, основные сайты сродства в МОАС являются атомами металлов, но в данном случае они имеют прочные химические связи с соседними атомами кислорода и, таким образом, решается проблема перехода катионов металлов в образец, присущая IMAC. Поскольку большинство оксидов в МОАС являются амфотерными (например, TiO_2 с pKa₁ = 4,4 и pKa₂ = 7,7), они могут действовать как жесткие кислоты Льюиса с положительно заряженными поверхностями в растворах кислот, и как жесткие основания Льюиса с отрицательно заряженными поверхностями в основных растворах. Следовательно, фосфорилированные биомолекулы могут быть сорбированы при низком рН (например, pH 2,7) и затем элюированы при высоком pH (например, pH 10,5) за счет обратимых кислотно-основных взаимодействий Льюиса (например, ионообмен, электростатическое взаимодействие, координационное взаимодействие) между катионами поверхностных металлов и фосфатных группы [320]. В настоящее время для МОАС используется ряд оксидов, включая NiO, ZnO, Al₂O₃, Fe₂O₃, Ga₂O₃, TiO₂, ZrO₂, SnO₂, HfO₂, Nb₂O₅, и Ta₂O₅ [321-331].

1.3.2 Очистка белковых соединений методом металл-аффинной хроматографии

Металл-аффинная хроматография на сегодняшний день используется, как препаративный метод экстракции и очистки белков. Одним из первых применений метода является очистка металлопротеинов – белков, содержащих один, или несколько ионов металла. При использовании ІМАС металлопротеины всегда экстрагируются в комплексе с металлом, что указывает на отсутствие взаимодействия участков белковых молекул, связанных с металлом с активными центрами сорбента. Соответственно, в процессе лигандообмена участвуют остатки аминокислот, расположенные на поверхности молекулы белка (остатки гистидина, цистеина и др.), что является особенностью данного класса белков [332]. Однако в большинстве случаев целевые белки не содержат на поверхности молекулы аминокислотных остатков, способных связываться с ионами металлов в достаточном количестве. При крупномасштабном производстве рекомбинантных белков используют подход, обеспечивающий наличие специфичной метки на N-конце целевого белка. К таким меткам можно отнести небольшой металл-связывающий белок (SmbP) из Nitrosomonas europaea [333] или гистидиновый таг (His-тег) – аминокислотную последовательность, состоящую из 6 и более остатков гистидина [334]. Гистидин – аминокислота, проявляющая, благодаря наличию в структуре имидазольного кольца, имеющего электрон-донорные свойства, высокое сродство к иммобилизованным ионам двухвалентных переходных металлов (медь, никель, кобальт, цинк и пр.) (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Структуры имидазола и гистидина [335]

Белковые соединения, имеющие в составе гистидиновые остатки, эффективно задерживаются на металл-аффинном сорбенте. После удаления несвязавшейся фракции, белки, содержащие полигистидиновые последовательности, легко элюируются с колонки путем изменения pH буфера, или добавления к буферу имидазола. С помощью IMAC можно добиться 95% степени очистки. Чаще всего указанный подход применяется при очистке рекомбинантных белков, содержащих полигистидиновый тег, привитый к Nконцу белка, обеспечивающий высокую степень взаимодействия между белком и сорбентом [334] (Рисунок 10). Одним из преимуществ His-тегов для очистки рекомбинантных белков яляется небольшой, по сравнению с молекулой белка, размер аффинного лиганда. Соответственно, в процессе сорбции практически исключается фолдинг белка, что позволяет сохранить его структуру. После выделения целевого соединения метка легко удаляется под действием эндопротеазы. Также к немаловажным достоинствам такого подхода можно отнести возможность извлечения His-меченных белков даже в денатурирующих условиях, когда изначально белки входят в состав нерастворимых комплексов. К недостаткам метода относятся: протеолитическая деградация гистидиновой последовательности, снижающая аффинность белка; формирование димеров и тетрамеров под воздействием ионов металлов, мешающее оценке молекулярной массы экстрагированного белка; соэлюирование белков, имеющих на поверхности молекулы два, или более смежнорасположенных гистидиновых остатка, что приводит к снижению степени очистки получаемого препарата [336].



b. Cobalt-carboxylmethylaspartate (Co+2-CMA)



Рисунок 10 – Взаимодействие His-меченых белков с металл-аффинными сорбентами на основе Ni²⁺-NTA (а) и Co²⁺-CMA (b) [334]

Еще одним приложением IMAC для очистки белков стало выделение иммуноглобулинов G (IgG) из плазмы крови животных и человека и очистка моно-поликлональных антител [337]. Было показано, что при использовании в качестве металл-аффинного сорбента агарозной матрицы с хелатироваными EDTA ионами двухвалентной меди можно эффективно выделять IgG из плазмы крови. При этом практически не происходит соэлюирования сывороточного альбумина – основного белка плазмы крови [338]. При условии использования градиента концентрации имидазола при элюировании становится возможным разделение цепей иммуноглобулинов. Стоит отметить, что для целей выделения IgG разрабатываются и новые структуры сорбентов. Так, например, в 2016 г. в качестве перспективных металл-аффинных сорбентов для очистки рекомбинантных белков были предложены криогели на основе полигидроксиэтилметакрилата, полиэтилендиамина и ионов двухвалентной меди [339].

1.3.3 Металл-аффинная хроматография в фосфопротеомике

Фосфорилирование белка – основная посттрансляционная модификация белка, которая регулирует множество механизмов биологических процессов, связанных, в том числе, и с патологическими состояниями [340,341]. Фосфорилированные белки и пептиды, полученные в результате динамического и обратимого фосфорилирования белков, участвуют во многих биологических процессах, таких как клеточная сигнализация и коммуникация [342], транскрипционная и трансляционная регуляция [343], деление клеток и апоптоз [344]. Соответственно, исследование фосфорилирования белка является ценным инструментом для выяснения механизмов заболевания и разработки подходов для ранней диагностики возникнования патологий. Кроме того, на сегодняшний день фосфопептиды рассматриваются, как биомаркеры маркеры потенциальных заболеваний [345-347].

Сегодня масс-спектрометрия с высокой чувствительностью и быстрой обработкой данных стала наиболее мощным и важным инструментом для исследований в области фосфопротеомики [348]. Однако прямой анализ фосфолирированных соединений массспектрометрическими методами все еще сталкивается с большими проблемами из-за хорошо известных затруднений, в том числе низких концентраций фосфорилированных белков, возникающее в результате высокой гетерогенности и низкой стехиометрии фосфорилирования белков, эффекта подавления сигнала компонентами присутствующих в образце в высоких концентрациях (например, солями, липидами и нефосфорилирован-

62

ными молекулами белков), а также низкой способности к ионизации фосфорилированных пептидов при масс-спектрометрическом анализе [349]. Специфичная экстракция фосфорилированных пептидов (чаще всего в качестве образца рассматривается ферментативный гидролизат белкового пула экстракта, или лизата) является необходимым процессом практически при любом исследовании в области фосфопротеомики [350,351].

В течение длительного времени именно IMAC является основным методом обогащения, применяемых для концентрирования фосфорилированных белков и пептидов [352]. Хорошо известно, что катионы металлов являются типичными кислотами Льюиса и что фосфатные группы с низкой константой равновесия ионизации кислоты по основанию (pKa = 1-2) демонстрируют типичные свойства основания Льюиса в широком диапазоне pH. Метод основывается на взаимодействии фосфатной группы, входящей в состав таких аминокислотных остатков, как тирозин, серин и треонин с катионами металлов металл-аффинных сорбентов. В случае металл-хелатных сорбентов чаще всего используют ионы Fe^{3+} и Ga³⁺. Ионы Fe(III), иммобилизованные на хелатирующий носитель, чаще всего показывают высокую специфичность в удерживании фосфорилированных белков, а константа связывания составляет 10¹³ [353]. Высокое сродство, которое фосфатные группы имеют по отношению к иону Fe(III), объясняется тем, что, вероятно, образуется две координационные связи с ионом металла, в то время как карбоксильные группы будут образовывать только одну связь.

Сродство фосфатной группы к металлу снижается при щелочном pH. Увеличение сродства при pH между 3 и 5 происходит в результате ионизации второго кислотного кислорода в фосфатной группе. Понижение сродства при pH выше 5 наблюдается из-за конкурентного связывания ионом железа гидроксильных ионов.

Следует отметить, что в случае материалов IMAC структура носителя не является полностью инертной, и гидрофильные носители, например полидофамин [354], могут улучшить селективность обогащения фосфопептидов за счет снижения количества гидрофобных взаимодействий, которые приводят к неспецифичному связыванию нефосфорилированных пептидов с сорбентом [355,356]. Однако исследования с помощью недавно разработанного многооболочечного материала [357] с иммобилизованными ионами Ti⁴⁺, продемонстрировали, что гидрофильность носителя не всегда оказывает влияние на общее количество идентифицированных фосфопептидов или селективность обогащения [358].

1.3.4 Разнообразие сорбентов для металл-аффинной хроматографии

В настоящее время аффинные материалы с уникальными достоинствами, такими как низкая стоимость, хорошая структурная стабильность, разнообразие и многофункциональность, широко используются для обогащения целевых биомолекул из сложных биологических проб на основе специфических взаимодействий между аффинными материалами и целевыми биомолекулами [359,360]. Благодаря быстрому развитию материаловедения, особенно появлению нанотехнологий, было разработано множество эффективных металл-аффинных материалов (Рисунок 11) для обогащения биомолекул различной природы [361,362], и, в первую очередь, для решения задач фосфопротеомики.



Рисунок 11 – Разнообразие материалов и подходов (1-4), используемых в металлаффинной хроматографии [359]

1.3.4.1 Материалы для ІМАС

На сегодняшний день в материалах ІМАС в различных целях используют ряд катионов металлов, в том числе Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, Ga³⁺, Al³⁺, Ti⁴⁺ и Zr⁴⁺[363-366]. Fe³⁺ и Ga³⁺ являются наиболее широко используемыми катионами металлов в традиционных сорбентах ІМАС, но эти металлы все-таки проявляют слабое неспецифическое связывание с нецелевыми биомолекулами, несущими кислотные группы. В настоящее время все чаще используются материалы IMAC с иммобилизованными катионами металлов с высокой валентностью (например, Ti⁴⁺ и Zr⁴⁺), которые показали более высокую селективность при экстракции фосфопептидов по сравнению с традиционными материалами, содержащими ионы железа [367,368], из-за уникальной координационной специфичности химического связывания металла (IV) и фосфатной группы. Как было описано выше, IDA и NTA, обычно используемые в качестве хелатирующих лигандов для иммобилизации катионов металлов (например, Fe^{3+} и Ga^{3+}), способны координировать только один ион металла. Кроме того, при их использовании наблюдается вымывание катионов иммобилизованного металла во время сорбции и промывки в образцец. Соответственно, были предложены новые хелатирующие лиганды с более высокой хелатирующей способностью, такие как арсенат (-AsO₃²⁻), фосфат (-PO₃²⁻), аденозин-трифосфат (ATP) и дофамин, которые были успешно использованы в качестве новых высокоэффективных хелатообразующих лигандов для иммобилизации катионов металлов.

Материалы IMAC на основе арсената, как новые инструменты обогащения для фосфопротеомики, могут быть получены путем модификации арсенатных групп (As), привитых к матричным материалам, таким как кремнезем [369] или магнитные наночастицы кремнезема [370] (Рисунок 12а). Например, ZrAs-Fe₃O₄@SiO₂ продемонстрировал более высокую селективность обогащения и лучшую способность сорбции мультифосфопептидов, чем коммерческий ZrO₂.

Твердые фосфаты металлов (IV) обладают уникальной структурой, катионы металлов (IV) координируются с фосфатными группами по октаэдрической координационной модели МО6, в которой каждый катион иммобилизованного металла (IV) прочно координируется с более чем одной фосфатной группой [371].



Рисунок 12 – Структура сорбентов с арсенатными (а) и фосфатными (b) лигандами [359,369]

Таким образом, материалы ІМАС на фосфатной основе могут обладать очень стабильным, четко определенным металлофосфатным интерфейсом с низко координированными поверхностно-активными центрами металлов (IV) для сорбции других фосфатных групп (Рисунок 12b) [372]. В некоторых ранних работах фосфатные лиганды для иммобилизации катионов металлов (IV) были получены на поверхностях пористой кремниевой пластины [373] и наночастиц Fe₃O₄@SiO₂ [374] путем химической реакции между -NH₂ и POCl, но однослойные фосфатные лиганды на этих материалах IMAC, способные иммобилизовать ограниченное количество катионов металлов (IV), показали достаточно низкую эффективность обогащения. Позднее были предложены полимерные материалы, позволившие привить гораздо большее количество фосфатных лигандов [375]. Так, на основе полученных материалов были изготовлены полимерные аффинные микросферы Fe₃O₄@SiO₂@PEG-Ti⁴⁺ [376]. Благодаря магнитным сердечникам, устойчивости цепей полиэтиленгликоля к неспецифической сорбции [377], и высокой концентрации Ti⁴⁺, структура продемонстрировала высокую эффективность обогащения: степень извлечения превысила 70% при пределе обнаружения 0,5 фмоль фосфорилированного белка. Также были предложены подложки, изготовленные из фосфорсодержащих материалов, таких как 3-(тригидроксисил)-пропилметилфосфонат [378], диэтоксифосфорилэтил-триэтоксисилан [379], и мономер этиленгликоль-метакрилатфосфат (EGMP) [380]. Кроме того, был синтезирован композит MCNC@PMAA@p(EGMP)-Ti⁴⁺, характеризующийся высоким содержанием катионов Ti⁴⁺ (4,1 мас.%), чистой границей раздела Ti⁴⁺-фосфат и высокой магнитной восприимчивостью [381].

Природные полимеры, такие как хитозан (CS) и целлюлоза, обладающие уникальными достоинствами (например, низкая стоимость, легкая доступность, большое количество функциональных групп и легкость химической модификации) также рассматриваются, как материалы для подложки IMAC. Путем этерификации целлюлозы и хитозана с использованием H₃PO₄ были получены функционализированные Ti⁴⁺ материалы [382,383], в том числе и магнитные микросферы MPCS-Ti⁴⁺, на основе Nметиленфосфонилированного хитозана [384].

Также в качестве хелатирующих лигандов были предложены молекулы ATP, которые были привиты к функционализированным аминогруппами магнитным наночастицам с использованием глутаральдегида в качестве линкера [385]. Лиганд характеризуется высокой гидлофильностью и большим содержанием фосфатных групп, что позволяет хелатировать значительное количество катионов металлов.

Также в качестве хелатирующего лиганда вызывающим немалый интерес представляется дофамин, который легко полимеризуется на различных подложках, включая частицы Fe₃O₄ [353] и графен [386]. Иммобилизация катионов металлов (например, Ti⁴⁺) происходит за счет сильного хелатирования гидроксильными группами дофамина.

1.3.4.2 Материалы для МОАС

Большинство оксидов металлов (МО) изначально использовались в их наиболее распространенных формах (например, кристаллические частицы) [387], которые, к сожалению, имеют незначительную площадь поверхности и, соответственно, невысокую сорбционную емкость. По сравнению со своими твердыми аналогами, мезопористые МО не только обладают большими площадями поверхности, но также имеют свойства сорбентов для эксклюзионной хроматографии, обусловленные мезопористой структурой. Поэтому значительное количество работ было посвящено синтезу мезопористых частиц оксидов металлов. Так, методом самосборки были получены кластеры нанокристаллов TiO_2 [388], с помощью которых было проведено обогащение образца интактными фосфопептидами, с использованием эффекта исключения молекулы по ее размеру [389]. Аэрогели МО (например, TiO_2 [390] и ZrO_2 [391]) с большой удельной поверхностью также продемонстрировали гораздо лучшие показатели обогащения, чем их кристаллические аналоги, и мезопористые кластеры нанокристаллов γ -Fe₂O₃ [392]. Было показано, что Fe₃O₄, NiFe₂O₄ и ZnFe₂O₄ могут сорбировать как моно-, так и мультифосфорилированные пептиды, но имеют относительно более сильное сродство к монофосфопептидам, тогда как для NiZnFe₂O₄ более характерна сорбция мультифосфопептидов. В работе [393] это явление связано с увеличением площади и уменьшением магнитного поля открытых октаэдрических подрешеток NiZnFe₂O₄. Было продемонстрировано, что некоторые MO демонстрируют специфичность при обогащении фосфопептидов. Например, TiO₂ преимущественно сорбирует мультифосфорилированные пептиды, тогда как ZrO₂ более характерна сорбция монофосфорилированных пептидов [394]. Соответственно были сделаны выводы, что смешанные оксиды позволяют проводить более эффективное обогащение образца фосфорилированными пептидами за счет большого количества поверхностных активных центров на поверхности, что было показано на примере бинарных смешанных оксидов TiO₂/MHMSS ZrAs-Fe₃O₄@SiO₂ [395] и системы SnO₂-ZnSn(OH)₆ [396].

Также как и в случае сорбентов для ІМАС магнитные частицы, модифицированные МО, представляют большой интерес, как сорбенты для металл-аффинной хроматографии. Благодаря суперпарамагнитным свойствам магнитных компонентов (например, Fe₃O₄), магнитные аффинные композиты МО могут быть не только быстро выделены с помощью внешнего магнитного поля, но также могут быть повторно диспергированы после его удаления, что значительно облегчает процедуру экстракции и снижает возможную потерю материалов и биопроб [397]. Магнитно-аффинные композиты МО обычно имеют структуру ядро-оболочка. МО могут быть нанесены непосредственно на магнитные сердечники [398] или через вспомогательные линкеры (например, SiO₂ [322], углерод [399] и полиметилакриловая кислота (РМАА) [400]). Например, магнитные композиты Fe₃O₄@ZnO, были изготовлены с помощью SiO₂. Кроме того, с применением гидротермальной [401] и сольватермальной обработок [402] были получены магнитные композиты с пористыми оболочками, состоящими из TiO₂.

Также немалый интерес представляют модифицированные металл-оксидные сорбенты на основе углеродных нанотрубок и графена. Принимая во внимание их уникальные свойства (например, простоту модификации, хорошую стабильность структуры или высокую удельную поверхность), углеродные нанотрубки [403] и графен [404] успешно используются в качестве прочных подложек для нанесения наночастиц МО. Кроме того, МО (например, TiO₂ и ZrO₂) могут быть синтезированы непосредственно на поверхности углеродных нанотрубок и графена *in situ* с использованием соответствующих предшественников, таких как изопропоксид титана [405,406]. Так, применение золь-гель метода позволило функционализировать поверхность графена диоксидом титана (G-TiO₂) [407]. Примечательно, что G-TiO₂ также может служить платформой для прямого MS анализа фосфопептидов. Кроме непостредственно оксидов, на поверхность углеродных нанотрубок и графена могут быть также нанесены магнитные частицы, что значительно облегчает процедуру экстракции [408]. Основным недостатком такого подхода является случайное распределение частиц оксидов на поверхности, что приводит к плохой диспергируемости композита и ограниченному доступу к активным центрам сорбента. Соответственно был предложен новый способ модификации поверхности графена путем нанесения полидофамина на графен с последующим осаждением тонкого слоя наночастиц TiO₂ [409]. При этом, слой полидофамина служит не только средним связующим линкером, но и улучшает диспергируемость композита.

С момента разработки метода Штобера для синтеза кремнезема в 1968 году SiO₂ стал одним из наиболее мультифункциональных материалов [410]. Его уникальные свойства, такие как контролируемая морфология, перестраиваемые структуры, высокая гидрофильность и превосходная модифицируемость, сделали кремнезем идеальным материалом для изготовления композитов на основе МО. Например, волокнистые композиты TiO₂/SiO₂, полученные методом электроспиннинга, показали лучшие характеристики при специфичной экстракции фосфорилированных пептидов, чем коммерчески доступные частицы TiO₂ [411]. Благодаря уникальным свойствам мезопористого SiO₂ (например, легкая модифицируемость, высокая удельная поверхность, стабильный скелет и инклюзионный эффект) и высокому сродству с МО, модифицированные МО мезопористые кремнеземные композиты также нашли свое применение в фосфопротеомном анализе [412]. При нанесении оксидов на кремнезем с макропористой упорядоченной структурой (MOSF) возможно получать материалы, позволяющие сорбировать фосфорилированные белки и проводить ферментативный гидролиз непосредственно на сорбенте с сохранением связывания фосфопептидов с активными центрами сорбента (Al-MOSF) [413].

Помимо вышеупомянутых композитов, были также исследованы несколько других функциональных материалов: гематитовые (α-Fe₂O₃) нанотрубки (композит α-Fe₂O₃@SnO₂), обладающие четко определенной морфологией, большой удельной поверхностью и хорошей доступностью к внутренней и внешней поверхности для молекул аналита [414]; диатомит (TiO₂-модифицированный диатомит) [415] и целлюлоза (TiO₂модифицированные микросферы целлюлозы) [416], к достоинствам которых можно отнести низкую стоимость, пористую структуру и хорошую химическую стабильность.

Особый интерес представляют материалы, характеризующиеся включением ионов металлов в каркас, например, лигированный титаном мезопористый SiO₂ (Ti-MPS) с молярным отношением Si/Ti = 8:1 [417], или молекулярные сита Ti-люминофосфоната-5 [418]. Пористые металлорганические каркасы характеризуются большим количеством активных центров, хорошей удельной поверхностью, легкостью химической перестраиваемости и механической прочностью, что вызвало интерес к разработке новых материалов для металл-аффинной хроматографии на их основе [419]. Так, было показано, что магнитные частицы, модифицированные металлорганической конструкцией на основе циркония (IV) и 1,4-бензолдикарбоновой кислоты проявляют более выраженные металлафинные свойства, чем аналогичные частицы, содержащие Zr^{4+} [420].

1.3.4.3 Аффинные материалы, содержащие редкоземельные элементы

Редкоземельные элементы (RE) представляют собой важный класс элементов (15 лантаноидов, скандий и иттрий). Стабильные RE-ионы обычно представляют собой трехвалентные/четырехвалентные катионы, которые в качестве типичных жестких кислот Льюиса могут преимущественно взаимодействовать с жесткими основаниями, к которым, как упоминалось выше, относятся фосфатные группы. Материалы на основе RE применяются в биомедицинских областях в течение нескольких десятилетий. Например, ионы лантана используются для дефосфорилирования нуклеотидов с 1950-х годов [421]. В настоящее время карбонат лантана вводят пациентам с гиперфосфонатемией в качестве фосфатсвязывающего агента для контроля фосфатов в сыворотке крови [422]. Поэтому материалы на основе RE теоретически обладают высоким потенциалом для обогащения фосфорилированных белков и пептидов.

Так, свободные катионы RE были успешно использованы в качестве осаждающего агента для выделения фосфорилированных белковых соединений из сложных биологических образцов (например, яичного белка, молока и незлокачественной ткани печени) [423,424]. Было показано, что La³⁺ вместе с фосфат-анионами позволяет осаждать фосфорилированные белки [425]. С уникальными преимуществами метода, такими как слабое неспецифическое связывание, высокая степень экстракции целевых белков и простота одностадийного процесса выделения без какого-либо сложного оборудования, осаждение фосфорилированных белков катионами RE открывает новые пути для разработки методик обогащения образцов фосфорилированными соединениями.

Подобно другим катионам (например, Ti⁴⁺), катионы RE также могут быть легко иммобилизованы на матрицах IMAC для обогащения фосфорилированных биомолекул. Были предложены Ce⁴⁺-хелатированные магнитные микросферы с использованием IDA в качестве хелатирующей группы, которые показали лучшую способность к связыванию фосфопептидов, чем Fe^{3+} -хелатированные магнитные частицы [426]. Также ионы Ce (IV) были привиты к магнитным частицам Fe₃O₄@SiO₂, покрытым поливинилфосфоновой кислотой (PVPA) [427]. Следует отметить, что сорбенты, содержащие ионы церия, отличались хорошей диспергируемостью, высокой сорбционной емкостью и хорошей селективностью. Интересно, что RE-катионы (такие как La³⁺, Ho³⁺ и Er³⁺) иммобилизованные на аффинные смолы PVPA показали различный уровень специфичности, а именно Er-PVPA> Ho-PVPA> La-PVPA, что было объяснено различными эффектами переноса заряда для трех катионов RE и подтверждено квантовохимическими расчётами для таких комплексов [428]. С помощью четырехстадийного метода химической дериватизации был приготовлен композит на основе кремнезема и оксида лантана, который при нанесении на MALDI мишень позволил провести эффективный анализ фосфопептидов непосредственно при пробоподготовке на мишени [429].

Особенно стоит обратить внимание на то, что ряд катионов редкоземельных металлов, например Ce (IV), находящийся как в катионизированной форме [430], так и входящий в состав оксида [431], способны катализировать процесс дефосфорилирования, соответственно, при масс-спектрометрическом анализе элюата с сорбентов, содержащих Ce (IV) в спектре будут присутствовать сигнал с характерной потерей массы $n \times 80$ Да ($n \ge 1$), которые позволяют проводить идентификацию фосфорилирования по принципу потери нейтральной частицы. Было показано, что легкодоступные кристаллические грани могут значительно влиять на сорбционные характеристики нанокристаллов CeO₂ для сорбции и дефосфорилирования фосфорилированных молекул [432]. Все три грани (то есть грани в кристаллографических направлениях [100], [111] и [110]) могут значительно катализировать дефосфорилирование адсорбированных фосфорилированных молекул, в то время как грани в направлении [111] и [110] обладают гораздо более высокой сорбционной способностью и кинетической каталитической активностью, чем грани [100]. Этот факт объясняют различной поверхностной упаковкой атомов на этих трех гранях.

Фосфаты редкоземельных металлов (REPO₄) также обладают свойствами (химическая стабильность, способность к катализу и способность к координации), позволяющими рассматривать их, как материалы для создания металл-аффинных сорбентов. Например, мезопористые микросферы на основе $REPO_4$ (RE = Y, Gd и Yb) были предложены, как для обогащения фосфорилированных пептидов, так и как материал, для катализа реакции дефосфорилирования, катализируемой присутствием редкоземельных металлов в форме RE³⁺ [433]. Кроме того, при последовательном использовании методов гомогенного осаждения и ионного обмена стало возможным получить магнитные микросферы. Для облегчения процесса выделения были предложены микросферы Fe₃O₄@REPO₄ со структурой магнитное ядро-оболочка [434,435]. Было показано, что такие микросферы обладают высоким потенциалом применения в фосфопротеомике. Для определения последовательностей различных видов пептидов на основе REPO4 были подготовлены многофункциональные аффинные зонды, состоящие из графена, наностержней LaPO₄ и наночастиц Fe₃O₄ [436]. При сочетании гидрофобного взаимодействия между графеном и пептидами, аффинной способности La³⁺ к фосфатным группам и магнитной чувствительности Fe₃O₄, этот многофункциональный композит позволил проводить в одном эксперименте экстракцию, быстрое магнитное разделение и последовательное масс-спектрометрическое определение нефосфорилированниых и фосфорилированных пептидов.

Помимо фосфатов редкозмельных металлов, также были разработаны, в том числе и магнитные, материалы на основе силикатов (Fe₃O₄@La_xSi_yO5 [437]), ванадатов (γ -Fe₂O₃@REVO₄ (RE = Sm, Dy и Ho) [438]) и фторидов (γ -Fe₂O₃@xNH₄F•yLuF₃ [439], GdF₃ [440]). Кроме того, было показано, что материалы на основе металлорганических каркасов, содержащие ионы редкоземельных металлов (например, Er³⁺) также могут быть эффективными металл-аффинными сорбентами [441].

За последние десятилетия было разработано большое количество аффинных материалов для решения задач протеомики и фосфопротеомики. различных механизмов обогащения. Несмотря на значительный прогресс, огромная часть разработок не находит широкого применения несмотря на что, большинство из разработанных аффинных
материалов были высоко оценены за продемонстрированную эффективность в специфичной и селективной экстракции биомолекул [359].

1.4 Формат «лаборатория на мишени»

Из-за ограничений метода MALDI MS, связанных с узким диапазоном концентраций аналитов в образце (~10⁻²) и с небольшим, по сравнению с HPLC-ESI MS, количеством детектируемых соединений в процессе одного анализа, для успешного эксперимента зачастую требуется достаточно сложная пробоподготовка.

Одно из ограничений метода MALDI MS в структурной биологии связано с предварительной и лительной подготовкой образца для нанесения ее на стальную мишень с требованием, чтобы анализируемые вещества были сокристаллизованы с матрицей. Упрощение подготовки образцов и оптимизация различных аналитических методов для MALDI может оказать значительную помощь работам в области биологических, химических и медицинских наук. Исследования в области биохимии и молекулярной биологии требуют использования высокочувствительных аналитических методов. Часто ограничивающими факторами являются не только низкая концентрация анализируемого вещества, но и малое количество пробы, доступное для анализа. Как было показано, MALDI MS анализ обладает выдающейся чувствительностью с точки зрения общего количества анализируемого вещества по сравнению с большинством методов. Тем не менее, многие области применения, включая анализ белков и метаболитов с низким содержанием целевых соединений или исследования отдельных клеток, требуют особых подходов для реализации возможности анализа методом MALDI MS. Недавно решения, позволяющие интегрировать несколько стадий прободготовки на одной платформе, а именно проводить подготовку образцов непосредственно на MALDI мишени получили общее определение - «лаборатория на мишени» [442].

В процессе решения различных задач разработываются различные подходы в формате «лаборатория на мишени». Таким разработкам способствует универсальность подложки для MALDI, которая может применяться не только непосредственно для MS анализа, но и для предварительных процедур, и охватывать различные этапы подготовительных и аналитических процессов. Эти этапы могут включать в себя любые действия, выполняемые в дополнение к тем, которые требуются для ионизации анализируемых веществ в процессе лазерной десорбции/ионизации, например: синтез, гомогенизация, предварительная концентрация, очистка, экстракция, расщепление, дериватизация, раз-

73

деление, обнаружение с помощью дополнительных методов, хранение данных или другие соответствующие действия [442].

1.4.1 Предварительное концентрирование образцов в формате «лаборатория

на мишени»

Как было показано выше, исследования в области биохимии и молекулярной биологии требуют использования высокочувствительных аналитических методов. Зачастую ограничивающими факторами являются не только низкая концентрация анализируемого вещества, но и незначительное абсолютное количество пробы, доступной для анализа. В настоящее время основные разработчики приборов сообщают о низких пределах обнаружения стандартных соединений (сотни аттомолей), анализируемых с помощью MALDI MS. Кроме того, усилия по совершенствованию масс-спектрометрического оборудовавния сопровождаются разработками в области пробоподготовки. Было показано, что ограничение области расположения образца на MALDI мишени может обеспечить значительное улучшение чувствительности [443]. Следовательно, было проведено значительное количество исследований по «фокусировке» образцов на поверхности MALDI мишени. Такой подход, независимо от способа его достижения, имеет два основных преимущества: во-первых, увеличивается концентрация аналита на единицу площади поверхности, поэтому количество ионов, генерируемых при каждом лазерном импульсе больше, чем при использовании традиционных методов, а во-вторых, поскольку диаметры пятна нанесенного образца и лазерного луча сравнимы, для сканирования всего пятна требуется меньшее количество лазерных импульсов.

На данный момент для анализа органических молекул в следовых количествах методом MALDI MS чаще всего используют несколько основных подходов к концентрированию аналитов.

1.4.1.1 Концентрирование при помощи внешних устройств

В 2009 году был предложен, так называемый, «концентратор образцов BD MALDI». Этот коммерческий продукт обычно изготавливается из силиконового эластомера в формате многолуночного планшета, который помещается поверх стандартной MALDI мишени. При размещении силиконового планшета на поверхность стандартной мишени и герметизации в его лунки можно загружать достаточно большой объем образца. После выпаривания избытка растворителя и добавления матрицы устройство удаляют и мишень готова для анализа с использованием прибора для MALDI MS [444]. Этот подход особенно удобен при исследованиях, в которых анализируют относительно большие объемы проб (до сотен микролитров), содержащих аналиты в низких концентрациях. Важным преимуществом подхода, является высокий коэффициент концентрации объема к поверхности кристаллизации образца из-за большого объема полостей внутри эластомерной структуры [445]. Однако этот метод обычно требует большего количества механических операций, чем другие способы фокусировки образца, представленные ниже. Например, устройство нужно монтировать/демонтировать при каждом новом эксперименте.

1.4.1.2 Концентрирование на поверхности MALDI мишени, функционализированной гидрофобными покрытиями

Применимость целевых покрытий в биомолекулярном MALDI MS анализе достаточно давно вызывает интерес исследователей [446]. Предварительное концентрирование проб на MALDI мишенях с помощью покрытий основано на общих принципах поведения жидкости на модифицированных поверхностях [447]. В то время как гидрофобность долгое время была наиболее важным свойством покрытия, недавно исследователи представили информацию об омнифобных поверхностях, которые отталкивают не только воду, но и органические растворители [448,449].

Одним из первых и до сих пор используемых способов сообщения мишени гидрофобных свойств является нанесение на поверхность парафиновой восковой пленки (Parafilm) или слоя политетрафторэтиленов. Такое покрытие не только позволяет концентрировать образец и формировать однородные пятна образца, но и способствует повышению чувствительности и солеустойчивости [450,451]. Интересный эффект был получен при использовании в качестве гидрофобного покрытия антигравийной полиуретановой пленки «3M Scotchgard» [452]. При нанесении образца на модифицированную поверхность исследователи отметили значительное уменьшение размера пятна, улучшение распределения кристаллов, а также гомогенность сокристаллизации для некоторых протестированных матриц. Как и ожидалось, повышение чувствительности анализа очень хорошо коррелировало с уменьшением размера пятна. При этом пленка Scotchgard не увеличивала фон и не вызывала химических помех в спектре. После удаления поверхностного слоя такая мишень легко очищалась, в то время как в случае некоторых коммерческих многоцелевых фокусирующих пластин жесткая процедура очистки чаще всего повреждает слой покрытия. В целом метод представлен как недорогая и надежная альтернатива коммерческим MALDI мишеням с гидрофобным покрытием. Планшеты, покрытые минеральным маслом, глицерином и вазелином, также могут использоваться в качестве экономичной альтернативы для фокусировки образцов с целью MALDI MS анализа, в том числе для высокопроизводительного анализа пептидов [453]. Основными преимуществами таких подходов являются простота и низкая стоимость, а общий недостаток заключается в слабом контроле над размером пятна и точным расположением пробы в пределах ячейки мишени.

Для возможности контроля размера пятна образца и его точного места расположения в пределах ячейки мишени был предложен способ комбинирования гидрофобных (омнифобных) и гидрофильных свойств покрытий. Было показано, что при нанесении образца на гидрофильную область, окруженную покрытием, отталкивающим растворители, позволяет проводить объемно-поверхностную концентрацию аналитов из жидких проб [454]. После нанесения образца образуется капля, которая из-за испарения растворителя сжимается до размеров гидрофильной области ячейки мишени, где, затем, и происходит кристаллизация. Благодаря отталкивающим свойствам покрытия, присутствующего в прилегающей области, жидкий образец, приготовленный в любом из обычно используемых растворителей, не растекается по большой площади мишени. Углы смачивания капель жидкости, нанесенных на такие поверхности, обычно выше, чем на стандартных пластинах. Следовательно, можно загрузить больший объем образца, не занимая большую площадь поверхности ячейки. Однако объемы загрузки обычно на порядок ниже, чем при использовании эластомерного устройства, прикрепленного к пластине.

Этот подход стал основой для ряда коммерческих продуктов, и, например, уже реализован компанией Bruker Daltonics в виде мишеней «AnchorChip» [455]. Многоцелевой AnchorChip представляет собой MALDI мишень из нержавеющей стали, покрытую омнифобным веществом, которое отталкивает как водные, так и некоторые органические растворы. Пластинка состоит из множества непокрытых пятен (якорей) с диаметром около 0,2 мм.

Альтернативой мишеням с гидрофобным покрытием являются мишени с микроструктурированной поверхностью (макропористый кремний), которые могут быть изготовлены, например, с помощью технологии протонной пучковой литографии. Было показано, что такие планшеты позволяют идентифицировать 5 фмоль гидролизата алкогольдегидрогеназы, сконцентрированного на этом планшете, из 5 мл разбавленного образца [456].

1.4.1.3 Концентрирование с помощью микроконструированных мишений

Метод основан на использовании мишеней, поверхность которых представляет собой множество микроскопических углублений (нановиал) [457,458].

Одним из основных преимуществ таких мишений является максимизация аналитической производительности, было показано, что плотность распределения нановиал может достигать 165 на см² [459]. Отмечено, что путем многократных капельных напылений разбавленных растворов проб в каждый нанофлакон можно достичь повышеннго содержания анализируемого вещества на поверхности мишени, что в последующем приводит к увеличению интенсивности сигнала аналита при MALDI MS анализе.

Также известны работы, в которых нановиалы заполняются функционализированными микрогранулами (например, с привитой обращенной фазой), предварительно проинкубированных с образцом [460]. Такой подход позволяет свести к минимуму количество переносов образца, что значительно снижает потери аналита [461].

1.4.2 Очистка образцов в формате «лаборатория на мишени»

МALDI MS анализ, как правило, устойчив ко многим буферным солям, реагентам и другим соединениям, которые могут присутствовать в образцах [462]. Однако, как и в других типах масс-спектрометрии, может наблюдаться подавление сигналов ионов. Это часто происходит, когда образцы содержат ионизируемые частицы, отличные от аналита. Избыточное присутствие солей также может значительно затруднить MALDI MS анализ. Кроме того, зачастую присутствие солей в образце приводит к сложностям в интерпретации полученных масс-спектрометрических данных, так как в масс-спектре регистрируются сигналы как протонированных, так и катионных форм одних и тех же соединений [463]. Следовательно, очистка и, в частности, обессоливание образов перед анализом непосредственно на мишени могут значительно упростить работу исследователя.

За последние годы было предложено несколько способов создания материалов для функционализации поверхности мишени, подходящих для очистки образцов. Так было показано, что самособирающиеся монослои и ультратонкие полимерные пленки являются универсальными платформами для очистки образцов [464]. Кроме того, для этих целей был успешно использован силилированный окисленный пористый кремний

[465,466]. Авторы работы [467] описали новый протокол для быстрого и автоматического обессоливания на планшете и концентрации пептидов для 2D гель-электрофореза с MALDI MS анализом. Модифицирование ячеек мишени для обессоливания включало нанесение раствора гидрофобного полимера и несколько дериватизаций. Соответственно, после нанесения образца на ячейку (центральное гидрофобное пятно) целевые пептиды концентрировались в центре пятна. После высушивания образца и добавления раствора матрицы, повторно растворенные соли заново кристаллизовались уже за пределами области концентрирования пептидов. Также был предложен метод самообессоливания и обогащения *in situ* без отмывки образца перед анализом на основе сополимера, включающего в себя как гидрофильные, так и гидрофобные домены, который позволил отделять соли и концентрировать пептиды [468]. Отдельно можно отметить метод очистки образцов на мишени, основанный на электросмачивании на диэлектрике, в формате микрофлюидного устройства [469].

1.4.3 Экстракция на поверхности MALDI мишени

Экстракция аналитов перед (MA)LDI MS анализом может относиться к различным этапам пробоподготовки. С одной стороны, экстракцию на мишени можно использовать для неспецифичного извлечения аналита из биологического образца для улучшения его сокристаллизации с матрицей, а с другой – для специфичного выделения аналита с целью повышения чувствительности анализа [470].

Экстракция на мишени может осуществляться при задействовании метода поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации. В этом режиме белковая смесь наносится на химически модифицированную поверхность с последующим селективным связыванием белков с поверхностью [471]. Функционализированные поверхности мишени могут содержать гидрофильные, гидрофобные, катионообменные, анионообменные, ферментные, аффинные и другие активные центры на органических и неорганических покрытиях [472], обладая функциями, не связанными напрямую с процессом LDI.

Чаще всего экстракцию на поверхности мишени проводят в формате твердофазной микроэкстракции [473]. Однако известны работы, например [474], где представлена процедура жидкостно-жидкостной экстракции для быстрой подготовки целевых образцов, которая может быть использована при MS-анализе белков и пептидов при пикомолярных концентрациях. Метод основан на распределении гидрофильных и гидрофобных пептидов между несмешивающимися водной и органической фазами с последующим переносом одной из фаз на соседнюю ячейку мишени.

Особый интерес представляют методы селективной и специфичной экстракции, реализованные в формате «лаборатория на мишени». Относительно недавно был предложен способ экстракции гликозилированных пептидов из гидролизатов белков. Для этого на поверхность мишени был иммобилизован ряд лектинов. Избирательное связывание гликопептидов с такой стационарной фазой позволило избавиться от всех остальных компонентов смеси [475]. Иммобилизация IgG или других белковых соединений позволяет проводить экстракцию по принципу аффинной хроматографии. Например, такой подход был использован для определения белка A в лизате клеток *Staphylococcus аureus*.

1.4.4 Металл-аффинная хроматография в формате «лаборатория на мишени»

Чаще всего экстракция в формате «лаборатория на мишени» используется для специфичного извлечения из многокомпонентного образца фосфорилированных пептидов методом металл-аффинной хроматографии.

Предлагаемые способы модификации поверхности мишени металл-аффинными сорбентами достаточно разнообразны. Однако большая часть исследований посвящена возможности нанесения на твердую подложку сорбентов на основе частиц оксидов металлов. Наночастицы обладают огромным потенциалом как металл-аффинные сорбенты, особенно при необходимости экстракции следовых количеств аналита из сложного образца. Соответственно, достаточно большая часть работ по модификации поверхности предлагает разнообразные методы нанесения именно наночастиц.

Часто для модификации поверхности используют оксиды титана и циркония, традиционно используемые в качестве сорбентов в фосфопротеомике [476,477]. Чаще всего для этих целей мишень покрывают тонким слоем этих оксидов. Так, в работе [478] поверхность стальных пластин модифицировали оксидами циркония, титана, гафния, применяя метод реактивного осаждения. Предварительно отполированные пластины подвергались воздействию кислородной плазмы. Нанесение наночастиц на поверхность происходило в ходе осаждения ионов из раствора, содержащего алкоголяты металлов, в процессе электрораспыления на только что обработанную плазмой поверхность (метод реактивного осаждения). При этом использовали установку, совмещающую методы плазменной обработки поверхности и электрораспыления. Процесс занимал от 1,5 до 4

79

часов, при этом увеличение продолжительности процесса нанесения увеличивало эффективность активной поверхности. В работе [479] также был рассмотрен метод модификации поверхности стальной пластины, при котором обработанную плазмой пластину помещали в установку электрораспыления при атмосферном давлении (Рисунок 13).



Рисунок 13 – Общая схема процесса электрораспыления при атмосферном давлении [479]. 1 – Высоковольтный источник питания (3 кВ) с заземлением; 2 – капилляр для электрораспыления; 3 – нагревательный блок; 4 – шприцевой насос, заполненный раствором алкоголята металла; 5 – MALDI мишень

При этом поверхность пластины требовала нагрева до температуры 170-200°С для обеспечения адгезии оксида металла к поверхности нержавеющей стали. Данный метод не позволил увеличить эффективность обогащения при увеличении длительности процесса осаждения в отличие от метода реактивного осаждения.

В работе [480] для модификации мишени использовали электрораспыление раствора, содержащего алкоголяты циркония и титана, через нагреваемую до 120°С трубку с использованием азота в качестве распыляющего газа. В результате нагрева происходило разложение алкоголятов до диоксидов, которые проходили сквозь сопло и попадали на MALDI мишень, используемую в качестве собирающего электрода.

Некоторые оксиды металлов так же могут иметь свойства неорганической матрицы. Так, порошки оксидов металлов, иммобилизированные в полимерной матрице, применяются в качестве покрытий поверхности в методе масс-спектрометрии с активируемой поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией (SALDI MS) [481]. Некоторые из таких покрытий могут быть применены и для металл-аффинного обогащения проб. Но, в случае упрощения подхода по иммобилизации оксидов металлов на MALDI мишенях, например, с использованием метода спекания частиц оксидов на ее поверхности, отсутствует возможность контроля характеристики структур полученных пятен [482].

Таким образом, электрораспыление наночастиц оксидов металлов на твердую подложку является достаточно популярным методом для модификации мишеней. Однако такой подход имеет свои недостатки. Методы на основе электрораспыления требуют высокотехнологичного оборудования (электрораспылительный узел и т.п.), часто необходимо применение высоких температур. При этом далеко не всегда удается обеспечить высокий уровень адгезии наночастиц к подложке, что может приводить к загрязнению прибора при дальнейшем анализе.

Для того чтобы решить перечисленные выше проблемы были предложены альтернативные подходы. Так, в работе [483] MALDI мишень сначала покрывали полимером, чтобы затем нанести на поверхность мишени TiO₂, который образовывал с полимером связи, препятствующие отслаиванию частиц сорбента (Рисунок 14). С применением полимеров в работе [484] модифицировали поверхность оксидами титана и железа.

Покрытие поверхности тонкой пленкой частиц TiO₂ было получено способом атомного осаждения с последующим модифицированием пленки триметоксисиланом для увеличения гидрофильности поверхности [485].



Рисунок 14 – Схема процесса модификации поверхности мишени TiO₂ с полидиметилсилоксаном (PDMS) [483]

Кроме того, была предложена технология нанесения на поверхность MALDI мишени наностержней REPO₄ (RE = La, Nd и Eu) [486].

Также был предложен метод получения одноразовых мишеней из алюминиевой фольги, на которую наночастицы TiO₂ наносились с помощью трафаретной печати с последующим запеканием (Рисунок 15) [487].



Рисунок 15 – Схематическая иллюстрация монтажа алюминиевой (Al) фольги на мишени (a), Al-фольга (b), TiO₂-Al фольга (c), TiO₂-Al фольга с ротогравюрной печатью (d), процесс ротогравюрной печати (e) [487]

Но такие одноразовые пластины необходимо закрепить на поверхности подходящей MALDI подложки для загрузки пластины в прибор. Применение способа иммобилизации к поверхности мишени, предварительно покрытой золотом, комплексов Fe(III) с нитрилотриацетатом (NTA) описано в работе [488].

Были выпущены и коммерческие MALDI мишени для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом, так называемые аффинные чипы «ProteinChip» (Ciphergen Biosystems, США), содержащие оксид циркония и диоксид титана, иммобилизированные на модифицированную полимером поверхность.

Стоит отметить, что каждый из перечисленных способов функционализации поверхности мишени металл-аффинными сорбентами имеет как значительные преимущества, так и некоторые недостатки. К общим недостаткам можно отнести, как сложность самого процесса функционализации поверхности, так и затруднения с повторным использованием мишени из-за ее необратимого повреждения. 1.4.5 Исследование межмолекулярных взаимодействий на поверхности MALDI мишени

Исследования биомолекулярных взаимодействий на мишенях обычно основаны на концепции так называемых «биочипов». Биочипы представляют собой наборы иммобилизованных пептидов, белков, антител или других молекул, на которые наносят раствор, содержащий предполагаемые объекты исследования. Высокая производительность MALDI MS анализа позволяет параллельно проводить множество исследований по поиску соединений, способных вступать в межмолекулярные взаимодействия. При этом масс-спектрометрия не требует использования хромогенов, радиоактивных или флуоресцентных меток и позволяет получать информацию о структурах исследуемых соединений. Это особенно важно при скрининге многокомпонентных биологических образцов, когда требуется идентификация веществ, вступающих во взаимодействие с покрытием мишени [489,490]. Эти достоинства метода стали причиной появления работ, посвященных повышению чувствительности подхода. Было предложено более низкую чувствительность масс-спектрометрии по сравнению с методами, основанными на флуоресценции компенсировать за счет увеличения функционализированной поверхности, например, за счет использования пористых или концентрирующих покрытий [491].

К одним из интереснейших задач, находящих решение при реализации формата «лаборатория на мишени», можно отнести скринниг низкомолекулярных соединений, способных связываться с белковыми молекулами. Так в работе [492], бычий сывороточный альбумин был иммобилизован на поверхности пористого кремния для дальнейшей идентификации низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с этим белком. Это приложение имеет очень высокую практическую значимость, учитывая, что молекулярная масса значительной части фармацевтических препаратов не превышает 600 Да, и оценка их сродства к белкам-мишеням может быть чрезвычайно важной в процессе разработки лекарств.

1.4.6 Ферментативные реакции на поверхности MALDI мишени

В литературе можно найти два основных направления применения ферментов в формате «лаборатория на мишени». В первом случае ферменты применяют для протеолиза белков непосредственно на поверхности мишени с целью их дальнейшей идентификации [493,494]. Во втором – проводят изучение активности и функций самих ферментов [462,495]. В дополнение к высокой чувствительности и производительности MALDI MS анализа, протеолиз на мишени представляет собой мощный аналитический инструмент для идентификации белков. Еще совсем недавно огромная часть протеомных исследований предполагала использование такого метода предварительного разделения белков, как гель-электрофорез в сочетании с электроблоттингом. И было показано, что поливинилиденфторидная мембрана, на которую перенесены белки после разделения может быть прикреплена к поверхности мишени, а ферментативное расщепление проведено непосредственно в ней для дальнейшей масс-спектрометрической идентификации [496]. Также возможно проведение протеолиза в растворе, помещенном на ячейку мишени после хроматографического разделения белков [497,498].

Интеграция стадий пробоподготовки на MALDI мишень снижает необходимость использования отдельных расходных материалов, таких как микропробирки или планшеты для микротитрования, и сокращает объем манипуляций с образцами и потребление дорогостоящих химикатов (например, ферментов). Для большего повышения производительности могут быть использованы мишени с предварительно фукнкционализированной поверхностью, например состоящей из нановиал, или обладающей концентрирующими свойствами [458,499,500]. Кроме того, были предложены способы автоматизации протокола ферментативного гидролиза белков на поверхности мишени при использовании хроматографических методов [501,502]. Отдельного внимания заслуживает подход, предлагающий иммобилизовывать фермент на поверхность магнитных наносфер. Такой подход отличается очень низким уровнем автолиза фермента, а магнитные свойства частиц, позволяют удалять фермент перед анализом, тем самым обеспечивая высокую гомогенность совместной кристаллизации матрицы и образца [503].

Ферменты и их субстраты также могут быть иммобилизованы на поверхность мишени, что имеет ряд преимуществ, в том числе легкое разделение реагентов и повторное использование фермента для нескольких реакционных циклов [504,505]. Большим преимуществом иммобилизации протеаз на ячейках мишени является снижение процессов автолиза, поэтому можно использовать высокое соотношение фермент/субстрат для ускорения гидролиза.

Было показано, что трипсин можно легко иммобилизовать на функционализированную пористым кремнием поверхность мишени, как плоскую, так и состоящую из нановиал [506,507]. Была продемонстрирована возможность проводить иммобилизацию фермента на материалы, обеспечивающие также концентрирование образца, например за счет гидрофобных свойств покрытия [508], или на поверхность эластомерного устройства, закрепленного на мишени [509].

В случае исследования активности ферментов на поверхность мишени иммобилизуют субстрат [510,511]. Существенным преимуществом иммобилизации субстрата является то, что тысячи мешающих соединений, присутствующих в биологическом образце, могут быть легко удалены перед MALDI MS анализом, что облегчает скрининг активности сложных биологических образцов. Так, например, пептиды, меченные акриламидом, иммобилизовали на поверхности гидрогеля для изучения ферментативной активности киназы с последующей детекцией фосфорилированных пептидов [512], которые отщеплялись от подложки под воздействием лазера.

Интересным подходом к проведению ферментативных реакций на планшете является интеграция микрофлюидных технологий на MALDI мишени [513]. Одним из первых применений фактической интеграции микрофлюидной технологии было проведение ферментативного гидролиза биомолекул с целью их секвенирования [514]. При использовании микрофлюидного устройства, основанного на электросмачивании на диэлектрике, интегрированного на мишень, был проведен ряд работ по изучению кинетики ферментативных реакций [515,516].

Таким образом, использование MALDI мишеней для ферментативных реакций, включая расщепление и анализ ферментов, может значительно повышать эффективность аналитического процесса. Повышая аналитическую производительность и уменьшая масштаб ферментных анализов, формат «лаборатория на мишени» может еще больше увеличить потенциал биоаналитической платформы на основе MALDI MS.

1.4.7 Химические реакции и дериватизация на поверхности MALDI мишени

Проведение химических реакций на поверхности MALDI мишени позволяет быстро и надежно идентифицировать продукты реакций. Причем, формат «лаборатория на мишени» позволяет проводить, как одностадийные, так и многостадийные процессы. Известны случаи, когда формат «лаборатория на мишени» использовали для восстановления дисульфидных связей с целью их локализации в белковой молекуле [517].

Большой интерес вызывают подходы, основанные на предварительной функционализации поверхности мишени самоорганизующимися монослоями. Этот метод обладает типичными преимуществами твердофазного синтеза, такими как высокая эффективность, простота очистки и минимальный риск взаимодействия между молекулами, иммобилизованными на поверхности, даже при относительно высоких концентрациях [518]. Примечательно, что каждая стадия реакции, при добавлении реагентов, может быть непосредственно охарактеризована с помощью метода MALDI MS [489].

Особый интерес представляют реакции дериватизации, проводимые непосредственно на мишени и позволяющие увеличить выход ионов аналитов при MALDI MS анализе [519]. Так был предложен протокол быстрой дериватизации на мишени для повышения чувствительности анализа карбонильных соединений после их взаимодействия с реакционноспособной матрицей [520]. Подобный протокол применяли для дериватизации глюкокортикоидов с образованием соответствующих гидразонов на ячейке мишени.

В последние годы одним из основных направлений использования MALDI MS является молекулярная визуализация, когда анализ целевых компонентов проводят непосредственно с поверхности ткани, помещенной на мишень [521]. В этом случае дериватизация позволяет обнаружить соединения, которые не были бы детектированы при обычном протоколе молекулярной визуализации [522], причем для улучшения охвата метаболитов можно параллельно проводить несколько химических дериватизаций [523]. Дериватизация 4-гидрокси-3-метоксикоричным альдегидом использовалась для повышения чувствительности и специфичности обнаружения метаболитов эндогенных аминов, таких как аминокислоты и нейротрансмиттеры в тканях животных [524]. Недавно была представлена новая простая и эффективная методика, быстрой химической дериватизации, катализированной наносекундной фотохимической реакцией, позволяющая проводить прямой MALDI MS анализ первичных аминосодержащих метаболитов с повышенной чувствительностью [525]. Соответственно, химическая дериватизация на тканях позволяет повысить эффективность десорбции/ионизации ряда эндогенных соединений, что имеет огромное значение при исследовании биологических путей метаболизма многоклеточных организмов.

Достаточно большое количество работ посвящено дериватизации, когда в качестве мишени используют пластину для тонкослойной хроматографии (TLC). Стоит отметить, что MALDI MS анализ непосредственно с пластины TLC сам по себе достаточно востребован при разделении низкомолекулярных соединений [526], пептидов [527] или белков [528], особенно, как средство идентификации продуктов органического синтеза [529,530]. Однако возможность проведения дериватизации слабо ионизируемых соединений значительно расширяет применимость этого подхода [531]. Так, например, для TLC/MALDI MS была использована ранее разработанная методика [532] дериватизации спиртов. Агенты дериватизации, включая 3-бромпропионилхлорид и пиридин, наносили непосредственно на зоны элюирования аналитов на проявленных TLC пластинах [533]. Аналогичный подход был использован для TLC/MALDI MS анализа первичных аминов [534]. В этом случае трис(2,6-диметоксифенил)метилийгексафторфосфат использовали для дериватизации с получением циклических акридин-подобных производных с фиксированным зарядом. Этот же агент дериватизации использовался при разработке метода анализа аминокислот [535]. Производные α -аминокислот элиминировали молекулу углекислого газа под действием лазерного импульса, но образующиеся ионы давали интенсивные сигналы в зарегистрированных MALDI масс-спектрах.

1.4.8 Многофункциональное применение MALDI мишеней в формате «лаборатория на мишени»

Как показано выше, MALDI мишень может использоваться в различных целях, включая предварительное концентрирование аналитов или экстракцию. На самом деле зачастую разделить эти функции достаточно затруднительно. Высокоинтегрированные процедуры, представленные в работах [536,537], включают множество стадий, среди которых дефосфорилирование фосфопептидов, TLC-разделение смеси гликосфинголипидов, визуализацию с помощью множественного иммуноокрашивания и структурную характерзацию с помощью MALDI MS непосредственно на пластине для TLC. С другой стороны, эластомерное устройство, устанавливаемое на мишень, может использоваться не только для концентрирования аналита, но также для сбора фракций, расщепления белков и обессоливания [445]. Кроме того, несколько этапов пробоподготовки на планшете теперь поддерживаются соответствующими функциями современных роботов для пробоподготовки.

Можно сделать заключение, что в последние годы интерес к разработкам способов функционализации поверхности мишени и различным вариантам реализации формата «лаборатория на мишени» только растет, а MALDI мишени, выполняющие несколько функций, становятся все более популярными. Кроме того, коммерциализация одноразовых функциональных мишеней гарантирует повышенную надежность подхода «лаборатория на мишени».

1.5. Монослои Ленгмюра

Монослои Ленгмюра, пленки нерастворимых поверхностно-активных веществ (ПАВ), получаемые на границе раздела фаз известны уже более 100 лет. До 80-х годов XX века их изучали в основном по изотерме поверхностного давления (давление в монослое в зависимости от площади, приходящейся на одну молекулу в монослое) или по изменению поверхностного потенциала в зависимости от сжатия монослоя [538,539]. Это позволило определить их структуру и термодинамические свойства. В 1980-х годах в этой области произошел настоящий прорыв благодаря разработке новых методов характеризации этих систем. Различные методы микроскопии [540] спектроскопии [541] и рассеяния [542] позволили определять структуру пленок, полученных при разных внешних условиях (поверхностное давление, температура и рН водного субстрата), их свойства [543] и, следовательно, оценивать их полезность во многих областях науки и техники.

Особый интерес представляют монослои насыщенных FFA и их солей. Это связано с простотой их структуры: на один длинный углеводородный неполярный «хвост» приходится одна полярная «голова». Такая структура позволяет для нерастворимых предельных длинноцепочечных представителей гомологического ряда насыщенных FFA образовывать на поверхности водной субфазы упорядоченные мономолекулярные слои (монослои Ленгмюра). Такие же монослои образуют не только сами FFA, но и их соли. Важно отметить, что стандартная процедура образования монослоев солей жирных кислот заключается не в нанесении раствора соли на поверхость водной субфазы, а в образовании монослоя соли на границе раздела фаз посредством реакции монослоя FFA, полученного путем нанесения раствора FFA в н-гексане на водную субфазу, с ионами металлов, находящимися в водной фазе. В 80-90 годах XX века при исследовании структуры образующихся фаз методом рассеяния рентгеновских лучей было выявлено, что фазы представляют собой двумерные решетки, отличающиеся друг от друга углами наклона гидрофобных частей молекулы и упорядочением расположения углеводородных хвостов [544]. Было показано, что «голова» оказывается погруженной в водную фазу, в то время, как углеводородная часть расположена на поверхности, хотя точное местоположение карбоксильной группы относительно поверхности воды в то время определено не было. Такая конфигурация представляется энергетически выгодной, если принять во внимание гидрофильное взаимодействие между «головой» и водой и гидрофобное между «хвостами» [545]. При этом наличие специфичных сил отталкивания между молекулами воды и неполярной частью не предполагается, и гидрофобный эффект является следствием вытеснения углеводородной части молекулами воды.

По свойствам гидрофильных групп дифильные соединения можно подразделить на пять типов:

1. анионные (анионактивные) ПАВ. Гидрофильные «головы» анионоактивных ПАВ способны диссоциировать при погружении в водную фазу с образованием поверхностно-активного аниона (алкилсульфаты, алкиларилсульфонаты, жирные кислоты, их соли и пр.);

2. катионные (катионактивные) ПАВ, способные в растворе ионизироваться с образованием поверхностно-активных катионов (алифатические и ароматические амины и их соли, четвертичные аммонийные соли, соли пиридиновых оснований и др.);

3. амфотерные (амфолитные) ПАВ, содержащие несколько полярных групп, и в зависимости от внешних условий (значение pH в водной субфазе) способные в растворе образовывать как поверхностно-активные катионы, так и анионы (алкиламинокарбоновые кислоты, ароматические аминосульфокислоты, белки, нуклеиновые кислоты и др.);

4. цвиттерионные ПАВ, полярные группы которых являются цвиттерионами (алкилбетаины, алкилсульфобетаины и производные имидазолина и др.);

5. неионные (неионогенные) ПАВ не способные к диссоциации в водных растворах (первичные и вторичные жирные спирты, алкилфенолы, проксанолы, глицериды, глюкозиды, сахариды и др.).

Особый интерес представляют монослои жирных кислот и их солей, отноящиеся к анионактивным ПАВ. При погружении в водную фазу карбоксильная группа диссоциированиет с образованием какрбоксилат-иона. При повышении уровня pH доля диссоциированной формы увеличивается, при этом за счет электростатического отталкивания заряженных частиц [R-COO]⁻ монослой расширяется. Соответственно, FFA способны вступать в реакции обмена с растворенными в водной фазе катионами металлов с образованием нерастворимых солей. Зачастую увеличение содержания металла в монослое влечет за собой уменьшение приходящейся на молекулу площади, за исключением случаев сорбции полиядерных комплексов гидратированого металла [Me_p(OH)_q]ⁿ⁺.

При взаимодействии соли двухвалентного металла и жирной кислоты, например стеариновой, возможно образование минимум двух форм: дистеарат MeSt₂ и моностеарат Me(OH)St металла. Первая форма характерна для щелочноземельных и некоторых двухвалентных переходных металлов. При этом уплотнение монослоя жирной кислоты происходит за счет связывания двух молекул в стехиометрическое соединение. Ионы гидролизующихся металлов образуют вторую форму или соли более сложного состава. Они вызывают расширение монослоя. Для металлов, ионы которых не подвергаются гидролизу вплоть до pH 10-11 влияние аниона, находящегося в растворе-субфазе на состав монослоев отсутствует. Монослои, полученные в щелочной области, содержащие ионы гидролизующихся металлов, могут адсорбировать анионы из раствора.

По классификации Адамсона [546] в зависимости от площади поверхности водной субфазы и количества амфифильного вещества (т.е. площади, приходящейся на одну молекулу монослоя) монослои можно подразделить на три типа [547]:

1. газообразные – при низкой поверхностной концентрации амфифильного соединения монослой на поверхности не является сплошным, «хвосты» на поверхности водной субфазы ориентированы произвольно, и молекулы практически не вступают во взаимодействие друг с другом. По аналогии с газовой фазой такой тип монослоя относят к двумерному газу;

2. жидкие (растянутые и конденсированные) – молекулы дифильного соединения расположены достаточно близко друг другу для межмолекулярного взаимодействия, однако все еще либо хаотически ориентированы, либо упорядочены частично. Такую фазу можно назвать двумерной жидкостью;

3. твердые – структуры ориентационно упорядоченные, способные к сохранению формы и перемещению в плоскости, такую фазу относят к конденсированному состоянию (двумерным жидким кристаллам или кристаллическим структурам).

При дальнейшеем увеличении поверхностного давления новой фазы не образуется. Твердый монослой в результате коллапсирования [548] из двумерной структуры перейдет либо в неупорядоченную трехмерную, либо относительно регулярную полиструктуру за счет наслаивания отдельных участков монослоя друг на друга.

Процесс коллапса может быть описан в контексте классической теории «нуклеации-роста-столкновения» (NGC), которая была введена для нерастворимых монослоев [549]. Теория NGC предполагает, что образование и последующий рост трехмерных центров является результатом перекрытия растущего ядра на последующих этапах процесса. Поэтому изменение площади со временем может быть выражено согласно формуле (8):

$$\frac{A(t)}{A_0} = \frac{A_{\infty}}{A_0} + \frac{(A_0 - A_{\infty})}{A_0} \exp\left[-k(t - t_{ind})^n\right]$$
(8)

где A₀ и A_∞ обозначают значения молекулярной площади в начальное и бесконечное время, соответственно; k является константой; t_{ind} является временем индукции; n является целым или полуцелым числом, которое зависит от механизма нуклеации [550].

Другая теория, разработанная группой Ли, объясняющая возможную корреляцию между морфологией монослоя и коллапсированными структурами [551], предполагает влияние на топографию разницы высот на границах доменов двух фаз, обусловленной разницей в эластичности и жесткости ПАВ в монослое. Складчатые и везикулярные структуры в монослоях (Рисунок 16) закладываются в основном на границе между жидкой растянутой фазой и доменами жидкой конденсированной фазы. В соответствии с этой теорией предполагается, что образование складчатых структур характерно для ПАВ, образующих твердые монослои, и происходит при высоком поверхностном давлении. При сжатии за пределами стабильного порога, как показано на Рисунке 16А, монослой может выступать в воздух, а затем изгибаться и складываться, в конечном итоге образуя многослойную структуру. Менее жесткий монослой, при таких условиях, возможно, разрушается раньше, образуя везикулярные структуры [552]. Монослой вдавливается в жидкую субфазу, где складывается в плоскую двухслойную структуру, которая изгибается в сторону монослоя, временно образуя полувезикул, и затем отщепляется в виде пузырька (Рисунок 16В).

Первый тип коллапсирования характерен для монослоев, образованных FA и их солями [553-555]. При высоких давлениях FA образуют достаточно жесткие пленки, и на формирование коллапсированной структуры оказывают влияние несколько факторов, таких как скорость сжатия, температура, уровень pH водной субфазы, концентрация соли и др [556]. При коллапсировании монослои на основе FA необратимо разрушаются, что приводит к образованию трещин и складок, имеющих различные топографии (шероховатая поверхность, анизотропные трещины и пр. [557]). На начальной стадии коллапса в монослое образуются трехмерные зародыши точечного типа (Рисунок 17 А,В), которые постепенно увеличиваются, чтобы сформировать трехмерные структуры высо-

кой плотности (Рисунок 17 С,D). На изотерме переход от 2D структуры к 3D отражается либо внезапным снижением, либо постоянным значением давления при уменьшении площади (Рисунок 17 Е).



Рисунок 16 – Схемы двух распространенных механизмов коллапса монослоев:





Рисунок 17 – Коллапсирование монослоя стеариновой кислоты. А-D – изображения монослоя, соответствующие точкам I-IV на изотерме сжатия (E) [553]

Экспериментально самый первый механизм коллапса был предложен в работе [558] на основе электронных микрофотографий монослойных пленок нгексатриаконтановой кислоты (Рисунок 18). В этой системе монослой поднимается с поверхности вдоль линии разрыва при увеличении давления. Затем монослой формирует складу с обращением полярной поверхности внутрь, которая, падая, образует длинные плоские структуры толщиной в две молекулы, как показано на Рисунке 18А, что приводит к образованию складчатых структур толщиной более чем в две молекулы (Рисунок 18В).



Рисунок 18 – Первая схема механизма коллапса монослоя, предложенная Е. Никомаровым [558]

На морфологию и структуру коллапсированного монослоя оказывает огромное влияние состав водной субфазы, на которой происходит образование монослоя, и, в первую очередь, значение pH [555] (Рисунок 19А). В случае стеариновой кислоты при низком значении pH все карбоксильные группы являются нейтральными и могут образовывать обширные водородные связи, как между собой, так и с и молекулами растворителя. При коллапсировании монослой с нейтрально заряженной поверхностью имеет тенденцию к слипанию при сжатии, что обуславливает образование трехслойной структуры как показано на схематической модели (Рисунок 19В) [559]. Однако когда значения pH становятся выше 5, образование трехслойных структур затрудняется, а при pH выше 6 вид изотермы указывает, что происходит прямой коллапс, в результате чего образуются трехмерные кристаллиты. Эти данные предполагают, что присутствие небольшой доли ионизированных молекул достаточно для предотвращения одновременного образования трехслойных структур, возможно, из-за притяжения катионов в поверхностном слое, которые генерируют кулоновские силы, предотвращающие образование молекулярного двойного слоя, способного скользить по поверхности монослоя. Так было показано, что в присутствии 1 ммоль ионов Cd^{2+} даже при нулевом поверхностном давлении монослой лигноцериновой кислоты содержит домены спонтанно собранных молекул (Рисунок 19 С-D).



Рисунок 19 – Изотермы сжатия монослоев стеариновой кислоты при различных значениях pH (A); формы монослоев при различных значениях поверхностного давления (B);

фазово-контрастные изображения монослоя лигноцериновой кислоты при pH 7,0 и ну-

левом поверхностном давлении без и в присутсвии 1 ммоль ионов Cd²⁺,

соответственно (C,D) [559]

Авторы работы [560] показали, что величина давления коллапса, полученная из изотерм сжатия (π-А зависимости) монослоев 10,12-пентакозадииновой кислоты, изменяется линейно в зависимости от температуры и логарифма скорости сжатия (Рисунок 20).



Рисунок 20 – Изотермы сжатия монослоев 10,12-пентакозадииновой кислоты при различной температуре [560]

Кроме того, в работе [561] было проведено сравнение электроповерхностных свойств регулярных мультимолекулярных структур солей стеариновой кислоты, пленок Ленгмюра-Блоджетт (LBF), и структур, полученных в результате медленного коллапса монослоев стеаратов непосредственно на поверхности водной субфазы. Представляет интерес сравнение данных, полученных для двух различных по своей морфологии структур: регулярные LBF (метод потенциала течения) и частицы, полученные в результате медленного коллапса монослоя (метод микроэлектрофореза), которое показало, что для всех исследованных систем наблюдается совпадение зависимостей электрокинетического потенциала (ζ) от pH водной субфазы. Совпадение данных зависимостей для

двух столь различных структур, свидетельствует, что для коллапсированных структур образующаяся поверхность так же, как и в случае регулярных структур, близка к молекулярно гладкой.

Таким образом, можно сделать вывод, что регулярные монослои Ленгмюра на основе стеаратов металлов (FMe) представляют собой уникальные структуры. Пленки толщиной в одну молекулу, одна из поверхностей которых полностью состоит из атомов металлов, могут рассматриваться, наряду с нанодисперсными оксидами металлов, как это было представлено выше, как перспективные металл-аффинные сорбенты. Кроме того, высокий уровень адгезии монослоев стеаратов металлов к твердым подложкам делает их перспективным материалом для функционализации поверхности MALDI мишени для дальнейшей работы в формате «лаборатория на мишени». Соответственно, разработка новых специализированных высокопроизводительных инструментальных решений и аналитических подходов, интегрированных в формат «лаборатория на мишени», с использованием монослоев Ленгмюра и нанодисперсных оксидов металлов представляется перспективной и востребованной во многих областях науки и промышленности.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Синтез наночастиц оксидов металлов (MeOx)

Исходные вещества (нитраты Fe, Cu, Ni, Zr и карбамид) были растворены в 200 мл дистиллированной воды. Молярное отношение нитрат-анионов и карбамида составляло 2:1, при этом концентрация соответствующей соли составляла 0,1 моль/л. При получении диоксида циркония был добавлен нитрат иттрия в количестве 5 мол.% для стабилизации синтезируемой тетрагональной формы оксида циркония. Полученный раствор был подвергнут термообработке в бытовой микроволновой печи при мощности микроволнового излучения 800 Вт (2,45 ГГц) в течение 25 мин до полного прохождения реакции и удаления газообразных продуктов. Полученные продукты реакции трижды промывали дистиллированной водой и высушивали при 200°C в течение 5 ч. Затем оксиды разминали в агатовой ступке, ресуспендировали в дистиллированной воде и подвергали обработке (70 Вт, 40 кГц) в ультразвуковой ванне Branson 1510R-MTH (Branson Ultrasonics Corp., США) в течение 30 мин. Фракцию, представляющую собой суспензию устойчивую в течение 15 мин, отбирали и высушивали.

2.2 Определение удельной поверхности MeOx методом низкотемпературной адсорбции азота

Измерения площади и объема пор образцов оксидов металлов проводили методом низкотемпературной адсорбции азота на поромере ASAP-2010N (Micrometrics, CША). Величину удельной поверхности из полученных изотерм рассчитывали методом Брунауэра-Эммета-Теллера (ВЕТ). Расчет величины удельной поверхности ВЕТ-методом производили по результатам измерений в интервале относительных давлений $P/P_0 = 0,0-1,0$ с использованием ВЕТ-уравнения для полимолекулярной адсорбции пара. Расчет площади и объема пор образцов проводили методами Барретта-Джойнера-Галенды, Хорвата-Кавазое, методами функционала плотности и т-графика.

2.3 Определение электрокинетического потенциала и фазового состава МеОх

Электрокинетический потенциал (ξ-потенциал) измеряли методом микроэлектрофореза в растворе KCl с концентрацией 10⁻⁴ моль/л с использованием прибора Zetasizer NANO ZC (Malvern Panalytical, Великобритания) и рассчитывали по формуле Гельмгольца-Смолуховского без введения поправок.

Фазовый состав MeOx определяли методом рентгенофазового анализа (XRD) с использованием дифрактометра «MiniFlex II» (Rigaku Corporation, Япония).

2.4 Определение сорбционной емкости FeOx и ZrOx по пептиду SSNGHVYpEKLSSI

В микропробирку помещали 1 мг FeOx или ZrOx, промывали 100 мкл 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты (TFA), супернатант после центрифугирования 10 мин при 10000 об/мин отбрасывали. После этого в микропробирку с сорбентом добавляли 30 мкл раствора SSNGHVYpEKLSSI (концентрация 1 мг/мл) и 30 мкл 0,1% TFA и оставляли на 15 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Затем, супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 50 мкл 0,1% TFA для промывки, оставляли на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и супернатант отбирали и объединяли с несвязавшейся фракцией.

2.5 Определение сорбционной емкости CuOx и NiOx по глобину крысы

10 мг красителя Кумасси G-250 растворяли в 5 мл 96 % этанола, добавляли 10 мл 85% ортофосфорной кислоты, перемешивали, объем раствора доводили дистиллированной водой до 100 мл и отфильтровали через плотный бумажный фильтр. Для построения калибровочного графика стандартный раствор глобина крысы (120 мг/мл) растворяли в 20 мМ трис-буфере (pH 7,4), содержащем 10 мМ EDTA.

К 250 мкл раствора с различной концентрацией белка (0, 20, 40, 60, 80, 100 мкг/мл) добавляли 1,25 мл реактива Кумасси и перемешивали. Через 2 мин измеряли поглощение раствора при длине волны 595 нм против соответствующего контроля.

В микропробирки, каждая из которых содержала 58 мг CuOx или NiOx, добавляли 250 мкл раствора глобина крысы с различной концентрацией и перемешивали в течение 30 мин. Далее растворы центрифугировали и отбирали по 250 мкл супернатанта, к которому добавляли 1,25 мл реактива Бредфорд и измеряли поглощение при длине волны 595 нм против соответствующего контроля. Концентрацию белка, не связавшегося с сорбентом, рассчитывали по ранее построенному калибровочному графику. Величину адсорбции рассчитывали по формуле:

$$\Gamma = ((C_{\text{нач}} - C_{\text{конечн}}) \cdot V) / M \cdot m_{\text{сорбента}}, \qquad (9)$$

где Г – величина адсорбции (моль/г), С_{нач} – начальная концентрация белка (мкг/мл), С_{конечн} – концентрация белка в растворе после прохождения адсорбции (мкг/мл), V – объем пробы (0,25 мл), М – молекулярная масса белка (г/моль), m_{сорбента} – масса сорбента (мг).

2.6 Исследование устойчивости FMe и MeOx в различных растворителях

В предварительно взвешенную спиновую колонку помещали 100 дм² FMe или 30 мг MeOx. К сорбенту добавляли один из следующих растворителей:

– Растворители, используемые на стадии сорбции и промывки: 0,1% водный раствор трифторуксусной кислоты, 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, 2% водный раствор уксусной кислоты (выдерживали в течение 60 мин).

– Растворители, используемые на стадии десорбции: 5% водный раствор аммиака, 0,5% водный раствор пиперидина, 0,5% водный раствор триэтиламина, 100% ацетонитрил, 100% метанол, 100% этанол, 100% изопропанол (выдерживали в течение 15 мин).

– Растворители, предположительно разрушающие FMe: тетрахлорметан, н-гексан, минеральная кислота (выдерживали до видимого растворения FMe)

Затем колонку центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, промывали дистиллированной водой, сорбент высушивали и взвешивали.

2.7 Получение FMe

В качестве субфазы использовали 10⁻⁴ М водный раствор нитрата соответствующего металла объемом 1,5 л (для ванны размером 500 мм х 150 мм х 20 мм). На субфазу наносили 1 мл насыщенного раствора стеариновой кислоты (HSt) в н-гексане. Монослой оставляли на водной подложке на 2 мин для полного прохождения реакции солеобразования. Полученный монослой коллапсировали с использованием подвижных барьеров и при помощи плоского шпателя собирали для переноса в спиновую колонку или другое устройство, в зависимости от целей эксперимента.

2.8 Определение влажности FMe

В предварительно взвешенную спиновую колонку помещали 30 монослоев соответствующего FMe и с помощью центрифуги (15 сек, 3000 об/мин) отделяли лишнюю жидкость. Затем колонку взвешивали и по разности масс устанавливали массу влажного сорбента. Далее на колонку наносили ацетон в таком количестве, чтобы сорбент был погружен в слой ацетона полностью. С помощью центрифуги (15 сек, 5000 об/мин) ацетон отделяли, и колонку с сорбентом выдерживали в вакуумном эксикаторе в течение 30 мин до полного высыхания сорбента. Затем колонку взвешивали и устанавливали массу сухого сорбента.

2.9 Стандартизация FMe

По 100 монослоев FMe с минимальными потерями переносили в предварительно взвешенные микропробирки объемом 1,5 мл. При переносе с помощью фильтровальной бумаги максимально удаляли излишек жидкой фазы. Затем микропробирки помещали в вакуумный эксикатор на три дня (P=15 мм.рт.ст.). После чего микропробирки повторно взвешивали и по разнице определяли массу сорбента. Для каждого металла процедуру повторяли трижды.

2.10 Определение удельной поверхности FMe

С помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания) были измерены размеры частиц сорбентов. Значение удельной поверхности было рассчитано при условии, что полученные частицы не обладают пористостью.

Масса одной частицы:

$$m = \frac{4}{3} \pi r^{3} \rho, \qquad (10)$$

где p – плотность стеарата; r – радиус частицы, мм.

Для большинства стеаратов плотность лежит в интервале 1,01-1,08 г/мл.

Число частиц в 1 грамме:

$$n = \frac{3}{4}\pi r^3 \rho \quad . \tag{11}$$

Площадь поверхности 1 частицы:

$$S_1 = 4\pi r^2 \,. \tag{12}$$

(12)

Удельную поверхность определяли по формуле:

$$S_{y\partial} = \frac{S_1}{m} = \frac{4 \cdot \pi r^2}{\frac{4}{3} \cdot \pi r^3 \rho} = \frac{3}{r\rho} .$$
(13)

2.11 Определение электрокинетического потенциала FMe

В колбу объемом 50 мл помещали 15 монослоев (150 дм²) соответствующего FMe. При микроэлектрофоретических исследованиях регуляторами pH во всех случаях являлись растворы HCl и KOH. Дисперсию пленок получали в ультразвуковом диспергаторе при частоте 44 МГц в течение 3 мин. Измерения электрокинетического потенциала проводили с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания). В микропробирку помещали 2 монослоя (20 дм²) FFe или FLa, промывали 50 мкл ацетонитрила, микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, супернатант отбрасывали. Затем сорбент промывали 50 мкл 0,1% TFA, супернатант после центрифугирования 10 мин при 10000 об/мин также отбросили. После этого в микропробирку с сорбентом добавляли 30 мкл раствора SSNGHVYpEKLSSI (концентрация 1 мг/мл) и 30 мкл 0,1% TFA и оставляли на 15 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Затем, супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 50 мкл 0,1% TFA для промывки, оставляли на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали и объединяли с несвязавшейся фракцией.

2.13 Определение сорбционной емкости FCu и FNi по глобину крысы

10 мг красителя Кумасси G-250 растворяли в 5 мл 96 % этанола, добавляли 10 мл 85% ортофосфорной кислоты, перемешивали, объем раствора доводили дистиллированной водой до 100 мл и фильтровали через плотный бумажный фильтр. Для построения калибровочного графика стандартный раствор глобина крысы (120 мг/мл) растворяли в 20 мМ трис-буфере (pH 7,4), содержащем 10 мМ EDTA.

К 250 мкл раствора с различной концентрацией белка (0, 20, 40, 60, 80, 100 мкг/мл) добавляли 1,25 мл реактива Кумасси и перемешивали. Через 2 мин измеряли поглощение раствора при длине волны 595 нм против соответствующего контроля.

В микропробирки, каждая из которых содержала 5 монослоев (50 дм²) FCu или FNi, добавляли 250 мкл раствора глобина крысы с различной концентрацией и перемешивали в течение 30 мин. Далее растворы центрифугировали и отбирали по 250 мкл супернатанта, к которому добавляли 1,25 мл реактива Бредфорд и измеряли поглощение при длине волны 595 нм против соответствующего контроля. Концентрацию белка, не связавшегося с сорбентом, рассчитывали по ранее построенному калибровочному графику. Величину адсорбции рассчитывали по формуле (14):

$$\Gamma = ((C_{\text{hay}} - C_{\text{конечн}}) \bullet V) / M \bullet m_{\text{сорбента}}, \qquad (14)$$

где Г – величина адсорбции (моль/г), С_{нач} – начальная концентрация белка (мкг/мл), С_{конечн} – концентрация белка в растворе после прохождения адсорбции (мкг/мл), V – объем пробы (0,25 мл), М – молекулярная масса белка (г/моль), m_{сорбента} – масса сорбента (мг).

2.14 Исследование морфологии FMe и MeOx

Исследование морфологии FMe и MeOx было проведено с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) оснащенного энергодисперсионным рентгеновским спектрометром Oxford X-Max 20 (Oxford Instruments, Великобритания).

2.15 Металл-аффинная хроматография фосфорилированного SSNGHVYpEKLSSI при оптимизации процесса десорбции с использованием FFe

В микропробирку помещали 20 дм² FFe, промывали 100 мкл 0,1 % TFA, супернатант после центрифугирования 10 мин при 10000 об/мин отбрасывали. После этого в микропробирку с сорбентом добавляли 30 мкл раствора пептида SSNGHVYpEKLSSI (концентрация 1 мг/мл) и 30 мкл 0,1 % TFA и оставляли на 15 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, затем супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 100 мкл 0,1 % TFA для промывки, оставляли на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и супернатант отбирали в чистую микропробирку. Элюирование проводили одним из следующих растворителей: 100 мкл 0,4 М водного аммиака, 100 мкл 0,5 % водного пиперидина, 100 мкл 0,5% фосфорной кислоты, 100 мкл 15% перфтороктановой сульфокислоты (PFOS) в 0,5 % водном растворе пиперидина, 100 мкл 5% тиоцианата натрия в 0,4 М водном аммиаке, 100 мкл 10% трилона Б в 0,4 М водном аммиаке, 100 мкл 10% перфторгексановой кислоты в 0,5% пиперидине, 100 мкл 0,0005% фосфорной кислоты в 0,5% пиперидине с центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин в каждом случае и с отбором фракций в чистые микропробирки.

2.16 Металл-аффинная хроматография триптического гидролизата казеина на сорбентах, содержащих атомы железа

В спиновую колонку помещали 200 дм² FFe или 5,8 мг FeOx или 60 мкл PHOS-Select[™] Iron Affinity Gel Sigma Aldrich GmbH, Германия), промывали 300 мкл 0,1 % TFA, супернатант после центрифугирования 10 мин при 10000 об/мин отбрасывали. После этого в спиновую колонку с сорбентом добавляли раствор триптического гидролизата казеина в 0,1 % TFA (гидролизат загружали на стационарные фазы в соотношениях 1:155, 1:310 и 1:620 (мас./мас.)) и оставляли на 15 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, затем супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 100 мкл 0,1 % TFA для промывки, оставляли на 10 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и супернатант отбирали в чистую микропробирку. Элюирование проводили последовательно следующими растворителями: 100 мкл 0,4 М водного аммиака, 100 мкл 0,5 % водного пиперидина, 100 мкл 0,015% PFOS в 0,5 % водном растворе пиперидина с центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин в каждом случае и с отбором фракций в чистые микропробирки.

2.17 Металл-аффинная хроматография гидролизата клеточного лизата HeLa на сорбентах, содержащих атомы железа

В спиновую колонку помещали 300 дм² FFe или 8,4 мг FeOx, или 90 мкл PHOS-SelectTM Iron Affinity Gel (Sigma Aldrich GmbH, Германия), или 8,4 мг нанопорошка TiO₂ (Merck, CША), промывали 50 мкл ацетонитрила, центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, супернатант отбрасывали. Затем сорбент промывали 100 мкл 0,1 % TFA, супернатант после центрифугирования 10 мин при 10000 об/мин также отбрасывали. После этого в микропробирку с сорбентом добавляли 50 мкл раствора триптических пептидов гидролизата клеточного лизата HeLa в 0,1 % TFA (суммарное содержание пептидов 30 мкг) и оставляли на 15 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, затем супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 50 мкл 0,1 % TFA для промывки, оставляли на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и супернатант отбирали в чистую микропробирку. Элюирование проводили последовательно 50 мкл 0,4 М водного аммиака, 50 мкл 0,5 % пиперидина, 50 мкл 0,5 % триэтиламина с центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин в каждом случае и отбором фракций в чистые микропробирки.

2.18 Количественный хроматографический анализ методом HPLC-UV

Количественный хроматографический анализ содержания пептида SSNGHVYpEKLSSI в элюатах, полученных при использовании различных элюентов, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым (UV) детектором с использованием хроматографа Shimadzu LC-20 «Prominence» (Shimadzu, Япония), оснащенного диодной матрицей SPD-M20A. Фракции элюатов предварительно высушивали и перерастворяли в 20 мкл 5% водного ацетонитрила с 0,1% TFA. Аналитическая колонка Supelcosil C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм, 120 Å). Состав подвижной фазы: компонент A – 7,6 мМ ацетат аммония в 0,1 % водном растворе TFA, компонент B – 100% ацетонитрил, режим элюирования – градиентный: 5 % B (5 мин), от

5 % В до 50 % В (5 – 12 мин), от 50 % В до 80 % В (12 – 15 мин), от 80 % В до 5 % В (15 – 17 мин). Рабочая длина волны 210 нм. Скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин. Колонку термостатировали при 45°С. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 20 мкл.

Содержание пептида в несвязавшейся фракции определяли относительно стандартного раствора с учетом известного внесенного количества и разбавления в ходе анализа.

2.19 Количественный хромато-масс-спектрометрический анализ методом HPLC-MS

Аликвоты элюатов после металл-аффинной хроматографии с использованием FFe и FeOx (10 мкл) высушивали в вакуумном испарителе, перерастворяли в 10 мкл 3% водного ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Разделение пептидов проводили с использованием жидкостного хроматографа Waters Alliance 2695 (Waters GmbH, Германия) Обращенно-фазовая хроматографическая колонка Aqua C18 (2 x 150 мм, 3 мкм, 125 Å) (Phenomenex, Германия). Подвижная фаза: компонент A – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, компонент B – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, режим элюирования – градиентный: 3% B (0 – 5 мин), от 3% B до 43% B (5 – 35 мин), от 43% B до 95% B (35 – 38 мин), 95% B (38 – 42 мин). Скорость потока подвижной фазы 220 мкл/мин. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 10 мкл.

Выход колонки был напрямую соединен с источником ионизации электрораспылением масс-спектрометра PE Sciex API QSTAR (AB Sciex, Германия) с квадрупольвремяпролетным масс-анализатором. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме положительной ионизации; скорость потока газа-осушителя – 8 л/мин; давление на распылителе – 30 psi; температура газа-осушителя – 300°C; напряжение на капилляре – 4 кВ; напряжение на фрагментаторе – 70 В; регистрация ионов в диапазоне m/z от 70 до 2000. Количественную оценку содержания пептидов осуществляли путем интегрирования площадей экстрагированных ионных хроматограмм (m/z \pm 0,05) при ожидаемых временах удерживания.

При обработке полученных данных степени извлечения всех трех фракций элюатов суммировали.

104

2.20 Качественный хромато-масс-спектрометрический анализ методом nanoHPLC-MS

Аликвоты (8 мкл) обессоленного обогащенного триптического гидролизата клеток HeLa вводили на пред-колонку Acclaim[®] PepMap100 (C18, ID 75 мкм, длина 2 см, размер частиц 3 мкм), после чего пептиды поступали на аналитическую колонку EASY-Spray ES803C18 (500 × 0,075 мм, размер частиц 2 мкм) и разделялись с использованием хроматографа EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Колонка термостатировалась при 40°С. Подвижная фаза: компонент A – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты, компонент B – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, режим элюирования – градиентный: 5% B (0 – 15 мин), от 5% B до 40% B (15 – 195 мин), от 40% B до 90% B (195 – 197 мин). Скорость потока подвижной фазы – 0,3 мкл/мин.

Выход колонки был напрямую соединен с источником ионизации электрораспылением масс-спектрометра Orbitrap Velos Pro MS (Thermo Fisher Scientific, Германия). Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме положительной ионизации; скорость потока газа-осушителя – 10 л/мин; давление на распылителе – 30 psi; температура газа-осушителя – 325° C; напряжение на капилляре – 4 кВ; напряжение на фрагментаторе – 70 В; регистрация ионов в диапазоне m/z от 400 до 2000 при разрешении 60000. Параметры тандемного масс-спектрометрического анализа: метод фрагментации CID с энергией столкновения 35 эВ, нейтральная потеря – 80 Да; регистрация фрагментных ионов в диапазоне m/z от 400 до 2000 с зарядовым состоянием не менее 2. Идентификацию белков проводили путем поиска по базам данных с использованием программного обеспечения Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific, Германия) на базе поискового движка Mascot (Matrix Science, Великобритания) при следующих параметрах поиска: база данных – Swiss-Prot; таксон – *Homo sapiens*; ошибка в определении массы пептида – 7 ppm; ошибка в массе ионов-продуктов – 0,8 m/z; модификации – карбамидометилирование (С), окисление (М), фосфорилирование (S, T, Y).

2.21 Металл-аффинная хроматография пептического гидролизата белков плазмы крови человека, модифицированной PFMP, с использованием FLa

Образцы крови (n=3) здоровых мужчин 25-45 лет собирали в полипропиленовые пробирки с EDTA (BD Vacutainer). Плазму отделяли путем центрифугирования крови (1500 g, 10 мин, 4°C), переносили в микропробирку, пулировали, добавляли раствор 2- (фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутана (PFMP) в изопропаноле до концентрации

10 мкг/мл и инкубировали в течение 24 часов при 37°С. После инкубации отбирали аликвоты плазмы объемом 25 мкл и добавляли к ним 975 мкл 0,1% водного раствора TFA. Далее к полученному раствору добавляли 10 мкл раствор пепсина 1 мг/мл (Roche) в 0,1% TFA и оставляли в термостате на ночь при 37°С. К аликвоте гидролизата плазмы (25 мкл) добавляли 75 мкл 5% водного аммиака.

В спиновую колонку помещали 50 дм² FLa, промывали 300 мкл 2,5 % водного аммиака, супернатант после центрифугирования 10 мин при 10000 об/мин отбрасывали. После этого в спиновую колонку с сорбентом добавляли раствор пептического гидролизата плазмы крови и оставляли на 20 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, затем супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 100 мкл 2,5 % водного аммиака, оставляли на 10 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, обавляли 10 мин при 10000 об/мин, в затем супернатант отбирали в чистую микропробирку. К сорбенту добавляли 100 мкл 2,5 % водного аммиака, оставляли на 10 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и супернатант отбирали в чистую микропробирку. Элюирование проводили 100 мкл 0,015% PFOS в 0,5 % водном растворе пиперидина с центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин и отбирали фракцию в чистую микропробирку.

2.22 Качественный масс-спектрометрический анализ методом MALDI MS FLa и пептического гидролизата белков плазмы крови человека

Масс-спектрометрический анализ монослоев FLa и пептического гидролизата белков плазмы крови человека осуществляли с использованием масс-спектрометра Axima Performance (Shimadzu, Япония), оснащенного UV лазером при длине волны 337 нм. Регистрация ионов осуществляли в режиме положительной ионизации в диапазоне m/z 600-2000 для монослоев и диапазоне m/z 1150-4000 для пептидов при следующих параметрах напряжения: источник – 20 кВ; линзы – 6,5 кВ; рефелктрон – 24,38 кВ. В качестве матрицы при анализе монослоев FLa использовали 1% (масс./об.) водный раствор _ сульфата аммония, при анализе пептидов раствор (5 мг/мл) альфацианогидроксикоричной кислоты (CHCA) в 50% водном ацетонитриле с 0,1% TFA. Для каждой фракции элюата регистрировали 4 спектра.

2.23 Характеризация частиц mSiO₂/Ni

Морфология синтезированных монодисперсных сферических мезопористых частиц кремнезема, содержащих на поверхности пор ионы никеля, была исследована с использованием сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония), оснащенного приставкой для энергодисперсионной спектроскопии (EDX) Oxford X-Max 20 (Oxford Instruments, Великобритания). Частицы наносились на кремниевую пластину для получения микрофотографий из водной суспензии с применением ультразвука для равномерного диспергирования. Количественный рентгенофлуоресцентный анализ (XRF) осуществляли с использованием анализатора Olympus Innov-X DELTA Premium (Olympus, Япония).

Исследование методом просвечивающей электронной микроскопии (TEM) осуществляли с использованием микроскопа Zeiss Libra 200FE (Carl Zeiss, Германия). Средний диаметр частиц определяли по результатам обработки измерений TEM изображений 50 частиц. Размер частиц также определяли с помощью динамического светорассеяния с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Великобритания) при температуре 25°C.

Анализ удельной поверхности и пористости проводили с использованием анализатора ASAP 2020 (Micromeritics, США) при температуре 77 К, в качестве адсорбента использовали азот. Удельную поверхность рассчитывали методом ВЕТ, а распределение размеров пор определяли в соответствии с теорией нелокального функционала плотности.

2.24 Металл-аффинная хроматография DCL с использованием частиц mSiO₂/Ni

Навеску частиц mSiO₂/Ni массой 5 мг помещали в спиновую колонку, инкубировали при встряхивании в 200 мкл дистиллированной воды в течение 20 мин, пробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), супернатант отбрасывали. Затем в колонку с сорбентом добавляли 100 мкл раствора, содержащего диклофенак (DCL), и инкубировали при встряхивании требуемое количество времени при заданной температуре. После этого микропробирку центрифугировали, супернатант (несвязавшуюся фракцию) сохраняли для последующего анализа, колонку переносили в другую микропробирку. Затем к сорбенту добавляли 100 мкл дистиллированной воды, выдерживали 1 мин при встряхивании, микропробирку центрифугировали, супернатант (промывочный раствор) сохраняли для дальнейшего анализа, колонку переставляли в другую микропробирку. К сорбенту добавляли 100 мкл раствора для десорбции, инкубировали при встряхивании требуемое количество времени при заданной температуре в зависимости от эксперимента, микропрбирку центрифугировали, супернатант (элюат) отбирали для анализа, процедуру повторяли.

2.25 Исследование изотерм сорбции DCL с использованием частиц mSiO₂/Ni

Для исследования изотермы сорбции при 25°С были приготовлены растворы, содержащие 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,7; 1 и 0,5 мкг DCL в 100 мкл воды (n=3). Для исследования изотермы сорбции при 35°С были приготовлены растворы, содержащие 7; 5; 4; 3; 2 и 1 мкг DCL в 100 мкл воды (n=3). Навеску частиц mSiO₂/Ni массой 5 мг помещали в спиновую колонку, инкубировали при встряхивании в 200 мкл дистиллированной воды в течение 20 мин, центрифугировали (2 мин, 7000 g), супернатант отбрасывали. Затем в колонку с сорбентом добавляли 100 мкл раствора, содержащего DCL, и инкубировали при встряхивании в течение 20 мин при заданной температуре. После этого микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), супернатант (несвязавшуюся фракцию) отбирали для анализа.

2.26 Исследование скорости сорбции DCL с использованием частиц mSiO₂/Ni

Навеску частиц mSiO₂/Ni массой 5 мг помещали в спиновую колонку, инкубировали при встряхивании в 200 мкл дистиллированной воды в течение 20 мин, центрифугировали, супернатант отбрасывали. 400 мкл водного раствора, содержащего 10 мкг DCL, помещали в спиновую колонку, включали секундомер и инкубировали при перемешивании в течение заданного времени, после чего секундомер останавливали, а микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g). Из супернатанта отбирали 20 мкл на анализ, раствор переносили в колонку обратно и включали секундомер. Процедуру повторяли через заданные промежутки времени: 0, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 80 мин.

2.27 Исследование скорости десорбции DCL с частиц mSiO₂/Ni

Навеску частиц mSiO₂/Ni массой 5 мг помещали в спиновую колонку, инкубировали при встряхивании в 200 мкл дистиллированной воды в течение 20 мин, центрифугировали (2 мин, 7000 g), супернатант отбрасывали. 100 мкл водного раствора, содержащего 5 мкг DCL, помещали в спиновую колонку и термостатировали при перемешивании 20 мин при 25°С. После этого микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), колонку переставляли в другую микропробирку, а супернатант (несвязавшуюся фракцию) сохраняли для последующего анализа. Затем к сорбенту добавляли 100 мкл дистиллированной воды, выдерживали 1 мин при встряхивании, микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), колонки с диин, 7000 g), колонку переставляли в другую микропробирку центрифугировании, а дальней воды, выдерживали 1 мин при встряхивании, микропробирку, супернатант (промывочный раствор) отбирали для дальнейшего анализа. По результатам рассчитывали количество DCL, задержавшегося на сорбенте.
Затем к сорбенту добавляли 400 мкл водного раствора 50% ацетонитрила с 0,5% пиперидином и 0,1% PFOS и включали секундомер. Через заданные промежутки времени секундомер выключали, а пробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g). Из раствора отбирали 40 мкл на анализ, раствор переносили в колонку и включали секундомер. Процедуру повторяли через заданные промежутки времени: 0,5, 1, 3, 5, 10, 20, 40, 80 мин.

2.28 Исследование сорбционной емкости частиц mSiO₂/Ni по DCL и выбор оптимального раствора для десорбции

Навеску частиц mSiO₂/Ni массой 5 мг помещали в спиновую колонку (n=10), инкубировали при встряхивании в 200 мкл дистиллированной воды в течение 20 мин, центрифугировали (2 мин, 7000 g), супернатант отбрасывали. Затем в колонку с сорбентом добавляли 100 мкл водного раствора, содержащего 5 мкг DCL, и инкубировали при встряхивании 20 мин при 25°C. После этого микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), колонку переставляли в другую микропробирку, а супернатант (несвязавшуюся фракцию) сохряняли для последующего анализа. Затем к сорбенту добавляли 100 мкл дистиллированной воды, выдерживали 1 мин при встряхивании, микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), колонку переставляли в чистую микропробирку, супернатант (промывочный раствор) отбирали для дальнейшего анализа. По результатам рассчитывали емкость сорбента. В качестве растворов для десорбции были использованы водные: 0,1% PFOS; 5% аммиак + 0,1% PFOS; 50% ацетонитрил; 50% ацетонитрил + 0,1% PFOS; 1% имидазол; 1% имидазол + 0,1% PFOS; 0,5% пиперидин; 0,5% пиперидин + 0,1% PFOS; 50% ацетонитрил + 0,5% пиперидин + 0,1% PFOS.

2.29 Исследование десорбции DCL с частиц mSiO₂/Ni при двукратной обработке одним элюентом

Для исследования были выбраны колонки, использованные при анализе изотермы сорбции при 25°С (n=3). Частицы mSiO₂/Ni промывали 100 мкл дистиллированной воды в течение 1 мин при встряхивании, микропробирку центрифугировали (2 мин, 7000 g), колонку переставляли в чистую микропробирку, супернатант (промывочный раствор) отбирали для дальнейшего анализа. По результатам рассчитывали количество сорбированного DCF. К сорбенту добавляли 100 мкл раствора для десорбции, термостатировали при перемешивании в течение 20 мин при 25°С, центрифугировали (2 мин, 7000 g), супернатант (элюат) отбирали для анализа, процедуру повторяли, используя тот же рас-

твор для десорбции. В качестве растворов для десорбции были использованы водные: №1 – 50% ацетонитрил + 0,1% PFOS; №2 – 1% имидазол + 0,1% PFOS; №3 – 0,5% пиперидин + 0,1% PFOS; №4– 50% ацетонитрил + 0,5% пиперидин + 0,1% PFOS.

2.30 Количественный хроматографический анализ DCL методом HPLC-UV

Хроматографический анализ выполняли с использованием хроматографической системы LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) состоящей из дегазатора подвижной фазы DGU-20A, двух насосов LC-20AD, автосамплера SIL-20A, термостата CTO-20A, диодно-матричного детектора SPD-M20A и контролера CBM-20A.

Хроматографическое разделение проводили с применением обращенно-фазовой колонки SupelcoSil LC-18 (15 см х 2,1 мм, 5 мкм, Supelco, США) с использованием градиентного режима элюирования пробы при изменении органического компонента от 20% до 100% в течение 10 мин. Скорость потока 400 мкл/мин. Сканируемый диапазон длин волн – 220-350 нм, характеристическая длина волны поглощения – 276 нм. Состав подвижной фазы: вода (А) и ацетонитрил (Б). Объем вводимой пробы составлял 10 мкл, колонку термостатировали при температуре 40°С. В примененных условиях хроматографического разделения время удерживания стандартного соединения DCL составило 5,8 мин.

2.31 Расчет энтальпии адсорбции

Уравнение линеаризованной изотермы адсорбции по теории Ленгмюра имеет вид:

$$\frac{1}{a} = \frac{1}{a^{\infty}} + \frac{1}{a^{\infty}K_a} \cdot \frac{1}{C}, \qquad (15)$$

где, а – величина адсорбции, а[∞] – ее предельное значение, соответствующее полному мономолекулярному покрытию сорбента молекулами адсорбата, К_а – константа адсорбционного равновесия, С – концентрация адсорбата в растворе.

Константа адсорбционного равновесия связана с энтальпией адсорбции уравнением Вант-Гоффа:

$$\frac{d\ln K_a}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \,. \tag{16}$$

В нешироком температурном интервале это уравнение можно проинтегрировать с допущением о независимости ΔH от температуры. В результате получаем простую форму уравнения, позволяющую, при наличии изотерм адсорбции хотя бы при двух температурах, рассчитать энтальпию адсорбции:

$$\lg \frac{(K_a)_{T_2}}{(K_a)_{T_1}} = \frac{\Delta H}{2.303R} \cdot \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right).$$
(17)

Для определения констант адсорбционного равновесия из уравнения Ленгмюра были построены зависимости $\frac{1}{a} = f(\frac{1}{C})$. Расчеты проводили по следующей схеме:

 Экстраполяцией линеаризованных изотерм адсорбции на ось ординат (1/C = 0) находили предельное значение адсорбции при двух температурах.

2. Зная предельную адсорбцию, из тангенса угла наклона соответствующих изотерм по формуле (15) находили константы адсорбционного равновесия.

3. По уравнению (17) определяли энтальпию адсорбции.

2.32 Металл-аффинная хроматография дильдрина с использованием FNi

В спиновую колонку поместили 100 дм^2 FNi, промыли 100 мкл ацетонитрила, центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин, супернатант отбросили. Затем сорбент промыли 100 мкл 0,1 % водного раствора трифторуксусной кислоты, центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин, супернатант также отбросили. После этого в спиновую колонку с сорбентом добавили 50 мкл раствора дильдрина в 0,1 % водной TFA (3 нг/мл) и 50 мкл 0,1% водного раствора ТFA и оставили на 15 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин., супернатант отобрали в чистую микропробирку для последующего анализа. К сорбенту добавили 100 мкл 0,1% водного раствора TFA добавили в чистую микропробирку для последующего анализа. К сорбенту добавили 100 мкл 0,1% водного раствора TFA для промывки, оставили на 10 мин, после чего микропробирку. Элюировали 5 мин при 3000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропробирку. Элюирование с сорбента проводили последовательно 100 мкл 0,4 М водного раствора аммиака, 100 мкл 0,015% PFOS в 0,5 % водном растворе пиперидина и 100 мкл раствора 0,1% TFA в ацетонитриле с отбором фракций в чистые микропробирки.

2.33 Количественный хроматографический анализ дильдрина методом GC-ECD

Количественный анализ дильдрина проводили методом газовой хроматографии с детектором электронного захвата (GC-ECD) в следующих условиях: газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Япония) с автодозатором АОС-20i. Колонка SPB-608 (30 м × 0,25 мм, Supelco, США). Анализ проводили в режиме программирования температур. Начальная температура колонки 90°С, время удерживания 1 мин, дальнейший подъем температуры до 250°С со скоростью 10°С/мин, время удерживания 5 мин, далее подъем температуры до 280°С со скоростью 5°С/мин, время удерживания 5 мин. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 1 мкл. Для построения калибровочного графика использовали метод внешнего стандарта.

2.34 Металл-аффинная хроматография диазинона с использованием MeOx

В спиновую колонку поместили 5 мг FeOx, ZrOx, TiOx или нанопорошка TiO₂ промыли 100 мкл 0,1 % водного раствора TFA, центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин, супернатант отбросили. После этого в спиновую колонку с сорбентом добавили 100 мкл водного раствора диазинона (40 мкг/мл) и 10 мкл 0,1% водного раствора TFA и оставили на 20 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин., супернатант отобрали в чистую микропробирку для последующего анализа. К сорбенту добавили 100 мкл 0,1% водного раствора TFA для промывки, оставили на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропровали 5 мин при 5000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропробирку. Затем проводили десорбцию в течение 5 мин 0,015% раствором PFOS в 0,5% водном пиперидине с отбором фракции в чистую микропробирку.

2.35 Количественный хроматографический анализ диазинона методом GC-FID

Количественный анализ диазинона проводили методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (GC-FID)в следующих условиях: газовый хроматограф Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Япония) с автодозатором AOC-20i. Числовые результаты эксперимента были получены с использованием площадей пика аналита на хроматограмме. Предварительная валидация методики включала в себя построение градуировочной зависимости концентрации раствора диазинона (5, 10, 15, 20, 30, 40 мкг/мл, вводимый объем 1 мкл) от площади хроматографического сигнала. Рассчитанное значение \mathbb{R}^2 составило 0,99 в диапазоне от 0,05-0,1 мкг на колонку. Относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика диазинона демонстрировало высокую точность и повторяемость метода (<10%). Предел обнаружения (LOD) составил 5 мкг/мл на колонку, предел количественного определения (LOQ) - 8 мкг/мл на колонку для стандартных растворов диазинона. Среднедневное относительное стандартное отклонение составляло 5%; междневное относительное стандартное отклонений n = 4.

2.36 Металл-аффинная хроматография пестицидов и лекарственных средств с использованием FNi и FCu

В спиновую колонку (диаметр пор 0,45 нм) поместили 100 дм² FCu или FNi промыли 100 мкл ацетонитрила, центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин, супернатант отбросили. Затем сорбент промыли 100 мкл 0,1 % водного раствора ТFA, центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин, супернатант отбросили. После этого в спиновую колонку с сорбентом добавили 50 мкл раствора целевого вещества (концентрация пиримикарба и феназепама – 20 мкг/мл; концентрация глифосата и аминометилфосфоновой кислоты (АМРА) – 1 мкг/мл) и 50 мкл 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты и оставили на 15 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин., супернатант отобрали в чистую микропробирку для последующего анализа. К сорбенту добавили 100 мкл 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты для промывки, оставили на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропробирку. Элюирование пиримикарба и феназепама с сорбента проводили последовательно 100 мкл 0,1% раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле и 100 мкл 0,5% водного раствора пиперидина с отбором фракций в чистые микропробирки, в случае глифосата и АМРА элюирование проводили последовательно 100 мкл 0,4 М водного раствора аммиака и 100 мкл 0,1% водного раствора пиперидина.

2.37 Металл-аффинная хроматография пестицидов или лекарственных средств с использованием NiOx и CuOx

В спиновую колонку (диаметр пор 0,22 нм) поместили 2,2 мг NiOx или CuOx, дважды промыли 100 мкл 0,1 % водного раствора TFA, центрифугировали 2 мин при 10000 об/мин, супернатант отбросили. После этого в спиновую колонку с сорбентом добавили 50 мкл раствора целевого вещества (концентрация пиримикарба и феназепама – 20 мкг/мл; концентрация глифосата и AMPA – 1 мкг/мл) и 50 мкл 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты и оставили на 15 мин, после чего спиновую колонку центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин., супернатант отобрали в чистую микропробирку для последующего анализа. К сорбенту добавили 100 мкл 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты для промывки, оставили на 10 мин, после чего микропробирку центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропробирку центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропробирку центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин и супернатант отобрали в чистую микропробирку сорбенте и и сорбенте и сорбение и сорбенте проводили последовательно 100 мкл 0,1% раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле и 100 мкл 0,5% водного раствора пиперидина с отбором фракций в чистые микропробирки, в случае глифосата и АМРА элюирование проводили последовательно 100 мкл 0,4 М водного раствора аммиака и 100 мкл 0,1% водного раствора пиперидина.

2.38 Количественный хроматографический анализ феназепама и пиримикарба методом HPLC-UV

Количественный анализ пиримикарба и феназепама проводили в следующих условиях: жидкостный хроматограф Shimadzu LC-20 «Prominence» (Shimadzu, Япония) с диодной матрицей SPD-M20A, рабочая длина волны: для феназепама 229 нм, для пиримикарба 244 нм. Колонка Ascentis C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм, Supelco). Состав подвижной фазы: компонент А – водный фосфатный буфер с pH 4,0; компонент В – ацетонитрил; элюирование изократическое при 70% В. Скорость потока - 1,0 мл/мин. Колонка термостатировалась при 40°С. Объем вводимой в хроматограф пробы составлял 20 мкл.

2.39 Количественный анализ глифосата и AMPA методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES)

Количественный анализ глифосата и AMPA проводили методом атомноэмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-AES) с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно-связанной плазмой Optima 2100DV (Perkin Elmer, CША) с использованием многоэлементного стандарта IV-ICPMS-71A 10.00 µg/mL ea: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Cd, Ca, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ho, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Ni, P, Pb, Pr, Rb, S, Se, Sr, Th, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn (Inorganic Ventures, CША).

Параметры анализа:

– скорость потока образца:	1,50 мл/мин;
 – скорость плазмообразующего потока: 	15 л/мин;
- скорость вспомогательного потока:	0,2 л/мин;
 – скорость распыляющего потока: 	0,8 л/мин;
– мощность высокочастотного генератора:	1300 Вт;
– обзор:	аксиальный;
– расчет интенсивности:	площадь пика;
– рабочая длина волны для определения фосфора:	213,617 нм.

2.40 Металл-аффинная экстракция фосфорилированных пептидов на поверхности мишени, функционализированной FeOx и ZrOx

На каждое пятно MeOx наносили 3 мкл 75% водного ацетонитрила, ожидали в течение 2 мин. На ячейку мишени с напылённым сорбентом наносили 5 мкл 0,1% водного раствора TFA. После двух мин инкубации капли удалили. На пятна MeOx повторно нанесли 5 мкл 0,1% TFA и в капли добавили 1 мкл смеси триптического гидролизата глобина человека (0,5 мг/мл) с синтетическими пептидами (0,5 мг/мл каждого). Мишень накрывали пластиковой крышкой, чтобы снизить испарение растворителя, и оставили на 20 мин для сорбции. Затем капли удалили, сорбент трижды промыли 5 мкл 0,1% TFA. После чего пятна высушили на воздухе, наносили на них 2,5 мкл 30% водного ацетонитрила с 0,1% TFA, и добавили 2 мкл раствора матрицы CHCA (5 мг/мл) в 50% водном ацетонитриле с 0,1% TFA. Высушивали пятна на воздухе перед дальнейшим MALDI MS анализом.

2.41 Качественный масс-спектрометрический анализ фосфорилированных пептидов методом MALDI MS

Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью тандемного времяпролётного MALDI масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного Nd:YAG-лазером с длиной волны 355 нм, на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПБГУ.

Регистрацию спектров осуществляли в режиме рефлектрон с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 700-4500 при значениях напряжений 1 и 2 на источнике равных соответственно 20,0 и 17,9 кВ. Напряжение на линзах было равным 7,0 кВ, на отражателе – 21,1 кВ, на детекторе отражателя – 10,85 кВ. Импульсная задержка экстракции ионов составляла 120 нс. Суммировалось не менее 20000 актов облучения ячейки с образцом лазером с частотой 2000 Гц при регистрации одного масс-спектра. Регистрацию и интерпретацию спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control и Flex Analysis 3.4. Для калибровки масс-спектрометра использовали калибровочную смесь Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics). Тандемные масс-спектры были получены в режиме LIFT (LIFT 1 и 2 равны 19,0 и 4,5 кВ, соответственно); окно селектора иона предшественника – 1 Да. Напряжения 1 и 2 на источнике, напряжение на линзах были равны 7,5, 6,8 и 3,5 кВ соответственно.

2.42 Синтез алкилирующих агентов

*N*1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид (CCAn). Растворяли 0,1 моль 4-хлоранилина в 100 мл хлороформа, добавляли 0,1 моль триэтиламина и раствор охлаждали до 0°С. К этому раствору при охлаждении приливали по каплям, при перемешивании, раствор 0,1 моль хлорангидрида хлоруксусной кислоты в 50 мл хлороформа. Температуру реакционной смеси в ходе реакции поддерживали не выше 10°С. После добавления расчетного количества реагента реакционную смесь доводили до комнатной температуры и обрабатывали 100 мл воды. Органический слой отделяли, промывали его последовательно водным раствором 10% HCl (100 мл), затем водой и водным раствором гидрокарбоната натрия 1%. Органический слой сушили сульфатом натрия и упаривали растворитель до получения кристаллического продукта. Полученный продукт перекристаллизовывали из водного этанола и сушили. Получали 16,2 г N1-(4-хлорфенил)-2хлорацетамида в виде бесцветного кристаллического порошка с Т_{пл} 184°С. Выход 81%. Хроматографически однороден, Rf 0,60 в системе хлороформ. Чистота не менее 97% по данным спектра ¹Н NMR. Спектр ¹Н NMR в CDCl₃, 6 м.д. 4,41 с (2 H, CH₂), 7,20 д (2H, J 8,1 Гц, 2H_{Аром}), 7,39 д (2H, J 8,1 Гц, 2H_{Аром}), 8,20 с (1H, NH).

По аналогичной методике получали N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамид (CC2An) в виде бесцветного кристаллического порошка с T_{nn} 108°C. Выход 77%. Хроматографически однороден, Rf 0,56 в системе хлороформ. Чистота не менее 97% по данным спектра ¹H NMR. Спектр ¹H NMR в CDCl₃, δ м.д. 4,44 с (2 H, CH₂), 7,43 д (1H, J 8,2 Гц, 1H_{Аром}), 7,95 д (1H, J 2,3 Гц, 1H_{Аром}), 8,33 д (1H, J 8,1 Гц, 1H_{Аром}), 9,49 с (1H, NH).

2.43 Выделение глобина из гемолизата крови человека

В пробирку вместимостью 15 мл помещали аликвоту гемолизата крови человека объемом 2 мл и добавляли 12 мл 50 мМ HCl в изопропаноле, после чего центрифугировали 15 мин при 3000 g. Супернатант двумя порциями равного объема переносили в две другие пробирки и добавляли в них по 4 мл этилацетата, затем центрифугировали 15 мин при 3000 g. Осадок отделяли от надосадочного раствора, промывали этилацетатом, после чего высушивали с помощью роторного испарителя, объединяли и замораживали при -20°С.

2.44 Получение аддуктов белков крови с алкилирующими агентами

Растворяли 10 мг глобина в 10 мл воды, получая раствор с содержанием белка 1 мг/мл. Параллельно готовили 1% раствор алкилирующего агента ССАп или СС2Ап в метаноле. В виалу вместимостью 5 мл помещали 1 мл раствора белка и добавляли 10 мкл 10% водного раствора аммиака, получая раствор с pH 7,5-7,9. После этого добавляли 50 мкл свежеприготовленного метанольного раствора алкилирующего агента и выдерживали полученный раствор на ультразвуковой бане при комнатной температуре. Герметично закрытую виалу выдерживали 2 часа при температуре 40°C. После инкубирования раствор охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через ватный фильтр. Полученный фильтрат, содержащий раствор алкилированного белка, использовали для дальнейших исследований.

Срок хранения растворов алкилированных белков при комнатной температуре до 8 часов, или в замороженном виде до 7 дней.

2.45 Ферментативный гидролиз алкилированных белков в присутствии трипсина

Растворяли 1 мг трипсина в 1 мл воды. В микропробирку вместимостью 1,5 мл помещали 200 мкл раствора алкилированного белка с содержанием белка 1 мг/мл и добавляли 5 мкл раствора трипсина с концентрацией 1 мг/мл. После этого микропробирки помещали в термостат и инкубировали при 37°C в течение 18 часов. По прошествии 3 часов в микропробирки добавляли еще по 5 мкл раствора трипсина с концентрацией 1 мг/мл. По прошествии 18 часов микропробирки извлекали из термостата, аликвоты полученного гидролизата объемом 20 мкл переносили в новые микропробирки, помещали в центрифужный испаритель SpeedVac (Eppendorf, Германия) и высушивали в течение 35 мин. Высушенные образцы хранили при -20°C до дальнейшего массспектрометрического анализа.

2.46 Синтез поликристаллического стеарата бария

Навеску гидроокиси натрия массой 40 мг растворяли в 100 мл 95% этанола, получая раствор с концентрацией 10⁻² моль/л. Навеску стеариновой кислоты массой 284 мг растворяли в 100 мл 95% этанола, получая раствор с концентрацией 10⁻² моль/л. Навеску нитрата бария массой 261 мг растворяли в 100 мл дистиллированной воды, получая раствор с концентрацией 10⁻² моль/л.

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

2.47 Формирование пленок Ленгмюра-Блоджетт (LBF) стеарата бария

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

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

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

Коллапсированные пленки стеариновой кислоты и ее соли получали в ванне Ленгмюра с использованием подвижных барьеров. Для этого ванна заполнялась водной субфазой. Для получения коллапсированных пленок стеариновой кислоты в качестве водной среды использовалась дистиллированная вода. При получении пленок стеарата бария в качестве водной субфазы использовали водный раствор нитрата бария с концентрацией $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для образования монослоя на поверхность субфазы (дистиллированная вода или водный раствор нитрата бария) наносили 400 мкл раствора стеариновой кислоты в н-гексане (C = 10^{-3} моль/л) и ожидали испарения н-гексана в течение 2 мин. Затем с помощью подвижных барьеров сжимали пленку стеарата бария или стеариновой кислоты, образовавшуюся на поверхности водной субфазы. Полученные коллапсированные пленки собирали шпателем, затем переносили в микропробирки и сушили в эксикаторе в течение одной недели.

2.49 Измерение угла смачивания

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

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

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

2.50 Световая микроскопия

Для изучения образования монослоев солей стеариновой кислоты на полусферической поверхности водной субфазы были проведены эксперименты с использованием поляризационного микроскопа Leica DM4500 P (Leica Microsystems, Германия). Навеску нитрата бария массой 10 мг растворяли в 10 мл воды, получая раствор с концентрацией $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Каплю (0,7 мкл) водного раствора нитрата бария (C = $4 \cdot 10^{-3}$ моль/л) наносили на ячейку MALDI мишени. После этого на поверхность водной субфазы наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °C раствора стеариновой кислоты в н-гексане. Изображения были получены с помощью зеркала под углом 45° при нанесении раствора стеариновой кислоты в н-гексане на каплю водной субфазы и последующем испарении летучего растворителя.

Для исследования морфологии пленок стеаратов металлов, получаемых на ячейке MALDI мишени, был использован стереомикроскоп SMZ 1500 с цифровой камерой Nikon DS-2MBWc (Nikon, Япония) и боковым освещением волоконно-оптическим бифуркационным осветителем C-FID с галогенной лампой 12 B-100 Bt.

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

2.51 Спектроскопия комбинационного рассеяния

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

2.52 Инфракрасная (IR) спектроскопия

Анализ проводили с использованием IR-спектрометра IRAffinity-1 (Shimadzu, Япония). Спектральный диапазон: 4000-400 см⁻¹. Следующие образцы в форме таблеток с бромидом калия были проанализированы в стандартном режиме пропускания: порошкообразный стеарата бария; порошкообразная стеариновая кислота; коллапсированные пленки стеарата бария. Спектр для пленок стеарата бария, полученных на капле водной субфазы, был получен в режиме нарушенного полного внутреннего отражения с гидро-фобизированной стеклянной подложки, на которой формировался образец.

2.53 Сканирующая электронная микроскопия (SEM) и энергодисперсионная рентгеновская (EDX) спектроскопия

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

2.54 Атомно-силовая микроскопия (AFM)

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

2.55 Масс-спектрометрический анализ структур на основе стеарата бария и стеарата лантана

Навеску матрицы 2,5-дигидроксибензойной кислоты (DHB) массой 5 мг помещали в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 500 мкл ацетонитрила, 10 мкл 10% водной TFA и 490 мкл дистиллированной воды, перемешивали. На ячейку мишенифункционализированной пленками стеарата бария или стеарата лантана, наносили 2 мкл раствора матрицы DHB (5 мг/мл) в 50% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра ultrafleXtreme. Спектры регистрировали в диапазоне m/z 300-800 в режиме «рефлектрон» с детектированием положительных ионов при следующих настройках источника ионов: напряжения 1 и 2 на источнике равны 20,1 и 18,0 кВ соответственно; напряжение на линзах 7,0 кВ; напряжение на рефлектроне 21,1 кВ; напряжение на рефлектроне 2 10,9 кВ, импульсная экстракция ионов 120 нс. Для одного спектра суммировалось 15000 актов облучения образца лазером. Регистрацию и интерпретацию масс-спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control и Flex Analysis 3.4. Тандемные масс-спектры были получены в режиме LIFT_low mass (LIFT 1 и 2 равны 19,0 и 4,5 кВ, соответственно); окно селектора иона предшественника - 1 Да. Напряжения 1 и 2 на источнике, напряжение на линзах были равны 7,5, 6,8 и 3,5 кВ соответственно.

2.56 Функционализация поверхности MALDI мишени структурами на основе стеаратов металлов

В мерный стакан вносили 90 мл воды, добавляли 10 мл 99% раствора трифторуксусной кислоты (TFA), перемешивали и получали 10% водный раствор TFA. Затем в другой мерный стакан вносили 99 мл воды, добавляли 1 мл 10% раствора TFA, перемешивали и получали 0,1% водный раствор TFA.

Готовили водные растворы (C = 10^{-2} моль/л) нитратов девяти металлов: бария, меди(II), никеля, кобальта, железа(III), индия, галлия, европия, лантана. В виалу вносили навеску нитрата бария 26,1 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата меди(II) 18,8 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата никеля 18,3 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата кобальта 18,3 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата железа(III) 24,2 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата индия 30,1 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата галлия 25,6 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали. В виалу вносили навеску нитрата европия 33,8 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемепивали. В виалу вносили навеску нитрата з2,5 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, переме-

На ячейку наносили 0,7 мкл раствора нитрата бария (C = 10^{-2} моль/л) в 0,1% водной TFA, затем на поверхность водной субфазы наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °C раствора стеариновой кислоты в н-гексане. После испарения н-гексана водную каплю аккуратно удаляли. Получали на ячейке структуру из одного слоя стеарата бария. На ячейку наносили 0,7 мкл раствора нитрата бария (C = 10^{-2} моль/л) в 0,1% водной TFA, затем на поверхность водной субфазы наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °C раствора стеариновой кислоты в н-гексане. После испарения н-гексана водной ТFA, затем на поверхность водной субфазы наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °C раствора стеариновой кислоты в н-гексане. После испарения н-гексана на поверхность водной субфазы наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °C раствора стеариновой кислоты в н-гексане.

122

водной субфазы наносили еще 0,7 мкл насыщенного при 20 °C раствора стеариновой кислоты в н-гексане. После испарения н-гексана водную каплю аккуратно удаляли. Получали на ячейке структуру из двух слоев стеарата бария. Аналогичным образом получали на ячейках структуры из четырех, шести и восьми слоев стеарата бария, при этом водную каплю удаляли и добавляли новую порцию (0,7 мкл) раствора нитрата бария в 0,1% водной TFA после каждых двух нанесений раствора стеариновой кислоты в нгексане. Для промывки полученного на поверхности ячейки сорбента добавляли 10 мкл дистиллированной воды и инкубировали в течение 5 минут для растворения кристаллов соли. По истечении 10 минут каплю удаляли и процедуру промывки сорбента повторяли еще раз. Аналогично функционализировали поверхность внутри ячейки MALDI мишени одним, двумя, четыремя, шестью и восьмью слоями стеаратов других металлов. Дополнительно на ячейке MALDI мишени формировали один, два, четыре, шесть и восьмь слоев стеариновой кислоты, при этом в качестве водной субфазы использовали 0,1% водный раствор TFA.

2.57 Металл-аффинная экстракция аддуктов глобина человека с ССАп поверхности MALDI мишени, функционализированной одним коллапсированным монослоем стеарата лантана

Поверхность мишени внутри одной ячейки функционализировали одним слоем стеарата лантана аналогично тому, как описано в пункте 2.56.

Растворяли 10 мг глобина человека в 10 мл воды, получая раствор с содержанием белка 1 мг/мл. Параллельно готовили раствор ССАп (100 нг/мл) в метаноле. В виалу вместимостью 5 мл помещали 500 мкл раствора белка и добавляли 5 мкл 10% водного раствора аммиака, получая раствор с рН 7,5-7,9. После этого добавляли 50 мкл метанольного раствора ССАп (100 нг/мл) и выдерживали полученный раствор на ультразвуковой бане при комнатной температуре. Герметично закрытую виалу выдерживали 2 часа при температуре 40°С. После инкубирования раствор охлаждали до комнатной температуры. Ферментативный гидролиз в присутствии трипсина и высушивание образца осуществляли в соответствии с пунктом 2.45. В микропробирку с высушенным гидролизатом глобина человека добавили 20 мкл воды, выдерживали на ультразвуковой ванне в течение 1 мин. Образец затем был разбавлен дистиллированной водой в 10 раз; для проведения металл-аффинной экстракции использовали 0,5 мкл разбавленного образца.

Навеску матрицы СНСА массой 5 мг помещали в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 700 мкл ацетонитрила, 10 мкл 10% водной ТГА и 290 мкл дистиллированной воды, перемешивали.

На ячейку мишени наносили 0,7 мкл разбавленного триптического гидролизата алкилированного глобина человека, добавляли 0,7 мкл раствора матрицы СНСА (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% ТFA, высушивали при комнатной температуре. На поверхность ячейки мишени, функционализированную одним слоем стеарата лантана, наносили 7 мкл дистиллированной воды, инкубировали в течение 5 мин, затем фазу удаляли. Для проведения сорбции на сорбент наносили 7 мкл дистиллированной воды, добавляли 0,5 мкл разбавленного триптического гидролизата алкилированной глобина человека и инкубировали в течение 20 мин под крышкой. Затем несвязавшуюся фракцию удаляли, на сорбент наносили 7 мкл дистиллированной воды, убирали каплю и повторяли процедуру промывки еще раз. После на сорбент добавляли 3 мкл 30% водного ацетонитрила с 0,1% TFA и 1,5 мкл раствора матрицы СНСА (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре в течение 20 мин и проводили масс-спектрометрический анализ в соответствии с пунктом 2.41.

2.58 Оценка специфичных и селективных свойств FMe, сформированных на ячейке MALDI мишени, на примере галогенсодержащих аддуктов HHb с ксенобиотиком алкилирующего действия

Растворяли 10 мг глобина человека в 10 мл воды, получая раствор с содержанием белка 1 мг/мл. Параллельно готовили раствор СС2Ап (100 мкг/мл) в метаноле. В виалу вместимостью 5 мл помещали 500 мкл раствора белка и добавляли 5 мкл 10% водного раствора аммиака, получая раствор с рН 7,5-7,9. После этого добавляли 50 мкл метанольного раствора СС2Ап (100 мкг/мл) и выдерживали полученный раствор на ультразвуковой бане при комнатной температуре. Герметично закрытую виалу выдерживали 2 часа при температуре 40 °C. После инкубирования раствор охлаждали до комнатной температуры. Полученный фильтрат, содержащий раствор алкилированного белка, использовали для дальнейших исследований. Ферментативный гидролиз в присутствии трипсина и высушивание образца осуществляли в соответствии с пунктом 2.45. В микропробирку с высушенным гидролизатом глобина человека добавили 20 мкл воды, выдерживали на ультразвуковой ванне в течение 1 минуты.

Поверхность мишени фукнционализировали сорбентами на основе шести слоев стеаратов восьми металлов (Cu, Ni, Co, Fe, In, Ga, Eu, La) в соответствии с пунктом 2.56. Сорбцию триптического гидролизата алкилированного глобина человека осуществляли в трех буферах с различным значением pH: 0,1% TFA (pH 2,0), дистиллированная вода (pH 6,0), 2,5% водный аммиак (pH 10,5). На ячейки мишени, покрытые сорбентом, наносили 7 мкл соответствующего буфера для кондиционирования сорбента, инкубировали в течение 5 минут, затем фазу удаляли. Для проведения сорбции на сорбент наносили 7 мкл соответствующей фазы, добавляли 1 мкл триптического гидролизата алкилированного глобина человека и инкубировали в течение 20 минут под крышкой. Несвязавшуюся фракцию удаляли.

Промывку ячеек с сорбентом после сорбции проводили соответствующим буфером, использованным при сорбции: наносили 7 мкл, убирали каплю и повторяли процедуру еще раз. Для проведения десорбции добавляли 3 мкл 30% водного ацетонитрила с 0,1% TFA и 2 мкл раствора матрицы CHCA (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре в течение 20 минут и проводили массспектрометрический анализ в соответствии с пунктом 2.41.

2.59 Оценка чувствительности подхода для металл-аффинной экстракции галогенсодержащих аддуктов белков крови на FLa, сформированном на ячейке MALDI мишени

Растворяли 10 мг белка в 10 мл воды, получая раствор с содержанием белка 1 мг/мл. Параллельно готовили серию метанольных растворов каждого алкилирующего агента (ССАп и СС2Ап) с концентрацией 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 100 нг/мл и 10 нг/мл. В виалы вместимостью 5 мл помещали по 500 мкл раствора белка и добавляли по 5 мкл 10% водного раствора аммиака, получая растворы с рН 7,5-7,9. После этого в виалы добавляли по 50 мкл метанольного раствора с различными концентрациями алкилирующего агента и выдерживали полученные растворы на ультразвуковой бане при комнатной температуре. Герметично закрытые виалы выдерживали 2 часа при температуре 40°С. После инкубирования растворы охлаждали до комнатной температуры. Аликвоты растворов модифицированных белков объемом 100 мкл отбирали в пробирки и замораживали при -20°С до дальнейшего масс-спектрометрического анализа. Для оставшейся части образца осуществляли ферментативный гидролиз в присутствии трипсина и высушивание в соответствии с пунктом 2.45. В микропробирку с высушенным гидролизатом глобина человека добавили 20 мкл воды, выдерживали на ультразвуковой ванне в течение 1 минуты.

Металл-аффинную экстракцию осуществляли на сорбенте на основе шести слоев стеарата лантана. В виалу вносили навеску нитрата лантана 32,5 мг, добавляли 10 мл 0,1% водного раствора TFA, перемешивали и получали раствор с концентрацией 10-2 моль/л. Ha ячейку 0,7 мкл наносили раствора нитрата лантана $(C = 10^{-2} \text{ моль/л})$ в 0,1% водной TFA, затем на поверхность водной субфазы трижды наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °С раствора стеариновой кислоты в н-гексане. После испарения н-гексана водную каплю аккуратно удаляли. На ячейку повторно наносили 0,7 мкл раствора нитрата лантана (С = 10⁻² моль/л) в 0,1% водной TFA, затем на поверхность водной субфазы трижды наносили 0,7 мкл насыщенного при 20 °С раствора стеариновой кислоты в н-гексане. Затем мишень выдерживали при комнатной температуре в течение 2 мин. Для промывки полученного на поверхности ячеек сорбента добавляли 7 мкл дистиллированной воды, инкубировали в течение 1 мин, каплю удаляли. Процедуру промывки сорбента повторяли еще раз. Затем мишень выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин.

На поверхность мишени, функционализированную шестью слоями стеарата лантана, наносили 7 мкл дистиллированной воды, инкубировали в течение 5 мин, затем добавляли 1 мкл триптического гидролизата алкилированного белка и инкубировали в течение 20 мин под крышкой. Несвязавшуюся фракцию переносили на свободную ячейку и смешивали с 1,5 мкл раствора матрицы СНСА (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA. На сорбент наносили 7 мкл дистиллированной воды, убирали каплю и повторяли процедуру промывки еще раз. После на сорбент добавляли 3 мкл 30% водного ацетонитрила с 0,1% TFA и 2 мкл раствора матрицы СНСА (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре в течение 20 мин и проводили масс-спектрометрический анализ в соответствии с пунктом 2.41.

Замороженные растворы модифицированных белков размораживали при комнатной температуре в течение 40 мин. На ячейку мишени наносили 1 мкл раствора модифицированного белка, выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем наносили 2 мкл раствора матрицы DHB (5 мг/мл) в 50% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин. MALDI массспектрометрический анализ осуществляли с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра ultrafleXtreme. Спектры регистрировали в диапазоне m/z 5000-20000 в линейном режиме с детектированием положительных ионов при следующих настройках: напряжения 1 и 2 на источнике равны 20,1 и 18,9 кВ соответственно; напряжение на линзах 5,6 кВ; импульсная экстракция ионов 250 нс. Для одного спектра суммировалось 15000 актов облучения образца лазером.

2.60 Проведение UV/TiO₂-PCO DCL

Для проведения UV-фотокаталитического окисления в присутствии наночастиц TiO₂ (UV/TiO₂-PCO) в кварцевую колбу объемом 100 мл помещали водный раствор DCL (10 мкг/мл), содержавший суспензию нанопорошка TiO₂ (1 мг/мл). Суспензию обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10 мин. Затем колбу помещали на магнитную мешалку, окружали по периметру восьмью UV-лампами (9 Вт, 365 нм) и проводили UV облучение в течение 15 мин при 20°C при интенсивном перемешивании. По завершении облучения из суспензии отбирали аликвоту в микропробирку, осаждали нанопорошок TiO₂ путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин, полученный супернатант пропускали через фильтрующую насадку с диаметром пор 0,2 мкм.

2.61 Масс-спектрометрический анализ продуктов UV/TiO₂-PCO DCL

Использовали масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением (ESI-FT-ICR-MS) SolariX XR 7T (Bruker Daltonics, Германия). Образцы вводили в режиме прямого ввода (2 мкл/мин) в источник ESI с использованием микрошприца Microliter Model 710 N (Hamilton, CША). Спектры получали в режиме регистрации отрицательных ионов в диапазоне m/z 150 – 600. Параметры работы источника ESI: напряжение электрораспыления – 4,5 кВ; давление в распылителе – 2,5 бар; осушающий газ – азот; скорость потока осушающего газа – 6 л/мин; температура осушающего газа – 150°С. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия (100 мкг/мл в 50% водном ацетонитриле), образующего кластерные ионы в интересующей области масс с m/z от 100 до 600 с интервалом 135,97 Да.

2.62 Получение аддуктов глобина человека с продуктами UV/TiO₂-PCO DCL

Растворяли 10 мг глобина человека в 10 мл воды, получая раствор с содержанием белка 1 мг/мл. В микропробирку помещали 500 мкл раствора белка (1 мг/мл) и добавляли 500 мкл раствора, полученного по результатам проведения UV/TiO₂-PCO диклофенака, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. Затем 500 мкл полученного раствора помещали в центрифужный фильтр Amicon® Ultra-0.5 10К (Merck KGaA, Германия) и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин Полученный раствор использовали далее для проведения триптического гидролиза в соответствии с пунктом 2.45.

2.63 Металл-аффинная экстракция аддуктов глобина человека с продуктами UV/TiO2-PCO DCL на поверхности MALDI мишени, функционализированной FMe или MeOx

На ячейку мишени наносили 0,7 мкл триптического гидролизата глобина человека, модифицированного продуктами UV/TiO₂-PCO DCL, добавляли 0,7 мкл раствора матрицы CHCA (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре.

На поверхность мишени, функционализированную пленками стеаратов металлов (FFe, FNi, FCu) или оксидами металлов (FeOx, NiOx, CuOx), наносили 7 мкл дистиллированной воды, инкубировали в течение 5 мин. Для проведения сорбции в водную каплю добавляли 1 мкл триптического гидролизата глобина человека, модифицированного продуктами UV/TiO₂-PCO диклофенака, и инкубировали в течение 20 мин под крышкой. Затем несвязавшуюся фракцию удаляли, на сорбент наносили 7 мкл дистиллированной воды, каплю удаляли и повторяли процедуру промывки еще раз. После на сорбент добавляли 3 мкл 30% водного ацетонитрила с 0,1% TFA и 2 мкл раствора матрицы CHCA (5 мг/мл) в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре в течение 20 мин.

2.64 Моделирование биотрансформации амодиахина с использованием микрореак-

торного устройства с последующей металл-аффинной экстракцией аддуктов глобина человека на поверхности MALDI мишени, функционализированной FLa

Для выполнения эксперимента было использовано 96-луночное фотокаталитическое микрореакторное устройство, разработанное в Институте аналитического приборостроения РАН и позволяющее проводить UV/TiO₂-PCO непосредственно на MALDI мишени.

Перед установкой микрореакторной насадки поверхность части ячеек MALDI мишени была функционализирована 3 коллапсированными монослоями FLa так, как описано в п. 2.56. Еще одна часть ячеек была функционализирована TiO₂ путем катодного электрофоретического осаждения (EPD) наночастиц TiO₂. EPD TiO₂ проводили в

потенциостатическом режиме. В качестве ячейки для проведения EPD использовали стеклянный мерный стакан, заполненный электролитом, с погруженными в него электродами (электрод 1 – MALDI мишень; электрод 2 - пластина, изготовленная из нержавеющей стали 316L), расстояние между электродами составляло 1 см. Разность потенциалов между электродами составляла 35 В. Для предварительной очистки электроды последовательно обрабатывали ультразвуком в хлороформе, метаноле и воде. В качестве электролита был использован ацетилацетон, содержавший TiO₂ (2 г/л) и йод (0,08 г/л). Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 60 минут, после чего перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут. EPD осуществляли в течение 180 секунд. После пластины высушивали при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего прокаливали в сушильном шкафу при 250 °C в течение 3 часов. Для модификации поверхности TiO₂ полидиметилсилоксаном подложку с электрофоретически осажденным TiO₂ покрывали тонким слоем силиконового масла (ПМС-100) и помещали под UV лампы (9 Вт, 365 нм) на 60 минут, после чего последовательно промывали хлороформом и метанолом.

Для проведения UV/TiO₂-PCO амодиахина (AQ) микрореакторное устройство закрепляли на MALDI мишени с помощью перфорированной эластомерной прокладки. В лунку микрореакторного устройства добавили 150 мкл водного раствора AQ (1 мкг/мл). Установили на микрореакторное устройство светодиодный модуль с охлаждающим термоблоком, поместили собранное устройство в шейкер-инкубатор и проводили UV/TiO₂-PCO в течение 20 минут при постоянном перемешивании. По окончании UV/TiO₂-PCO AQ из лунки отбирали 20 мкл образца для ESI-FT-ICR-MS (проводили в соответствии с п. 2.61, но в режиме регистрации положительных ионов) и SALDI-FT-ICR-MS анализа продуктов UV/TiO2-PCO. SALDI-FT-ICR-MS анализ осуществляли с использованием масс-спектрометра SolariX XR 7T. На ячейки мишени, поверхность которой была покрыта TiO₂ (полидиметилсилоксан), наносили 1 мкл образца и высушивали при комнатной температуре. Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме положительных ионов в диапазоне m/z 150-500. Для калибровки был использован источник ионизации электрораспылением, которым также оснащена данная модель массспектрометра. Калибровку проводили с использованием раствора трифторацетата натрия, образующего кластерные ионы в области m/z от 100 до 1000 с интервалом 135,97.

Затем в лунки добавили 5 мкл водного раствора глобина человека (1 мг/мл). Накрыли микрореакторное устройство силиконовым листом и выдерживали при температуре 37°C в шейкере-инкубаторе в течение 60 минут. Удаляли силиконовый лист, отбирали 5 мкл образца для MALDI MS анализа в соответствии с п. 2.59, после чего грели микрореакторное устройство при 40°C до полного испарения растворителя.

В лунки с модифицированным глобином человека добавляли 150 мкл трипсина (30 мкг/мл) в 25 мМ бикарбонате аммония (pH 8,5). Микрореакторное устройство накрывали силиконовым листом, инкубировали в течение ночи при температуре 37° C в шейкере-инкубаторе. Удаляли силиконовый лист, несвязавшуюся фракцию с поверхности сорбента собирали и переносили на свободную ячейку, добавляли раствор матрицы СНСА (5 мг/мл в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA). На ячейку с сорбентом наносили 7 мкл дистиллированной воды, выдерживали 1 минуту, каплю удаляли, процедуру повторяли ещё один раз. На ячейку с сорбентом наносили 3 мкл 30% водного раствора ацетонитрила с 0,1% TFA и 2 мкл раствора матрицы СНСА (5 мг/мл в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA). Высушивали при комнатной температуре в течение 10 минут.

МАLDI MS анализ осуществляли в соответствии с п. 2.41. Идентификацию аддуктов глобина человека осуществляли с использованием программного обеспечения Mascot (Matrix Science) при следующих настройках: База данных – Swiss-Prot; Таксон – Homo sapiens; Фермент – трипсин; Число пропущенных ферментом сайтов расщепления – 1; Модификации – AQ-M1 (C), AQ-M4 (C), AQ-Mx (C); Допустимое отклонение в массе пептида – 50 ppm; Допустимое отклонение в массе фрагмента – 0,5 m/z.

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

Чашку Петри наполняли раствором ацетата бария с концентрацией 1 мг/мл таким образом, чтобы верхний мениск незначительно возвышался над краями чашки. На края чашки помещали две стеклянные пластины, выполняющие функцию подвижных барьеров. На поверхность водной фазы наносили 50 мкл раствора смеси насыщенных жирных кислот (лауриновой, тридекановой, миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой и стеариновой), растворенных в н-гексане, в концентрации 25 мкг/мл каждой кислоты. После формирования монослоя подвижные барьеры сдвигали друг к другу на расстояние 5 мм, сколлапсированный между ними монослой собирали шпателем, и после удаления лишней воды переносили в микропробирку. Монослой растворялт в 50 мкл 0,1%

раствора TFA в ацетонитриле. Образец использовали для дальнейшего MALDI массспектрометрического анализа.

2.66 Получение монослоев на основе монокарбоксилатов бария на поверхности MALDI мишени

Каплю водного раствора ацетата бария с концентрацией 1 мг/мл и объемом 0,6 мкл наносили на ячейку полированной мишени из нержавеющей стали (MTP 384 polished steel, Bruker Daltonics, Германия). Затем 0,6 мкл раствора смеси насыщенных жирных кислот (лауриновой, тридекановой, миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой и стеариновой), растворенных в н-гексане, с концентрацией 250 нг/мл каждой, аккуратно наносили поверх водной капли таким образом, чтобы наконечник дозатора касался поверхности водного раствора, но не проникал в него. Процедуру наслаивания органической фазы повторяли еще раз. После высыхания на образец наносили 1,5 мкл 90% водного ацетонитрила с 0,1% TFA и высушивали.

2.67 Оптимизация концентрации матрицы при формировании монослоев на MALDI мишени

Готовили водный раствор ацетата бария в концентрации 1 мг/мл и водные растворы DHB в концентрациях 0,5, 2, и 10 мг/мл. В 3 микропробирки добавляли по 100 мкл раствора ацетата бария (1 мг/мл), затем в одну из микропробирок добавляли 100 мкл раствора DHB (0,5 мг/мл), во вторую - 100 мкл раствора DHB (2 мг/мл), в третью - 100 мкл раствора DHB (10 мг/мл). Таким образом, получили 3 водных раствора, содержащих ацетат бария в концентрации 0,5 мг/мл и DHB в концентрациях 0,25, 1 и 5 мг/мл. Полученные растворы, содержащие ацетат бария и DHB, наносили на 3 ячейки MALDI мишени в объёме 0,6 мкл. Затем н-гексановый экстракт из таллома *Fucus vesiculosus* объёмом 0,6 мкл наносили на каплю водной фазы аналогично тому, как описано в пункте 2.66. На ячейку со сформированными монослоями наносили 1,5 мкл 90% водного ацетонитрила с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре.

2.68 Формирование монослоев монокарбоксилатов бария на MALDI мишени в присутствии матрицы DHB

В микропробирку добавили 100 мкл раствора ацетата бария (1 мг/мл), затем в микропробирку добавили 100 мкл раствора DHB (0,5 мг/мл). Полученный раствор в объёме 0,6 мкл наносили на ячейку MALDI мишени. Затем образец, растворенный в нгексане, объёмом 0,6 мкл наносили на каплю водной фазы аналогично тому, как описано в пункте 2.67. На ячейку со сформированными монослоями наносили 1,5 мкл 90% водного ацетонитрила с 0,1% TFA, высушивали при комнатной температуре.

2.69 Экстракция FFA из биологических образцов различной природы

Образцы семян (n=3) и клубеньков (n=3) гороха посевного (*Pisum sativum* L.) были предоставлены сотрудниками кафедры биохимии растений Санкт-Петербургского государственного университета.

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

Образцы плазмы крови кроликов (*Oryctolagus cuniculus*), порода Советская шиншилла (n = 4) были предоставлены сотрудниками ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

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

2.69.1 Экстракция из семян и клубеньков гороха Pisum sativum L

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

2.69.2 Экстракция из морских организмов

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

2.69.3 Экстракция из плазмы крови и фолликулярной жидкости

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

2.69.4 Экстракция из водоросли Fucus vesiculosus

1. Для отработки методики и валидации: 1 г образца замороженных водорослей *F*. *vesiculosus* помещали в сублимационную установку и лиофилизировали при 0,5 мбар в течение 6 ч. Высушенный образец нарезали на частицы размером 1-2 мм. К нарезанному материалу добавляли 10 мл н-гексана и инкубировали в закрытой виале при 20 °C в течение 24 ч при постоянном перемешивании (60 об/мин). Затем супернатант отделяли декантацией и переносили в полипропиленовую пробирку для дальнейшего анализа.

2. При исследовании состава FFA в спиртовом экстракте: 1 г образца замороженных водорослей *F. vesiculosus* нарезали на частицы размером 1-2 мм. К нарезанному образцу таллома добавляли 5 мл 96% этанола и инкубировали в соответствии с процедурой, описанной выше. Затем образцы центрифугировали (12045 g, 5 мин), супернатант (1 мл) переносили в чистые полипропиленовые пробирки и концентрировали под потоком азота. Полученный сухой остаток растворяли в 2 мл н-гексана.

2.70 Исследование изменения относительного содержания FFA в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом ртути

Образцы плазмы крови интактных крыс (n = 7) и крыс, подвергнутых хроническому отравлению ацетатом ртути (n = 7), объёмом 200 мкл смешивали с 200 мкл нгексана, инкубировали при перемешивании на мульти-ротаторе RS-60 (Biosan, Латвия) с угловой скоростью 60 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали в течение 30 мин при 12045 g и отбирали органическую фазу в объеме 100 мкл в чистую микропробирку для последующего анализа. В микропробирке типа эппендорф смешали 100 мкл раствора ацетата бария (0,5 мг/мл) и 100 мкл раствора 2,5-DHB (0,5 мг/мл). Полученный раствор в объёме 0,6 мкл наносили на ячейку MALDI мишени. Затем образец, растворенный в н-гексане, объёмом 0,6 мкл дважды наносили непосредственно на поверхность капли таким образом, чтобы наконечник дозатора касался поверхности водного раствора, но не проникал в него. После распределения образца по поверхности ячейки и высыхания водной фазы, на ячейку со сформированными монослоями наносили 1,5 мкл 90% (об/об) водного ацетонитрила, высушивали при комнатной температуре.

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

2.71 Масс-спектрометрический анализ FFA в составе монослоев монокарбоксилатов бария методом MALDI MS

осуществляли с помощью тандемного Анализ времяпролетного массспектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Германия) в режиме «рефлектрон» с детектированием положительных ионов. Спектры регистрировали в диапазоне m/z 150-800 при значениях напряжений 1 и 2 на источнике равных 20,0 и 17,9 кВ соответственно. Напряжения на линзах, отражателе и на детекторе отражателя были равны 7,0, 21,1 и 10,9 кВ соответственно. Число актов облучения образца лазером при регистрации одного спектра составляло не менее 24500, частота выстрелов – 2000 Гц. Импульсная задержка экстракции ионов - 120 нс. Регистрацию и интерпретацию спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control и Flex Analysis 3.4. Тандемные масс-спектры получали в режиме LIFT lowmass (LIFT 1 и 2 равны 19,0 и 4,5 кВ, соответственно); окно селектора иона предшественника – 1 Да, время импульсной экстракции ионов – 90 нс. Напряжения 1 и 2 на источнике, напряжение на линзах были равны 7,5, 6,8 и 3,5 кВ соответственно.

Калибровку проводили по сигналам монозамещенных солей бария следующих 5 кислот: 2,5-дигидроксибензойная (m/z 290,9240), миристиновая (m/z 365,1059), пальмитиновая (m/z 393,1372), стеариновая (m/z 421,1685), арахидоновая (m/z 441,1377).

2.72 Анализ свободных жирных кислот методом GC MS в экстрактах водорослей *Fucus vesiculosus*

Fucus vesiculosus нативный, свежезамороженный 1 г заливали 5 мл смеси этанолацетон 1:2 и выдерживают при 20°С в течение суток. Экстракт отделяли и упаривали в токе азота при 40°С. Полученный сухой материал растворяли в 2 мл хлороформа, фильтровали раствор через ватный фильтр и упаривали досуха в токе азота при 20°С. К полученному остатку приливали 1 мл метанола, 0,1 мл эфирата трифторида бора и нагревали при 50°С в течение 5 мин, к реакционной смеси добавляли 5 мл дистиллированной воды и 3 мл смеси дихлорметан-н-гексан (1:5, об/об). Смесь встряхивали, отделяли органический экстракт и промывали его водой, после чего упаривали досуха в токе азота при 20°С. Полученный остаток (около 4 мг) растворяли в 4 мл хлороформа.

Анализ полученного образца проводили методом газовой хроматографии с массспектрометрическим детектированием (GC MS) с помощью газового хроматографа с масс-селективным детектором Agilent 7890A MSD 5977E (Agilent Technologies, США). Условия проведения GC MS анализа приведены в Таблице 2.

Колонка	HP-5-MS капиллярная колонка $(30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \text{ ID}, 0.25 \text{ мкм} \text{ film thickness}, Agilent Technologies CIIIA)$				
Газ-носитель	Гелий				
Скорость газа-носителя	1 мл/мин				
Температура испарителя	280°C				
Температурная программа термостата колонки	25 мин при 105 °C подъём температуры со скоростью 7 град/мин до 280°C 15 мин при 280°C				
Объем вводимой пробы	1 мкл				
Метод ионизации	Электронная ионизация				
Энергия электронов	70 эВ				
Диапазон m/z	50 - 550				

Таблица 2 – Условия GC MS анализа

2.73 Сравнение профилей FFA в составе н-гексановых экстрактов из агробактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021

Н-гексановые экстракты из агробактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021 (n=4 для каждого вида) были получены от сотрудников кафедры биохимии растений СПбГУ. Каждый из полученных экстрактов наносили на три ячейки мишени в соответствии с пунктом 2.67 и с каждой ячейки регистрировали по три масс-спектра в соответствии с пунктом 2.70 в режиме автоматической регистрации масс-спектров. Полученные масс-спектры переводили в формат .mzxml и загружали в рабочее пространство программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2. Для нормализации данных использовали значение полного ионного тока или интенсивность сигнала m/z 421. Нормализованные данные затем в формате .xls загружали в рабочее пространство онлайн-программы MetaboAnalyst 4.0., где проводили сравнение между двумя видами методами многомерной статистики.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Формат «лаборатория на мишени» реализуется за счет интеграции нескольких стадий пробоподготовки при целевом анализе определенных компонентов в составе сложных образцов в рамках одной платформы на основе MALDI мишени. В первую очередь рассматривается возможность специфичной экстракции аналитов как для повышения чувствительности анализа, так и для концентрирования образца непосредственно на MALDI мишени. Структуры, содержащие атомы металлов, хорошо себя зарекомендовали в качестве металл-аффинных сорбентов при экстракции соединений, содержащих электрон-донорные гетероатомы. Такие сорбенты можно разделить на два класса: металл-оксидные, когда атом металла является составной частью оксида, и металл-хелатные, в случае ковалентного или координационного связывания атома металла с твердой подложкой. При этом оксидные структуры обеспечивают более высокую химическую стабильность по сравнению с хелатирующими фазами [562], которые обычно основаны на агарозе и содержат соответствующие спейсерные и хелатирующие функциональные группы, способные координировать ионы металлов, такие как иминодиацетат (IDA), нитротриуксусная кислота (NTA) и трис-(карбоксиметил) этилендиамин (TED). Поскольку электроны орбитали хелатора не занимают все вакантные иона металла, запасные координационные центры (занятые водой или буферными молекулами) могут быть легко заменены нуклеофильными группами, например фосфатными группами пептидов [563]. Таким образом, связывание с неподвижной фазой и элюирование осуществляются в кислых (pH 2-3) и щелочных (pH 9-11) условиях, соответственно [564]. Водный аммиак, пиперидин или разбавленная фосфорная кислота являются наиболее распространенными элюентами в таких экспериментах. К сожалению, коммерчески доступные стационарные фазы для IMAC/MOAC на основе хелатов или оксидов дороги и зачастую характеризуются низкой селективностью и специфичностью (то есть высокими скоростями неспецифического связывания пептидов, содержащих аспартат и глутамат). Более того, существующие подходы демонстрируют низкое извлечение целевых аналитов [564], независимо от применяемых систем элюентов [565].

Соответственно, на первом этапе были проведены разработка и исследование структур, обладающих металл-аффинными свойствами, проявляющими высокий уровень специфичности и селективности и способных надежно связываться с металлической поверхностью мишени, что необходимо для реализации подхода «лаборатория на мишени».

3.1 Разработка и исследование структур для функционализации поверхности MALDI мишени

Металл-аффинные сорбенты, содержащие такие переходные металлы, как Zr(IV), Fe(III), Ni(II) и Cu(II), достаточно часто используют в биоорганическом анализе. Так, структуры, имеющие в составе Zr(IV) и Fe(III), успешно применяют в фосфопротеомном анализе [368], а сорбенты, содержащие Ni(II) и Cu(II), традиционно используют при очистке рекомбинантных гистидин-меченных белков [566]. При этом особый интерес представляют пористые металл-оксидные структуры на основе этих металлов, образующиеся при синтезе золь-гель методом, зарекомендовавшим себя, как способ получения высокодисперсных оксидов металлов. На сегодняшний день нанодисперсные оксиды металлов являются одними из наиболее часто используемых материалов для модифицирования поверхности MALDI мишени. В связи с этим материалами для создания покрытия на основе металл-оксидных сорбентов (MeOx) были выбраны оксиды вышеперечисленных металлов (ZrOx, FeOx, NiOx и CuOx), синтезированные золь-гель методом, усовершенствованным микроволновой обработкой.

Отдельной задачей был выбор материала для создания покрытия на основе металл-хелатных сорбентов. Стоит отметить, что монослои Ленгмюра, формирующиеся на границе раздела фаз, при нанесении н-гексанового раствора стеариновой кислоты (HSt) на поверхность водной субфазы, содержащей ионы металла, и нашедшие свое применение во многих областях науки и техники, также могут рассматриваться, как металл-аффинные сорбенты, благодаря одной из поверхностей, полностью состоящих из атомов металла. Известно, что монослои Ленгмюра обладают высокой адгезией к твердым подложкам, что также делает их перспективным материалом (FMe) для модифицирования поверхности MALDI мишени. Однако, если монослои на основе стеаратов Fe(III), Ni(II) и Cu(II) (FFe, FNi, FCu) достаточно легко формируются, то в случае Zr(IV) образование таких структур невозможно в виду амфотерных свойств циркония. Поэтому при исследовании структур на основе стеаратов металлов вместо циркония, не образует устойчивых во времени оксидов, а с другой – из-за большего

ионного радиуса и протяженных диффузных валентных орбиталей ионы La(III) имеют широкие возможности для координации.

3.1.1 Разработка и стандартизация металл-аффинных пористых сорбентов на основе оксидов металлов (MeOx)

3.1.1.1 Получение и стандартизация металл-аффинных пористых сорбентов на основе оксидов металлов (MeOx)

В последнее время для увеличения скорости процессов, протекающих в гетерофазных системах, все чаще используется микроволновая обработка [567]. Ее применение позволяет реализовать такие важные физико-химические процессы как дегидратация, разложение солевых и гидроксидных прекурсоров, синтез и спекание многокомпонентных соединений. При этом удается добиться существенного снижения временных и энергетических затрат по сравнению с традиционными способами проведения этих процессов. Более того, в ряде случаев использование микроволнового воздействия позволяет осуществить синтез однофазных соединений, которые не удается получить при использовании обычных методов нагревания [568].

Микроволновая обработка неорганических смесей относится к числу перспективных методов повышения скорости твердофазных процессов. В силу особенностей микроволнового нагрева этот метод открывает широкие возможности для синтеза порошков неорганических соединений с контролируемыми свойствами при использовании электромагнитной энергии. Среди особенностей микроволнового синтеза можно назвать равномерное нагревание образцов во всем объеме вещества, высокую скорость и низкую инерционность нагрева и возможность осуществления избирательного нагревания отдельных компонентов смеси веществ. Кроме того, использование микроволновой обработки позволяет получать хорошо закристаллизованные порошки оксидных материалов с низкой дефектностью [569].

В литературных данных о механизме разложения нитратов переходных металлов отмечено, что наблюдаемое в процессе микроволновой обработки кристаллогидрата нитрата меди выделение из раствора газообразного NO₂ однозначно указывает на то, что начало процесса формирования оксидной фазы предшествует полному удалению воды из обрабатываемого образца. Таким образом, начало процесса формирования оксидной фазы процесса формирования оксидной жидком состоянии и может активно поглощать микроволновое излучение [570].

Согласно результатам исследования растворов нитратов металлов и мочевины методом масс-спектрометрического анализа с ионизацией электрораспылением во время синтеза в растворах присутствуют ионы NH_2 –CO–O⁻ (остаток карбамата аммония) и H_2N –CO–NH–CO–NH₃⁺ (ион биурета). По наличию таких веществ в растворе в процессе синтеза, а также исходя из данных по зависимости давления от температуры, можно предположить схему реакций, происходящих в растворе, которая согласуется с процессами высокотемпературного гидролиза мочевины в водной среде [571].

При микроволновом нагреве водных растворов выше 100°С на первой стадии в растворе происходит гидролиз карбамида, который превращается в карбамат аммония (18), который в свою очередь разлагается на аммиак и диоксид углерода (19). В случае нагревания водных растворов карбамида, одновременно с гидролизом происходит термическое разложение карбамида с образованием биурета и выделением аммиака (20). Выделение газообразных продуктов увеличивает давление в системе. Наличие аммиака в растворе, содержащем ионы d-металлов, приводит к образованию гидроксидных форм по механизму золь-гель метода синтеза (21).

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \leftrightarrow NH_2 - CO - ONH_4.$$
(18)

$$NH_2-CO-ONH_4 \leftrightarrow 2NH_3 + CO_2. \tag{19}$$

$$2H_2N-CO-NH_2 \rightarrow H_2N-CO-NH-CO-NH_2 + NH_3.$$
(20)

$$x M(NO_3)_3 + 3x - y NH_3 H_2O = M_x(OH)_y + 3x NH_4NO_3.$$
 (21)

Дальнейшая микроволновая обработка, приводящая к полному испарению воды в открытой системе, вызывает локальный перегрев на частицах гидроксидов, наличие электронно-ионной проводимости у которых позволяет поглощать микроволновое излучение, что сопровождается локальным разогревом частиц гидроксида, которые, отщепляя воду, переходят в оксид. Наличие источников высокой температуры (микроволновый нагрев частиц оксидов металлов локально повышает их температуру до 1000-1500°C) вызывает разложение нитрата аммония и других продуктов деградации мочевины до различных оксидов углерода и азота. Схематично уравнения реакции образования нанопористых оксидов можно представить уравнениями 22-25. Стоит отметить, что при получении диоксида циркония был добавлен нитрат иттриия в количестве 5 мол. % для стабилизации синтезируемой тетрагональной формы оксида циркония, обеспечивающей лучшее формирование пор (25).

$$Fe(NO_3)_3 + 1,5NH_2CONH_2 \rightarrow Fe_2O_3 + 1,5N_2O + 1,5CO_2 + 3H_2O.$$
(22)

$$Cu(NO_3)_2 + (NH_2)_2CO = CuO + 2N_2O + CO_2 + 2H_2O.$$
 (23)

$$Ni(NO_3)_2 + (NH_2)_2CO = NiO + 2N_2O + CO_2 + 2H_2O.$$
 (24)

$$0,95 \text{ ZrO}(\text{NO}_3)_2 + 0,05 \text{ Y}(\text{NO}_3)_3 + 1,025 \text{ NH}_2\text{CONH}_2 \rightarrow \rightarrow \text{Zr}_{0,95}\text{Y}_{0,05}\text{O}_{1,975} + 1,025 \text{ N}_2\text{O} + 1,025 \text{ CO}_2 + 3,075 \text{ H}_2\text{O}.$$
(25)

Исследование морфологии синтезированных оксидов было проведено методом сканирующей электронной микроскопии (SEM) (Рисунок 21), фазовый состав определяли методом рентгенофазового анализа (XRD) (Таблица 3).



Рисунок 21 – Результаты XRD анализа FeOx (А), NiOx (Б), CuOx (В) и ZrOx (Г). На врезках представлены микрофотографии соответствующих MeOx, перенесенных на кремниевую подложку

По виду частиц получаемые оксиды можно разделить на две группы:

1) пористая структура без выделения отдельных частиц;

2) сферические частицы.

К первой группе относятся FeOx и ZrOx; ко второй – NiOx, CuOx. Особенности процесса связаны с различием температур испарения растворителя и различием температур превращения оксидов в гидроксиды.

Для определения размера частиц и агрегатов в водной дисперсионной среде был проведен седиментационный анализ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в среднем размер диспергированных частиц FeOx составляет примерно 10 нм, ZrOx, NiOx и CuOx - около 20 нм (Таблица 3).

Состав MeOx определяли с помощью EDX спектроскопии. Во всех образцах присутствуют только кислород и соответствующий металл. В Таблице 3 приведены величины массового содержания элементов в оксидах. Во всех случаях содержание металла соответствует расчетному с отклонением в пределах точности измерения.

3.1.1.2 Исследование поверхностных свойств металл-аффинных сорбентов на основе оксидов металлов (MeOx)

Удельную поверхность полученных структур определяли по низкотемпературной сорбции азота с последующими рассчетами по методу Брунауэра-Эммета-Теллера (ВЕТ) [572]. Расчет площади и объема пор образцов проводили методами Барретта-Джойнера-Галенды (ВЈН) [573], Хорвата-Кавазое [574], методами функционала плотности [575] и т-графика [576]. Полученные результаты представлены в Таблице 3.

Электрокинетический потенциал (ξ-потенциал) измеряли методом микроэлектрофореза и рассчитывали по формуле Гельмгольца-Смолуховского без введения поправок (Таблица 3). Исходя из полученных значений изоэлектрической точки, можно сделать вывод, что MeOx могут быть использованы в качестве металл-аффинных сорбентов, и сорбцию следует проводить в кислых растворах при pH не выше 5.

Сорбционную емкость для FeOx и ZrOx оценивали по фосфорилированному пептиду SSNGHVYpEKLSSI, а для NiOx и CuOx по глобину крысы. Все разработанные структуры продемонстрировали высокую сорбционную емкость, сравнимую с коммерческими аналогами (Таблица 3).

Для исследования химической устойчивости использовали растворители, представленные в Таблице 4. Подбор растворителей был обусловлен стандартными условиями проведения металл-аффинной хроматографии. Все сорбенты проявляют устойчивость как в стандартных водных элюентах, так и в органических.

Сорбент	Сорбционная емкость	Удельная поверхность, ^{M²/г}	Средний размер частиц, нм	Изоэлектриче- ская точка, ед. pH	Пористость, см ³ /г	Химический состав, мас. %; результаты XRD
FeOx(III)	0,019 мкмоль/г по пептиду SSNGHVYpEKLSSI	60±6,0	10-20	5,5±0,2	0,17±0,03	Fe – 70±1, О – 30±1 Гематит
ZrOx(IV)	0,019 мкмоль/г по пептиду SSNGHVYpEKLSSI	45±4,5	10-30	6,9 ±0,2	0,0020±0,0004	Zr – 70±2, Y – 3±2, O– 26±2 Циркон
CuOx(II)	0,067 мкмоль/г по глобину крысы	2,5±0,3	10-20	5,5±0,2	0,012±0,002	Cu – 80±,1 О – 20±1 Тенорит
NiOx(II)	0,057 мкмоль/г по глобину крысы	31±3,2	10-30	6,5 ±0,2	0,07±0,02	Ni – 78±2, O – 22±1 Бунзенит

Таблица 3 – Основные характеристики разработанных МеО	X
---	---

Таблица 4 –	Результаты	исследования	химической	устойчивости	MeOx

Растворитель	FeOx	NiOx	CuOx	ZrOx
Вода	Да	Да	Да	Да
0,1% трифторуксусная кислота	Да	Да	Да	Да
0,1% муравьиная кислота	Да	Да	Да	Дa
2% уксусная кислота	Да	Да	Дa	Дa
5% аммиак	Да	Да	Дa	Дa
0,5 % пиперидин	Да	Да	Да	Дa
0,5 % триэтиламин	Да	Да	Дa	Дa
100% ацетонитрил	Да	Да	Дa	Дa
100% метанол	Да	Да	Да	Дa
100% этанол	Да	Да	Да	Дa
100% изопропанол	Да	Да	Да	Дa
Тетрахлорметан	Да	Да	Дa	Дa
н-гексан (и другие предельные растворители)	Да	Да	Дa	Дa
минеральные кислоты	Нет	Нет	Нет	Дa

3.1.2 Разработка и стандартизация металл-аффинных сорбентов на основе монослоев Ленгмюра (FMe)

3.1.2.1 Получение и стандартизация металл-аффинных сорбентов на основе монослоев Ленгмюра (FMe)

Технология Ленгмюра позволяет получить уникальные мономолекулярные слои на основе амфифильных соединений или их солей [538]. Образование монослоя происходит на границе раздела двух фаз: водной и органической [577]. Характерное расположение амфифильной молекулы на границе раздела фаз (в качестве амфифильного соединения, как основы сорбента, рассматривается HSt, благодаря ее способности формировать жесткие монослои, нерастворимые в воде и во многих полярных растворителях) обеспечивает процесс образования соли за счет диссоциации полярной карбоксильной группы, погруженной в водную фазу, содержащую ионы металлов [578]. Ранее было показано, что включение в монослой как трехвалентных, так и двухвалентных металлов в условиях, когда HSt находится в диссоциированном состоянии, происходит преимущественно по двум остаткам жирной кислоты [579]. При этом в случае трехвалентных металлов одна валентность остается лабильной и может быть занята гидроксильным ионом, либо кислотными остатками, входящими в состав используемой для формирования монослоя соли или кислоты [580]. Уникальное строение монослоев Ленгмюра на основе солей HSt, а именно структура жесткой пленки толщиной в одну молекулу, одна из поверхностей которой состоит из ионов металлов, позволило сделать предположение о возможности использования этого материала в качестве металл-аффинного сорбента. Если рассматривать основные требования, предъявляемые к сорбентам, монослои Ленгмюра соответствуют большинству из них. Во-первых, структура монослоя стеарата металла гарантирует не только наличие ионов металла на поверхности сорбента, но и благодаря совершенно плоской структуре обеспечивает полную доступность активных центров для молекул аналита, независимо от размеров 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 необходи-
мом количестве непосредственно перед экспериментом. К недостаткам такого материала можно отнести процесс слипания монослоев при коллапсировании, которое может происходить по механизму образования мультимолекулярных LBF. Однако, как было показано нами 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 [581], особенно с появлением таких коммерчески доступных устройств для batch-экспериментов, как спиновые колонки [582]. 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.

Монослои стеаратов металлов получали в специальной ванне, заполненной раствором соли соответствующего металла (нитрата или хлорида) в концентрации 10⁻⁴ моль/л при рН 5, в таких условиях практически полностью исключается физическая сорбция ионов металла на поверхности монослоя [583,584]. На водную подложу аккуратно добавляли концентрированный раствор HSt в н-гексане до образования однородной опалесцирующей пленки на поверхности водной субфазы. Монослой оставляли на водной подложке на 2 минуты для полного прохождения реакции солеобразования (ранее было показано, что такого времени достаточно для максимально возможного перехода кислоты в соль). Затем с помощью подвижных барьеров коллапсировали в одном направлении (1D-коллапсирование), и при помощи плоского шпателя собирали для переноса в спиновую колонку или другое устройство, в зависимости от целей эксперименколлапсирование та, осуществляя В перпендикулярном направлении (2Dколлапсирование). Такой способ обеспечивал распад монослоя большой площади на множество маленьких пленок по границам слома первоначального слоя. Процесс слипания исключали путем обработки коллапсированных монослоев 100% ацетонитрилом.

В соответствии с особенностями получения материала, количество сорбента, используемого при проведении анализа, оценивали по площади первоначально сформированного монослоя (площадь поверхности водной фазы в ванне, ограниченной барьерами). Тем более, что при использовании подвижных барьеров и шпателя, покрытых тонким слоем гидрофобного материала (например, парафина), коллапсирование и перенос монослоя из ванны в пробирку происходит без видимых потерь материала. Однако при этом требуется контроль количества водной фазы, которая остается на поверхности сорбента даже после удаления основной ее массы путем центрифугирования. Соответственно, первые эксперименты по характеризации сорбентов на основе монослоев стеаратов металлов (FMe) были посвящены стандартизации монослоев (установление соотношения масса/площадь) и определению остаточной влажности материала после его получения.

Монослои вследствие их толщины, определяемой размером одной молекулы, характеризуются очень невысоким отношением масса/площадь. Поэтому для стандартизации FMe для каждого технического повтора было получено по 1000 дм² всех материалов. Дм² были выбраны в качестве единицы измерения площади по этой же причине. После высушивания материала в вакууме и взвешивания была установлена величина отношения массы к площади монослоев (Таблица 5). Как и ожидалось, эта величина оказалась невысокой для всех FMe. При этом небольшой разброс значений, полученных при взвешивании, продемонстрировал хорошую воспроизводимость процессов коллапсирования и переноса монослоев с поверхности водной фазы в емкость для проведения эксперимента.

Для определения влажности были использованы спиновые колонки, так как с их помощью можно максимально удалить избыток водной фазы без потерь твердого материала путем центрифугирования. Влажность материала определяли по разнице массы после центрифугирования и после высушивания в вакууме (Таблица 5). Результаты показали, что FMe способны удерживать значительное количество водной фазы после коллапсирования, переноса в спиновую колонку и центрифугирования. Поэтому при проведении металл-аффинной хроматографии с использованием FMe дополнительная про-

146

мывка сорбентов для удаления остатков свободных ионов металлов является необходимой.

В случае трехвалентных металлов структурное звено сорбента определяли методом MALDI MS. Монослои, перенесенные в микропробирку, оставляли под слоем 100% ацетонитрила для частичного растворения, после чего анализировали. В масс-спектрах были детектированы сигналы, соответствующие ионам $Fe(C_{17}H_{35}COO)_{2}^{+}$ и La($C_{17}H_{35}COO)_{2}^{+}$, что свидетельствует о формировании монослоя на основе дистеаратов трехвалентных металлов с одной лабильной валентностью. Двухвалентные металлы (Cu и Ni) в монослое также находятся в составе дистеаратов, как это было показано ранее [585,586].

Для исследования морфологии коллапсированные FMe были перенесены на кремневую подложку и исследованы методом SEM (Рисунок 22), также как и при характеризации MeOx.



Рисунок 22 – Микрофотографии FFe (А), FNi (Б), FCu (В) и FLa (Г), перенесенных на кремниевую подложку

По результатам исследования можно сделать вывод, что для всех FMe сохраняется доступность поверхности для взаимодействия с аналитом, притом что монослой при коллаписировании сжимается более чем в 100 раз.

3.1.2.2 Исследование физико-химических свойств металл-аффинных сорбентов на основе монослоев Ленгмюра (FMe)

Основными параметрами характеризации сорбента являются удельная поверхность, изоэлектрическая точка, сорбционная емкость и устойчивость к растворителям, применяющимся при экстракции.

Значение удельной поверхности было рассчитано при условии, что полученные частицы не обладают пористостью. Результаты, представленные в Таблице 5, свидетельствуют о соответствии установленных величин удельной поверхности требованиям, предъявляемым к сорбентам.

ξ-потенциал измеряли так же, как и при исследовании MeOx. Исходя из полученных значений изоэлектрической точки (Таблица 5), можно сделать вывод, что FMe могут быть использованы в качестве сорбентов, при этом сорбцию следует проводить в кислых растворах при pH не выше 3.

Сорбент	Сорбционная ем- кость	Удельная поверхность, м ² /г	Удельная масса, мг/дм ²	Изоэлектрическая точка, ед. pH	Влажность, %	Основное структурное звено
FFe	0,035 мкмоль/г по пептиду SSNGHVYpEKLSSI	15,0±1,5	0,028±0,001	3,6±0,2	61±2	Fe(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂ ⁺
FLa	0,013 мкмоль/г по пептиду SSNGHVYpEKLSSI	34,5±3,5	0,029±0,003	3,3±0,2	63±2%	La(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂ ⁺
FCu	0,198 мкмоль/г по глобину крысы	14,01±1,5	0,018±0,002	3,9±0,2	60±2%	Cu(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂
FNi	0,168 мкмоль/г по глобину крысы	20,0±2,1	0,022±0,003	3,5±0,2	63±2%	Ni(C ₁₇ H ₃₅ COO) ₂

Таблица 5 – Основные характеристики разработанных FMe

По аналогии с MeOx сорбционную емкость FFe и FLa, оценивали по фосфорилированному пептиду SSNGHVYpEKLSSI, a FNi и FCu - по глобину крысы. Все разработанные структуры продемонстрировали достаточно высокую сорбционную емкость, сравнимую с коммерческими аналогами (Таблица 5).

Для исследования химической устойчивости использовали растворители, представленные в Таблице 6. Все сорбенты проявляют устойчивость, как в стандартных водных элюентах, так и в полярных органических, за исключением FLa, который устойчив в 100% ацетонитриле только в течение 5 минут.

Растворитель	FFe	FNi	FCu	FLa
Вода	Дa	Дa	Да	Да
0,1% трифторуксусная кислота	Дa	Дa	Дa	Да
0,1% муравьиная кислота	Дa	Дa	Дa	Да
2% уксусная кислота	Дa	Дa	Да	Да
5% аммиак	Дa	Дa	Да	Да
0,5 % пиперидин	Дa	Дa	Да	Да
0,5 % триэтиламин	Дa	Дa	Дa	Да
100% ацетонитрил	Дa	Дa	Да	Ограни- ченно
100% метанол	Дa	Дa	Да	Да
100% этанол	Дa	Дa	Дa	Да
100% изопропанол	Дa	Дa	Да	Да
Тетрахлорметан	Нет	Нет	Нет	Нет
н-гексан (и другие предельные растворители)	Нет	Нет	Нет	Нет
минеральные кислоты	Нет	Нет	Нет	Нет

Таблица 6 – Результаты исследования химической устойчивости FMe

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

3.1.3 Исследование специфичных и селективных свойств MeOx и FMe

3.1.3.1 Исследование специфичных и селективных свойств FFe и FeOx на примере задач фосфопротеомики

Фосфорилирование — это посттрансляционная модификация, включающая сайтспецифический перенос фосфатной группы от доноров нуклеотид-трифосфата к боковым цепям остатков серина, треонина, тирозина и гистидина в белках [587]. Этот процесс катализируется соответствующими киназами [588], активность которых точно согласована с фосфатазозависимым дефосфорилированием [589]. Такая обратимость фосфорилирования (и возникающие в результате конформационные изменения в соответствующих ферментах) лежит в основе универсального механизма внутриклеточной передачи сигнала [590]. Таким образом, множественные киназы и фосфатазы организуются в каскадах передачи сигналов [591], опосредуя метаболизм, транскрипцию, прогрессию клеточного цикла, дифференцировку, построение цитоскелета и миграцию клеток, апоптоз и межклеточные связи [592]. Следовательно, знание паттернов фосфорилирования является критически важным для понимания клеточной физиологии. В рамках данного исследования проведено сравнение сорбционных, селективных и специфичных свойств коллапсированных монослоев Ленгмюра стеарата железа(III) (FFe) и наночастиц оксида железа(III) (FeOx), которые, были разработаны на предыдущем этапе.

3.1.3.1.1 Оптимизация условий проведения ІМАС

Процесс обогащения фосфопептидов с использованием FFe и FeOx оптимизировали на примере синтетического модельного пептида SSNGHVYpEKLSSI. Эффективность связывания 95% (оцененная анализом несвязавшейся фракции) наблюдалась при pH 2,05 (что соответствует 0,1% (об./об.) водной TFA), в то время как более высокие значения pH приводили к ухудшению сорбции. Хотя 0,4 моль/л водный раствор аммиака (NH4OH) является обычным элюентом при IMAC [593], его использование позволило экстрагировать только 40% пептида SSNGHVYpEKLSSI с FFe. Поэтому были протестированы дополнительные перспективные десорбционные агенты, выбранные в соответствии с их ожидаемым механизмом взаимодействия с аналитом и неподвижной фазой FFe: вещество, которое образует высокостабильные комплексы с железом (III) (10% EDTA в 0,4 моль/л водном NH4OH, 5% NaSCN в 0,4 моль/л водном NH4OH); способность соединения вытеснять аналит из неподвижной фазы за счет более сильного связывания (0,05% (мас./об.) SDS в 0,5% (об./об.) водном пиперидине, 10% (об./об.) перфторгексановой кислоты в 0,5% (об/об) водном пиперидине, 0,015% (об/об) гептадекафтороктансульфоновой кислоты (PFOS) в 0,4 моль/л водном NH4OH и 0,015% (об/об) PFOS в 0,5% (об./об.) водном пиперидине); соединения, содержащие функциональную группу, аналогичную аналиту (0,0005% (об./об.) H₃PO₄ в 0,5% (об./об.) водном пиперидине, 0,5% (об./об.) водная H₃PO₄) (Таблица 7).

Таблица 7 – Степень извлечения пептида SSNGHVYpEKLSSI на FFe с использованием различных элюентов

Элюент*	Степень извлечения (%)			
0,015% PFOS в 0,5% пиперидине	86 ± 3			
0,5% пиперидин	63 ± 3			
0,015% PFOS в 0,4 моль/л NH4OH	59 ± 3			
5% NaSCN в 0,4 моль/л NH4OH	45 ± 2			
10% двунатриевый EDTA в 0,4 моль/л NH ₄ OH	44 ± 3			
0,5% H ₃ PO ₄	44 ± 2			
0,4 моль/л NH4OH	40 ± 1			
0,05% SDS в 0,5% пиперидине	13 ± 2			
0,0005% H ₃ PO ₄ в 0,5% пиперидине	12 ± 2			
10% перфторгексановая кислота в 0,5% пиперидине	10 ± 1			
Примечание – Образцы элюировали с 0,56 мг FFe 0,1 мл каждого элюента.				
* – Все растворы водные.				

Самые высокие показатели извлечения наблюдались при использовании 0,5% водного пиперидина и его комбинации с 0,015% PFOS, соответственно: $63 \pm 3\%$ и $86 \pm 3\%$ (Таблица 7). PFOS в сочетании с 0,4 моль/л водным NH4OH также позволял достичь высокого выхода целевого аналита, в то время как элюенты на основе SDS, перфторгексановой или фосфорной кислоты были неэффективными (Таблица 7). Для получения более высоких уровней извлечения фосфопептидов была протестирована трехступенчатая последовательная процедура элюирования, включающую две стандартные стадии (0,4 моль/л водный NH4OH и 0,5% водный пиперидин), а затем новую стадию с использованием 0,015% PFOS в 0,5% водном пиперидине.



Рисунок 23 – Извлечение синтетического пептида SSNGHVYpEKLSSI на FFe, полученное с помощью одно- (A) и трехступенчатого последовательного элюирования 0,4 моль/л водным NH4OH, 0,5% водным пиперидином и 0,015% PFOS в 0,5% водном пиперидине (Б), выраженное как среднее арифметическое (n = 3) ± стандартное отклонение (SD)

По сравнению с одноэтапной процедурой элюирования (Рисунок 23А) этот подход оказался более эффективным, поскольку он увеличивал извлечение пептида до 95% (Рисунок 23Б). Таким образом, вклад последней стадии элюирования в общее извлечение составлял приблизительно 15%.

3.1.3.1.2 Извлечение фосфорилированных пептидов из триптического гидролизата казеина

В отличие от синтетических пептидных смесей, ферментативный гидролизат представляет собой гораздо более сложную систему. Поскольку только небольшая часть пептидов содержит остатки фосфорной кислоты, было необходимо оптимизировать загрузку колонки, содержащую металл-аффинный сорбент. Эксперимент проводили в сравнении с эталонным коммерческим материалом – PHOS-SelectTM Iron Affinity Gel (IAG) (Sigma Aldrich GmbH, Германия). Казеин (фосфорилированный белок молока, содержащий 26 потенциально возможных сайтов фосфорилирования) был использован в качестве модели: гидролизат (9 или 18 мкг) загружали на стационарные фазы в соотношениях 1:155, 1:310 и 1:620 (мас./мас.), фосфопептиды элюировали по трехступенчатой процедуре. Элюаты объединяли и анализировали с помощью HPLC-MS параллельно с необогащенным гидролизатом. Наиболее высокая степень экстракции (до 90%) трех триптических фосфорилированных пептидов FQSpEEQQQTEDELQDK, YKVPQLEIVPNSpAEER и TVDMESpTEVFTK была достигнута при соотношении гидролизат/сорбент 1:310 (мас./мас.) (Рисунок 24). В этих условиях все три пептида были количественно связаны с неподвижной фазой и не были обнаружены в несвязавшейся фракции, тогда как более высокая нагрузка приводила к обнаружению фосфопептидов в несвязавшейся фракции.



Рисунок 24 – Содержание фосфорилированных пептидов TVDMESpTEVFTK (A), YKVPQLEIVPNSpAEER (Б) и FQSpEEQQQTEDELQDK (В) из триптического гидролизата казеина в несвязавшейся фракции (белый) и элюатах (серый) после фаз FFe, FeOx и IAG, представленное как среднее арифметическое (n = 3) ± стандартное отклонение (SD). Необратимо связанная фракция помечена черным цветом Следует отметить, что при таких условиях более 50% каждого пептида не связывалось с IAG, что указывает на его более низкую емкость по сравнению с FFe и FeOx. Примечательно, что даже при соотношении гидролизат/сорбент 1:8000 (мас./мас.) 10% пептида FQSpEEQQQTEDELQDK наблюдали в несвязанной фракции из IAG (Рисунок 24В). Для всех трех пептидов выход фракций элюата был значительно выше как для FFe, так и для FeOx по сравнению с коммерческой фазой IAG (70–95% против 5–10%). Таким образом, окончательная процедура IMAC для FFe и FeOx включила следующие этапы: уравновешивание 0,1 мл 0,1% (об./об.) TFA; нанесение образца (0,1 мл образца, растворенного в 0,1% (об./об.) TFA); промывание 0,1 мл 0,1% (об./об.) TFA и последовательное элюирование 0,1 мл 0,4 моль/л NH₄OH, 0,5% (об./об.) пиперидина и 0,015% (об./об.) PFOS в 0,5% пиперидине.

3.1.3.1.3 Анализ фосфопептидов в гидролизате лизированных клеткок линии HeLa

Оптимизированная процедура применялась для обогащения фосфорилированных пептидов в триптических гидролизатах, полученных из лизатов клеток HeLa. Эффективность сорбентов FFe и FeOx (n=4) сравнивали по количеству идентифицированных фосфорилированных пептидов после проведения металл-аффинной хроматографии. Кроме того, в качестве эталонных сорбентов были использованы IAG и нанопорошок TiO₂ (TI) (n=4). Фракции анализировали с помощью nanoHPLC-MS. Последующий поиск в базе данных и фильтрация результатов выявили 372 фосфопептида, надежно идентифицированных во всех повторностях всех четырех экспериментальных групп (Приложение Б). Таким образом, в группах FFe, FeOx, IAG и TI были идентифицированы 192, 103, 36 и 110 фосфопептидов, соответственно. Перекрестная аннотация идентифицированных пептидов в параллельных группах образцов (где соответствующие протонированные молекулы были четко и точно обнаружены (≤3 ppm), но не выбраны для фрагментации алгоритмом регистрации, зависящей от собранных данных) позволила выявить 357, 197, 56 и 178 сайтов фосфорилирования в элюатах с FFe, FeOx, IAG и TI, соответственно (Рисунок 25А). Эти сайты представляли 204, 125, 37 и 113 фосфорилированных белков, соответственно (Рисунок 25Б). Таким образом, с помощью FFe было идентифицировано 55% от общего количества найденных фосфорилированных белков, в то время как для FeOx, IAG и TI это значение составляло только 34, 10 и 29%, соответственно. Таким образом, применение FFe привело к увеличению покрытия фосфопротеома в 2-5 раз по сравнению с коммерчески доступными аналогами (Рисунок 25).



Рисунок 25 – Фосфорилированные белки (А) и отдельные сайты модификации в них (Б), идентифицированные с помощью nanoHPLC-MS в объединенных элюатах, полученных с помощью IMAC на FFe (FF), FeOx, (FO) IAG и TI (n = 4). Общее количество фосфопептидов показано курсивом

3.1.3.1.4 Извлечение синтетических пептидов из триптического гидролизата лизата клеток линии HeLa

Достижение высоких линейных динамических диапазонов (LDR) и точности анализа является сложной задачей при применении металл-аффинной хроматографии. Однако недавно несколько исследователей сообщили о довольно хорошей линейности $(R^2 = 0.85 - 0.90)$, полученной при использовании Ті-содержащих неподвижных фаз [594,595]. Чтобы оценить потенциал разработанных сорбентов для количественного применения, была определена линейность извлечения фосфопептидов на FFe и FeOx по сравнению с IAG. Цель состояла в том, чтобы смоделировать реальный биологический протеомный эксперимент, в котором несколько фосфорилированных пептидов конкурируют за сайты связывания стационарной фазы на фоне матрицы сложного образца, содержащей большое количество нефосфорилированных пептидов. Для этого в 10 мкг триптического гидролизата, полученного из лизата клеток HeLa, были добавлены синтетические стандартные пептиды VAVVRTpPPKSPSSAK и VAVVRTpPPKSpPSSAK в количествах от 0,1 нг до 10 нг. После чего проводили экстракцию по процедуре, аналогичной вышеописанной, и объединенные элюаты анализировали с помощью HPLC-MS (n=3). Площади пиков соответствующих пептидов наносили на график в зависимости от массы добавленных пептидов. Анализ показал хорошую линейность отклика детектора $(R^2 = 0.98, n=3)$ VAVVRTpPPKSPSSAK, как лля пептила так И лля VAVVRTpPPKpSPSSAK (Рисунок 26). Самая низкая точка данных находилась за пределами LDR. Это ясно указывает на применимость предложенного подхода к количественному определению фосфопептидов. Примечательно, что при использовании IAG наблюдалась не только ухудшенная линейность ($R^2 = 0,80$), но и более низкая степень извлечения пептидов, о чем можно было судить по более пологому наклону кривой.



Рисунок 26 – Зависимость площадей пиков синтетических фосфорилированных пептидов VAVVRTpPPKSPSSAK (A) и VAVVRTpPPKSpPSSAK (Б), в зависимости от их количества в 10 мкг триптического гидролизата, полученного из лизата клеток HeLa, после металл-аффинной хроматографии на FFe (треугольники), FeOx (квадраты) и IAG (ромбы) (n = 4)

Таким образом, оба новых сорбента на основе Fe(III) в сочетании с трехэтапной процедурой элюирования показали высокую эффективность при металл-аффинной экстракции фосфорилированных пептидов. При этом показано, что FFe обладает существенно более высокой способностью связывать фосфопептиды по сравнению с коммерческими аналогами. Кроме того, как FFe, так и FeOx отличаются чрезвычайно низкой степенью неспецифического связывания. Эти преимущества были усилены при помощи трехступенчатой процедуры элюирования с использованием электронодонорных агентов (аммиак и пиперидин), а также высокоаффинной добавки к Fe(III) (PFOS). В сочетании с FFe элюирующая система обеспечивает более высокую степень извлечения по сравнению с коммерчески доступными аналогами.

3.1.3.2 Монослои стеарата лантана - металл-аффинный сорбент для селективной сорбции аддуктов сывороточного альбумина человека с фосфорорганическими соединениями

Идентификация и количественное определение токсичных соединений и их метаболитов в биологических жидкостях является строго обязательным для расследования случаев острой интоксикации и необходимо для биомониторинга персонала, работающего с высокотоксичными веществами. Сывороточный альбумин человека (HSA), основной транспортный белок плазмы крови, одна из основных мишеней для ковалентного связывания высокотоксичных фосфорорганических соединений (ОР) в крови человека. Аддукты ОР альбумина достаточно стабильны в кровотоке и могут быть обнаружены в течение 49 дней после отравления [596,597]. Однако из-за чрезвычайно низкого содержания этих аддуктов по сравнению с немодифицированной фракцией HSA производные ОР не могут быть обнаружены и идентифицированы без специальной пробоподготовки. Известно, что альбуминовые аддукты ОР могут быть селективно обогащены с помощью металл-аффинной хроматографии на титан-(IV) или железосодержащих (III) сорбентах, используемых в фосфопротеомике. Однако этот подход отличается высокой степенью неспецифического связывания, т.е. эти сорбенты удерживают значительные количества немодифицированных пептидов, содержащих У-411 (основной сайт связывания ОР с альбумином).

Ионы лантана (III) классифицируются как жесткая кислота Льюиса, способная координировать функциональную группу Р=О. Из-за большого радиуса иона и протяженных диффузных валентных орбиталей ионы La (III) имеют более широкие возможности для координации, чем другие элементы IV периода. Реакционная способность ионов La (III) по отношению к свободным ОР, включая их реактивацию в органических растворителях, была отмечена ранее [598]. Известные к настоящему времени сорбенты на основе лантана (III) весьма разнообразны [437,599], но их получение требует значительных затрат времени. Тем не менее такие материалы могут быть использованы в фосфопротеомных исследованиях [600]. Было сделано предположение, что монослои стеарата лантана (FLa) могут быть использованы в качестве возможных сорбентов для селективного обогащения аддуктов белка с OP, присутствующих в биологических образцах, на примере аддуктов HSA с 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутаном (PFMP) (образец был получен в рамках выполнения СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации вероятных маркеров интоксикации ФОС», Шифр: «Орфей-12» и СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации маркеров ФОС», Шифр: «Признак»).

На стадии разработки сорбента была получена информация о складчатой структуре коллапсированных монослоев стеарата лантана с участками гладкой поверхности, которые обеспечивают легкий доступ остаткам PFMP в составе аддукта к связанным ионам металла. Присутствие сигнала дистеарата лантана ((C₁₇H₃₅COO)₂La⁺) с m/z 705,43 в MALDI масс-спектрах монослоя, частично растворенного в ацетонитриле, указывает на образование соответствующей структуры (Рисунок 27А).

В MALDI масс-спектрах, полученных для пептического гидролизата плазмы крови человека, преобладают пептиды HSA. Y-411 в составе HSA способен присоединять остаток PFMP. Для последующей идентификации пептид, содержащий Y-411, получали в результате гидролиза в присутствии пепсина, так как в результате триптического гидролиза образуется только короткий трипептид Y₄₁₁TK, который не может быть эффективно обнаружен с помощью MALDI MS из-за низкого значения m/z соответствующего иона и интерференции с матричными сигналами. Пептиды, содержащие Y-411, давали интенсивные сигналы с m/z 1405,82 и 1518,90, соответствующие аминокислотным последовательностям VRY₄₁₁TKKVPQVST и LVRY₄₁₁TKKVPQVST, соответственно. В масс-спектрах гидролизатов плазмы крови человека, инкубированной с PFMP, интенсивность этих сигналов была намного ниже, тогда как появлялись сигналы с m/z 1567,77 (VRY_{PFMP}TKKVPQVST) и 1680,86 (LVRY_{PFMP}TKKVPQVST) (Рисунок 27Б). Наблюдаемая разница в значениях m/z по сравнению с m/z 1405,82 и 1518,90 составляла 162, что соответствует увеличению массы за счет присоединения остатка PFMP.

Было обнаружено, что успешное связывание с неподвижной фазой может быть достигнуто, когда 25 мкл гидролизата плазмы с концентрацией белка 1 мг/мл добавляли

к 1,5 мг FLa. После завершения связывания неподвижную фазу промывали 2% (об./об.) водным аммиаком, при этом в несвязавшейся фракции аддуктов HSA с PFMP обнаружено не было (Рисунок 27В). Элюирование проводили 100 мкл 0,5% (об./об.) водного пиперидина, содержащего 0,015% (об./об.) PFOS. Для MALDI MS анализа элюаты наносили на мишень без дополнительного обогащения.



Рисунок 27 – Фрагменты MALDI масс-спектров: А – фрагмент масс-спектра растворенного монослоя на основе стеарата лантана (режим высокого разрешения); Б – пептический гидролизат общего белка плазмы крови до металл-аффинной хроматографии; В – несвязавшаяся фракция; Г – элюат с FLa 0,5% (об./об.) водный раствор пиперидина с 0,015% (об./об.) PFOS (режим высокого разрешения); Д – идентификация модификации пептида VRY_{PFMP}TKKVPQVST по нейтральной потере; Е – идентификация модификации пептида LVRY_{PFMP}TKKVPQVST по нейтральной потере

Сигналы пептидов VRY_{PFMP}TKKVPQVST и LVRY_{PFMP}TKKVPQVST были надежно детектированы в масс-спектрах (Рисунок 27Г) с хорошим отношением сигнал/шум (S/N > 1000). В то же время интенсивность примесных сигналов не превышала 10% от интенсивности сигналов аддуктов. В отличие от процедуры с использованием Fe(III)-содержащего коммерческого сорбента (IAG), в масс-спектре сигналов Y-411-содержащих нативных пептидов обнаружено не было. Идентификацию модифицированных пептических пептидов проводили с помощью тандемного масс-спектрометрического (MS/MS) анализа, по нейтральной потере 162 Да, характерной для остатка PFMP (Рисунок 27 Д,Е).

Известно, что каталитическая смесь La³⁺/метанол быстро реактивирует свободные агенты G- и V-типа до малотоксичных сложных эфиров [601,602]. Поэтому нельзя было исключить возможность деалкилирования (старения) аддуктов альбумина с PFMP на стационарной фазе FLa во время связывания. Однако в результате эксперимента сигналов, соответствующих аддуктам HSA с метилфосфоновой кислотой обнаружено не было. Соответственно в описанных экспериментальных условиях FLa не катализирует гидролиз PFMP, связанного с остатком тирозина. Таким образом, FLa можно рассматривать как перспективный металл-аффинный сорбент для селективного обогащения аддуктов OP белками крови в биологических образцах.

3.1.3.3 Исследование эффективности элюентов, содержащих PFOS

В процессе протеомных исследований было выявлено, что добавка PFOS к элюентам при проведении металл-аффинной хроматографии значительно повышает эффективность десорбции фосфорсодержащих пептидов с сорбентов. Соответственно, возникла необходимость проверки универсальности предложенного подхода. Для этого был выбран сорбент, значительно отличающийся по составу и характеристикам, как от пленочных сорбентов, так и от оксидных, а в качестве аналита использовали диклофенак (DCL), имеющий в составе атомы хлора, которые могут рассматриваться как жесткие основания Льюиса, так и как основания Льюиса промежуточной силы (Рисунок 28А).

Сорбент mSiO₂/Ni представляет собой мезопористые частицы кремнезема, содержащие на поверхности пор ионы никеля (0,77% масс. по данным XRF) (Рисунок 28Б). Синтезированные mSiO₂/Ni частицы размером 500 нм имеют сферическую форму и являются монодисперсными (по результатам TEM среднеквадратичное отклонение диаметров частиц менее 5%). Удельная поверхность частиц по BET, объем и диаметр пор составили, соответственно, 760 м²/г, 0,52 см³/г и 3,0±0,2 нм. Частицы агрегативно устойчивы в диапазоне pH 3-12.

160



Рисунок 28 – Объекты исследования: А – химическая структура диклофенака; Б – ТЕМ изображения сорбента mSiO₂/Ni

Показано, что частицы mSiO₂/Ni проявляют свойства металл-аффинных сорбентов. Рассчитанное значение энтальпии сорбции составило -43,8 кДж/моль, что подтверждает химическую природу сорбции. Сорбционная емкость частиц mSiO₂/Ni по DCL составила 0,60±0,06 мкг/мг, что вполне соответствует характеристикам металл-аффинных сорбентов. Исследования кинетики сорбции показали, что насыщение сорбента DCL происходит в течение ~ 20 мин.

Для оценки воспроизводимости экспериментальных данных по сорбции DCL были проведены три независимые серии измерений для получения изотермы сорбции при 25°С. Сопоставление данных, полученных в независимых опытах, позволило заключить, что экспериментальная ошибка не превышает 3%. На Рисунке 29 приведены изотермы сорбции DCL на исследуемом сорбенте при двух температурах: 25 и 35°С (n=3).Для исследования процесса десорбции DCL с частиц mSiO₂/Ni были выбраны водные растворы, содержащие донорные вещества (наиболее часто используемые элюенты в металлаффинной хроматографии), для сравнения эти же растворы, но с добавкой PFOS, и дополнительно 0,1% (об./об.) PFOS, а также смесь трех веществ – 50% (об./об.) ацетонитрил + 0,5% (об./об.) пиперидин + 0,1% (об./об.) PFOS, как показано в Таблице 8. Необходимо отметить, что в ходе предварительных экспериментов исследования десорбции DCL с mSiO₂/Ni было выявлено, что начальная концентрация PFOS 0,015%, используемая в протеомных исследованиях, оказалась неэффективной, поэтому содержание PFOS в исследуемых элюентах было увеличено до 0,1%. По всей видимости, в исследуемой

161

системе аналит/сорбент наблюдается более прочная связь металл-неметалл, чем в предыдущих экспериментах.



Рисунок 29 – Изотермы сорбции DCL на mSiO₂/Ni при двух температурах: 25 и 35°C Таблица 8 – Степень извлечения DCL с mSiO₂/Ni при использовании различных элюентов

N⁰	Элюент*	Степень извлечения (%), t = 30 мин, n=3				
1	0.10/ DEOC					
1	0,1% PFOS	2,90±0,43				
2	5% аммиак	30,4±1,6				
3	5% аммиак + 0,1% PFOS	60,6±4,4				
4	50% ацетонитрил	44,3±2,3				
5	50% ацетонитрил + 0,1% PFOS	72,3±3,7				
6	1% имидазол	67,9±2,5				
7	1% имидазол + 0,1% PFOS	80,3±3,6				
8	0,5% пиперидин	47,1±5,6				
9	0,5% пиперидин + 0,1% PFOS	79,0±6,4				
10	50% ацетонитрил + 0,5% пиперидин + 0,1% PFOS	88,1±2,4				
	Примечание – * – все растворы элюентов водные					

Частицы mSiO₂/Ni нагружали из расчета 1 мкг DCL на 1 мг сорбента. Десорбцию проводили в течение 30 мин при 25°C, количество элюированного вещества определяли методом HPLC-UV. Результаты представлены на Рисунке 30 и в Таблице 8.



Рисунок 30 – Влияние состава элюента на степень извлечения DCL с mSiO₂/Ni

Полученные данные позволяют сделать вывод, что одинарные растворы, за исключением 1% (об./об.) имидазола, не приводят к эффективной десорбции, степень экстракции не достигает 50%. В то же время, добавление к стандартному элюенту PFOS приводит к значительному увеличению степени экстракции, например, в случае пиперидина количество экстрагированного DCL увеличилось более чем на 30%. При этом следует отметить, что водный раствор PFOS без присутствия органического вещества, являющегося донором электронной плотности, не проявляет активности как элюент для металл-аффинной хроматографии. С его помощью удавалось десорбировать не более 3% вещества. Особого внимания заслуживает элюент, включающий в состав одновременно воду, ацетонитрил, пиперидин и PFOS. При его использовании степень экстракции в одной стадии (30 мин) достигла 88%, что является очень высоким показателем.

Также важно было оценить эффективность экстракции в зависимости от нагрузки на сорбент (Таблица 9). После промывки сорбента и расчета количества связавшегося вещества, десорбцию проводили путем двукратной обработки сорбента (20 мин при 25°C) элюентами, в состав которых входил PFOS а именно водными растворами: 1) 50% (об./об.) ацетонитрил с 0,1% (об./об.) PFOS; 2) 1% (об./об.) имидазол с 0,1% (об./об.)

PFOS; 3) 0,5% (об./об.) пиперидин с 0,1% (об./об.) PFOS; 4) 50% (об./об.) ацетонитрил с 0,5% (об./об.) пиперидин и 0,1% (об./об.) PFOS. Как показано в Таблице 9 при двукратном элюировании наблюдается хорошая сходимость результатов как внутри каждой серии, так и для суммарной степени экстракции, которая для всех использованных элюентов превышала 80%, а в случае 50% (об./об.) ацетонитрил с 0,5% (об./об.) пиперидин и 0,1% (об./об.) РFOS превысила 97%.

		Фракции элюатов					
№	Нагруз- ка, мкг (Ср)	Этап 1, t=20 мин		Этап 2, t=20 мин		Экстрак-	Экстрак-
		Экстрак- ция 1, мкг (Ср)	Экстрак- ция 1, % (Ср)	Экстрак- ция 2, мкг (Ср)	Экстрак- ция 2, % (Ср)	ция, мкг (Ср)	ция, % (Ср)
		50% (o	об./об.) ацето	нитрил + 0,19	% (об./об.) Pl	FOS	
1	3,24	2,43	75,0	0,25	7,72	2,68	82,7
2	2,20	1,62	73,6	0,16	7,27	1,78	80,9
3	1,36	1,00	73,5	0,14	10,3	1,14	83,8
4	0,45	0,36	80,0	0,033	7,33	0,393	87,3
						Cpe	днее 83,7 %
		1% ((об./об.) ими	цазол + 0,1%	(об./об.) РFС)S	
1	3,78	2,93	77,5	0,48	12,7	3,41	90,2
2	2,23	1,67	74,9	0,24	10,8	1,91	85,7
3	0,890	0,68	76,4	0,11	12,4	0,790	89,8
4	0,24	0,18	75,0	0,038	15,8	0,213	90,8
						Cpe	днее 89,1 %
		0,5%	(об./об.) пипе	еридин + 0,1%	% (об./об.) РБ	TOS	
1	2,59	1,94	74,9	0,32	12,4	2,26	87,3
2	1,80	1,41	78,3	0,11	6,11	1,52	84,4
3	0,940	0,73	77,8	0,092	9,79	0,823	87,6
4	0,36	0,29	80,6	0,035	9,72	0,396	90,3
						Cpe	днее 87,4 %
50% (об./об.) ацетонитрил + 0,5% (об./об.) пиперидин + 0,1% (об./об.) PFOS							
1	3,29	2,62	79,6	0,61	18,5	3,23	98,1
2	2,22	1,86	83,8	0,33	14,8	2,19	98,6
3	1,56	1,23	78,8	0,28	17,9	1,51	96,7
4	0,53	0,44	83,0	0,071	13,4	0,511	96,4
	Среднее 97,5 %						

Таблица 9 – Результать	і оценки степени экст	тракции DCL о	c mSiO₂/Ni
------------------------	-----------------------	---------------	------------

Были построены зависимости площади хроматографического пика элюированного вещества от количества диклофенака, нагруженного на колонку, для каждого элюента. Линейный вид зависимости (Рисунок 31) позволяет сделать вывод, что предлагаемые методы десорбции DCL с частиц mSiO₂/Ni показывают воспроизводимые результаты, независимо от количества вещества на сорбенте. В то же время, степень экстракции, достигающая величин 82-97%, свидетельствует об универсальности и эффективности элюентов, содержащих PFOS, для металл-аффинной хроматографии.





Таким образом, на основании полученных данных можно оценить PFOS, как универсальную добавку, способную значительно повысить эффективность металлаффинной экстракции.

3.1.3.4 Металл-аффинная хроматография, как способ экстракции экотоксикантов на примере пестицидов и лекарственных препаратов

Многие пестициды и лекарственные препараты относятся к особо устойчивым сильнодействующим веществам, поражающим нервную систему, внутренние органы и пр. Такие вещества можно обнаружить в водных средах, а также в почве, откуда они могут попадать в открытые водоемы, и как следствие, в живые организмы. Многие пестициды обладают способностью к биоаккумуляции и могут мигрировать посредством климатических и экологических процессов на большие расстояния [603]. На сегодняшний день методы, применяемые для извлечения экотоксикантов из водных и биологических сред, характеризуются сложностью и низкой специфичностью и, наряду с целевым объектом, в образец попадает значительное количество примесей, которые зачастую мешают анализу [604].

3.1.3.4.1 Извлечение хлорсодержащего инсектицида дильдрина из водных и биологических образцов методом металл-аффинной хроматографии на монослоях стеарата никеля

Дильдрин относится к особо устойчивым сильнодействующим токсичным хлорсодержащим инсектицидам. Несмотря на запрет использования дильдрина во многих странах, его до сих пор можно обнаружить в почве и водоемах. На сегодняшний день постоянным источником дильдрина является его разрешенный предшественник – альдрин, способный метаболизироваться до дильдрина в кислой среде. Основными источниками контаминации дильдрином являются водоемы и молоко, и степень экстракции дильдрина из воды и молока не превышает 80% [605].

Новый подход к извлечению дильдрина из водных и биологических образцов основывается на использовании FNi в качестве сорбента, тем более что на предыдущих этапах исследования был установлен хороший уровень специфичного взаимодействия никельсодержащего сорбента mSiO₂/Ni с диклофенаком, имеющем в составе атомы хлора.

Модельный эксперимент по исследованию экстракции дильдрина из водных растворов проводили методом пакетной хроматографии в условиях, соответствующих классической металл-аффинной хроматографии: инкубирование с сорбентом (сорбция) в присутствии 0,1% TFA (pH 2,5); десорбция 0,4 М водным аммиаком (pH 9) [606]. Растворы содержали дильдрин в концентрациях от 0,01 нг/мл до 1 нг/мл. Стоит отметить, что минимальная концентрация дильдрина (0,01 нг/мл), взятая нами для проведения модельного эксперимента по специфичной экстракции, была выбрана, исходя из данных, представленных Всемирной организацией здравоохранения, и соответствует предельно допустимой концентрации дильдрина в природных образцах [607]. В качестве метода количественного анализа был выбран один из наиболее распространенных, точных и удобных методов определения хлорсодержащих веществ – метод газовой хроматографии с детектором электронного захвата (GC-ECD). Линейная зависимость концентрации дильдрина в несвязавшейся фракции от концентрации дильдрина в исходных растворах до сорбции на FNi (Рисунок 32) свидетельствует о том, что в условиях проведенного эксперимента, насыщения достигнуть не удалось, но дальнейшее увеличение начальной концентрации токсичного вещества не представлялось возможным в связи с достижением предела растворимости дильдрина в воде. При этом после установления равновесия содержание дильдрина в растворе не превышает 10 % от исходной концентрации.



Рисунок 32 – Концентрация дильдрина в несвязавшейся фракции в зависимости от исходной концентрации растворов

Стоит отметить, что провести успешную десорбцию в условиях классической металл-аффинной хроматографии не удалось. В растворах, полученных после обработки сорбента водным раствором аммиака, дильдрин был обнаружен в следовых количествах, поэтому следующим этапом была оптимизация процесса десорбции дильдрина с FNi. Как было показано выше, элюирование с металл-аффинных сорбентов можно проводить несколькими способами: значительно изменить pH среды по сравнению с условиями сорбции, изменить донорную силу элюентов или использовать раствор соли в высокой концентрации. Было показано, что комбинация элюентов, обладающих различными свойствами, приводит к более эффективному элюированию вещества с сорбента, а, следовательно, и повышению степени экстракции. В этом исследовании были последовательно использованы следующие растворы: 0,4 М водный раствор аммиака; 0,015% раствор PFOS в 0,5% водном растворе пиперидина и раствор 0,1% TFA в ацетонитриле (данный элюент был выбран в связи с высокой растворимостью дильдрина в органических растворителях). Полученные фракции, как и на предыдущем этапе, анализировали методом GC-ECD. Диаграмма, демонстрирующая степени извлечения дильдрина из водной матрицы, представлена на Рисунке 33.

Стоит отметить, что полученные результаты полностью согласуются с предыдущим экспериментом: содержание дильдрина в несвязавшейся фракции составило 7,8%, а в первой фракции (0,4 М водный аммиак) – 0,2%. При этом, наибольшее количество было определено во фракции пиперидин-PFOS, а обработка сорбента 0,1% раствором трифторуксусной кислоты в ацетонитриле позволило извлечь дополнительно 26,3% дильдрина. То есть суммарная степень извлечения составила 86,7% при минимальных потерях вещества на сорбенте (5,5%). Соответственно, на дальнейших этапах работы стадию элюирования 0,4 М раствором аммиака исключили в связи с ее неэффективностью.

Наряду с водными растворами, основными источником контаминации дильдрина являются продукты питания животного происхождения, в первую очередь – молоко. С точки зрения объекта исследования, молоко представляет достаточно сложную матрицу, в состав которой входят белки, липиды, углеводы и различные минеральные вещества. Кроме того, представлялось интересным исследовать возможность экстракции дильдрина из еще более сложной матрицы, такой как плазма крови.

Для эксперимента была выбрана концентрация дильдрина 100 нг/мл, что было обусловлено следующими причинами: во-первых, растворимость дильдрина в молоке гораздо выше, чем в воде; во-вторых, такое содержание дильдрина в молоке при употреблении его в пищу может привести к интоксикации и, наконец, именно такие концентрации зачастую встречаются в контаминированном молоке в таких регионах, как Азия, Южная Америка и т.д. [605] По процедуре, предложенной выше, была проведена экстракция дильдрина из молока коровы (ГОСТ 31450-2013) и плазмы крови крыс с последующим газохроматографическим анализом. Результаты представлены на Рисунке 34.



Рисунок 33 – Степень экстракции дильдрина из водной матрицы при последовательном элюировании 0,4 М водным раствором аммиака; 0,015% раствором PFOS в 0,5% водном растворе пиперидине и раствором 0,1% TFA в ацетонитриле



Рисунок 34 – Степень экстракции дильдрина из молока и плазмы крови крысы при последовательном элюировании 0,4 М водный раствором аммиака; 0,015% раствором PFOS в 0,5% водном растворе пиперидина и раствором 0,1% TFA в ацетонитриле

Из данных, представленных на диаграммах следует, что применение метода металл-аффинной хроматографии с использованием FNi для извлечения дильдрина из молока позволяет увеличить степени экстракции до 91,4% при минимальных потерях вещества на сорбенте (0,2%). В случае плазмы крови, данные величины составили 76,1% и 9,2%, соответственно.

3.1.3.4.2 Извлечение фосфорсодержащего инсектицида диазинона из водного образца

Инсектицид диазинон (О,О-диэтил-О-(2-изопропил-6-метил-пиримидин-4ил)тиофосфат) широко используется в сельском хозяйстве для борьбы с вредителями. Диазинон классифицируется Всемирной организацией здравоохранения как инсектицид среднего риска (класс II) с ЛД₅₀ = 285 мг/кг, однако Агентство по охране окружающей среды США показало, что широкое использование этого инсектицида приводит к загрязнению поверхностных, сточных и подземных вод, в том числе питьевых источников [608]. Молекула диазинона содержит фосфорную группу, атомы кислорода которой, как и в случае фосфорилированных пептидов, проявляют сродство к ионам переходных металлов, таких как титан, цирконий и железо. В то же время структура диазинона очень устойчива и достаточно длительное время остается неизменной в различных средах [609].

В рамках данного исследования проводилось изучение специфичной экстракции диазинона из водных образцов с использованием металл-оксидных сорбентов FeOx и ZrOx. Для сравнения третьей и четвертой стационарными фазами были выбраны часто используемый в фосфопротеомике нанопорошок оксида титана (TI) и пористый нанопорошок оксида титана (TiOx), синтезированный тем же способом, что и ZrOx. Сорбцию проводили в стандартных условиях, для десорбции использовали 0,015% раствор PFOS в 0,5% водном растворе пиперидина. Элюаты анализировали методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (GC-FID). Результат оценивали по величинам площадей пика аналита на хроматограмме (n=4). Результаты экстракции диазинона из водной матрицы с помощью исследуемых сорбентов представлены на Рисунке 35.

Согласно представленным диаграммам, FeOx и TI показали наименьшую степень извлечения аналита – 20 и 28%, при большом содержании диазинона в несвязавшейся фракции – 42 и 46% соответственно. Эти сорбенты показали невысокую специфичность в отношении диазинона, при этом десорбция с сорбентов не прошла полностью, и поте-

ри составили 38 и 26% соответственно. Такие значения демонстрируют неэффективность этих материалов в качестве сорбентов для экстракции, и, таким образом, FeOx и коммерческий порошок оксида титана оказались не перспективными для извлечения диазинона из водной матрицы.





С другой стороны, сорбент TiOx показал высокую способность взаимодействовать с диазиноном, степень экстракции составила 77%, а потери на сорбенте – 15%. Наилучшие результаты в эксперименте показал ZrOx – потери на сорбенте были ниже 5%, а степень извлечения достигала 86%.

Для оценки эффективности экстракции в зависимости от нагрузки на ZrOx, водные растворы (100 мкл) с различной концентрацией диазинона (5, 10, 15, 15, 20, 25, 30, 35, 40 мкг/мл) инкубировали с равными навесками ZrOx (5 мг). Количественный анализ фракций после сорбции проводили, как и ранее, методом GC-FID. На Рисунке 36 представлена зависимость количества сорбированного диазинона от исходной нагрузки диазинона на ZrOx. Как следует из представленных данных, при концентрации аналита от 30 мкг/мл до 40 мкг/мл достигается насыщение сорбента и, таким образом, расчетная емкость ZrOx по диазинону составляет 0,1 ммоль/мкг.

Десорбцию диазинона проводили 0,015% раствором PFOS в 0,5% водном растворе пиперидина с сорбентов, инкубированных при концентрациях диазинона от 10 до 40 мкг/мл. На Рисунке 37 представлена зависимость площади хроматографического пика, полученная после анализа элюата, от исходного количества диазинона, внесенного на ZrOx.



Рисунок 36 – Количество диазинона, связавшегося с ZrOx, в зависимости от исходной нагрузки на сорбент

Представленная зависимость имеет линейный вид с R²=0,99, что свидетельствует о применимости метода извлечения на оксидах металлов для количественного определения диазинона в воде.



Рисунок 37 – Зависимость площади хроматографического пика диазинона в элюате от количества введенного диазинона на ZrOx

Для оценки скорости десорбции при различных количествах аналита на сорбенте была построена зависимость количества элюированного вещества от количества вещества во фракции, полученной после десорбции. Зависимость описывается уравнением первого порядка: A = 0,9756·B-0,012; $R^2=0,90$ (где A - количество десорбированного диазинона на 1 мг сорбента (мкг/мл), B - количество сорбированного диазинона в пересчете на 1 мл раствора (мкг/мл)), что позволяет сделать вывод о том, что разработанный метод извлечения диазинона из водного раствора с использованием ZrOx показывает воспроизводимые результаты во всем диапазоне выбранных концентраций. Кроме того, высокая степень извлечения свидетельствует об эффективности использованного элюента.

3.1.3.4.3 Исследование специфичных свойств сорбентов, содержащих медь и никель

Кроме диазинона и дильдрина для исследования специфичных свойств разработанных сорбентов, содержащих медь и никель, были выбраны такие экотоксиканты, как инсектицид глифосат, его метаболит – аминометилфосфоновая кислота (AMPA), и два лекарственных препарата, феназепам и пиримикарб, имеющие в составе гетероатомы – основания Льюиса (Рисунок 38).



Рисунок 38 – Экотоксиканты, использованные при исследовании специфичных свойств сорбентов, содержащих медь и никель

Полученные результаты (включая описанные выше) сведены в Таблицу 10. Стоит отметить, что практически во всех случаях, в том числе при использовании элюентов с

невысокой донорной силой, степень экстракции превышала 50%, что свидетельствует об эффективности исследуемых структур, как металл-аффинных сорбентов.

Таблица 10 – Результаты исследования специфичных свойств сорбентов, содержащих медь и никель

Сорбент	Вещество (гетероатом)	Матрица	Набор элюентов	Метод колич. анализа	Степень извлечения, %
	глифосат (N,O)	вода	0,4 М аммиак	ICP-AES	93%/70%
	AMPA (N,O)	вода	0,4 М аммиак	ICP-AES	96%/82%
	the ward and (NI)	вода	0,1% ТFA в MeCN, 0,5% пиперидин	HDICIN	65%/53%
	феназенам (11)	плазма крови крыс	0,1% ТFA в MeCN, 0,5% пиперидин	HFLC-UV	51%/55%
FNi/NiOx	пиримикарб (N)	вода	0,1% ТFA в MeCN, 0,5% пиперидин	HDICIN	76%/72%
		плазма крови крыс	0,1% ТFA в MeCN, 0,5% пиперидин	III LC-0 V	42%/40%
	дильдрин (Cl)	вода	0,4 М амми- ак, 0,015% РFOS в 0,5% пиперидине	GC-ECD	87%/85%
		плазма крови крыс	0,4 М амми- ак, 0,015% РFOS в 0,5% пиперидине		76%/72%
FCu/CuOv	глифосат (N,O)	вода	0,4 М аммиак	ICP-AES	93%/85%
	AMPA (N,O)	вода	0,4 М аммиак	ICP-AES	85%/82%

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

3.2 Функционализация поверхности MALDI мишени MeOx и FMe для проведения металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени»

На предыдущем этапе работы был охарактеризован ряд новых металл-аффинных сорбентов, и показано, что разработанные сорбенты могут быть успешно применены для решения задач фосфопротеомики (специфичная экстракция фосфорилированных пептидов из гидролизатов сложных белковых смесей), для экстракции экологических загрязнителей из природных образцов (в первую очередь галоген- и фосфорсодержащих пестицидов и лекарственных препаратов), а также при исследовании модификации белковых соединений ксенобиотиками. Было показано, что металл-аффинная хроматография позволяет эффективно экстрагировать и концентрировать аддукты белков с ОР из биологических образцов, в том числе из плазмы крови.

Однако в последние годы значительные усилия исследователей в области металлаффинной хроматографии были направлены на уменьшение количества образца, требуемого для анализа, и снижение потерь на сорбенте при проведении металл-аффинной хроматографии. Формат "лаборатория на мишени" [442], который позволяет манипулировать очень малыми объемами проб, а также сводить обработку проб к нескольким простым этапам. Покрытая слоем сорбента мишень может использоваться для прямого обогащения образца *in situ* с последующим анализом методом MALDI MS.

3.2.1 Функционализация поверхности MALDI мишени MeOx методом электрораспыления в бескапельном режиме

Разработчики методов нанесения металл-аффинных сорбентов на мишень неизменно вынуждены решать три основные задачи: получение поверхности устойчивой к внешним и температурным воздействиям, обеспечение доступности для аналита к атомам металла при проведении анализа, воспроизводимость метода нанесения.

Значительная часть исследований посвящена разработке методик нанесения на твердую подложку сорбентов на основе частиц оксидов металлов, большая часть которых основывается на методе электрораспыления. Для получения покрытий в результате электрораспыления частиц оксидов требуется тщательная подготовка поверхности мишени, например обработка кислородной плазмой и/или нагрев самой пластины до 170-200°С для обеспечения адгезии частиц к поверхности. По всей видимости, такие жесткие условия для получения покрытий из частиц оксидов металлов необходимы по причине образования микрокапель при распылении с использованием классического варианта источника ионов «электроспрей».

Ранее на базе ИАП РАН был создан узел, позволяющий проводить электрораспыление в бескапельном режиме с динамическим делением потока жидкости при нормальном давлении, с помощью которого удалось распылять достаточно крупные объекты, например клетки эпидермоидной карциномы человека А431 [610,611]. Соответственно, было сделано предположение, что с помощью такого узла электрораспыления наноча-

стицы разработанных MeOx также могут быть нанесены на MALDI мишень при нормальных условиях.

3.2.1.1 Разработка метода нанесения наночастиц MeOx на поверхность MALDI мишени с помощью электрораспыления в бескапельном режиме с динамическим делением потока жидкости при нормальном давлении

На Рисунке 39 представлена схема установки, с помощью которой проводили функционализацию поверхности MALDI мишени нанодисперсными металл-оксидными сорбентами. Установка состоит из устройства, позволяющего осуществлять десорбцию заряженных частиц в бескапельном режиме при нормальных условиях (1), включающее в себя металлический капилляр (2), по которому поступает суспензия частиц оксида металла в область сильного электрического поля на конце капилляра. Другим концом капилляр присоединен к программируемому шприцевому насосу Harvard Apparatus PhD 2000 (3) с помощью тефлоновой трубки. Для того, чтобы предотвратить слипание частиц сорбента в объеме и их оседание на стенках шприца в процессе распыления, в шприц помещали металлический якорь, приводимый в движение магнитной мешалкой (21). На металлический капилляр подается регулируемое высокое напряжение (до 5 кВ) от блока питания (4) Stanford research systems Model PS 380/5000V/25 W через контакт (5). Металлический капилляр коаксиально расположен внутри большего по диаметру капилляра-изолятора (6). Для эффективного удаления лабораторного воздуха около мениска торец металлического капилляра выступает над капилляром-изолятором.

Под воздействием потока воздуха избыток раствора перемещается по поверхности мениска в сторону его основания. По коаксиальному зазору между капиллярами (6) и (2) происходит откачка газовой смеси, состоящей из излишка раствора и лабораторного воздуха. Откачивание смеси происходит с помощью воздушного мембранного насоса DAP-6DULVAC (7). Перед подачей в насос газовая смесь проходит через систему фильтрации, состоящую из входного механического манометрического датчика (8) и последовательно подключенных к нему четырех автомобильных топливных фильтров TS07T (9), выходного механического манометрического датчика (10), за которым находится механический ротаметр (11) с ручным механическим клапаном (12) для контроля подачи газовой смеси в фильтр TS03T (13). Перед металлическим капилляром располагается устройство для десорбции ионов. В качестве противоположного электрода (14) используется пластина из нержавеющей стали или закрепленную на ней MALDI мишень (µFocus MALDI plate, 384 circles, STA µFocus plate 24x16 с 700 µm, Hudson Surface Technology, Inc., США) (15). Наблюдения за формой мениска и процессом десорбции проводились с помощью микроскопа МБС-10 (16) с укрепленной на нем видеокамерой Lumenerra LU100M (17) с USB-выходом и передачей данных на компьютер (18). Для освещения раствора в области мениска и участка для напыления MALDI мишени использовали светодиодный узел (19) с блоком питания Agilent E36612A (20).



Рисунок 39 – Схема экспериментальной установки по нанесению сорбента на основе нанодисперсных оксидов на твердую подложку с использованием методики электрораспыления в бескапельном режиме: 1 – устройство десорбции заряженных частиц;
2 – металлический капилляр; 3 – шприц; 4 – блок питания; 5 – высоковольтный контакт;
6 – капилляр-изолятор; 7 – воздушный мембранный насос; 8 – входной механический манометрический датчик; 9 – автомобильный топливный фильтр TS07T;
10 – выходной механический манометрический датчик; 11 – механический ротаметр;
12 – ручной механический клапан; 13 – автомобильный топливный фильтр TS03T;
14 – противоэлектрод; 15 – MALDI мишень; 16 – микроскоп; 17 – цифровая видеокамера; 18 – компьютер; 19 – светодиодный узел; 20 – источник питания светодиодов;
21 – магнитная мешалка

Для того чтобы полевая десорбция заряженных частиц была бескапельной, необходим стабильный поток суспензии, а также необходимо подобрать оптимальное напряжение на электродах для осуществления стабильного потока парогазовой смеси, откачиваемой из области мениска, которая состоит из воздуха, паров растворителя и частиц сорбента. Контроль бескапельного электрораспыления проводился по форме мениска на торце капилляра. На Рисунке 40А изображен мениск, форма которого характерна для бескапельного распыления. Главным условием такого распыления является отсутствие струи микрокапель с поверхности мениска.

В случае, когда форма мениска не соответствовала бескапельному режиму электрораспыления, переноса сорбента на MALDI мишень не осуществлялось, так как перенесенный вместе с каплями растворителя сорбент не закреплялся на поверхности мишени после испарения жидкости.

Параметрами, которые влияют на получение бескапельного режима, являются: высокостабильное высоковольтное напряжение на элементах узла электрораспыления (нестабильность высоковольтного напряжения обеспечивается источником питания Stanford research systems Model PS 380/5000V/25 W (±) 5кВ 10⁻⁴), постоянная подобранная скорость откачки избытка парогазовой смеси (скорость откачки парогазовой смеси составляет 1-2,5 л/мин. Режим распыления имеет гистерезис, соответственно, нестабильность откачки парогазовой смеси микронасосом не влияет на режим распыления). После правильного подбора этих параметров поток остается стабильным весь период нанесения сорбента (нестабильность потока взвеси в течении всего периода нанесения нестабильностью жидкостного сорбента определяется насоса Harvard. что составляет $\approx 3\%$.). Для получения одного пятна сорбента диаметром 5 мм на поверхности мишени требуется около 20 минут. Используемое напряжение между электродами менялось в пределах 4300-4800 В, а расстояние между ними – 10 мм. Расход жидкости составлял 100-150 мкл/мин. Суспензию предварительно обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут.

В процессе распыления дисперсии наночастиц на поверхность металлической пластины (Рисунок 40Б) или MALDI мишени (Рисунок 40В) формировалось пятно сорбента. Пятно представляет собой круг с явным уплотнением нанесенного слоя в его центре. Такое напыление оказалось устойчивым к стиранию и к воздействию различных растворителей, которые применяются в металл-аффинной хроматографии. Главной осо-

бенностью покрытия является его хорошая адгезия к поверхности основного металла подложки. Так как причиной адгезии являются сильные межмолекулярные взаимодействия, которые являются короткодействующими, то есть наиболее сильное взаимодействие наблюдается при расстояниях в несколько ангстремов, подложка, на которую наносится растворитель, должна быть металлически чистой. Наибольшая прочность сцепления наблюдается в том случае, когда параметры решетки материала подложки и наносимого материала отличаются не более 12,5% [612]. В таком случае происходит воспроизведение кристаллической решетки металлической подложки атомами нанесенного материала.



Рисунок 40 – Нанесение FeOx на MALDI мишень: А – фотография формы мениска в режиме бескапельного электрораспыления; Б – вид пятна FeOx на подложке при электрораспылении суспензии с динамическим делением потока в бескапельном режиме (диаметр пятна ~5 мм); В – поверхность мишени, модифицированная FeOx (диаметр пятна ~2,5 мм)

При варьировании растворителей и соотношения объемов растворителей, был подобран состав, который проявляет универсальные свойства и подходит для электрораспыления широкого перечня оксидов металлов, в том числе FeOx, CuOx, NiOx и ZrOx. Состав для 11 мл расходуемого объёма суспензии представляет собой: 5 мл ацетонитрила; 5 мл дистиллированной воды; 100 мкл муравьиной кислоты; 400 мкл суспензии нанопорошка MeOx (200 мг MeOx в 1 мл дистиллированной воды). Для получения пятна сорбента диаметром 1,5 мм распыление проводили при следующих условиях: время работы автоматического поршня 10 минут, расходуемый объём раствора 500 мкл, скорость подачи раствора 50 мкл/мин; напряжение, подаваемое на противоэлектрод и внешний капилляр 4000 В; расстояние между противоэлектродом и внутренним капилляром 7 мм; напряжение воздушного микронасоса 8,1 В; расстояние между внешним и внутренним капиллярами 0,35 см. В этих условиях FeOx, CuOx, NiOx формировали устойчивые пятна, хорошо сцепленные с подложкой. При этом со стандартной полированной мишени пятна ZrOx легко удалялись при незначительном механическом воздействии. Соответственно, для модификации наночастицами ZrOx поверхность мишени предварительно покрыли слоем диоксида титана, имеющего близкие параметры кристаллической решетки, толщиной около 50 нм, (ООО "ЭЛКОМ" Беларусь). На Рисунке 41 представлены микрофотографии MeOx, нанесенных на поверхность стальной пластины, полученные метолом SEM.



Рисунок 41 – Микрофотографии FeOx (А), CuOx (Б), NiOx (В) и ZrOx (Г), распыленных на поверхность стальной пластины, полученные методом SEM
В каждом случае можно отметить присутствие частиц размером менее 0,1 мкм, что подтверждает нанодисперстность структур, нанесенных на мишень.

Выбор диаметра пятна сорбента, составляющего 1,5 мм, был обусловлен удобством дальнейшей работы с мишенью при напылении сорбента в центр ячейки мишени до ее границ остается примерно 1 мм чистой подложки, обеспечивающее формирование водной капли образца даже в условиях высокой гидрофильности распыленной фазы.

3.2.1.2 Металл-аффинная экстракция на МеОх функционализированной поверхности

MALDI мишени

Для оценки сорбционных свойств MeOx, нанесенных на мишень, процедура проведения металл-аффинной хроматографии была переведена в формат «лаборатория на мишени». На пятно сорбента наносили каплю водной фазы объемом 4-5 мкл (в зависимости от объекта исследования это может быть кислый, нейтральный или слабощелочной водный раствор), инкубировали 2-3 минуты, каплю удаляли. Затем каплю наносили повторно, к ней добавляли 1 мкл образца и оставляли на 20 минут под пластиковой крышкой, чтобы уменьшить испарение жидкой фазы. Затем несвязавшуюся фракцию переносили на соседнюю ячейку, сорбент дважды промывали водным раствором и высушивали на воздухе. Для обеспечения десорбции к сорбенту добавляли 2-3 мкл 30% водного раствора ацетонитрила с 0,1% TFA и 2 мкл матрицы CHCA. После полного высыхания жидкой фазы мишень помещали в масс-спектрометр и проводили MALDI MS анализ.

3.2.1.2.1 Металл-аффинная экстракция фосфорилированных пептидов на пятнах FeOx и ZrOx в формате «лаборатория на мишени»

Для FeOx и ZrOx (жесткие кислоты Льюиса, специфичные к P=O, входящей в состав фосфатной группы) специфичную экстракцию фосфорилированных пептидов оценивали с использованием смеси синтетических нефосфолированных, монофосфорилированных и дифосфорилированных пептидов в концентрации 1 мг/мл каждого (Таблица 11, Рисунок 42), которую смешивали с триптическим гидролизатом глобина человека (HHb) (1 мг/мл) в соотношении 1:1. Экстракцию проводили в соответствии с процедурой, представленной выше, сорбцию и промывку осуществляли с использованием 0,1% TFA.



Рисунок 42 – Масс-спекр смеси синтетических петидов: где: 1 - SRTPSLPTPPTREPK; 2 - SRTpPSLPTPPTREPK; 3 - SRTpPSpLPTPPTREPK; 4 -VAVVRTPPKSPSSAK; 5 - VAVVRTpPPKSPSSAK; 6 - VAVVRTpPPKSpPSSAK; 7 – SSNGHVYpEKLSSI

Таблица 11 – Аминокислотные последовательности синтетических нефосфолированных, монофосфорилированных и дифосфорилированных пептидов

N⁰	Аминокислотная последовательность	pI	$[M+H]^+ m/z$
1	SRTPSLPTPPTREPK	10,83	1663,913
2	SRTpPSLPTPPTREPK	7,07	1743,879
3	SRTpPSpLPTPPTREPK	5,05	1823,846
4	VAVVRTPPKSPSSAK	11,17	1523,891
5	VAVVRTpPPKSPSSAK	8,67	1603,857
6	VAVVRTpPPKSpPSSAK	6,98	1683,824
7	SSNGHVYpEKLSSI	7,82	1500,673

Масс-спектрометрический анализ смеси синтетических пептидов с гидролизатом ННb показал, что в этих условиях из всей смеси пептидов детектируются только два нефосфорилированных пептида (Рисунок 43А), при этом сигналы фосфорилированных пептидов в масс-спектре отсутствуют, а остальные сигналы соответствуют триптическим пептидам альфа- и бета-субъединиц глобина человека.

182



Рисунок 43 – MALDI масс-спектры смеси триптического гидролизата HHb и синтетических пептидов: А – до проведения металл-аффинной хроматографии; Б – после металлаффинной хроматографии на пятне FeOx; В - после металл-аффинной хроматографии на пятне ZrOx. Номера сигналов соответствуют пептидам, перечисленным в Таблице 11

После проведения металл-аффинной хроматографии на пятнах FeOx и ZrOx были получены MALDI масс-спектры, представленные на Рисунке 43Б и 43В, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что при модификации мишени MeOx методом бекапельного распыления обе структуры сохраняют специфичные свойства. В обоих масс-спектрах присутствуют сигналы, соответствующие пяти фосфорилированным пептидам. При этом структуры проявили достаточно близкий уровень селективности, однако, ZrOx показал более высокий уровень специфичности по отношению к дифосфорилированным пептидам (№ 3 и № 6).

Следует отметить, что оба сорбента хорошо удерживались на подложке как в процессе металл-аффинной хроматографии, так и при облучении лазерными импульсами во время проведения MALDI MS анализа. Как показано на Рисунке 44, пятно сорбента сохраняет свою форму и плотность после завершения анализа.



Рисунок 44 – Фотографии с камеры масс-спектрометра монитора пятна ZrOx: А – сразу после распыления; Б - после получения MALDI масс-спектров

3.2.1.2.2 Металл-аффинная экстракция фосфонилированных пептидов на пятнах FeOx и ZrOx в формате «лаборатория на мишени»

Исследование проводили на примере аддуктов HSA с PFMP на мишени, модифицированной FeOx и ZrOx (жесткие кислоты Льюиса, специфичные к P=O, входящей в состав фосфоновой группы). Образец представлял собой пептический гидролизат HSA, в котором соотношение модифицированной PFMP формы белка к немодифицированной составляло 1:100 при начальной концентрации белка 1 мг/мл (при таком соотношении в гидролизате сигналы соответствующих аддуктов либо не детектируются, либо по интенсивности незначительно превышают уровень шума, как показано на Рисунке 45А). Эксперимент проводили в соответствии с предложенной процедурой, сорбцию и промывку осуществляли с использованием 2,5% водного раствора аммиака.

MALDI MS анализ показал, что действительно при таком соотношении форм белка в образце определяется только один из ожидаемых аддуктов с соотношением сигнал/шум = 4 (Рисунок 45А). При этом в масс-спектрах, полученных с пятен каждого из сорбентов после экстракции, сигналы соответствующие фосфонилированным пептидам становятся мажорными компонентами (Рисунок 45Б,В). Однако ZrOx продемонстрировал более высокий уровень и специфичности, и селективности.





А – до проведения металл-аффинной хроматографии;

Б – после металл-аффинной хроматографии на пятне ZrOx;

В – после металл-аффинной хроматографии на пятне FeOx

3.2.1.2.3 Металл-аффинная экстракция аддуктов ННb с ксенобиотиками из группы хлорацетамидов на MeOx функционализированной MALDI мишени

При исследовании специфичных свойств разработанных сорбентов была продемонстрирована возможность извлекать из водных и биологических образцов галогенсодержащие ксенобиотики, такие как дильдрин и диклофенак методом металл-аффинной хроматографии. В связи со своей структурой, хлор, как основание Льюиса, в различных источниках классифицируется либо как жесткое [613] основание, либо как основание промежуточной силы [614]. Соответственно хлорсодержащие аддукты являются подходящим аналитом для тестирования сорбентов, содержащих как жесткие кислоты Льюиса (FeOx и ZrOx), так и кислоты Льюиса промежуточной силы (CuOx и NiOx).

Галогензамещенные органические соединения, обладающие алкилирующими свойствами, представляют собой широко распространенную группу промышленных и бытовых токсикантов. В связи с этим, разработка методов диагностики отравлений алкилирующими агентами представляет актуальную задачу. Как и в случае с фосфорорганическими соединениями, представляется перспективным диагностировать отравления этими токсикантами по наличию долгоживущих аддуктов с белками крови, которые могут рассматриваться как маркеры интоксикации. Известно, что многие ксенобиотики или их метаболиты способны мигрировать из эндоплазматического ретикулума гепатоцитов в эритроциты, где могут избирательно алкилировать цистеиновые остатки в составе гемоглобина [615]. Время полужизни гемоглобина составляет 60 дней, соответственно, можно ожидать, что в течение этого времени аддукт белка с ксенобиотиком может быть обнаружен и идентифицирован, как это было ранее показано на примере аддукта глобина крысы с тиодигликолем. Поэтому в качестве модельного объекта был выбран прямой алкилирующий агент из группы хлорацетамидов, N1-(4-хлорфенил)-2хлорацетамид (CCAn), который взаимодействует с цистеинами, входящими в состав глобина, по схеме, представленной на Рисунке 46.

В составе ННb имеется несколько цистеинов: один в альфа-субъединице (C-104) и два в бета-субъединице (C-93 и C-112), как показано в Таблице 12. Для поиска аддуктов, были проведены расчеты m/z пептидов, которые образуются в результате гидролиза в присутствии трипсина, с учетом его неполного прохождения (0 и 1 пропущенный сайт ферментативного расщепления последовательности аминокислотных остатков).



Рисунок 46 – Схема реакции алкилирования белка N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамидом по цистеиновому фрагменту с образованием S-алкилированного аддукта

Таблица 12 – Цистеинсодержащие аддукты глобина человека с *N*1-(4-хлорфенил)-2хлорацетамидом

Nº	C _x	m/z нативно- го пепти- да	m/z пептида, модифици- рованного CCAn	Аминокислотная последователь- ность/pI	Субъеди- ница глобина
1	104	4201,31	4368,32	LLSHC _{CAn} LLVTLAAHLPAEFTPAV HASLDKFLASVSTVLTSK/7,34	альфа
2	104	3767,03	-	VDPVNFKLLSHC _{CAn} LLVTLAAHL PAEFTPAVHASLDK/6,34	альфа
3	104	2967,61	-	LLSHC _{CAn} LLVTLAAHLPAEFTPAV HASLDK/6,34	альфа
4	112	3079,65	3246,66	LLGNVLVC _{CAn} VLAHHFGKEFTPP VQAAYQK/8,76	бета
5	93	3072,54	-	VLGAFSDGLAHLDNLKGTFATLS ELHC _{CAn} DK/5,11	бета
6	112	2827,52	-	LHVDPENFRLLGNVLVC _{CAn} VLAH HFGK/7,34	бета
7	93	2529,21	2696,23	GTFATLSELHC _{CAn} DKLHVDPENF R (2)/5,17	бета
8	112	1719,97	1886,99	LLGNVLVC _{CAn} VLAHHFGK (1)/8,84	бета
9	93	1421,67	1588,69	GTFATLSELHC _{CAn} DK 5,17	бета

МАLDI MS анализ показал, что при избытке аликилирующего агента все цистеины, входящие в состав обеих субъединиц глобина человека, алкилируются CCAn, о чем свидетельствует наличие в масс-спектрах сигналов с разницей m/z 167 по сравнению с немодифицированными (Рисунок 47, в Таблице 12 перечислены m/z идентифицированных аддуктов). С точки зрения значения m/z, наиболее перспективными аналитами представлялись пептиды LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK(1) (m/z 1886,99) и GTFATLSE-LHC_{CAn}DKLHVDPENFR(2) (m/z 2696,23) бета-субъединицы, содержащие C-112 и C-93, соответственно.

Для исследования чувствительности предложенного подхода были приготовлены образцы полностью модифицированного белка (контроль проводили по линейным MALDI масс-спектрам цельного белка), а также смесь с соотношением модифицированной формы к немодифицированной 1:10 и 1:100. Сорбцию и промывку проводили в водной среде. Результаты представлены на Рисунке 47.

Как продемонстрировано на Рисунке 47А, пептиды (1) и (2), в отличие от остальных, представленных в Таблице 12, хорошо детектируются при MALDI MS анализе. При этом можно сделать вывод, что они хорошо связываются с каждым из сорбентов. При высоком содержании аддуктов в образце выявить значимые различия в компонентности масс-спектров не удалось. Набор примесных сигналов для всех сорбентов в значительной мере совпадает. При этом в каждом из масс-спектров наряду с сигналами, соответствующим аддуктам, становятся более значимыми сигналы нативных пептидов с m/z 1719,95 и 2529,21. Принадлежность сигналов с m/z 1886,99 и 2696,23 исследуемым аддуктам LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK и GTFATLSELHC_{CAn}DKLHVDPENFR, соответственно, была подтверждена методом тандемной масс-спектрометрии (Приложение В).

Как продемонстрировано на Рисунке 48, фрагментные масс-спектры содержат достаточное количество сигналов, чтобы восстановить аминокислотную последовательность каждого из пептидов. При этом разница m/z между ионами-продуктами y11 и y12 в масс-спектре аддукта GTFATLSELHC_{CAn}DKLHVDPENFR и ионами-продуктами y8 и y9 в масс-спектре аддукта LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK составляла 270, что однозначно доказывало наличие модификации у остатков цистеинов 93 и 112, соответственно.

При соотношении модифицированной формы к немодифицированной 1:10 в массспектре необогащенного гидролизата ННb сигнал аддукта (1) незначительно превышает шум (Рисунок 47Б).

Однако после экстракции на сорбентах сигнал аддукта (1), также как и сигнал аддукта (2), надежно детектируются, хотя и не являются мажорными компонентами спектра. Следует заметить, что масс-спектры, полученные с пятен CuOx и NiOx, воспроизводимо содержат большее количество примесных минорных сигналов. Как, например, сигнал с m/z 1895,814, который имеет в них достаточно большую интенсивность и практически отсутствует в масс-спектрах, полученных с FeOx и ZrOx. По всей видимости, это связано с природой металла, входящего в состав оксида. Медь и никель, как кислоты Льюиса промежуточной силы, проявляют специфичность к большему числу неметаллов, например азоту, который хорошо представлен в белковых веществах, и, соответственно, способны координировать большее число соединений.

При соотношении модифицированной формы к немодифицированной 1:100 в масс-спектре гидролизата присутствует только сигнал аддукта (2) (Рисунок 47В). При этом в масс-спектрах, полученных с сорбентов, воспроизводимо детектируются сигналы обоих аддуктов. И так же, как и в предыдущем случае, FeOx и ZrOx демонстрируют более высокие селективные свойства, чем CuOx и NiOx. Следует отметить, что при ис-

пользовании CuOx, FeOx и ZrOx сигналы целевых аддуктов с соотношением сигнал/шум ≥ 3 детектируются при соотношении модифицированной формы к немодифицированной 1:500, а в случае NiOx – 1:1000.



Рисунок 47 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата HHb, модифицированного CCAn, до и после металл-аффинной экстракции на мишени с нанесенными MeOx при соотношении модифицированной формы к немодифицированной: A – 100:0 (белок полностью модифицирован); Б – 1:10; В – 1:100



Рисунок 48 – Фрагментные масс-спектры аддуктов глобина человека с ССАп (** помечен остаток модифицированного цистеина): A – LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK; Б – GTFATLSELHC_{CAn}DKLHVDPENFR (Sequence Viewer 3.0, ИАП РАН) Соответственно, можно сделать вывод, что предложенный подход в формате «лаборатория на мишени» для специфичной экстракции хлорсодержащих белковых аддуктов представляется перспективным для применения в биоорганическом и протеомном анализе, так как позволяет упростить и ускорить процедуру пробоподготовки, снизить количество образца и потери аналита в процессе подготовки к анализу и, в целом, значительно повысить эффективность MALDI MS анализа.

3.2.2 Функционализация поверхности MALDI мишени FMe

Сорбенты на основе стеаратов переходных металлов хорошо проявили себя при проведении металл-аффинной хроматографии в спиновых колонках в связи с выявленными преимуществами:

 простота получения сорбента (не требует применения сложного оборудования и высоких температур, больших временных затрат);

- возможность получения сорбента непосредственно перед экспериментом;

крайне малое количество реагентов, требующихся для формирования сорбента,
 что позволяет получать и исследовать структуры, содержащие атомы дорогостоящих металлов;

 высокий уровень сорбционной емкости, а также специфичных и селективных свойств, так как одна из поверхностей пленки полностью состоит из атомов металла, доступных для взаимодействия с аналитом;

– отсутствие продуцирования ионов металлов в образец;

 возможность формирования сорбентов, содержащих различные металлы, для целей одного эксперимента;

– устойчивость к подавляющей части растворителей, применяемых в металлаффинной хроматографии.

Все перечисленное позволило предположить перспективность структур на основе стеаратов, как материала для модифицирования поверхности MALDI мишени.

Однако, невозможность адаптации классической технологии Ленгмюра (образование монослоя на горизонтальной поверхности) для такой малой площади твердой подложки (например, диаметр ячейки MALDI мишени, производимой фирмой Bruker, составляет 3,1 мм) привело к необходимости разработки нового метода формирования сорбентов непосредственно на мишени. Было предложено органическую фазу, содержащую HSt, наносить на каплю водного раствора соли металла, которая будет расположена в центре ячейки мишени. Соответственно, потребовалась разработка модели формирования плёнок, подобных коллапсированным монослоям, на субфазе в геометрии, отличной от плоской поверхности ванны Ленгмюра. Можно было ожидать, что, с одной стороны, искривление поверхности, характерное для капли, изменяет ее механохимические свойства [616], что по всей вероятности, может обеспечить более быстрый и полный переход HSt в соль с образованием упорядоченной структуры, содержащей ионы металла. С другой, быстрое испарение 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.

3.2.2.1 Исследование самоорганизации солей жирных кислот на полусферической поверхности водной субфазы для формирования металл-аффинных сорбентов на MALDI мишени

Как упоминалось выше, ионы La (III) имеют широкие возможности для координации. Соответственно, сорбенты, содержащие лантан представляют особый интерес. Однако, в связи с тем, что катион лантана обладает способностью к комплексообразованию, характерному для переходных металлов, что может значительно осложнить исследование процесса самосборки стеаратов на полусферической поверхности водной субфазы, в качестве модельной системы были выбраны тонкие плёнки стеарата бария, который координирует только воду.

Во-первых, если сравнить ионные радиусы катионов La⁺³ и Ba⁺², они достаточно близки по значению [617], при этом имеется схожесть координационных возможностей обоих ионов (от шести до двенадцати). Можно ожидать, что окружение у лантана и бария в составе стеаратов в одних и тех же условиях эксперимента будет одним и тем же. Во-вторых, у ионов лантана и бария энергии гидратации (в расчёте на один заряд) практически идентичны [618]. Наконец, барий обладает характерным изотопным распределением, что, как ожидалось, значительно упростит интерпретацию результатов, получаемых методом MALDI MS.

3.2.2.1.1 Исследование процесса формирования пленки стеарата бария на поверхности капли водной субфазы

Основным объектом исследования стала структура, сформированная на ячейке MALDI мишени при нанесении насыщенного раствора HSt в н-гексане на поверхность капли водной субфазы, содержащей ионы бария (C= 10^{-2} M). Следует отметить, что концентрация соли была увеличена по сравнению с используемой при классическом формировании монослоев Легнмюра в связи с изменившимся соотношением объемов водной субфазы и н-гексанового раствора HSt. Эта же концентрация была использована и при дальнейших исследованиях. Ожидалось, что на выпуклой поверхности так же, как и на горизонтальной будет происходить самоорганизация молекул стеарата бария. При этом пленка при формировании на поверхности капли будет передвигаться вниз под воздействием силы тяжести, что приведет к образованию сначала конденсированной, а затем и коллапсированной структуры на ячейке мишени за пределами водной субфазы.

Для получения информации о состоянии капли при нанесении на нее раствора HSt были измерены углы смачивания капли на различных стадиях эксперимента.

Методом оптической тензиометрии был исследован процесс формирования плёнки на поверхности капли. На Рисунке 49 представлены результаты измерения угла смачивания в системе субфаза-подложка-воздух в момент перед нанесением раствора HSt в н-гексане, в момент нанесения раствора HSt, и спустя пять секунд.

При нанесении раствора HSt в н-гексане угол смачивания значительно уменьшается (с 64° (Рисунок 49А) до 31°(Рисунок 49Б)) за счет образования на поверхности пленки ПАВ, что и приводит к снижению поверхностного натяжения, и следовательно угла смачивания. Однако, через 5 сек после нанесения раствора HSt в нгексане капля принимает первоначальный вид, и значение угла смачивания возвращается к исходному значению (Рисунок 49В). На основании этого можно сделать вывод о том, что образовавшаяся пленка перемещается с поверхности капли на подложку и накапливается за пределами капли водной субфазы. Образование и перемещение плёнки по поверхности водной капли также было зафиксировано при исследовании процесса методом световой микроскопии в отраженном свете (Рисунок 50).



Рисунок 49 – Нанесение раствора HSt в н-гексане на водную субфазу, содержащую нитрат бария: А – капля перед нанесением н-гексанового раствора; Б – капля сразу после нанесения н-гексанового раствора; В – после испарения н-гексана



Рисунок 50 – Образование пленки при испарении н-гексана

Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света была исследована поверхность ячейки мишени после формирования пленки, удаления капли субфазы и промывки полученной структуры водой для избавления от избытка нитрата бария. Как показано на Рисунке 51, структура нанесенного на ячейках мишени материала состоит из упорядоченных концентрических кругов яркосветящегося материала, причем их скопление наблюдается по периметру водной капли. Подобное распределение вещества позволяет предположить волнообразный характер формирования пленки вследствие комплекса процессов, связанных с перемещением образовавшейся пленки по поверхности водной субфазы и испарением слоя н-гексана. Промывка материала водой обеспечивает отсутствие исходной соли в полученных структурах, соответственно, можно сделать вывод о том, что наблюдаемые скопления вещества являются продуктом взамодействия HSt с ионами бария.



Рисунок 51 – Изображение ячейки MALDI мишени в световом микроскопе после исапения н-гексана. А - яркие светящиеся концентрические круги коллапсированного материала. Б - Увеличенная область концентрических кругов коллапсированного материала (Указана на Рисунке А прямоугольником). Широкий яркий светящийся круг по периметру области испарения н-гексана – граница ячейки MALDI мишени Методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) были проанализированы коллапсированные монослои стеарата бария, полученные в ванне Ленгмюра, плёнки, нанесённые на подложку по классической технологии Ленгмюра-Блоджетт, и пленка моностеарата бария, сформированная на твердой подложке. Спектры КР, представленные на Рисунке 52, одинаковы для трех рассмотренных структур вне зависимости от способа получения материала.



Рисунок 52 – Спектры комбинационного рассеяния, полученные при исследовании:

1 – классические LBF стеарата бария на кремниевой подложке;

2 – монослой стеарата бария, коллапсированный в ванне Ленгмюра;

3 – структура, сформированная у периметра водной капли, после испарения н-гексана

На основании этого можно сделать вывод, что на капле формируется структура, подобная классическим LBF, образующимся при многократном наслаивании одного монослоя на другой, или при коллапсировании одного монослоя. То есть, пленка, образующаяся на поверхности капли водной субфазы, является монослоем стеарата бария, который при передвижении на подложку коллапсируется, образуя мультиструктуру.

При исследовании с помощью микроскопической приставки процесса образования структуры в режиме реального времени сразу после нанесения раствора HSt на каплю были получены спектры комбинационного рассеяния (Рисунок 53А) с разных частей образца, в том числе и с разных частей водной капли (Рисунок 53Б,В). Полученные результаты хорошо согласуются с данными из работы [619], представленными на Рисунке 53Г, где продемонстрировано изменение вида спектров КР для LBF с разным числом нанесенных монослоев стеарата бария, то есть в зависимости от толщины пленки.



Рисунок 53 – Спектры комбинационного рассеяния, полученные с пяти разных участков образца при формировании пленки стеарата бария на поверхности водной субфазы (А); изображение образца после формирования пленки стеарата бария на поверхности водной субфазы, полученные с помощью светового микроскопа и сканирующего электронного микроскопа, соответственно (Б, В); спектры КР LBF стеарата бария разной толщины по данным работы [619] (Г)

Одинаковое пространственное расположение метиленовых -CH₂- групп сопровождается наличием двух интенсивных линий на 2850 см⁻¹ и 2880 см⁻¹, которые относятся к v_s (CH₂) и v_A (CH₂) колебаниям, соответственно. Авторы работы [619] отмечают, что при уменьшении толщины мультиструктур наблюдается снижение интенсивности пиков 2850 см⁻¹ и 2880 см⁻¹, детализация правого плеча, образование плато и в тонких плёнках уже наблюдается пик при частоте 2920 см⁻¹ (Рисунок 53Г). Изменение вида спектра связано с изменением пространственной конфигурации углеводородной цепи и соответственно регулярности структур. В нашем случае спектры, полученные с области за пределами периметра капли, соответствуют спектрам LBF толщиной не менее 20 нм, что позволяет сделать вывод о том, что в данной области образуется структура, содержащая как минимум 8 монослоев. В то время как спектры, характерные для одного монослоя, были получены с поверхности капли водной субфазы. Неоднородное распределение плёнки, полученной на поверхности капли, происходит за счёт самопроизвольного коллапсирования, которое возникает из-за особенностей геометрии субфазы (геометрия полусферы). Соответственно, полученные результаты свидетельствуют об образовании мультиструктур уже за пределами капли из монослоя, сформированного на ней.

3.2.2.1.2 Исследование состава пленок, сформированных на ячейке MALDI мишени

Для подтверждения перехода HSt в соль бария было проведено исследование методом инфракрасной (IR) спектроскопии (Рисунок 54). На Рисунке 54 представлены спектры, полученные для различных объектов: HSt; объёмного стеарата бария; монослоя стеарата бария, коллапсированного в ванне Ленгмюра; пленки, сформированной на капле субфазы с нитратом бария. Спектры первых трех веществ были получены в матрице из бромида калия, а спектр пленки на капле субфазы, в связи крайне малым количеством, был получен методом нарушенного полного внутреннего отражения с гидрофобизированной стеклянной подложки, на которой производилось формирование материала. Вследствие этого на спектре с капли видна часть спектра поглощения стеклянной подложки. По этим же причинам интенсивность зафиксированных полос является небольшой. Однако положение полос определяется достаточно чётко.

IR спектры HSt и стеаратов содержали валентные колебания в диапазоне 3000-2800 см⁻¹ (ассиметричные) и 1380 см⁻¹ (симметричные), которые относятся непосредственно к колебаниям углеводородной цепи.

Ножничные колебания групп CH₃ обнаруживались в диапазоне 1470-1450 см⁻¹. Валентные колебания C-C лежали в области 1250-1160 см⁻¹. Веерные деформационные колебания метиленовой группы приводили к появлению слабых полос при 1240 см⁻¹. Расположенные подряд метиленовые группы (CH₂)_n проявлялись в спектре полосами в районе 720 см⁻¹ (маятниковые колебания) и 1350-1180 см⁻¹ (веерные или крутильные колебания). Рассматривая колебания -COOH группы, нужно учитывать колебания как C=O, так и C-O и O-H. Валентные колебания COO-H наблюдались в области 3350-2500 см⁻¹.



Рисунок 54 – IR спектры HSt (А), поликристаллического стеарата бария (Б), коллапсированного монослоя стеарата бария (В) и плёнки стеарата бария, полученной на капле водной субфазы (Г). Нижняя панель (Д-3) представляет собой увеличенную область 1750-1250 см⁻¹ спектров А-Г

Валентные колебания C=O в случае HSt характеризовались интенсивной полосой в области 1720-1700 см⁻¹. В свою очередь валентные колебания связи C-O наблюдались в диапазоне 1440-1395 см⁻¹, в этом же диапазоне находились и полосы, соответствующие деформационным колебаниям связи O-H. Кроме того, в спектрах наблюдался дублет в области 1320-1211 см⁻¹, который возникает ввиду наличия деформационных колебаний O-H и C-O. Деформационные внеплоскостные колебания связи O-H находились в диапазоне 940-925 см⁻¹.

что Следует отметить, спектрах синтезированного стеарата бария, В коллапсированного монослоя стеарата бария и плёнки, полученной на капле, C=O отсутствовала или практически отсутствовала полоса поглощения неионизированной карбоксильной группы в области 1700 см⁻¹, в отличии от свободной HSt. Однако во всех спектрах, кроме спектра HSt, присутствовали полосы в области 1513 см⁻¹, которые характерны для асимметричных колебаний ионизированной группы COO⁻.

Таким образом, можно сделать вывод о практически полном переходе HSt в бариевую соль во всех трёх случаях. Наличие бария в составе пленки, сформированной на капле и промытой водой, было потверждено методом локальной энергодисперсионной спектроскопии на базе сканирующего электронного микроскопа (Рисунок 55). Алюминий, кремний и железо присутствуют в составе металлической мишени, линии бария, кислорода и углерода относятся к коллапсированному стеарату бария.



Рисунок 55 – EDX-спектр коллапсированных слоев стеарата бария на поверхности MALDI мишени

Для исследования структурного звена пленки был проведен MALDI MS анализ полученных структур (Рисунок 56). При идентификации учитывались три параметра: точная масса, наличие характерного изотопного распределения и результаты MS/MS анализа. В масс-спектре детектировался сигнал с m/z 421,169, соответствующий положительно заряженному иону моностеарата бария [M-H+Ba]⁺ (Рисунок 56А), и имеющий характерное для соединения, содержащего этот металл, изотопное распределение (Рисунок 56Б).

При этом сигналов, которые можно было бы интерпретировать, как принадлежащие депротонированной молекуле HSt (m/z 283,263) или протонированному дистеарату бария (m/z 705,440), обнаружено не было. В MS/MS спектре присутствовал сигнал BaOH⁺, а также сигналы, соответствующие характерным отщеплениям воды и CO₂ (Рисунок 56В). В MS/MS спектре также наблюдалась серия сигналов, относящихся к разрывам о-связей C-C в углеводородной цепи, характеризующаяся инкрементом m/z 14, соответствующего метиленовым группам (сигналы b – т на Рисунке 56В). Интенсивный сигнал m/z 195,949 соответствовал катион-радикалу 'CH₂CO₂Ba⁺. Результаты MALDI MS анализа позволяют утверждать, что основным структурным звеном пленок, сформированных на твердой подложке путем нанесения насыщенного раствора HSt в н-гексане на полусферическую поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария, является моностеарат бария.

Таким образом, комплекс исследований на модельном стеарате бария, показал, что при нанесении раствора HSt в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы металла, образуется монослой на основе моностеарата бария, который при передвижении вниз под действием силы тяжести самопроизвольно коллапсируется на подложке, формируя мультиструктуры аналогичные LBF или коллапсированным монослоям, полученным в ванне Ленгмюра. Соответственно, можно ожидать, что при нанесении нгексанового раствора HSt на водную каплю, содержащую ионы лантана, также будет формироваться мультиструктура на основе стеарата лантана.

Действительно, EDX-спектр, полученный с пленок, сформированных на водной субфазе, содержащей ионы лантана, на поверхности MALDI мишени, подтверждает их наличие в структуре (Рисунок 57А). Алюминий, галлий и мышьяк присутствуют в составе металлической мишени, линии лантана, кислорода и углерода относятся к коллапсированному стеарату лантана. Незначительная интенсивность сигнала от коллапсированных монослоев обусловлена их малой толщиной.



Рисунок 56 – Результаты MALDI MS анализа пленки, сформированной на капле субфазы, содержащей ионы бария: А – сигнал иона моностеарата бария в MALDI массспектре; Б – рассчитанный масс-спектр моностеарата бария; В – фрагментный масс-спектр моностеарата бария

МALDI MS анализ пленок, показал, что основным структурным звеном монослоя является дистеарат лантана с одной свободной валентностью. Присутствующий в массспектре сигнал с m/z 705,439 (Рисунок 57Б) соответствует иону (С17H35COO)2La⁺, что полностью согласуется с результатами, полученными на этапе разработки сорбентов. Последующий фрагментный анализ также подтвердил эту структуру. Большая часть интенсивных сигналов масс-спектра принадлежит фрагментам дистеарата лантана, кроме того, наличие ряда сигналов с разницей 14 Да свидетельствует о наличии в структуре остатка предельного углеводорода (Рисунок 57В, Таблица 13).



Рисунок 57 – Результаты анализа пленок, сформированных на капле, содержащей ионы лантана: А – EDX-спектр; Б – сигнал иона дистеарата лантана в MALDI масс-спектре; В – фрагментный масс-спектр дистеарата лантана

Таблица 13 – Результаты MALDI MS/MS анализа FLa при определении структурного звена

N⁰	m/z	m/z	Химическая формула
п/п	расчетное	экспериментальное	$[M^+]$
1	705,4	705,4	O H + La O O-C-(CH ₂) ₁₆ CH ₃ O-C-(CH ₂) ₁₆ CH ₃
2	677,4	677,4	$+ La O - C - (CH_2)_{16}CH_3 + U O - C - (CH_2)_{14}CH_3$
3	661,4	660,9	$+_{L_{a}} \bigcirc -C - (CH_{2})_{16}CH_{3} \\ -C - (CH_{2})_{12}CHCH_{2} \\ 0 \\ U \\ O \\ U \\ O \\ O \\ O \\ O \\ O \\ O \\ O$
4	649,4	648,8	$+ L_{4} O - C - (CH_{2})_{16}CH_{3} O - C - (CH_{2})_{12}CH_{3} O - C - (CH_{2})_{12$
5	631,4	631,0	$ \begin{array}{c} & O \\ & I \\ & -C - (CH_2)_{16}CH_3 \\ & La \\ & O - C \equiv C - (CH_2)_{11}CH_3 \end{array} $
6	621,3	620,7	$ \begin{array}{c} $
7	493,2	493,0	+ La $C(CH_2)_{16}CH_3$ $C(CH_2)_{16}CH_3$ $CC-C=CH_2$ $C=CH_2$
8	466,2	466,8	0 C 0 + La-OC(CH ₂) ₁₆ CH ₃
9	439,2	438,9	OH O + La-OC(CH ₂) ₁₆ CH ₃
10	397,1	396,9	OH O + La-OC(CH ₂) ₁₃ CH ₃
11	369,1	368,7	ОН О +

3.2.2.1.3 Исследование морфологии пленок, сформированных на ячейке MALDI мишени

Исследование морфологии сформированных на капле FBa и FLa методом SEM показало, что так же, как и в случае стеарата бария, пленка стеарата лантана формируется в виде упорядоченных концентрических кругов (Рисунок 58А,Б). По всей видимости, процесс самопроизвольного коллапсирования не ограничивается пространством близким к периметру водной капли, а распространяется на всю область растекания нгексана. Неравномерная яркость затемненных участков на изображениях свидетельствует о различном количестве монослоев, образующих мультиструктуру. При этом у FLa концентрические круги расположены более равномерно и с большим расстоянием друг от друга, чем в случае FBa, что, возможно, связано с большей жесткостью монослоя стеарата лантана.

Методом атомно-силовой микроскопии (AFM) была исследована морфология структур, сформированных на графитовой подложке, в области близкой к границе испарения н-гексана (Рисунок 58В-Е). Данные AFM показывают структурное сходство пленок стеаратов бария и лантана. Образцы характеризуются развитой поверхностью с формированием структур различных масштабов. Наиболее крупным структурным элементом поверхности является волнообразный рельеф с перепадом высот 300-500 нм (FBa) 350-600 нм (FLa) (Рисунок 58В,Г) и периодом около 10 мкм для FBa и 15 мкм для FLa, соответственно, сформированный в результате макроскопического коллапса пленки. Тонкая структура пленок представлена зернистой структурой с размером агрегатов 300-500 нм в плоскости изображения и высотой до 150 нм в случае FBa (Рисунок 58Д).

FLa структурно аналогичны по морфологии FBa, но отличаются более плотной упаковкой агрегатов, которые имеют несколько большие размеры (размер в плоскости изображения 350-600 нм, высота около 200 нм) (Рисунок 58E). Такая морфология обеспечивает высокую удельную поверхность пленок на периферии капли. Следует отметить, что эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом SEM. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что процесс самопроизвольного коллапсирования, начинающийся у периметра водной капли, затем распространяется на всю область растекания н-гексана. Причем наибольшая высота агрегатов отмечается ближе к границе испарения неполярного растворителя. Это может быть связано, как с постоянным передвижением сформированной пленки по мишени за счет не-

прерывного образования монослоя на свободной поверхности водной капли, так и с неравномерным осцилляторным испарением н-гексана.



Рисунок 58 – Изображения FBa и FLa, сформированных на твердой подложке: А, Б – изображения FBa и FLa, соответственно, сформированных на MALDI мишени, полученные методом SEM; В, Г - трехмерные изображения FBa и FLa (50x50 мкм), сформированных на графитовой подложке, полученные методом AFM; Д, Е – трехмерные изображения FBa и FLa (10x10 мкм), сформированных на графитовой подложке, полученные методом AFM

лантана, сформированного на ячейке MALDI мишени в формате

«лаборатория на мишени»

Следующим этапом работы было исследование сорбционных свойств коллапсированных монослоев стеарата лантана, сформированных на MALDI мишени. FLa были успешно использованы для металл-аффинной хроматографии при экстракции аддуктов HSA с остатком PFMP, поэтому в качестве модельного объекта был также выбран белок, модифицированный остатком OP, а именно бутирилхолинэстераза человека (hBChE), модифицированная остатком диизопропилфторфосфата (DFP). С одной стороны, аддукт hBChE, присоединяющей остаток OP по серину-198, чаще всего рассматривается, как маркер интоксикации OP. С другой, DFP является эталонным ингибитором hBChE и, несмотря на чрезвычайно высокую токсичность, до сих пор в некоторых странах находит свое применение, например в офтальмологии при лечении глаукомы.

Триптические пептиды hBChE, модифицированные OP – удобные аналиты при MALDI MS анализе. Соответственно, для исследования сорбционных свойств был использован триптический гидролизат hBChE, модифицированной остатком DFP по серину-198 (степень ингибирования составила ~ 10%), в концентрации 0,1 мг/мл (образец был получен в рамках выполнения СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации вероятных маркеров интоксикации ФОС», Шифр: «Орфей-12» и СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации маркеров ФОС», Шифр: «Признак»). Для получения сорбента в центр ячейки MALDI мишени помещали каплю водной субфазы (0,7 мкл), содержащую нитрат лантана в концентрации 10⁻² M, на которую, затем, наносили 0,7 мкл насыщенного при 20°С раствора HSt в н-гексане. После формирования структуры и испарения органической фазы водную каплю удаляли. Следует отметить, что поверхность сформированного сорбента проявляет гидрофобные свойства, что позволило при промывке для удаления избытка соли на пятно сорбента нанести каплю воды объемом 10 мкл, которую, затем, так же удаляли. Для проведения сорбции, на сорбент наносили 5 мкл 2,5% водного раствора аммиака, к которому добавляли 1 мкл триптического гидролизата hBChE, модифицированной DFP. Через 20 минут несвязавшуюся фракцию удалили, сорбент дважды промыли 2,5% водным раствором аммиака и один раз водой. После высыхания, на сорбент наносили 3 мкл 30% водного раствора ацетонитрила с 0,1% TFA, добавили 2 мкл раствора матрицы CHCA в 50%

водном ацетонитриле с 0,1% TFA в концентрации 5 мг/мл и оставили до полного высыхания для последующего масс-спектрометрического исследования.

Результаты MALDI MS анализа представлены на Рисунке 59. Как и ожидалось, в масс-спектре триптического гидролизата в диапазоне m/z 3040-3100 обнаруживаются два сигнала с низкой интенсивностью, соответствующие модифицированному триптическому пептиду hBChE, содержащему серин-198 (SVTLFGES₁₉₈AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR). Сигнал с m/z 3094,574 соответствует аддукту hBChE с DFP, в то время как сигнал с m/z 3050,544 принадлежит аддукту hBChE с деалкилированным остатком DFP (Рисунок 59А). Также в указанном диапазоне m/z наблюдаются сигналы других пептидов, с более высокой интенсивностью, которые исчезают из масс-спектра после экстракции аддуктов на FLa. При этом после обогащения образца с помощью FLa сигналы SVTLFGES_{DFP}AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR и SVTLFGES_{DFP aged}AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR определяются в масс-спектре с гораздо лучшим соотношением S/N (Рисунок 59Б). Это позволяет сделать вывод, что FLa, сформированные на MALDI мишени, обладают такими же сорбционными свойствами, что и коллапсированные FLa, а образующейся поверхности достаточно для проведения эффективной металл-аффинной хроматографии непосредственно на пятне сорбента, сформированного при одном нанесении раствора HSt в н-гексане на поверхность субфазы.

В качестве второго объекта исследования был выбран триптический гидролизат HHb (C = 1 мг/мл), модифицированного CCAn (C = 10 нг/мл). Образец был разбавлен дистиллированной водой в 10 раз; для проведения металл-аффинной экстракции использовали 0,5 мкл разбавленного образца. Металл-аффинную хроматографию проводили из водной среды. MALDI MS анализ образца без предварительной экстракции не позволил выявить наличие аддукта глобина человека с CCAn (m/z_{pacy}) 1886,986; LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK) (Рисунок 60А). После проведения металл-аффинной хроматографии в комбинации с MALDI MS анализом (IMAC-MALDI MS) соответствующий сигнал был достоверно идентифицирован (Рисунок 60Б).

Таким образом, на примере экстракции аддуктов белков крови с ксенобиотиками продемонстрировано, что структура, сформированная при единичном нанесении раствора HSt в н-гексане на каплю водного раствора нитрата лантана, проявляет сорбционные свойства.



209

Рисунок 59 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата hBChE, модифицированной DFP, до (A) и после (Б) проведения металл-аффинной экстракции с использованием одного коллапсированного монослоя FLa



Рисунок 60 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата глобина человека, модифицированного CCAn, до (А) и после (Б) проведения металл-аффинной экстракции с использованием одного коллапсированного монослоя FLa

3.2.2.2 Формирование мультимолекулярных структур FMe

Одним из неоспоримых достоинств предложенного подхода является возможность варьирования металла, входящего в состав сорбента, сформированного на мишени. Поэтому к ранее исследованным структурам были добавлены сорбенты, имеющие в составе Co, In, Ga и Eu.

Эффективность сорбента в значительной степени зависит от поверхности, доступной для взаимодействия с аналитом. Соответственно, было необходимо определить, какое количество слоев FMe (где Me = Cu, Ni, Co, Fe, In, Ga, Eu, La) может быть нанесено на одну ячейку мишени внутренним диаметром 3,1 мм. Выбор металлов был обусловлен их свойствами с точки зрения принципа Пирсона. Cu(II) и Ni(II) относятся к кислотам Льюиса промежуточной силы, так же, как и Co(II). В свою очередь Fe(III), In, Ga, Eu и La относятся к жестким кислотам Льюиса. При этом, как было упомянуто выше, лантаноиды из-за большего радиуса иона и протяженных диффузных валентных орбиталей, и, как следствие, имеющие большие возможности для координации, могут рассматриваться, как более перспективные активные центры сорбентов.

На мишени были сформированы один, два, четыре, шесть и восемь слоев FMe, в трех последних случаях водную каплю удаляли и наносили заново после формирования каждых двух слоев. Для удаления избытка соли сформированные FMe дважды промывали водой. Сорбент, полученный непосредственно на MALDI мишени из капли, обладает характерной структурой. Многократное формирование слоев порождает специфичную объемную структуру с надломами поверхности (Рисунок 61).

При стекании с капли на краях ячейки н-гексан быстро испаряется, что приводит к многократному наползанию новых частей слоя на предыдущие, их деформации и разрушению. Кроме того, каждый последующий слой, при повторных нанесениях на это же пятно, может формироваться как на поверхности уже нанесенных FMe, так и под ними, дополнительно надламывая и разворачивая предыдущие слои. В результате на мишени образуется структура с периодическими утолщениями и взломами. Результаты, полученные с помощью SEM, свидетельствуют о формировании на мишени материала с достаточно развитой поверхностью (Рисунок 61), что, соответственно, позволяет ожидать от FMe, сформированных на поверхности мишени, хороших сорбционных свойств. Следует отметить, что для получения жесткой структуры с развитой поверхностью следует использовать насыщенный или близкий к насыщенному раствор HSt в н-гексане (насыщенный при 20°С раствор HSt при температуре в помещении 25°С). Снижение концентрации на 20% приводит к образованию относительно гладких структур, что связано с отсутствием плотной упаковки молекул стеаратов в слое, и как следствие, заметным снижением жесткости пленки.





2MBWc (А) и сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Б-Г)

Для получения монослоев FLa в ванне Ленгмюра на ровной водной поверхности субфазы ранее использовали соль лантана с концентрацией 10-3 моль/л, поскольку такой концентрации достаточно, чтобы с избытком компенсировать расход ионов лантана на образование солей HSt в монослое. При таких условиях монослой может находиться на поверхности водной субфазы достаточно долго, чтобы реакция прошла практически полностью. При формировании пленки на капле время реакции ограничено временем стекания И испарения органической фазы, что составляет 1-2 секунды. Именно поэтому концентрация соли в водной фазе при работе в ванне Ленгмюра, может быть недостаточна для полного прохождения реакции образования стеарата лантана на капле, особенно при последовательном формировании нескольких монослоев. Соответственно, при получении сорбентов на мишени концентрация солей в водной субфазе составляла 10⁻² моль/л.

Методом световой микроскопии с использованием рассеянного света была исследована морфология полученных структур непосредственно на поверхности ячейки мишени (для примера представлены данные только для FLa, результаты для остальных FMe представлены в Приложении Г). По интенсивности свечения было установлено, что структура нанесенного на ячейках мишени материала состоит из упорядоченных концентрических кругов яркосветящегося материала и центрального ядра, которое образуется на месте нанесения водной капли (Рисунок 62А). При увеличении количества слоев дополнительно образуются скопления гетероморфных частиц (Рисунок 62Б-Д). Наибольшее количество материала на ячейках мишени остается после промывки при формировании шести слоев FLa (Рисунок 62Г).

По всей видимости, при нанесении большего количество слоев из-за сложной неупорядоченной структуры нарушаются взаимодействия между слоями, характерные для классических LBF, и часть сформированного материала не удерживается при обработке пятна водой. Этот же эффект наблюдался при замене н-гексана гептаном в органической фазе. Гептан испаряется медленнее н-гексана, и, возможно, с этим связано образование крупных рыхлых структур по краям пятна, которые не удерживались на мишени при обработке водой.



Рисунок 62 – Изображение ячеек мишени MALDI после нанесения одного (А), двух (Б), четырех (В), шести (Г) и восьми (Д) слоев FLa

Также следует отметить, что для большинства структур при формировании 6 монослоев пятно сорбента остается в пределах ячейки мишени, в то время как пятно из 8 монослоев выходит за ее пределы (Приложение Г). Если сравнивать удельную яркость, являющуюся характеристикой количества материала в ячейке, для пятен FMe, сформированных из 6 монослоев, можно сделать вывод, что наибольшее количество сорбента формируется при нанесении н-гексанового раствора HSt на водную субфазу, содержащую ионы лантана (Рисунок 63А). На Рисунке 63Б представлена диаграмма, демонстрирующая максимальную удельную яркость для каждой структуры. Наибольшие значения были получены для 8 монослоев FFe и 6 монослоев FLa, при этом пятно FFe, в отличие от FLa заметно заходит за пределы границ ячейки. Для остальных сорбентов значение максимальной удельной яркости составляло значительно меньшую величину.





Соответственно, можно сделать заключение, что с точки зрения количества материала, сформированного в пределах одной ячейки на мишени, наиболее предпочтительным является сорбент, сформированный из 6 монослоев FLa.

3.2.2.3 Разработка методики металл-аффинной экстракции галогенсодержащих аддуктов HHb с ксенобиотиком алкилирующего действия в формате «лаборатория на мишени»

С учетом результатов предыдущих экспериментов для дальнейших исследований сорбенты на MALDI мишени формировали путем шестикратного нанесения 0,7 мкл насыщенного при 20°C раствора HSt в н-гексане на каплю подкисленного водного раствора соли в концентрации 10⁻² моль/л объемом 0,7 мкл. После трех первых нанесений водную каплю удаляли и наносили заново. Сформированный сорбент промывали дважды 7 мкл воды и высушивали. После чего сорбент считали готовым для работы.

Ранее было показано, что для повышения улучшения эффективности металлаффинной экстракции при помощи спиновых колонок, коллапсированные монослои необходимо обрабатывать ацетонитрилом для исключения их слипания, произошедшего в результате переноса структуры из ванны в колонку. Соответственно, эта же процедура была применена к FMe, сформированным на мишени. Результаты, полученные методом SEM, представленные на Рисунке 64, свидетельствуют о нарушении структуры сорбента после его обработки ацетонитрилом (Рисунок 64Б).



Рисунок 64 – SEM изображения FLa, сформированных на мишени, до (А) и после (Б) обработки ацетонитрилом

Для подбора условий металл-аффинной экстракции галогенсодержащих аддуктов белков крови на MALDI мишени, модифицированной сорбентами на основе монослоев Ленгмюра, была проведена оценка сорбции триптического гидролизата HHb, модифицированного N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамидом (CC2An), при различных значениях pH. Были исследованы сорбенты, содержащие в своем составе атомы следующих металлов: Cu, Ni, Co, Fe, In, Ga, Eu, La. Сорбцию осуществляли в кислой, нейтральной и щелочной средах с целью выявить оптимальное значение pH буфера для сорбции. Для проведения эксперимента HHb инкубировали с CC2An в соотношении 100 мкг ксенобиотика на 1 мг белка.

По результатам MALDI MS анализа триптического гидролизата модифицированного белка было выявлено 4 аддукта HHb с CC2An, которые представлены в Таблице 14 и на Рисунке 65.

Следует отметить, что при таком соотношении ксенобиотика и белка аддукты достаточно хорошо детектируются без предварительного обогащения, поэтому для определения оптимальных условий сорбции был выбран гидролизат модифицированного HHb, полученный после инкубации 10 мкг CC2An с 1 мг белка. Таблица 14 – Цистеинсодержащие аддукты глобина человека с N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамидом

N⁰	Cx	m/z	m/z	Аминокислотная	Субъединица
п/п		натив-	пептида, мо-	последовательность/	HHb
		ного	дифициро-	pI	
		пеп-	ванного		
		тида	CC2An		
1	112	1719,97	1921,10	LLGNVLVC _{C2An} VLAHHFGK 8,84	бета
2	93	2529,21	2730,31	GTFATLSELHC _{C2An} DKLHVD PENFR 5,17	бета
3	112	3079,65	3280,75	LLGNVLVC _{C2An} VLAHHFGKEF TPPVQAAYQK 8,76	бета
4	104	4201,31	4402,41	LLSHC _{C2An} LLVTLAAHLPAEF TPAVHASLDKFLASVSTVLTSK 7,34	альфа



Рисунок 65 – MALDI масс-спектр триптического гидролизата HHb, модифицированного СС2Ап в соотношении 100 мкг ксенобиотика на 1 мг белка. Номера сигналов соответствуют номерам аддуктов, представленным в Таблице 14

Поверхность ячеек полированной стальной MALDI мишени модифицировали сорбентами на основе стеаратов меди(II) (FCu), никеля (FNi), кобальта(II) (FCo), железа(III) (FFe), индия (FIn), галлия (FGa) и европия (FEu) и лантана (FLa). Сорбцию триптического гидролизата HHb, модифицированного CC2An, осуществляли в трех буферах с различным значением pH: 0,1% TFA (pH 2,0), дистиллированная вода (pH 6,0), 2,5% водный аммиак (pH 10,5). После проведения сорбции промывку сорбента проводили соответствующим буфером (в случае аммиачного буфера перед десорбцией сорбент дополнительно промывали водой). Десорбцию проводили в одинаковых условиях для всех сорбентов путем нанесения на поверхность 30% водного ацетонитрила и добавления раствора матрицы. Результаты MALDI MS анализа представлены на Рисунке 66.

При проведении сорбции в присутствии 0,1% ТFA для всех видов сорбентов удалось зарегистрировать сигналы, соответствующие всем четырем целевым аддуктам, однако интенсивность сигналов не была заметно выше по сравнению со спектрами, полученными без проведения металл-аффинной хроматографии. При этом в массспектрах присутствовало значительное количество нецелевых сигналов, что свидетельствует о низкой селективности сорбции в данных условиях.


Рисунок 66 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата HHb, модифицированного CC2An, после проведения металл-аффинной экстракции на сорбентах: FCu (A), FNi (Б), FCo (B), FFe (Г), FIn (Д), FGa (E), FEu (Ж) и FLa (3)

При использовании 2,5% водного раствора аммиака в качестве буфера для сорбции сигналы четырех аддуктов имели более высокую интенсивность, чем при сорбции в кислой среде. При этом следует отметить, что для двух сорбентов, содержащих железо(III) (FFe) и лантан (FLa), сигнал аддукта с m/z 4402,41 зарегистрирован не был (Рисунок 66Г,3). Несмотря на увеличение селективности сорбции в таких условиях по сравнению с сорбцией в 0,1% TFA, в масс-спектрах также присутствовало значительное число сигналов, соответствующих немодифицированным пептидам.

Необходимо подчеркнуть, что использование водного раствора аммиака в качестве раствора для сорбции может быть сопряжено с определенными затруднениями. Во-первых, при pH выше 8 морфология пленок изменяется, они становятся менее жесткими, и снижается адгезия сорбента к поверхности мишени. Во-вторых, перед десорбцией необходимо тщательно высушивать сорбент до полного испарения остатков водной капли, содержащей аммиак. В противном случае при добавлении раствора матрицы на поверхности сорбента будет происходить образование кристаллов соли аммония, что в значительной степени затрудняет дальнейший MALDI MS анализ.

Проведение сорбции в нейтральной среде позволило добиться наилучших результатов с точки зрения специфичности и селективности сорбции и интенсивности сигналов аддуктов для всех сорбентов (Рисунок 67).

В масс-спектрах, полученных после сорбции в водной среде. были зарегистрированы наиболее интенсивные сигналы целевых аддуктов. Следует отметить, что только в масс-спектрах, полученных с пятен FLa и FEu (сорбентов на основе лантаноидов) было обнаружено интенсивных стеаратов не сигналов немодифицированных пептидов (Рисунок 67Ж,3), в то время как в остальных они Причем, результаты, полученные для сорбентов, содержащих присутствуют. переходные металлы IV периода, хорошо согласуются между собой (Рисунок 67А-Г). Так же хорошо согласуются данные и для сорбентов, имеющих в составе элементы III группы главной подгруппы (Рисунок 67Д,Е). Можно предположить, что различие в количестве и составе примесных пептидов связано с различной доступностью акцепторных орбиталей перечисленных металлов разных групп (Ga и In являются рэлементами; Cu, Ni, Co и Fe – d-элементами; Eu и La – f-элементами). Это оказывает значительное влияние на их способность к комплексообразованию и, как следствие, на специфичные и селективные свойства сорбента, в состав которого входит металл.

Соответственно, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод, что лучшие специфичные и селективные свойства проявляют сорбенты, содержащие fэлементы, а именно FEu и FLa. С учетом результатов, полученных на предыдущем этапе, FLa представляется наиболее эффективным сорбентом для разработки методики экстракции аддуктов белков с галогенсодержащими ксенобиотиками.



Рисунок 67 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата HHb, модифицированного CC2An в соотношении 10 мкг ксенобиотика на 1 мг белка, после проведения металл-аффинной экстракции на сорбентах: FCu (A), FNi (Б), FCo (B),

FFe (Г), FIn (Д), FGa (Е), FEu (Ж) и FLa (З)

С одной стороны, при формировании FLa на ячейке мишени образуется достаточно большое количество сорбирующего материала, а с другой, этот сорбент обладает высоким уровнем специфичности и селективности при металл-аффинной экстракции хлорсодержащих аддуктов глобина человека.

По результатам проведенного исследования для дальнейшей работы были выбраны следующие условия:

– Сорбент – 6 монослоев FLa, сформированных на ячейке MALDI мишени при нанесении насыщенного при 20°C раствора HSt в н-гексане на водную каплю, содержащую нитрат лантана в концентрации 10⁻² моль/л.

– Сорбция – в водной среде при рН 6 в течение 20 минут.

– Десорбция – 30% водным ацетонитрилом в присутствии матрицы СНСА в 70% водном ацетонитриле с 0,1% TFA.

Таким образом, с учетом перечисленных условий была составлена схема проведения металл-аффинной экстракции галогенсодержащих аддуктов, представленная на Рисунке 68.



Рисунок 68 – Схема проведения металл-аффинной экстракции галогенсодержащих аддуктов с использованием FMe. Синим цветом отмечены блоки, посвященные формированию сорбента на ячейке MALDI мишени, коричневым – процедуре металл-аффинной экстракции, зеленым – MALDI MS анализу 3.2.2.3.2 Оценка чувствительности подхода для металл-аффинной экстракции хлорсодержащих аддуктов HHb на FLa, сформированном на ячейке MALDI мишени

Для оценки чувствительности подхода были приготовлены растворы HHb, инкубированного с CXAn (X=C, C2) в следующих соотношениях ксенобиотик/белок: 10 мкг/1 мг, 1 мкг/1 мг, 100 нг/1 мг, 10 нг/1 мг, 1 нг/1 мг в 1 мл образца. После триптического гидролиза была проведена металл-аффинная экстракция аддуктов на MALDI мишени, модифицированной FLa, в полном соответствии со схемой, представленной на Рисунке 68. В качестве сорбента использовали FLa в связи с высокими характеристиками, установленными в ходе работ на предыдущих этапах. По данным MALDI MS анализа оценивали количество сигналов, соответствующих аддуктам и их интенсивность (по соотношению сигнал/шум (S/N)). Основные результаты представлены в Таблице 15 и более подробно в Приложении Д.

№	Аминокислотная последова-	Алкили	m/z	Предел об	бнаружения	
	тельность/pI (субъединица глобина)	рующи й агент	[M+H] ⁺	Концентраци я аликилирую	Мольное соот- ношение алки- лирующий	
				щего агента	агент/белок	
		Глобин	человека	1		
1	GTFATLSELHC93DK	CCAn	1588,686	10 мкг/мл	1:1,2	
1	5,17 (бета)	CC2An	1622,647	10 мкг/мл	1:1,5	
2	LLGNVLVC112VLAHHFGK	CCAn	1886,986	1 нг/мл	1:12000	
2	8,84 (бета)	CC2An	1920,947	1 нг/мл 10 нг/мл 2 1 мкг/мл 3 1 мкг/мл	1:1500	
	GTFATLSE-	CCAn	2696,232	1 мкг/мл	1:12	
3	LHC93DKLHVDPENFR 5,17 (бета)	CC2An	2730,193	Концентраци я аликилирую щего агента 10 мкг/мл 10 мкг/мл 1 мкг/мл 1 мкг/мл 1 мкг/мл 1 мкг/мл 10 мкг/мл 10 мкг/мл 10 мкг/мл	1:15	
	LLSHC104LLVTLAAHLPAE	CCAn	3134,626	1 мкг/мл	1:12	
4	FTPAVHASLDK 6,34 (альфа)	DK CC2An 3168,58'	3168,587	1 мкг/мл	1:15	
5	VDPVNFKLL- SHC ₁₀₄ LLVTLAAHLPAEFTP AVHASLDK 6,34 (альфа)	CCAn	3934,048	10 мкг/мл	1:1,2	
	LLSHC104LLVTLAAHLPAE	CCAn	4368,322	10 мкг/мл	1:1,2	
6	FTPAVHAS- LDKFLASVSTVLTSK 7,34 (альфа)	CC2An	4402,284	10 мкг/мл	1:1,5	

Таблица 15 – Пределы обнаружения хлорсодержащих аддуктов глобина человека

Следует отметить, что был обнаружен хлорсодержащий аддукт, чувствительность которому оказалась гораздо выше, чем к остальным (пептид к LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK бета-субъединицы HHb). MALDI MS анализ триптических гидролизатов показал, что без обогащения интенсивность сигналов хлорсодержащих аддуктов LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK и LLGNVLVC_{C2An}VLAHHFGK уже при концентрации алкилирующего агента 100 нг/мл незначительно превышает уровень шума (Рисунок 69, Рисунок 70). При этом в случае LLGNVLVC_{C2An}VLAHHFGK наблюдается наложение друг на друга двух сигналов с близкими значениями m/z, что не позволяет однозначно отнести сигнал к аддукту. При снижении концентрации хлорсодержащих алкилирующих агентов при инкубации с HHb в масс-спектрах сигналов, соответствующим аддуктам обнаружено не было. После проведения металл аффинной экстракции на FLa в соответствии с предложенной схемой анализа предел обнаружения для аддукта, содержащего 2 атома хлора был достигнут при мольном соотношении ксенобиотик/белок, как 1:1500 и для аддукта, содержащего 1 атом хлора – 1:12000. При этом, LLGNVLVC_{C2An}VLAHHFGK был идентифицирован после инкубации 1 мг белка с 10 нг алкилирующего агента, a LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK с 1 нг агента, соответственно.

Эти результаты позволяют сделать заключение о высокой чувствительности подхода при анализе хлорсодержащих аддуктов глобина (в случае ССАп значительно превышающие требования к металл-аффинной экстракции, когда соотношение модифицированной формы к немодифицированной оценивается, как 1:1000 считается хорошим результатом [359]). Такая чувствительность может быть объяснена составом пептида, содержащего цистеин-112 и образующегося в результате триптического гидролиза. Значение pI пептида составляет 8,84, что является причиной его высокой способности к ионизации, на которую наличие галогенов не оказывает значимого влияния. Кроме того, молекулярная масса пептида находится в диапазоне m/z, обеспечивающем высокую чувствительность MALDI MS анализа.

Таким образом, на примере экстракции аддукта HHb с CC2An на пятнах FCu, FNi, FCo, FFe, FIn, FGa, FEu и FLa, сформированных на MALDI мишени из 6 монослоев, было показано, что все сорбенты проявляют хорошие сорбционные свойства при экстракции из водной среды. В этих условиях все структуры обладают высокими специфичными свойствами, однако лучшие селективные свойства проявляют сорбенты, имеющие в составе лантаноиды.



Рисунок 69 – Сигнал, соответствующий аддукту LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK, в MALDI масс-спектре до и после металл-аффинной экстракции на FLa при различной концентрации алкилирующего агента при инкубации



Рисунок 70 – Сигнал, соответствующий аддукту LLGNVLVC_{C2An}VLAHHFGK, в MALDI масс-спектре до и после металл-аффинной экстракции на FLa при различной концентрации алкилирующего агента при инкубации

3.2.2.3.3 Оценка чувствительности подхода для металл-аффинной экстракции фосфорсодержащих аддуктов белков крови на FLa, сформированном на ячейке MALDI мишени

Метод MALDI MS имеет преимущества для скринингового анализа аддуктов белков крови с OP в случаях идентификации неизвестных ингибиторов hBChE. Определение $\Delta m/z$ между модифицированным и нативным пептидами, содержащими Y-411, позволяет подобрать брутто формулу OP [620]. При этом интегрирование стадий пробоподготовки непосредственно на мишени может значительно упростить задачу при диагностике интоксикации. На предыдущих этапах было показано, что монослои стеарата лантана (FLa) проявляют специфичность к аддуктам HSA с PFMP при проведении металл-аффинной экстракции в спиновых колонках и аддуктам hBChE с DFP, экстрагированным непосредственно на мишени. Соответственно можно было ожидать, что подход «лаборатория на мишени» с использованием 6 монослоев FLa будет также применим для металл-аффинной экстракции аддуктов белков крови с PFMP.

Для исследования сорбционной способности FLa использовали пептический гидролизат HSA, модифицированного PFMP на 90%, с начальной концентрацией белка 1 мг/мл (образец был получен в рамках выполнения СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации вероятных маркеров интоксикации ФОС», Шифр: «Орфей-12» и СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации маркеров ФОС», Шифр: «Признак»). Путем последовательного разбавления были приготовлены растворы с концентрацией 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 и 0,1 мг/мл. MALDI-MS анализ показал, что после металл-аффинной хроматографии сигнал со значением m/z 1567,87 в масс-спектре несвязавшейся фракции не детектируется после нанесения на сорбент 1 мкл раствора с начальной концентрацией белка 0,5 мг/мл. Исходя из степени модификации белка, соответствующей 90%, и при полном прохождении гидролиза белка, можно сделать вывод, что 6 слоев FLa, сформированных предложенным способом, способны сорбировать 0,012 мкг аддукта VRY_{PFMP}TKKVPQVST.

Для оценки чувствительности подхода пептические гидролизаты модифицированного и немодифицированного HSA смешивали таким образом, чтобы соотношения модифицированной и немодифицированной форм составляли 1:10, 1:100, 1:1000 и 1:10000. На сформированные и подготовленные пятна FLa наносили образец с начальной концентрацией белка в 2,5% водном растворе аммиака в соответствии с данными, представленными в Таблице 16.

Молярное соотношение VRY _{PFMP} TKKVPQVS/ VRYTKKVPQVST	Количество образца, нанесенного на сорбент, мкл	Соотношение сигнал/шум
1:10	1	51
1:100	1	35
1.1000	5	13
1.1000	1	5
1.10000	5	3
1.10000	1	_

Таблица 16 – Результаты исследования чувствительности метода

Результаты, представленные в Таблице 16, свидетельствуют о высокой эффективности предложенного подхода металл-аффинной экстракции аддуктов HSA с PFMP. Детектировать сигнал, соответствующий фосфонилированному пептиду, не удалось только при нанесении 1 мкл смеси 1:10000. Уже при нанесении 5 мкл этого раствора наблюдается сигнал со значением m/z 1567,87 с соотношением сигнал/шум 2-3 (при различных повторах). В случае анализа 1 мкл смеси 1:1000 соотношение сигнал/шум составляло 5-6. При более высоких концентрациях аддукт воспроизводимо и надежно детектируется. Соответственно, можно сделать вывод, что при использовании MALDI мишени, модифицированной FLa, можно концентрировать аддукт HSA с PFMP непосредственно на мишени, а сам подход отличается высокой чувствительностью.

Несмотря на то, что аддукты сывороточного альбумина с фосфорорганическими соединениями в ряде работ [621-624] определяются, как маркеры интоксикации, позволяющие не только установить ее факт, но и идентифицировать ОР по присоединившемуся остатку, большая часть исследователей основным белковым маркером рассматривают аддукт hBChE, присоединяющей остаток OP по S-198 [621,624,625]. Поэтому на следующем этапе работы была исследована возможность экстракции аддуктов hBChE с PFMP с использованием предложенной процедуры.

Триптический пептид hBChE, модифицированный PFMP, более удобный аналит при MALDI MS анализе, чем пептический нонапептид. Триптический пептид, содержащий S-198 активного центра, состоит из 29 аминокислотных остатков: SVTLFGES₁₉₈AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (m/z 2928,521). Однако, в отличие от аддуктов альбумина с OP, аддукты hBChE подвержены деалкилированию (старению) [626], и при масс-спектрометрическом анализе чаще всего детектируют аддукт hBChE с остатком метилфосфоновой кислоты (MPA) [624,626].

Эксперимент проводили с использованием предварительно выделенной из плазмы крови человека hBChE, которую инкубировали с PFMP до достижения 100% ингибирования (образец был получен в рамках выполнения СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации вероятных маркеров интоксикации ФОС», Шифр: «Орфей-12» и СЧ НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации маркеров ФОС», Шифр: «Признак»). В соответствии с предложенной процедурой, был приготовлен триптический гидролизат белка с концентрацией 1 мг/мл, 1 мкл которого затем был нанесен на 6 слоев FLa.

По результатам MALDI MS анализа можно сделать вывод, что FLa, сформированные на мишени, проявляют специфичность по отношению к аддуктам hBChE как с PFMP, так и MPA. В масс-спектре присутствуют сигналы с m/z 3006,51, соответствующий пептиду SVTLFGES_{MPA}AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, и с m/z 3090,61, соответствующий пептиду SVTLFGES_{PFMP}AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (Рисунок 71А). При разбавлении гидролизата модифицированной hBChE гидролизатом немодифицированной, чувствительность IMAC-MALDI-MS анализа заметно снижается, по сравнению с анализом аддуктов HSA с PFMP (Рисунок 71Б), тем не менее, при соотношении модифицированной формы к немодифицированной 1:100 сигналы аддуктов hBChE с PFMP и MPA надежно детектируются с S/N≥6 (Рисунок 71В).

Соответственно, FLa позволяет сорбировать аддукты как с полным остатком PFMP на сывороточном альбумине по Y-411, так и обе формы PFMP на триптическом пептиде hBChE, содержащем S-198 активного центра. Способность сорбировать все формы ОР, присоединенные к белкам, дает FLa преимущества по сравнению с оксидом титана, который может использоваться для анализа деалкилированных состарившихся аддуктов с hBChE. Наличие в одном MALDI масс-спектре нативного И модифицированного пептида hBChE в области m/z 2920-3100 может позволить рассматривать процедуру специфичной экстракции аддуктов HSA и hBChE на FLa как скрининговую для поиска возможных неизвестных модификаций OP в случаях расследования реальных случаев интоксикации ОР.



Рисунок 71 – Результаты IMAC(FLa)-MALDI MS анализа триптического гидролизата hBChE (1 мг/мл), модифицированой PFMP при соотношении немодифицированной формы к модифицированной: А – 100:0; Б – 1:10; В – 1:100

И наконец, был проведен поиск пептидов, модифицированных PFMP, в образцах плазмы крови, инкубированной с PFMP. Концентрации hBChE и HSA в плазме человека значительно различаются – 5 и 40000 мкг/мл соответственно. Сывороточный альбумин является основным компонентом плазмы крови, поэтому в случае фосфонилированных пептидов сывороточного альбумина можно использовать пептические гидролизаты плазмы крови без дополнительной стадии выделения белка. В случае же hBChE, для скрининговых исследований важно выделить hBChE в максимально чистом виде, для этого использовали высокоспецифичный метод иммунопреципитации [627]. В качестве

модельных образцов использовали hBChE, очищенную на прокаинамидном геле, фосфонилированную PFMP, а также плазму крови человека, инкубированную с PFMP с концентрацией 1 и 10 нг/мл, при этом степень ингибирования hBChE составила менее 5% и 40%, соответственно. Стоит отметить, что такой уровень OP в крови человека является низким и может не проявляться признаками отравления [628].

По результатам IMAC-MALDI MS анализа, представленным на Рисунке 72 и в Таблице 17, можно сделать вывод, что предложенная процедура позволяет экстрагировать достаточное для MALDI MS детектирования количество аддуктов, как HSA, так и hBChE.



Рисунок 72 – Результаты IMAC(FLa)-MALDI MS анализа образцов плазмы крови, инкубированной с PFMP. Представлены масс-спектры: А, Б – контрольные образы; В, Г – аддукты VRY_{PFMP}TKKVPQVST и SVTLFGES_{MPA}AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, соответственно (концентрация PFMP – 10 нг/мл);

Д, Е - аддукты VRY_{PFMP}TKKVPQVST и SVTLFGES_{MPA}AGAASVSLHLLSPGHSLFTR, соответственно (концентрация PFMP – 1 нг/мл)

Таблица 17 – Оценка чувствительности

IMAC(FLa)-MALDI MS анализа

фосфорсодержащих аддуктов белков крови человека

N⁰	Пептид (m/z)	Соотнош ение РFMP / плазма, нг/мл	Кол-во образца, нанесенн ого на сорбент, мкл	Соотношение сигнал/шум
	HSA			
1	VRY(PFMP)TKKVPQVST (1567,89)	10:1	1	5
2	VRY(PFMP)TKKVPQVST (1567,89)	1:1	5	4
	hBChE			
3	SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3006,54)	10:1	1	34
4	SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3090,56)	10:1	1	-
5	SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3006,54)	1:1	1	14
6	SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3090,56)	1:1	1	-

Как и ожидалось, в пептическом гидролизате плазмы детектируется сигнал, соответствующий аддукту VRY_{PFMP}TKKVPQVST сывороточного альбумина, в то время как в триптическом гидролизате hBChE только аддукт с деалкилированным остатком PFMP SVTLFGES_{MPA}AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR. Соотношение форм аддукта с остатком OP и деалкилированного аддукта связано с процессом старения, который в плазме крови в случае PFMP протекает за несколько минут [626], следовательно, аддукт с остатком метилфосфоновой кислоты является доминирующим.

Таким образом, предлагаемый подход IMAC-MALDI MS может позволить идентифицировать аддукты HSA и hBChE с PFMP в реальных образцах плазмы крови при низких концентрациях с использование небольшого количества биоматериала (1-2 мл), что очень важно для проведения скрининговых исследований в токсикохимической экспертизе.

Соответственно, методика формирования пленок стеарата лантана на MALDI мишени с последующей металл-аффинной экстракцией аддуктов HSA и hBChE с PFMP и MALDI MS анализом в формате «лаборатория на мишени» в отличие от процедуры,

проводимой в спиновых колонках, не требует большого количества образца, исключает стадию десорбции, следовательно, позволяет снизить потери аналита во время пробоподготовки и повысить чувствительность и эффективность анализа.

3.2.3 Сравнение свойств FMe и MeOx

На завершающем этапе разработки подхода металл-аффинной экстракции на MALDI мишени было проведено сравнение ряда свойств покрытиц на основе распыленных наночастиц и сформированных монослоев.

В первую очередь было необходимо определить сохранность сорбентов на мишени и возможность их использования спустя продолжительное время после нанесения. Исследование проводили для сорбентов, содержащих медь, никель и железо. MALDI мишени, модифицированные как наночастицами оксидов металлов, так и монослоями на основе стеаратов металлов, были использованы для экстракции пептида LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK, модифицированного CCAn, из триптического гидролизата ННb (соотнощение CCAn/белок при инкубации 1 мкг/1 мг) в соответствии с разработанными методиками. После проведения MALDI MS анализа мишени были убраны в контейнеры и хранились 1 год при комнатной температуре. По истечении указанного срока на неиспользованных ранее пятнах сорбентов была проведена повторная экстракция аналита в тех же условиях из образца, приготовленного аналогичным способом. Результаты MALDI MS анализа, представленные на Рисунке 73, свидетельствуют о хорошей сохранности сорбентов на мишени: во всех случаях пептид LLGNVLVC_{CAn}VLAHHFGK был надежно детектирован с сопоставимым соотношением S/N до и после хранения.



Рисунок 73 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата глобина человека, модифицированного CCAn, после проведения металл-аффинной экстракции с использованием свежеприготовленных и хранившихся в течение года MeOx и FMe

На основании этого можно сделать вывод, что металл-аффинную экстракцию в формате «лаборатория на мишени» можно проводить как на свежесформированных сорбентах, так и спустя длительное время после функционализации поверхности мишени.

Сравнительное исследование специфичных и селективных свойств сорбентов, нанесенных на мишень, проводили на примере HHb, модифицированного метаболитами лекарственного препарата диклофенак (DCL). Выбор объекта исследования был обусловлен рядом причин. DCL является одним из наиболее продаваемых фармацевтических препаратов, который, попадая в природные воды, оказывает негативное воздействие на экосистему [629]. В настоящее время, Хельсинская комиссия выбрала DCL в качестве маркера антропогенного загрязнения окружающей среды [630]. Также, DCL был включен в главный список приоритетных веществ EC, подлежащих мониторингу [631]. Следует отметить, что низкая эффективность процессов очистки сточных вод от DCL приводит к его распространению в водных объектах, миграции с водотоками, воздействию на гидробиоту, биоаккумуляции и биомагнификации [632]. При этом применение методов очистки сточных вод на основе активированных окислительных процессов, подразумевающих совместное использование химических окислителей, фотокатализаторов и UV излучения может приводить к образованию более токсичных промежуточных продуктов деградации DCL, идентичных его метаболитам *in vivo*.

Недавно, в работе [633] авторами было продемонстрировано, что метаболиты DCL способны образовывать аддукты как с глутатионом, так и с макромолекулами на примере бета-лактоглобулина. Известно, что DCL, окислительная биотрансформация которого хорошо изучена [633,634], подвергается окислительной биоактивации in vivo моногидроксилированных реакционноспособных метаболитов 4'-OH-DCL до И 5-OH-DCL [635]. При этом, несмотря на высокую реакционную способность данных метаболитов, не исключена их миграция из эндоплазматического ретикулума гепатоцитов в эритроциты с последующим алкилированием цистеиновых остатков в составе гемоглобина [636]. И наконец, на предыдущих этапах работы было продемонстрировано, что атомы металлов, входящие в состав разработанных сорбентов, способны координировать атомы хлора в структуре DCL, что позволило предположить возможность экстракции аддуктов HHb с метаболитами DCL методом металл-аффинной хроматографии с применением подхода «лаборатория на мишени».

Известно, что подход на основе UV-индуцированного фотокаталитического окисления в присутствии наночастиц TiO₂ (UV/TiO₂-PCO) позволяет имитировать окислительную биотрансформацию ксенобиотиков [637]. В связи с этим данный метод был использован для получения продуктов окисления DCL, имитирующих его метаболиты. Идентификацию продуктов окисления DCL, полученных путём UV/TiO₂-PCO, проводили путем измерения точной массы с использованием масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением (ESI-FT-ICR MS), а также по наличию у сигналов изотопного распределения, характерного для соединений, содержащих атомы Cl. Основным продуктом UV/TiO₂-PCO DCL являлось моногидроксилированное производное DCL (m/z 310,0032, MD1). Также были идентифицированы продукты деметиленирования (m/z 279,9926, MD2) и полигидроксилирования (m/z 325,9981, MD3), хинониминовое производное MD3 (m/z 323,9824, MD4) и декарбоксилированное хинониминовое производное MD1 (m/z 263,9980, MD5) (Рисунок 74). Следует отметить, что полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [638] (Приложение E).



Рисунок 74 – ESI-FT-ICR масс-спектр продуктов UV/TiO₂-PCO DCL и соответствующие им структуры

После инкубации полученных метаболитов с ННb и последующим гидролизом в присутствии трипсина был получен модельный образец, в котором для пептида бетасубъединицы, содержащего остаток цистеина-112 LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK (m/z 1719,972; pI 8,84), степень модификации составила примерно 40%. MALDI MS анализ исходного образца показал, что в области m/z, соответствующей вероятным аддуктам HHb с метаболитами DCL, появляется ряд слабых трудноинтерпретируемых сигналов, среди которых только один по виду изотопного распределения и значению m/z 1998,947 можно отнести к аддукту LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK с продуктом деметиленирования DCL MD2 (Рисунок 75А).

Металл-аффинную экстракцию проводили в соответствии с процедурами, разработанными на предыдущих этапах исследования для MeOx и FMe, на сорбентах, содержащих железо(III), никель и медь.После проведения металл-оксидной хроматографии на пятнах всех MeOx в соответствии с представленной выше процедурой, в масс-спектрах сигнал с m/z 1998,947 детектируется с хорошим соотношением S/N (Рисунок 75Б-Г), при этом Δm/z с сигналом интактного пептида составляет 279, что соответствует остатку деметиленированного DCL.



Рисунок 75 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата HHb, модифицированного продуктами UV/TiO₂-PCO DCL, до (А) и после проведения металл-аффинной экстракции на сорбентах: FeOx (Б), NiOx (В), CuOx (Г), FFe (Д), FNi (Е), FCu (Ж)

MALDI MS/MS анализ показал, что разность $\Delta m/z$ между ионами-продуктами с m/z 908,3 (у8) и m/z 1290,3 (у9), составляет 382, что соответствует остатку цистеина, модифицированному метаболитом DCL MD2 (Рисунок 76). Кроме того, данный аддукт был идентифицирован с помощью программы Mascot (Таблица 18) с достаточно высоким уровнем достоверности (Score = 38).

Таблица 18 – Результаты идентификации аддукта HHb с метаболитом DCL MD2 с использованием программы Mascot

Теоретиче- ское m/z	Экспе- римен- тальное m/z	Ошибка (Да)	b- ионы	По- сле- дова- тель- ность	у- ионы	Теорети- ческое m/z	Экспе- римен- тальное m/z	Ошибка (Да)
1998,958	1998,957	0,001		PMI	-	-	-	-
114,091	-	-	1	L	16	-	-	-
227,175	227,061	-0,11	2	L	15	1885,874	1885,736	-0,13
284,196	-	-	3	G	14	1772,789	1772,795	0,006
398,239	397,984	-0,25	4	Ν	13	1715,768	-	-
497,308	497,094	-0,21	5	V	12	1601,725	-	-
610,392	610,151	-0,24	6	L	11	1502,657	1502,348	-0,30
709,460	709,194	-0,26	7	V	10	1389,573	1389,370	-0,20
1091,455	1091,216	-0,23	8	С	9	1290,504	1290,293	-0,21
1190,523	1190,286	-0,23	9	V	8	908,510	908,257	-0,25
1303,607	1303,318	-0,29	10	L	7	809,441	809,196	-0,24
1374,644	-	-	11	А	6	696,357	696,103	-0,25
1511,703	1511,521	-0,18	12	Н	5	625,320	625,038	-0,24
1648,762	1648,734	-0,02	13	Н	4	488,261	488,037	-0,22
1795,831	1795,891	0,06	14	F	3	351,202	351,038	-0,10
1852,852	1852,864	0,01	15	G	2	204,134	204,027	-0,10
-	-	-	16	K	1	147,112	147,077	-0,03



Рисунок 76 – MALDI MS/MS спектр сигнала с m/z 1999,0, соответствующего [M+H]⁺ иону аддукта LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK с метаболитом DCL MD2

Следует отметить, что наряду с сигналом аддукта HHb с метаболитом MD2 в масс-спектрах в этой области m/z наблюдается еще ряд сигналов, которые могут быть интерпретированы, как принадлежащие аддуктам (например, m/z 1982,962 и m/z 2028,964), однако ввиду их слабой интенсивности провести дополнительные исследования не представилось возможным.

При сравнении масс-спектров, полученных с MeOx, можно отметить, что более высокая интенсивность сигнала аддукта, по сравнению с сигналами неспецифично связавшихся пептидов, наблюдалась в масс-спектре, полученном с пятна FeOx (Рисунок 75Б). В масс-спектрах, полученных с NiOx, интенсивность сигнала была чуть ниже, в то время как с пятна CuOx был получен наихудший результат. При этом в масс-спектрах несвязавшихся фракций сигналов, которые могли бы быть отнесены к аддуктам HHb с метаболитами DCL, обнаружено не было. Соответственно, можно сделать вывод, что для FeOx характерен более низкий уровень неспецифичного связывания, по сравнению с остальными MeOx, а CuOx демонстрирует самый высокий.

Сорбенты FMe (Рисунок 75Д-Ж) в целом проявляют более высокий уровень, как специфичности, так и селективности по сравнению с MeOx. Наиболее интенсивный сигнал целевого аддукта наблюдается в масс-спектре, полученном с пятна FFe, однако и присутствие примесных сигналов наибольшее по сравнению с остальными двумя масс-

236

спектрами. В отличие от CuOx сорбент на основе монослоев Ленгмюра, содержащий в составе ионы меди (FCu), продемонстрировал наилучшие результаты с точки зрения селективности и специфичности (Рисунок 75Ж).

Тем не менее, можно сделать вывод о том, что все сорбенты, использованные в эксперименте, могут быть использованы для экстракции аддуктов HHb с метаболитами DCL, что свидетельствует об эффективности предложенных подходов.

Одним из основных достоинств обоих разработанных способов получения металл-аффинных покрытий является отсутствие необходимости трудоемкой предварительной подготовки поверхности подложки. Достаточно обработать поверхность предварительно вымытой мишени ацетоном перед распылением MeOx или н-гексаном перед формированием FMe. Однако процесс функционализации мишени достаточно неравнозначен. Для получения покрытия на основе MeOx требуется предварительный синтез сорбента, затем использование уникальной установки (узел бескапельного электрораспыления) для нанесения сорбента на мишень. Это приводит к усложнению и удорожанию процесса функционализации поверхности, а также требует значительных временных затрат (напыление одного пятна сорбента занимает около 15 минут). FMe формируются непосредственно на мишени, причем способ формирования позволяет получать параллельно несколько пятен сорбента. При этом для модификации мишени требуется гораздо меньшее количество реактивов, что позволяет получать сорбенты даже с использованием солей дорогостоящих металлов, например некоторых лантаноидов. Еще одним преимуществом способа получения FMe является возможность варьирования состава водной субфазы в процессе функционализации мишени, что позволяет формировать сорбенты, содержащие различные металлы без временных затрат, в отличие от распыления, когда требуется разобрать установку, сменить суспензию MeOx, заново собрать и настроить узел распыления. Однако в границах одной ячейки мишени можно сформировать достаточно ограниченное количество сорбента FMe, в то время как при распылении возможности варьирования количества сорбента гораздо шире. Оба вида сорбентов в условиях, разработанных для функционализации поверхности, демонстрируют высокий уровень адгезии к поверхности мишени. Особенно это относится к первому слою покрытия. Однако если распыленные наночастицы MeOx благодаря плотной упаковке хорошо удерживаются независимо от размера пятна, то при формировании FMe каждый последующий слой увеличивает рыхлость всего пятна, что может привести к потере сорбента при попытке сформировать большее количество монослоев в пределах ячейки, чем показано в разделе 3.2.2.2. Кроме того, сами монослои стеаратов металлов обладают достаточно хрупкой структурой, что, с одной стороны, приводит к их коллапсированию и, как следствие увеличению рабочей поверхности сорбента, но, с другой, значительно повышает требования к аккуратности проведения эксперимента. Следует отметить, что как MeOx, так и FMe устойчивы во всех растворителях, применяемых при металл-аффинной хроматографии, и остаются на мишени все время проведения экстракции. В силу того, что в обоих случаях атом металла входит в состав молекул, из которых состоит сорбент, продуцирование ионов металла в образец практически полностью исключено. МеОх с мишени удаляется при механическом воздействии, однако практически полное отсутствие повреждения поверхности позволяет наносить новые пятна сорбентов взамен использованных в тех же условиях. В случае FMe удаление отработанного сорбента эффективней всего проводить путем растворения монослоев стеаратов металлов в н-гексане или хлороформе. После стандартной процедуры для мытья MALDI мишеней и обработки поверхности н-гексаном можно формировать новые пятна сорбентов.

Таким образом, на основании вышеперечисленного можно заключить, что в зависимости от целей и задач эксперимента оба типа сорбентов могут быть с успехом использованы, а подход «лаборатория на мишени» для специфичной экстрации пептидов, модифицированных ксенобиотиками, может найти применение при решении многих задач медицины, экологии и фармакологии.

3.2.4 Интеграция стадии металл-аффинной экстракции в формат

«лаборатория на мишени» на основе фотокаталитического микрореактора

Для выполнения эксперимента была использована микрореакторная насадка, разработанная в Институте аналитического приборостроения РАН (Рисунок 77).

Устройство (Рисунок 77) позволяет объединить моделирование биотрансформации ксенобиотиков и последующую пробоподготовку непосредственно на MALDI мишени и состоит из MALDI мишени (1), перфорированной эластомерной прокладки (2), микрореакторной насадки с 96 коническими отверстиями (3) и охлаждаемого UVсветодиодного модуля (4). Поверхность насадки в области конических отверстий функционализирована гидрофобным фотокаталитическим композитным TiO₂/полидиметилсилоксан покрытием, что позволяет проводить UV/TiO₂-PCO. Перфорированная прокладка и насадка соответствуют стандартной MALDI мишени микропланшетного формата (мишень MTP) от Bruker Daltonics по размеру и по положениям 96 ячеек из 384. Насадка обратимо закрепляется на MALDI мишени с помощью перфорированной прокладки, которая обеспечивает герметичное уплотнение благодаря своим эластомерным свойствам. Таким образом, формируется 96-луночный планшет с MALDI мишенью в качестве основания (5). Благодаря микропланшетному формату, устройство совместимо со стандартными термошейкерами для микропланшетов, центрифужными концентраторами и роботизированными системами дозирования жидкостей. Для проведения UV/TiO₂-PCO поверх насадки устанавливается UV-светодиодный модуль. Компоненты 1-5 в сборе образуют фотокаталитическое микрореакторное устройство (6).



Рисунок 77 – 96-луночный UV/TiO₂-PCO микрореактор. (А) 3D-модель (слева) и собранная установка (справа). В разрезе показано положение UV-светодиодов относительно лунок. (Б) Собранная установка (6) на шейкере-инкубаторе (7). Охлаждение модуля UV-светодиодов управляется блоком управления TEC (8)

Перед установкой микрореакторной насадки поверхность MALDI мишени была функционализирована 3 коллапсированными монослоями FLa. Для сравнения на соседние ячейки был нанесен путём электрофоретического осаждения один из наиболее часто используемых металл-аффинных сорбентов, нанопорошок диоксида титана. С использованием микрореактора были последовательно проведены все стадии моделирования окислительной биотрансформации и пробоподготовка, включая металл-аффинную экстракцию на примере амодиахина (AQ) и HHb, как показано на схеме эксперимента. При прохождение каждой стадии контролировали использованием этом с массспектрометрических методов (Рисунок 78, Рисунок 79).

На первом этапе (Рисунок 78А) продукты UV/TiO₂-PCO AQ были идентифицированы методом SALDI-FT-ICR MS с использованием электрофоретически функционализированной наночастицами TiO₂ MALDI мишени. Регистрация масс-спектров осуществлялась в режиме детектирования положительных ионов в диапазоне m/z 150-400. Точную массу определяли с использованием ESI-FT-ICR MS. Тандемный массспектрометрический анализ для определения вероятных структур продуктов окисления проводили методом SALDI-MS/MS (Приложение E). На Рисунке 80 представлен массспектр продуктов UV/TiO₂-PCO AQ, полученный с использованием SALDI-FT-ICR MS. Вероятные структуры продуктов окисления, определенные с помощью SALDI-MS/MS представлены в Таблице 19. Следует отметить, что продукты окисления, полученные с использованием предложенного подхода, соответствуют описанным в литературе продуктам окислительной биотрансформации AQ [639].



с использованием микрореакторного устройства:

(A) проведение UV/TiO₂-PCO с последующим ESI-FT-ICR MS и

SALDI-FT-ICR MS анализом продуктов окисления;

(Б) получение аддуктов с последующим MALDI MS анализом;

(B) проведение ферментативного гидролиза с последующим MALDI MS анализом



с продуктами UV/TiO₂-PCO AQ с использованием FLa

в формате «лаборатория на мишени»

241



Рисунок 80 – SALDI-FT-ICR масс-спектр продуктов UV/TiO_2-PCO AQ

Таблица	19.	– Идентиф	бицированные	продукты	UV/TiO ₂ -P	'CO AQ
,		/ 1				· ·

Обозначе- ние	Брутто формула [М+Н] ⁺	m/z теоре- тический	m/z наблю- даемый	Ошибка, ррт	Вероятная структура
Амодиахин	C ₂₀ H ₂₃ ClN ₃ O	356,15241	356,15242	0,02	
MA1	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₃ O	354,13676	354,13678	0,05	
MA2	C ₁₈ H ₁₇ ClN ₃ O	326,10546	326,10551	0,15	CI CI N NH
MA3	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₃ O	328,12111	328,12119	0,24	HN OH CI N NH
MA4	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₂ O ₂	299,05818	299,05832	0,46	HN OH
MA5	C ₁₆ H ₁₂ ClN ₂ O ₃	315,05309	315,05310	0,3	
MA6	C ₂₀ H ₂₁ ClN ₃ O ₂	370,13168	370,13169	0,02	

Для оценки эффективности образования аддуктов HHb инкубировался с продуктами UV/TiO₂-PCO AQ, после чего образец анализировался методом MALDI MS в линейном режиме детектирования положительных ионов в диапазоне m/z 7500-20000 (Рисунок 78Б). Можно было ожидать, что моноизотопная масса белка увеличится соответственно количеству и химической природе присоединенных продуктов окисления.

На Рисунке 81 представлен масс-спектр, на котором наблюдаются сигналы как соответствующие интактным альфа- и бета-субъединицам ННb, так и смещенные в область больших масс, что подтверждает образование ковалентных аддуктов. При этом соотношение интенсивностей сигналов интактного НHb и образованных аддуктов свидетельствует о практически полной модификации белка, а наличие двух раздельных пиков модифицированной бета-субъединицы указывает на возможность модификации по двум сайтам.



Рисунок 81 – Линейный MALDI масс-спектр HHb после инкубации с продуктами UV/TiO₂-PCO AQ

После проведения триптического гидролиза (Рисунок 78В) стандартная процедура проведения эксперимента в установке была изменена. Раствор, содержащий триптический гидролизат, не концентрировали на мишени, а удаляли. После чего насадку снимали с мишени, сорбент промывали дважды водой. Затем после нанесения матрицы на ячейки с сорбентом проводили MALDI MS анализ. Результаты MALDI MS анализа продемонстрированы на Рисунке 82.

В отличие от масс-спектра образца, полученного в лунке с нефункционализированной поверхностью ячейки мишени (Рисунок 82А), в масс-спектре, зарегистрированном с ячейки, функционализированной FLa (Рисунок 82В), в диапазоне m/z, соответствующему пептиду LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK, модифицированному продуктами окисления AQ, присутствует ряд интенсивных сигналов с m/z 1999,971, m/z 2015,943 и m/z 2037,977, два из которых по результатам MALDI MS/MS анализа были идентифицированы, как аддукты LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK с MA1 и MA4 (Таблица 20, протоколы идентификации представлены в Приложении В). Сигнал с m/z 2037,977 по виду изотопного распределения нами также был определен, как аддукт, но разницу $\Delta m/z$ 318 между рассматриваемым сигналом и сигналом нативного пептида (m/z 1719,634) мы не смогли отнести ни к одному из ранее описанных продуктов окисления АО (МА7). Тем не менее, это соединение было идентифицировано с использованием программного обеспечения Mascot с достаточным уровнем достоверности, как пептид LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK, содержащий модификацию по C-112 (Таблица 20). Такое значение $\Delta m/z$ (318) может соответствовать структуре с предположительной брутто формулой C₁₆H₁₅ClN₂O₃. Исчезновение из масс-спектра или значительное снижение интенсивности сигналов нецелевых пептидов свидетельствует о высоком уровне селективных и специфичных свойств мультимолекулярных структур FLa, сформированных на MALDI мишени, для проведения металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени». При этом FLa не смывается с поверхности мишени все время проведения эксперимента. Следует отметить, что результаты, полученные с использованием ТІ (Рисунок 82Б), в целом согласуются с результатами для FLa. Однако в масс-спектре, зарегистрированном с пятна TI, в отличие от FLa наблюдается большое количество сигналов, соответствующих немодифицированным пептидам HHb. На основании чего можно сделать вывод, что FLa является более специфичным и селективным сорбентом, чем нанопорошок ТІ.

Таблица 20 – Идентифицированные аддукты HHb с продуктами UV/TiO₂-PCO AQ, полученными в формате «лаборатория на мишени»

Обозначение	Брутто формула	m/z MA	m/z	$\Delta m/z$	Mascot
	$[M+H]^{+}$	$[M+H]^+$	аддукта		score
			$[M+H]^+$		
MA1	$C_{20}H_{21}CIN_3O$	354,13678	1999,971	280 (с учетом	86
				нейтральной потери	
				диэтиламина 73 Да)	
MA4	$C_{16}H_{12}ClN_2O_2$	299,05832	2015,943	296	66
MA7	-	-	2037,977	318	47



Рисунок 82 – MALDI масс-спектры триптического гидролизата HHb, модифицированного продуктами UV/TiO₂-PCO AQ: А – без обогащения; Б – после металл-аффинной экстракции на TI; В – после металл-аффинной экстракции на FLa.

Во врезке – MS/MS масс-спектр сигнала с m/z 2000,00, соответствующего [M+H]⁺ иону пептида LLGNVLVCVLAHHFGK бета-субъединицы HHb, модифицированного MA1

Таким образом, продемонстрирована возможность интеграции стадии металлаффинной экстракции с использованием FMe в более масштабное устройство, позволяющее проводить моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков непосредственно на MALDI мишени. Было показано, что сформированные непосредственно на поверхности мишени структуры на основе FMe крепко удерживаются на поверхности ячеек в течение всего эксперимента, проводимого в формате «лаборатория на мишени», и проявляют высокий уровень специфичных и селективных свойств при металл-аффинной экстракции хлорсодержащих аддуктов HHb, обеспечивая высокий выход ионов целевых аддуктов.

3.3 Формат «лаборатория на мишени» для анализа свободных жирных кислот

Как было приведено выше, подход «лаборатория на мишени» основывается на интеграции нескольких стадий пробоподготовки для анализа определенных компонентов в составе сложных образцов в рамках одной платформы на основе MALDI мишени. В предыдущих разделах были рассмотрены разработки с нанесением на мишень функциональных материалов с их последующим использованием для целевого анализа. Однако к такому подходу можно отнести и пробоподготовку, осуществленную непосредственно на ячейке мишени и приводящую к значительному повышению эффективности анализа. К таким стадиям можно отнести дериватизацию с образование аддуктов или конъюгатов, способность к ионизации которых выше, чем у исходных аналитов. Примером соединений, анализ которых чаще всего осуществляется после дериватизации, являются свободные жирные кислоты (FFA).

На сегодняшний день основным методом определения FFA в биологических образцах является газовая хроматография (GC) с пламенно-ионизационным (FID) или масс-спектрометрическим детектированием (MS) [640]. Однако, несмотря на высокую чувствительность и надежность, GC MS имеет некоторые внутренние ограничения. Так, для разделения на фенилметилполисилоксановых колонках, обычно используемых в GC MS экспериментах, требуется дериватизация гидрофильных аналитов [641,642]. Результатом этого является длительное время анализа и низкая производительность. С другой стороны, жесткие условия дериватизации могут приводить к изомеризации и окислению ненасыщенных FFA со скоростью, пропорциональной числу двойных связей [643]. Другим фактором, влияющим на структуру паттернов FFA, является переэтерификация липидов во время подготовки образца [644]. Хотя для анализа FFA также может быть применена обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (RP-HPLC) с масс-спектрометрическим (ESI MS) или тандемным массспектрометрическим (ESI MS/MS) детектированием [645], данные методы менее чувствительны (HPLC-ESI MS) или более специфичны (HPLC-ESI MS/MS), чем комплексные GC MS методы [646].

В течение последних десятилетий MALDI MS зарекомендовал себя как эффективный метод анализа FFA. Как правило, подходы основаны на детектировании в режиприменением 1,8-ди(пиперидинил)нафталина, ме отрицательных ионов с N¹,N⁴-дибензилиденбензол-1,4-диамина или оксида графена в качестве матрицы [647,648]. В то же время известно, что повышение степени диссоциации карбоксильной группы может обеспечить существенное увеличение чувствительности анализа FFA при MALDI MS анализе. Соответственно, были предложены методики с детектированием положительных ионов, основанные на добавлении хлорида бария (или солей других двухвалентных металлов) в жидкий образец или легировании мезо-тетракиспорфириновой матрицы ацетатом цезия или натрия [649,650]. В последнем случае детектирование проводилось в режиме положительных ионов с регистрацией аддуктов в виде [RCOOMe+Me]⁺. Поскольку способы нанесения образцов, используемые в MALDI MS, предполагают использование водных растворов, содержащих ацетонитрил или метанол [651] (при таком составе растворителя происходит подавление диссоциации FFA), равновесие ионного обмена в таком случае смещается в пользу исходных веществ (FFA и ионы металлов). В результате, это значительно снижает степень солеобразования и негативным образом сказывается на чувствительности анализа [652].

Исследование самоорганизации солей HSt на полусферической поверхности водной субфазы при формировании металл-аффинных сорбентов на MALDI мишени показало, что на границе раздела фаз достигается практически количественная диссоциация FFA с переходом кислоты в соль. Соответственно, было сделано предположение, что нанесение на водную фазу смеси FFA, растворенной в н-гексане, приведет к образованию монослоя Ленгмюра, состоящего из солей FFA, входящих в состав смеси. При этом барий, ввиду его большого ионного радиуса и сильных ионных свойств, должен способствовать эффективной ионизации карбоксилатов при энергиях лазера, применяемых в MALDI масс-спектрометрах за счет легкого отщепления второго кислотного остатка с образованием положительно заряженного иона в виде монокарбоксилата бария. С другой стороны, сигналы монокарбоксилатов могут быть легко различимы в масс-спектрах из-за характерного изотопного распределения бария [653].

3.3.1 Формирование твердых монослоев на основе смеси насыщенных FFA

Для исследования возможности анализа FFA в виде монокарбоксилатов бария мономолекулярные слои Ленгмюра, полученные путем нанесения раствора FFA в нгексане на поверхность водного раствора, содержащего ионы бария, в чашке Петри, как показано на Рисунке 83А-Г, были сколлапсированы, растворены в ацетонитриле и перенесены на ячейку MALDI мишени. Известно, что такие соединения, как, например, хлорид бария, могут служить в качестве неорганических MALDI матриц [649]. Массспектрометрический анализ показал, что среди шести исследованных стандартов FFA (Таблица 21) те, которые имели в составе углеводородной цепи менее 14 атомов углерода (лауриновая и тридекановая кислоты), были слабо представлены в сформированных монослоях (Рисунок 84А), либо детектировались с более низкой чувствительнстью.

Действительно, воспроизводимое образование твердых монослоев (то есть карбоксилатных монослоев, которые могут быть сколлапсированы на поверхности водной фазы) требует наличия насыщенных алкилацильных фрагментов, содержащих по меньшей мере 14 атомов углерода. С другой стороны, потенциал ненасыщенных (особенно короткоцепочечных) FFA для образования твердых пленок Ленгмюра мал [654], и поэтому такие структуры не могут быть коллапсированы и перенесены в микропробирку. Таблица 21 – Состав смеси стандартов FFA, использованной при апробировании и валидации метода

N⁰	Стандарт FFA	Обозначение	m/z [M-H+Ba] ⁺	Элементный состав
1	Лауриновая кислота	C12:0	337,075	$C_{12}H_{23}O_2Ba^+$
2	Тридекановая кислота	C13:0	351,091	$C_{13}H_{25}O_2Ba^+$
3	Миристиновая кислота	C14:0	365,106	$C_{14}H_{27}O_2Ba^+$
4	Пентадекановая кислота	C15:0	379,122	$C_{15}H_{29}O_2Ba^+$
5	Пальмитиновая кислота	C16:0	393,138	$C_{16}H_{31}O_2Ba^+$
6	Стеариновая кислота	C18:0	421,169	$C_{18}H_{35}O_2Ba^+$



Рисунок 83– Процесс формирования монослоев смеси FFA в чашке Петри (А-Г) и на MALDI мишени (Д-З)

Для решения этой проблемы была использована ранее разработанная технология для формирования сорбентов на мишени, когда образование монослоев происходит непосредственно на ячейке MALDI мишени. Действительно, использование объема раствора ацетата бария менее 1 мкл и нанесение на него образца такого же объема в нгексане обеспечило надежную локализацию пленок Ленгмюра в пределах одной ячейки на MALDI мишени. Использование водных растворов без добавления органических растворителей является одной из важнейших особенностей предложенного подхода, так как это обеспечивает высокие константы диссоциации FFA и солеобразования. Оптимальное формирование монослоя наблюдалось в случае, когда на каплю водной фазы объёмом 0,5 – 0,75 мкл наносили образец в н-гексане такого же объема (Рисунок 83Д-3). После испарения органической фазы на поверхности мишени образовывалась тонкая пленка, представляющая собой монослой. Кроме того, часть монослоя оставалась на кристаллах соли после высыхания водной субфазы, что, однако не приводило к ухудшению качества спектра. Нанесение органической фазы в объемах больших 0,75 мкл приводило к растеканию образца за границы ячейки для его нанесения. В то же время, использование объемов органической фазы меньших 0,5 мкл вело к недостаточному распределению н-гексанового раствора по поверхности водной капли, что, в свою очередь, негативно сказывалось на формировании монослоев с организованной структурой. Результатом переноса процедуры формирования монослоев непосредственно на мишень стала надежная идентификация всех шести сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария, в масс-спектре, полученном для смеси стандартов FFA (Рисунок 84Б). Кроме того, при таком подходе отдельные аналиты могут быть идентифицированы по трём параметрам (значению m/z, характерному изотопному распределению и результатам MS/MS анализа), а расход образца и время его подготовки к анализу значительно сокращаются. Предложенный подход значительно увеличил чувствительность метода, доводя его до значений, близких для методов на основе MS/MS (Таблица 22), при этом одновременно с, по меньшей мере, стократным уменьшением количества образца, необходимого для анализа (до 250 нг/мл каждой кислоты).



Рисунок 84 – MALDI масс-спектры смеси стандартов FFA при формировании монослоев в чашке Петри (А) и непосредственно на MALDI мишени (Б)

3.3.2 Определение оптимальной концентрации матрицы для осуществления MALDI MS анализа монокарбоксилатов бария

Следующим этапом исследования была апробация предложенного метода анализа FFA для биологических образцов. В качестве объекта исследования были выбраны бурые водоросли вида *Fucus vesiculosus*, в тканях которых отмечено высокое содержание FFA [655]. Результаты MALDI MS анализа, проведенного для экстрактов из *F. vesiculosus*, выявили значительные различия в масс-спектрах, которые были получены в присутствии матрицы и её отсутствии для образцов биологической природы и стандартных растворов соответственно. Эксперименты показали, что даже при условии полного разрушения монослоев, ионизация монокарбоксилатов бария проходила в достаточно жестких условиях. Так для перехода солей FFA в газообразное состояние и разрушения аддуктов ацетата анализ с кристаллов ацетата бария и с поверхности монослоя требовал соответственно 85 - 90 и 90 - 95% от максимальной мощности лазера. Таким образом, ацетат бария не обеспечивал эффективного перераспределения энергии лазера в кристаллах с образцом. Было сделано предположение, что добавление к образцу подходящей матрицы может улучшить перенос энергии.

Для этого были приготовлены водные растворы, содержащие ацетат бария в концентрации 0,5 г/л и DHB в концентрациях 0,25, 1 и 5 г/л. Затем полученную смесь в объеме 0,6 мкл наносили (n=4) на MALDI мишень, после чего на неё наслаивали нгексановый экстракт из F. vesiculosus такого же объема. Масс-спектры были получены при различных настройках мощности лазера (начиная с 30% с шагом 4-5%). В случае с наибольшей концентрацией DHB (5 г/л), сигналы в масс-спектре детектировались при 45-50% от максимальной мощности лазера. Однако в спектре присутствовали только пики, относящиеся к аддуктам бария и DHB (m/z 410,073, 426,973, 444,998, 466,971, Рисунок 85А), при этом сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария, обнаружено не было. Когда DHB была добавлена в концентрации 1 г/л, в масс-спектре обнаруживались сигналы как монокарбоксилатов, так и аддуктов DHB с барием при мощности лазера, составившей 53 – 58% от максимальной (Рисунок 85Б). Дальнейшее уменьшение концентрации DHB до 0,25 г/л потребовало соответствующего увеличения мощности лазера (до 65 – 75% от максимального уровня), однако в данном случае в масс-спектре образца были представлены сигналы, соответствующие исключительно монокарбоксилатам бария (Рисунок 85В). Таким образом, добавление DHB в незначительной концентрации (не превышающей 5% от используемой в рутинных MALDI MS экспериментах) в водную фазу перед формированием монослоя позволило проводить анализ при мощности лазерного излучения, меньшей примерно на 20-25%, чем при использовании в качестве матрицы только ацетата бария.

По всей видимости, в этом случае высокая гомогенность водных и н-гексановых растворов обеспечивает хорошо упорядоченную структуру монослоев со статистическим распределением отдельных FFA в соответствии с их молярным отношением в исходном растворе н-гексана и однородное распределение образцов на MALDI мишени. Скорее всего, многослойные структуры, содержащие монослои монокарбоксилатов бария с равномерно распределенной матрицей DHB, образуются на периферии капли, на которую наносится раствор FFA в н-гексане.



Рисунок 85 – MALDI масс-спектры экстракта из *F. vesiculosus*, полученные при добавлении в водный раствор ацетата бария DHB в концентрации 5 (A), 1 (Б), или 0,25 (В) мг/мл

Таким образом, анионы дигидроксибензоата могут быть встроены в структуру монослоя или могут быть распределены по его поверхности. Хотя концентрация DHB
составляла только 1-5% (масс./об.) от традиционно используемой [50,656], это количество было достаточным для хорошего распределения энергии и получения интенсивных сигналов монокарбоксилатов бария (Рисунок 85В). Более того, при сравнении со спектрами, полученными в присутствии более высоких концентраций DHB, малые количества дигидроксибензоата обеспечивают высокую специфичность анализа для монокарбоксилатов бария. Это объясняет наличие высоких значений соотношений сигнал/шум и неожиданно высокую чувствительность MALDI MS анализа.

3.3.3 Определение чувствительности и параметров линейности предложенного подхода

В качестве модельного объекта нами был выбран раствор смеси пяти стандартов FFA в н-гексане: лауриновая, тридекановая, миристиновая, пентадекановая и пальмитиновая. Были приготовлены растворы стандартов FFA, смешаны в различных пропорциях и затем трижды последовательно разбавлены н-гексаном в 10 раз. Пальмитиновая кислота была использована в качестве аналита, относительно которого были нормированы концентрации других FFA. Нормирование интенсивностей сигналов проводили по значению интенсивности пика, соответствующего монопальмитату бария m/z 393,14. Детали приготовления растворов, построения графиков и расчёта точности приведены в Приложении Ж.

Таблица	22	—	Чувствительность	И	параметры	линейности	MALDI-MS	метода
для анали	за Fl	FA						

Обо- значе- ние	m/z [M-H+Ba] ⁺	LOD, пмоль	LOQ, пмоль	LDR	Угловой коэффи- циент	Точка пере- сечения с осью ординат	R ²	Точность
C12:0	337,075	0,05	0,50	104	1,60E-02	4,80E-02	0,95	99,6
C13:0	351,091	0,05	0,47	104	2,20E-02	6,54E-02	0,98	99,7
C14:0	365,106	0,01	0,04	104	9,41E-02	2,60E-01	0,99	101,7
C15:0	379,122	0,01	0,04	104	1,15E-01	3,35E-01	0,99	100,6
C16:0	393,138	0,01	0,09	-	-	-	-	-

Полученные значения пределов обнаружения (LOD) составили от 10 (миристиновая, пентадекановая и пальмитиновая кислоты) до 50 фмоль (лауриновая и тридекановая кислоты), в то время как пределы количественного определения (LOQ) не превышали 500 фмоль. LDR для компонентов смеси FFA определяли в соответствии с графиками нормированных интенсивностей сигналов аналитов от отношений концентраций, отложенных в логарифмическом масштабе. Для всех исследованных аналитов LDR составил четыре порядка (Таблица 22). В тоже время значения коэффициента детерминации (R²) были не ниже 0,95, а точность находилась в диапазоне от 99,6 до 101,7 % (Таблица 22).

Результаты экспериментов с экстрактами из *F. vesiculosus*, проведенных в течение трех последовательных дней, свидетельствуют об относительно высокой внутриячеечной сходимости: для большинства исследуемых FFA относительное стандартное отклонение (RSD), определенное для отношений интенсивностей как описано выше, не превышало 10,0 %, достигая значения 13,1% только для миристиновой кислоты (Таблица 23).

Таблица 23 – Исследование внутриячеечной, внутридневной и междневной сходимостей результатов, полученных для экстракта из *F. vesiculosus*

Обо-	m/7	Нормирован	іная интенсивность ± S	D (RSD%)	
значе- ние	[M-H+Ba] ⁺	Внутриячеечная сходимость (n = 3)	Внутридневная сходимость (n = 27)	Междневная сходимость (n = 27/день)	
C14:0	365,106	0,221 ± 0,029 (13,1)	0,221 ± 0,022 (10,0)	0,216 ± 0,035 (16,0)	
C16:1	391,129	$0,100\pm0,009$ (9,2)	0,090 ± 0,012 (13,8)	0,105 ± 0,018 (17,5)	
C16:0	393,134	0,441 ± 0,023 (5,3)	0,412 ± 0,048 (11,5)	0,477 ± 0,057 (11,9)	
C18:2	417,136	0,438 ± 0,027 (6,2)	$0,\!435\pm0,\!020~(4,\!7)$	0,421 ± 0,031 (7,5)	
C20:5	439,123	0,133 ± 0,009 (7,4)	0,168 ± 0,022 (13,1)	0,140 ± 0,022 (16,0)	
C20:4	441,136	0,287 ± 0,020 (6,9)	0,356 ± 0,042 (11,9)	0,303 ± 0,043 (14,0)	

Значения RSD для внутридневной сходимости лишь незначительно превышали 10%, в то время как значения RSD для междневной сходимости достигали 17,5% (C16:1). На следующем этапе исследования была проведена оценка сходимости результатов, получаемых с помощью предложенного подхода, в экспериментах с экстрактами биологических образцов различной природы (Таблица 24). Для этого н-гексановые экстракты (0,6 мкл), полученные из различных тканей животной и растительной природы, а также физиологических жидкостей млекопитающих, наносились на поверхность капли объемом 0,6 мкл, содержащую смесь 0,5 г/л водного раствора ацетата бария с 0,25 г/л DHB и нанесенную непосредственно на MALDI мишень. Внутридневная сходимость, выраженная через RSD, составила менее 15% в большинстве экспериментов, причем в большинстве случаев значения RSD не превосходили 10% (лучшие показатели были получены для экстрактов из мягких тканей мидии, Таблица 24).

		Нормированная			
Образец	Обозначение	интенсивность			
-	FFA	Среднее±SD	RSD%		
	C14:0	0,120±0,018	15,3		
Carron pagana	C16:1	0,063±0,004	6,8		
	C16:0	0,599±0,026	4,4		
(Pisum salivum	C18:3	0,644±0,034	5,2		
L.)	C18:2	2,670±0,147	5,5		
	C18:0	0,142±0,019	13,2		
	C15:0	0,076±0,014	17,8		
Клубеньки го-	C16:1	$0,464{\pm}0,044$	9,4		
роха	C16:0	1,680±0,143	8,5		
(Pisum sativum	C18:3	0,307±0,047	15,2		
L.)	C18:2	1,679±0,169	10,1		
	C18:0	1,123±0,156	13,9		
	C14:0	0,251±0,022	8,7		
T	C16:0	0,423±0,019	4,4		
I аллом Галлом	C18:3	0,169±0,015	8,8		
FUCUS	C18:2	0,536±0,028	5,2		
vesiculosus	C20:5	0,177±0,021	11,6		
	C20:4	0,315±0,017	5,4		
	C16:1	$0,702{\pm}0,050$	7,1		
Π. 1	C16:0	$1,171\pm0,051$	4,4		
Дафнии	C18:4	0,326±0,030	9,2		
(Daphnia	C18:3	2,058±0,204	9,9		
magna)	C18:2	$1,073\pm0,048$	4,5		
	C18:0	0,225±0,033	14,7		
	C16:1	0,484±0,039	8,2		
Икра беломор-	C16:0	0,935±0,073	7,8		
ской сельди	C18:2	$1,123\pm0,070$	6,3		
(Clupea pallasii	C18:0	0,249±0,037	14,7		
marisalbi)	C20:5	0,327±0,038	11,8		
	C22:6	0,858±0,124	14,5		

		Нормированная интенсив-			
Образец	Обозначение	нос	ть		
	FFA	Среднее±SD	RSD%		
	C16:1	$1,344\pm0,133$	9,9		
	C16:0	2,321±0,154	6,6		
Мяткие ткани	C18:2	0,515±0,029	5,7		
мидии (Mytilus adulis)	C20:5	$1,204\pm0,113$	9,4		
(Myillus edulis)	C20:1	0,538±0,035	6,5		
	C22:6	1,967±0,182	9,3		
	C15:0	$0,060{\pm}0,006$	9,8		
	C16:1	0,287±0,015	5,2		
Плазма крови	C16:0	$0,646\pm0,045$	6,9		
кролика	C17:0	$0,070\pm0,009$	13,5		
	C18:2	0,792±0,045	5,7		
	C18:0	0,512±0,052	10,2		
	C16:1	0,283±0,032	11,3		
Панаранаакая	C16:0	$0,705\pm0,060$	8,5		
Аслинатиа	C18:3	0,490±0,042	8,6		
фолликулярная	C18:2	2,180±0,131	6,0		
жидкость	C18:0	0,251±0,027	10,6		
	C20:4	0,135±0,016	11,7		

Анализ серий разбавлений выбранных стандартов (Таблица 22) показал, что чувствительность метода оказалась на один или два порядка выше, чем для других MALDI MS методов [267,657]. Значения LOD, полученные с использованием этого подхода (десятки фемтомолей), больше соответствуют чувствительности методов, основанных на HPLC-MS [658]. Интересно, что значение LOD для C20:5 (33 фмоль) для HPLC-MS/MS-метода, разработанного Lee и соавт., находилось в том же диапазоне [659]. Аналогично, полученные значения LOQ были на два порядка меньше, чем в опубликованных ранее работах по определению FFA с помощью MALDI- и GC MS и сопоставимы с теми, что были получены при анализе с помощью HPLC-MS/MS [657,660,661]. Нормализация интенсивности сигналов аналитов к интенсивности сигнала FFA, присутствовавшей во всех образцах (пальмитиновая кислота), с последующим логарифмированием полученных отношений привела к неожиданно широкому LDR величиной в четыре порядка (Таблица 22). Между тем, полученные значения LDR были как минимум на один порядок больше, чем в ранее опубликованных работах, в которых использовались MALDI MS и HPLC-MS методы [662]. Таким образом, с точки зрения линейности подход может быть сравним GC MS процедурой, описанной в работе Kloos и соавт. [663]. Важно отметить, что значение точности метода находится в согласии с опубликованными данными [661].

К достоинствам предложенного метода можно отнести его высокую выбросоустойчивость. В самом деле, внутриячеечная сходимость, которая характеризовалась значениями RSD, была ниже 10% (Таблица 23), в то время как значения внутридневной и междневной сходимостей были схожи и не превышали 15%. Эти значения согласуются с литературными данными по MALDI MS и HPLC-MS/MS методам [647,664], и превышают аналогичные для метода профилирования FFA, основанного на GC MS [665]. Обобщая вышесказанное, высочайшая чувствительность и широкий LDR в совокупности с хорошей точностью и прецизионностью делают данный метод отличным инструментом для сриннинга биологических образцов различной природы.

3.3.4 Исследование влияния изотопного распределения бария на проведение

полуколичественной оценки содержания FFA в образце

Выше было упомянуто о том, что изотопное распределение бария может значительно упростить качественное определение и идентификацию соединений, в состав которых входит этот элемент. Однако в случае присутствия в образце семейств FFA, отличающихся по значению m/z на 2–4 единицы, интерпретация масс-спектров и возможность проведения количественной оценки усложняется. Такой случай продемонстрирован на Рисунке 86. При наложении масс-спектров моностеарата бария (C18:0) и моноолеата бария (C18:1) (Рисунок 86А-В) можно отметить наличие незначительного (около 5%) перекрывания сигналов третьего по интенсивности изотопомера насыщенной кислоты и моноизотопного сигнала соответствующей мононенасыщенной кислоты. Однако, анализ масс-спектрометрических данных, полученных для смеси стеариновой и олеиновой кислот с известным их содержанием, показал, что отношения интенсивностей моноизотопных пиков в достаточной степени соответствуют отношению количеств соответствующих FFA в образце (Рисунок 86Г).



Рисунок 86 – Масс-спектры моностеарата бария (2,1 нмоль, А), моноолеата бария (4,3 нмоль, Б), наложение масс-спектров друг на друга (В) и масс-спектр смеси моноолеата (170 пмоль) и моностеарата (250 пмоль) бария (Г)

Анализ смесей FFA, сигналы которых в масс-спектре могут перекрываться (пальмитиновая и пальмитолеиновая (C16:0/C16:1), стеариновая и олеиновая (C18:0/C18:1)), позволил установить, что при варьировании процентного содержания ненасыщенных

258

FFA от 5% до 80% зависимость отношения моноизотопных сигналов к содержанию ненасыщенных FFA имеет линейный вид ($R^2 \ge 0.99$), что продемонстрировано на Рисунке 87 и Рисунке 88. Соответственно, можно сделать вывод, что изотопное распределение бария не вносит существенных искажений при возможной количественной оценке содержания вещества в случае наличия интерферирующих компонент.



Рисунок 87 – Масс-спектры смеси стандартов пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой и олеиновой кислот при различном процентном содержании ненасыщенных FFA: 5% (A), 10% (Б), 20% (В), 40% (Г), 60% (Д), 80% (Е)



Рисунок 88 – Зависимость отношения интенсивностей сигналов моноизотопных пиков двух пар насыщенной и соответствующей ей мононенасыщенной FFA от процентного содержания ненасыщенных FFA в образце

3.3.5 Сравнение результатов, получаемых с помощью MALDI MS и GC MS

Как упоминалось ранее, на сегодняшний день наиболее распространённым методом определения FFA является газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (GC MS). К ряду неоспоримых достоинств GC MS метода следует отнести высокую чувствительность и селективность определения FFA. Соответственно, представлялось немаловажным сравнить новый разработанных подход с наиболее зарекомендовавшей себя методикой анализа FFA, используя в качестве образца н-гексановый экстакт из *F. vesiculosus*

Полученные данные представлены на Рисунке 89 в виде относительных величин: в случае MALDI MS интенсивности соответствующих сигналов были нормированы на значение интенсивности пика монопальмитата бария, а для GC MS значения площадей пиков были нормированы на величину площади пика метилового эфира пальмитиновой кислоты. Сравнивая результаты, можно сделать вывод о хорошей согласованности между собой данных, полученных с помощью двух различных аналитических платформ. Однако, если с помощью GC MS было идентифицировано 14 FFA, то предложенный подход позволил определить 20 FFA. Подобное различие в количестве идентифициро-

260

ванных FFA может быть связано с присутствием в анализируемом продукте дериватизации экстракта из F. vesiculosus множества побочных летучих веществ, а также малолетучих соединений, которые могут разлагаться в испарителе газового хроматографа. Наличие подобных компонентов создаёт значительный фон и затрудняет идентификацию минорных сигналов, среди которых могут быть метиловые эфиры жирных кислот.

Линолевая

Олеиновая

Стеариновая

Арахиновая

Бегеновая



Рисунок 89 – Сравнение профилей FFA в составе экстракта из *F. vesiculosus*, полученных методами MALDI-MS и GC-MS

3.3.6 Исследование профилей FFA в биологических образцах различной природы

Для того, чтобы продемонстрировать возможность применения метода для анализа FFA в биологических матрицах различной природы, был выбран ряд образцов, которые находят применение в пищевой промышленности (например, для контроля качества пищевой продукции), медицинской диагностике, а также в областях науки, связанных с изучением животных и растений. Помимо фукуса, изученного на предыдущем этапе, состав FFA был исследован в экстрактах из семян и клубеньков гороха (Pisum sativum L), дафнии (Daphnia magna), мидии (Mytilus edulis), икры беломорской сельди (Clupea pallasii marisalbi), человеческой фолликулярной жидкости, а также плазмы крови кролика и человека. Результаты экспериментов показали, что данные образцы имеют различные по составу наборы FFA, причем отличия наблюдались как в количестве сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария, так и в их относительных интенсивностях в масс-спектрах (Рисунок 90). Число сигналов, которые были поставлены в соответствие соединениям, относящимся к классу FFA, варьировалось от 9 в экстрактах из семян гороха до 25 для образцов фолликулярной жидкости (Таблица 25). При идентификации FFA учитывались три параметра: точная масса, наличие характерного изотопного распределения и результаты MS/MS анализа (Таблица 26). Всего 22 FFA были идентифицированы по изотопному распределению и результатам MS/MS анализа, в то время как ещё 9 – только по значению m/z (и три в соответствии со значением точной массы и результатами MS/MS анализа).

В качестве примера идентификации монокарбоксилатов бария на Рисунке 91 приведены результаты MS/MS анализа обнаруженного в экстракте из *F. vesiculosus* соединения с m/z 441,14, что соответствует расчетным данным для моноарахидата бария (арахидоновая кислота, C20:4). Для сравнения был проведен MS/MS анализ бариевой соли стандарта арахидоновой кислоты, полученной в тех же условиях. Как следует из Рисунка 91, масс-спектры хорошо согласуются между собой, что позволяет отнести сигнал с m/z 441,14 к моноарахидату бария. В MS/MS спектрах присутствуют сигнал катионрадикала Ba⁻⁺, сигнал BaOH⁺, а также сигналы, соответствующие характерным отщеплениям молекулы воды и CO₂. Кроме того, в MS/MS спектрах также представлена серия сигналов с характерными инкрементами, соответствующими метиленовым и метиновым группам, которые позволяют определить положение двойных связей в FFA (сигналы a-о на Рисунке 91).

В н-гексановых экстрактах из семян гороха (Рисунок 90А) был обнаружен набор из 9 сигналов, представляющих монокарбоксилаты бария С14, С16, С18 и С19 соединений с преобладанием пика, соответствующего линолевой кислоте и/или её изомерам (18:2, m/z 417,134). Несмотря на то, что в масс-спектрах, полученных для экстрактов из клубеньков гороха, наиболее интенсивный сигнал также соответствует С18:2 (Рисунок 90Б), общее количество идентифицированных FFA оказалось выше для данных образцов. Следует отметить, что по сравнению с семенами гороха в клубеньках интенсивности сигналов, соответствующих насыщенным FFA (миристиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты) были значительно выше, чем интенсивности сигналов ненасыщенных FFA.



Рисунок 90 – MALDI масс-спектры экстрактов из семян (А) и клубеньков (Б) гороха *Pisum sativum* L., таллома *Fucus vesiculosus* (В), дафний *Daphnia magna* (Г), икры *Clupea pallasii marisalbi* (Д), мидий *Mytilus edulis* (Е), плазмы крови кролика (Ж) и фолликулярной жидкости человека (З). На вставках представлены увеличенные в масштабе участки масс-спектров, отмеченных звёздочкой

263

ži umicija C			Шарам	етры аннот	ации аналитов		Био.	IOL	IHECK	ие о	браз	щы	
COCTAB	Обозначение	Ошибка, ррт	Изотопное распределение	MS/MS	Предположительная жирная кислота	A	P	~		Ш	X	e	И
$C_{14}H_{27}O_2Ba^+$	C14:0	19,2	+	+	Миристиновая	+	+	+	+	+	+	+	+
$C_{15}H_{27}O_2Ba^+$	C15:1	5,3	•	+	Пентадеценовая	ı	+		+	1	+	+	-
$C_{15}H_{29}O_2Ba^+$	C15:0	6'L-	+	+	Пентадекановая	ı	+	+	+	+	+	+	+
$C_{16}H_{23}O_2Ba^+$	C16:4	5,2	+	+	Гексадекатетраеновая	ı	1		י +	1	ı	ı	ı
$C_{16}H_{25}O_2Ba^+$	C16:3	12,9	+	+	Гексадекатриеновая	ı	-		- +	1	1	ı	
$C_{16}H_{27}O_2Ba^+$	C16:2	23,1	+	+	Гексадекадиеновая	ı	-		+	1	1	ı	,
$C_{16}H_{29}O_2Ba^+$	C16:1	L'L	+	+	Пальмитолеиновая	+	+	+	+ +	+	+	+	+
$C_{16}H_{31}O_2Ba^+$	C16:0	-10,2	+	+	Пальмитиновая	+	+	+	+	+	+	+	+
$C_{17}H_{31}O_2Ba^+$	C17:1	-19,7	+	+	Гептадеценовая	ı	+	+	+	+	+	+	+
$C_{17}H_{33}O_2Ba^+$	C17:0	-44,2	+	+	Гептадекановая	ı	+	+	+	+	+	+	+
$C_{18}H_{27}O_2Ba^+$	C18:4	14,5	+	+	Стиоридовая	ı	'	' +	' +	+	•	ı	·
$C_{18}H_{29}O_2Ba^+$	C18:3	2,4	+	+	Линоленовая	+	+	' +	' +	+	•	+	+
$C_{18}H_{31}O_2Ba^+$	C18:2	-9,6	+	+	Линолевая	+	+	' +	+	+	+	+	+
$C_{18}H_{33}O_2Ba^+$	C18:1	-11,9	+	+	Олеиновая	+	+	+	+	+	+	+	+
$C_{18}H_{35}O_{2}Ba^{+}$	C18:0	4,8	+	+	Стеариновая	+	+	+	+ +	+	+	+	+
$C_{19}H_{33}O_{2}Ba^{+}$	C19:2	46,4	+	+	Нонадекадиеновая	+	+	+	۔ +	1	+	+	+
$C_{19}H_{35}O_{2}Ba^{+}$	C19:1	-90,0	+	+	Нонадеценовая	+	+	+	+	+	+	+	+
$C_{19}H_{37}O_{2}Ba^{+}$	C19:0	-96,5	+	+	Нонадекановая	ı	+	+	+ +	+	+	+	+
$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{29}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba}^{+}$	C20:5	2,3	+	+	Эйкозапентаеновая	ı	-	+	+ +	+	I	+	+
$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{31}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba}^{+}$	C20:4	-9,1	+	+	Арахидоновая	ı	-	+	- +	+	I	+	+
$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{33}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba^{+}}$	C20:3	-4,5	-	+	Дигомо-ү-линоленовя	ı	1		'	+	ı	ı	ī
$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{35}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba^{+}}$	C20:2	6,7	+	+	Эйкозадиеновая	ı	-	+	+	+	ı	ı	ı.
$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{37}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba^{+}}$	C20:1	2,2	+	+	Гондоиновая	ı	1		+	+	ı	+	•
$\mathrm{C}_{20}\mathrm{H}_{39}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba^{+}}$	C20:0	-8,9	1	+	Арахиновая	ı	+	+	+	'	1	+	ı
$\mathrm{C}_{21}\mathrm{H}_{29}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba}^{+}$	C21:6	48,8			Генэйкозагексаеновая	ı	1		'	1	1	+	+
$C_{21}H_{33}O_2Ba^+$	C21:4	-84,2	-		Генэйкозатетраеновая	ı	1		'	1	ı	+	+
$C_{21}H_{35}O_2Ba^+$	C21:3	-76,3	-		Генэйкозатриеновая	ı	1		'	1	ı	+	+
$C_{22}H_{31}O_2Ba^+$	C22:6	-2,2	+	+	Докозагексаеновая	ı	1		+	+	1	+	+
$C_{22}H_{33}O_2Ba^+$	C22:5	-6,4	1	•	Докозапентаеновая	ı	-		'	I	ı	+	+
$C_{22}H_{43}O_2Ba^+$	C22:0	2,1	1		Докозановая	ı	+	+	+	1	+	+	+
$\mathrm{C}_{24}\mathrm{H}_{47}\mathrm{O}_{2}\mathrm{Ba}^{+}$	C24:0	9,9		-	Тетракозановая	•	+	+	+	+	+	+	+
А – семена гороха <i>I</i> сельди; Е – мидии; ⁻	⁷ <i>isum sativum</i> L.; Б – Ж – плазма крови кр	клубеньки гор олика; 3 – фол	оха Pisum sativu. ликулярная жид	и L; B – тал кость яелов	илом Fucus vesiculosus; Г – дафнии Dap ека; И – плазма крови человека	ohnia	magı	1a; J	I – И	kpa (бело	Mopc	кой

Таблица 25 – Список FFA, аннотированных в экстрактах из биологических образцов различной природы



Рисунок 91 – Тандемный масс-спектр, полученный для m/z 441,14, соответствующий [М-H+Ba]⁺ иону арахидоновой кислоты (С20:4)

Анализ другого аутотрофного организма, бурых водорослей *F. vesiculosus*, позволил выявить довольно скудный состав FFA у данного образца (Рисунок 90В). В массспектрах экстрактов из бурых водорослей доминирующим являлся сигнал m/z 419,148, который соответствует монокарбоксилатам бария C18:1 (олеиновая кислота и/или её изомеры), также наблюдались достаточно интенсивные сигналы солей миристиновой и пальмитиновой кислот (m/z 365,106 и 393,134, соответственно). Следует отметить, что в масс-спектрах присутствовали интенсивные сигналы, соответствующие монокарбоксилатам бария из семейства C20 (Таблица 25), представляющими семейства омега-6 и

265

омега-3 FFA, причем их интенсивности располагались в следующем порядке: m/z 441,137 (C20:4) > m/z 439,124 (C20:5) > m/z 445,187 (C20:2). Кроме того, были идентифицированы сигналы линолевой и линоленовой кислот (m/z 417,140 и 415,131, соответственно).

Таблица 26 – Характерные ионы в тандемных масс-спектрах монокарбоксилатов бария, соответствующих различным FFA, обнаруженным в биологических образцах

Обозна-	Элементный	m/z						
чение	состав	[M-H+Ba] ⁺	[MBa-H ₃ O] ⁺	[MBa-HCO ₂] ⁺	$\operatorname{Ba}^{\cdot+}$	BaOH ⁺		
C14:0	$C_{14}H_{27}O_2Ba^+$	365,113	346,9	320,9	138,6	154,7		
C15:1	$C_{15}H_{27}O_2Ba^+$	377,108	358,9	332,8	-	-		
C15:0	$C_{15}H_{29}O_2Ba^+$	379,119	361,2	335,2	138,1	154,2		
C16:4	$C_{16}H_{23}O_2Ba^+$	385,077	366,9	341,0	-	154,6		
C16:3	$C_{16}H_{25}O_2Ba^+$	387,096	368,8	342,9	-	-		
C16:2	$C_{16}H_{27}O_2Ba^+$	389,115	370,9	345,0	-	-		
C16:1	$C_{16}H_{29}O_2Ba^+$	391,125	372,9	347,0	138,5	154,6		
C16:0	$C_{16}H_{31}O_2Ba^+$	393,134	375,0	348,9	138,5	154,6		
C17:1	$C_{17}H_{31}O_2Ba^+$	405,130	387,0	361,1	-	154,6		
C17:0	$C_{17}H_{33}O_2Ba^+$	407,135	389,0	362,9	138,5	154,6		
C18:4	$C_{18}H_{27}O_2Ba^+$	413,112	394,9	369,0	-	-		
C18:3	$C_{18}H_{29}O_2Ba^+$	415,123	396,9	370,9	138,3	154,5		
C18:2	$C_{18}H_{31}O_2Ba^+$	417,134	398,9	372,9	138,4	154,5		
C18:1	$C_{18}H_{33}O_2Ba^+$	419,148	401,0	375,0	138,4	154,5		
C18:0	$C_{18}H_{35}O_2Ba^+$	421,171	403,0	376,9	138,4	154,5		
C19:2	$C_{19}H_{33}O_2Ba^+$	431,173	413,1	387,0	-	154,5		
C19:1	$C_{19}H_{35}O_2Ba^+$	433,130	415,1	389,1	-	154,5		
C19:0	$C_{19}H_{37}O_2Ba^+$	435,143	417,1	391,1	138,4	154,5		
C20:5	$C_{20}H_{29}O_2Ba^+$	439,123	421,0	394,8	138,3	154,5		
C20:4	$C_{20}H_{31}O_2Ba^+$	441,134	423,0	396,8	138,3	154,5		
C20:3	$C_{20}H_{33}O_2Ba^+$	443,151	425,2	399,1	-	154,7		
C20:2	$C_{20}H_{35}O_2Ba^+$	445,172	427,2	401,2	-	-		
C20:1	$C_{20}H_{37}O_2Ba^+$	447,186	429,0	403,0	-	-		
C20:0	$C_{20}H_{39}O_2Ba^+$	449,196	431,0	405,0	-	-		
C22:6	$C_{22}H_{31}O_2Ba^+$	465,137	446,9	421,0	-	154,3		

Следующим объектом изучения состава FFA стали ткани животных. Массспектры, полученные для экстрактов из дафний (представителей морской фауны), характеризуются значительно большим количеством сигналов (22), отнесенных к монокарбоксилатам бария FFA, по сравнению с ранее исследованными образцами (Рисунок 90Г). Однако часть сигналов в данных масс-спектрах имела низкую интенсивность, вследствие чего не наблюдалось изотопного распределения, характерного для монокарбоксилатов бария. В данном случае идентификация FFA проводилась в соответствии со значением точной массы и результатами MS/MS анализа. Следует подчеркнуть, что только в экстрактах из дафний были детектированы сигналы, соответствующие монокарбоксилатам бария C16:2, C16:3 и C16:4 (m/z 389,115, m/z 387,096, и m/z 385,077, соответственно).

Масс-спектры экстрактов из икры беломорской сельди (*Clupea pallasii marisalbi*) и мидий (*Mytilus edulis*) содержали около 20 сигналов, интерпретированных как монокарбоксилаты бария FFA. Мажорными сигналами в данных масс-спектрах являлись сигналы, соответствующие FFA, принадлежащим к семействам C16 и C18 (Таблица 25). В отличие от профилей объектов, описанных ранее, в масс-спектрах этих образцов присутствуют интенсивные сигналы, отнесенные к семейству C20 и докозагексаеновой кислоте (22:6) и/или её изомерам (Рисунок 90Д,Е). Причем в экстракте из мидий представлен наиболее полный перечень ненасыщенных FFA семейства C20 с расположением по интенсивности в профиле 20:5 > 20:1 > 20:2 > 20:4 > 20:3, что даёт основания предполагать наличие всех основных представителей омега-3-, -6-, и -9-жирных кислот (Рисунок 90Е).

На завершающем этапе исследования мы оценивали применимость разработанного метода для анализа различных жидкостей организма млекопитающих. Для этого были получены MALDI MS спектры экстрактов из плазмы крови кролика и человека. Как ни странно, для экстрактов из плазмы крови кролика и человека различным оказалось не только количество идентифицированных сигналов, соответствующих монокарбоксилатам бария (15 и 22 соответственно), но и общий вид паттернов сигналов (Рисунки 90Ж и 92). Во-первых, в масс-спектрах экстрактов из плазмы крови человека надежно детектируются сигналы, соответствующие бариевым солям FFA семейств C20 и C22, при этом сигналы C20:4 и C20:5 кислот имеют интенсивность, сопоставимую с C18:0, несмотря на то, что по литературным данным содержание свободной стеариновой кислоты в плазме крови человека в несколько раз выше, чем представителей семейства C20 [666]. Это является показателем высокой чувствительности метода к полиненасыценным FFA.

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

человека практически полностью отсутствуют сигналы, соответствующие монокарбоксилатам бария короткоцепочечных FFA (C<16), за исключением минорного пика, соответствующего миристату бария m/z 365,106 (Рисунок 92).



Рисунок 92 – Масс-спектры н-гексановых экстрактов из плазмы крови кролика и человека

Анализ профиля FFA человеческой фолликулярной жидкости показал, что данный объект обладает наиболее богатым набором FFA в своём составе среди рассмотренных образцов. В масс-спектрах данного биологического материала было аннотировано 25 сигналов, относящихся к классу FFA (Рисунок 903). В сравнении с образцами плазмы в масс-спектрах экстрактов из фолликулярной жидкости надежно детектировались монокарбоксилаты бария соединений, относящихся к семействам C19, C20 и C22.

Несмотря на то, что в паттернах сигналов монокарбоксилатов бария FFA образцов различной природы имелись ощутимые отличия, можно выделить некоторые общие признаки. В большей части масс-спектров преобладают два кластера, представленные

сигналами кислот C16 и C18. В первом кластере доминирующими сигналами были C16:0 и C16:1 (в основном пальмитиновая и гексадеценовая кислоты соответственно), тогда как второй был представлен в основном соединениями C18:0, C18:1, C18:2 и C18:3 (соответствующие стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислотам соответственно) с выраженной распространенностью группы C18:1.

Известно, что MS/MS анализ жирных кислот используется для установления положения двойных связей в структуре исследуемой FA [667]. Действительно, положение двойных связей в такой структуре достаточно просто может быть определено благодаря наличию характерных инкрементов метиленовых и метиновых групп. В связи с этим, MS/MS анализ был применен нами для анализа структуры соединений, относящихся к кластеру C18 FFA (Рисунок 93). В результате было установлено, что в составе *F. vesiculosus* присутствует именно альфа-линоленовая кислота, а не её изомер по положению двойной связи – гамма-линоленовая кислота (Рисунок 93Г).



Рисунок 93 – MS/MS спектры m/z 421,175 (A), 419,154 (Б), 417,139 (В), 415,123 (Г), соответствующих [М-H+Ba]⁺ ионам стеариновой (С18:0, А), олеиновой (С18:1, Б), линолевой (С18:2, В), альфа-линоленовой (С18:3, Г) кислот

Таким образом, предложен надежный метод идентификации FFA по принципу «отпечатка пальцев» для быстрого профилирования биологических образцов различной природы. Благодаря высокой чувствительности, точности и широкому линейному динамическому диапазону метод может быть применим не только при качественном, но и при полуколичественном сравнении больших серий образцов. Более того, при использовании метода изотопного разбавления возможно в будущем усовершенствовать данный метод для абсолютного количественного определения FFA. Очевидно, что метод обладает универсальностью и может быть применён в клинической диагностике, при анализе состава и качества пищевой продукции, а также в экспериментальной биологии, например для скрининга мутантов или широкомасштабных экологических исследований.

3.3.7 Профилирование FFA в плазме крови крыс при интоксикации ацетатом ртути

Разработанный подход был использован при исследовании хронического отравления крыс ацетатом ртути. В качестве объекта исследования были выбраны самцы белых беспородных лабораторных крыс, были сформированы опытная и контрольная группы. В соответствии с протоколом исследования сотрудники ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России вводили животным из опытной группы ацетат ртути в виде водного раствора перорально в дозе 4 мг/кг в течение 1 месяца. Для эксперимента по исследованию профилей FFA плазмы крови из контрольной и опытной групп было отобрано по 7 животных. Образцы плазмы крови крыс также были предоставлены сотрудниками ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Экстракцию FFA, нанесение образца на мишень и MALDI MS анализ проводили также как при исследовании плазмы кролика и человека. Статистическую обработку полученных масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2 (Nonlinear Dynamics, Великобритания).

Результаты эксперимента, представленные на Рисунке 94, свидетельствуют о наличии значимых (p<0,05) изменений содержания ряда FFA в плазме крови крыс подвергшихся интоксикации, по сравнению с контрольной группой: наряду с понижением содержания миристиновой и пентадекановой кислот наблюдалось повышение концентраций линолевой и арахидоновой кислот.

Соответственно, предложенный подход может быть успешно использован в исследованиях, требующих значительное количество как экспериментальных, так и технических повторов.



Рисунок 94 – Результаты статистической обработки данных, проведенной с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2, для контрольной (Control) и опытной групп (Hg) крыс: А – миристиновая кислота, Б – пентадекановая кислота, В –линолевая кислота, Г – арахидоновая кислота

3.3.8 Профилирование FFA в агробактериях *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021

Для того, чтобы проиллюстрировать потенциал предлагаемого подхода, было проведено сравнительное исследование FFA метаболомов двух близких видов ризобий – *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021 после лизиса в н-гексане. Вся процедура была проведена для культур двух организмов (n=4, MALDI MS анализ осуществляли для трех нанесений образцов на мишень и с каждого нанесения регистрировали по три спектра). По результатам анализа было выявлено 9 сигналов, которые могут быть аннотированы в обоих видах по значению m/z с точностью массы менее 10 ppm, что находится в пределах технических характеристик прибора (Рисунок 95).

Масс-спектры были информативными и позволяли установить положение двойной связи в структуре FFA, также как было описано выше. Подтверждение наблюдаемых сигналов с помощью спектров соответствующих стандартов продемонстрировало надёжность идентификации FFA с помощью результатов MS/MS анализа в образцах, полученных по технологии Ленгмюра.

Среди идентифицированных FFA было обнаружено только два структурных класса, из ранее обнаруженных в ризобиях, а именно насыщенные и ненасыщенные FFA. Не было обнаружено гидроксилированных и циклических кислот. Однако в целом полученные наборы сигналов FFA согласуются с данными GC MS.

Гомогенность групп и различия между двумя видами оценивались методами многомерной статистики. Наиболее важной задачей, которую необходимо было решить на данном этапе, был выбор типа нормализации интенсивности, который будет применен к полученным данным. Интенсивность сигнала зависит от количества соответствующих монокарбоксилатов в точке облучения лазером. В свою очередь, число ионизируемых солей зависит от конформации монослоя – гладкий он или коллапсированный.



Рисунок 95 – MALDI масс-спектры экстрактов, полученных из н-гексановых лизатов клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae RCAM1026 (A) и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021 (Б)

Ввиду того, что монослои, полученные по технологии Ленгмюра, содержат набор различных FFA анионов, нормализация на мажорные компоненты позволяет

скорректировать вариацию конформаций монослоев от лунки MALDI мишени к лунке. Поэтому, основываясь на предыдущем опыте, для нормализации интенсивности сигналов мы использовали сигнал m/z 421, соответствующий стеариновой кислоте, а также значение полного ионного тока.

По результатам сравнения, нормализация на интенсивность сигнала m/z 421 показала лучший результат, чем для полного ионного тока. Всего было обнаружено шесть FFA (p<0,05) с различным содержанием в разных видах (Рисунок 96). Результаты анализа методом главных компонент продемонстрировали, как хорошее разделение двух видов ризобий (Рисунок 97А), так и невысокую дисперсию между биологическими повторами, что проиллюстрировано соответствующими тепловыми картами (Рисунок 97Б). Иерархическая кластеризация всех отдельных спектров, включая все технические повторы, однозначно показывает, что предложенный подход к анализу FFA имеет очевидные преимущества с точки зрения точности и воспроизводимости (Рисунок 97В).



Рисунок 96 – Статистическая обработка данных, проведенная с помощью программного обеспечения Progenesis MALDI 1.2 для н-гексановых лизатов клеток *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021



Рисунок 97 – Результаты анализа методом главных компонент (PCA), построенные для первых двух главных компонент(A); тепловые карты различий содержания FFA между образцами *R. leguminosarum* и *S. meliloti* для среднего (Б) и с учётом всех спектров (биологические и технические повторности) (В). Данные были обработаны в программе Progenesis MALDI 1.2 при нормализации на интенсивность (высоту пика) сигнала m/z 421,17. Таблица данных затем была проанализирована с использованием онлайн-программы MetaboAnalyst 4.0.

Таким образом, несмотря на то, что отсутствие хроматографического разделения и, как следствие, невозможность разделить изомерные кислоты, является недостатком такого метода как MALDI MS, разработанная методика может быть успешно использована для чувствительного, точного и высокопроизводительного скрининга множества образцов, бактериальных видов, линий, мутантов, экотипов или специфичных экологических ответов. Также, как и традиционные GC MS методы разработанный подход характеризуется высокой чувствительностью, точностью и сходимостью, что во многом определяется регулярностью монослоев из монокарбоксилатов бария, сформированных на MALDI мишени. При этом, в свою очередь использование технологии Ленгмюра в комбинации с MALDI MS позволяет анализировать большие группы образцов, величина которых ограничена числом ячеек MALDI мишени, которое обычно составляет 384, включая ячейки для нанесения калибровочных образцов. Такая высокая производительность не может быть достигнута при использовании GC MS, которая очевидно менее применима при скрининге большого числа проб.

Соответственно, по результатам проведенной работы можно сделать вывод, что разработан надежный метод идентификации FFA по принципу «отпечатка пальцев» для быстрого профилирования биологических образцов различной природы. Благодаря высокой чувствительности, точности и широкому линейному динамическому диапазону он может быть применим не только при качественном, но и при полуколичественном сравнении больших серий образцов. Более того, при использовании техники разбавления стабильных изотопов возможно в будущем усовершенствовать данный метод для абсолютного количественного определения FFA. Очевидно, что метод обладает универсальностью и может быть применён в клинической диагностике, при анализе состава и качества пищевой продукции, а также в экспериментальной биологии, например для скрининга мутаций или широкомасштабных экологических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были разработаны и исследованы структуры на основе нанодисперсных пористых оксидов металлов и монослоев Ленгмюра, обладающие свойствами металл-аффинных сорбентов, которые в дальнейшем были использованы для функционализации поверхности MALDI мишени. Было показано, что все разработанные структуры соответствуют требованиям, предъявляемым к металл-аффинным сорбентам: устойчивы в элюентах; имеют достаточную поверхность для взаимодействия с аналитом; обладают высокой сорбционной емкостью и при этом просты в получении и использовании. Структуры проявляют высокий уровень специфичности по отношению к гетероатомам – основаниям Льюиса, входящим в состав аналитов при извлечении их из матриц различной природы, и могут быть использованы в качестве сорбентов. К основным достоинствам разработанных сорбентов можно отнести: простоту получения сорбента; возможность получения сорбента непосредственно перед экспериментом; отсутствие продуцирования ионов металлов в образец; высокий уровень сорбционной емкости, а также специфичных и селективных свойств; устойчивость к подавляющей части растворителей, применяемых в металл-аффинной хроматографии.

Сорбенты на основе монослоев Ленгмюра имеют дополнительные преимущества: крайне малое количество реагентов, требующихся для формирования сорбента, что позволяет получать, исследовать и использовать структуры, содержащие атомы дорогостоящих металлов; возможность быстрого формирования сорбентов, содержащих различные металлы, для целей одного эксперимента.

При исследовании специфичных и селективных свойств было выявлено, что добавка PFOS к элюенту значительно повышает степень десорбции аналитов независимо от природы металл-аффинного сорбента и аналита, что было показано на примерах фосфор- и хлорсодержащих соединений.

Были предложены методы функционализации поверхности MALDI мишени разработанными сорбентами. В случае нанодисперсных оксидов применяли метод бескапельного электрораспыления при нормальных условиях, позволяющий воспроизводимо формировать в пределах ячейки мишени пятна сорбентов, надежно сцепленных с поверхностью. Сорбент на основе монослоев Ленгмюра формировали непосредственно на поверхности мишени. В процессе работы был разработан и исследован новый способ формирования коллапсированных монослоев на поверхности твердой подложки с ис-

276

пользованием технологии Ленгмюра, адаптированной к поверхности капли. Был предложен механизм их образования, и доказано, что сформированные структуры по морфологии и свойствам аналогична коллапсированным монослоям и пленкам Ленгмюра-Блоджетт, получаемым классическими способами. При этом сформированные структуры сохраняют свойства металл-аффинных сорбентов и остаются на поверхности в течение всего времени выполнения эксперимента в формате «лаборатория на мишени».

Разработаны и оптимизированы методики металл-аффинной экстракции фосфори галогенсодержащих аддуктов в формате «лаборатория на мишени», которые можно оценить, как перспективные для применения в биоорганическом и протеомном анализе, поскольку позволяют упростить и ускорить процедуру пробоподготовки, снизить количество образца и потери аналита в процессе подготовки к анализу и, в целом, значительно повысить эффективность MALDI MS анализа. Кроме того, было показано, что что металл-аффинную экстракцию в формате «лаборатория на мишени» можно проводить как на свежесформированных сорбентах, так и спустя длительное время (не менее 1 года) после функционализации поверхности мишени. Соответственно, в зависимости от целей и задач эксперимента оба типа сорбентов могут быть с успехом использованы, а подход «лаборатория на мишени» для специфичной экстракции пептидов, модифицированных ксенобиотиками, методом металл-аффинной хроматографии может найти применение при решении многих задач медицины, экологии и фармакологии.

Кроме того, была разработана методика, позволяющая проводить анализ свободных жирных кислот в виде монокарбоксилатов бария. Дериватизацию жирных кислот также проводили в формате «лаборатория на мишени» с использованием технологии Ленгмюра, адаптированной к поверхности капли. К достоинствам предложенного метода можно отнести его высокую робастность, а высочайшая чувствительность и широкий линейный динамический диапазон в совокупности с хорошей точностью и прецизионностью делают данный метод отличным инструментом для скрининга биологических образцов различной природы. Метод обладает универсальностью и может быть применён в клинической диагностике, при анализе состава и качества пищевой продукции, а также в экспериментальной биологии, например скрининга широкомасштабных для мутантов или экологических исследований.

277

Основные результаты и выводы:

1. Разработаны специализированные высокопроизводительные инструментальные решения и аналитические подходы, интегрированные в формат «лаборатория на мишени», с использованием наноструктур, содержащих атомы металлов.

2. Установлено, что метод электрораспыления в нормальных условиях в бескапельном режиме с динамическим делением потока распыляемой жидкости позволяет функционализировать химически чистую поверхность MALDI мишени нанодисперсными оксидами металлов без предварительной и дополнительной подготовки поверхности. Полученное покрытие обладает механической устойчивостью и сохраняется на поверхности мишени все время выполнения эксперимента в формате «лаборатория на мишени».

3. Разработан новый подход к функционализации поверхности MALDI мишени, основанный на технологии Ленгмюра, перенесенной с плоской поверхности на поверхность капли, позволяющий формировать наноструктуры на основе стеаратов металлов непосредственно на поверхности мишени перед проведением эксперимента без дополнительной подготовки и последующей регенерации поверхности мишени.

4. Обосновано использование нанодисперсных оксидов металлов, полученных золь-гель методом с совместным самораспространяющимся синтезом, индуцированным микроволновым излучением, и монослоев стеаратов металлов в качестве высокоэффективных металл-аффинных сорбентов, позволяющих специфично экстрагировать органические и биоорганические соединения с функциональными группами, содержащими атомы неметаллов (O, Cl, N и пр.), доноры электронной пары, из образцов различной природы.

5. Показано, что технология Ленгмюра, адаптированная к поверхности капли, позволяет формировать мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных монослоев стеаратов металлов в пределах ячейки MALDI мишени с сохранением металл-аффинных свойств этих структур. Структуры обладают высоким уровнем адгезии к подложке, механической устойчивостью и развитой поверхностью, что позволяет использовать их в формате «лаборатория на мишени».

6. Продемонстрировано, что нанодисперсные оксиды металлов и монослои стеаратов металлов, нанесенные на поверхность MALDI мишени, при использовании в формате «лаборатория на мишени» проявляют равноценный уровень специфичности, однако сорбенты на основе коллапсированных монослоев проявляют более высокую селективность при экстракции аддуктов белков с ксенобиотиками из многокомпонентных образцов.

7. Доказано, что хлорсодержащие органические соединения и белковые соединения, модифицированные их остатками или метаболитами, могут быть селективно экстрагированы из многокомпонентных образцов методом металл-аффинной хроматографии на нанодисперсных оксидах металлов и монослоях стеаратов металлов как в условиях пакетной хроматографии, так и в формате «лаборатория на мишени».

8. Выявлено, что формирование монослоев Ленгмюра на поверхности водной капли, содержащей ионы бария, при нанесении смеси свободных жирных кислот в нгексане позволяет получить регулярный монослой монокарбоксилатов бария. На основании этого разработана новая методика, позволяющая осуществлять профилирование свободных жирных кислот методом MALDI MS с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

2D – двумерный

9-АА – 9-аминоакридин

AFM – атомно-силовая микроскопия

АМРА – аминометилфосфоновая кислота

AQ – амодиахин

АТР – аденозинтрифосфат

BChE – бутирилхолинэстераза

ВЕТ – метод Брунауэра-Эммета-Теллера

ВЈН – метод Барретта-Джойнера-Галенды

СС2Аn – N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамид

ССАп – N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамид

СНСА – α-циано-4-гидроксикоричная кислота

CID – диссоциация, активируемая соударениями

CRM - «модель заряженного остатка»

CS – хитозан

DCL – диклофенак

DFP – диизопропилфторфосфат

DHB – 2,5-дигидроксибензойная кислота

DIOS – десорбция/ионизация на пористом кремнии

DMAN – 1,8-бис-(диметиламино)-нафталин

ЕСО – диссоциация с захватом электрона

EDTА – этилендиаминтетрауксусная кислота

EDX – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

EGMP – этиленгликоль-метакрилатфосфат

EPD – электрофоретическое осаждение

ESI – ионизация электрораспылением

ESI-FT-ICR MS – масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразовани-

ем Фурье с ионизацией электрораспылением

ESI MS – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением

ESPT – перенос протонов в возбужденном состоянии

ЕТО – диссоциация с переносом электрона

FFA – свободные жирные кислоты

FMe – монослои стеаратов металлов

FT-ICR – масс-анализатор ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

GC-ECD – газовая хроматография с детектором электронного захвата

GC-FID –газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором

hBChE – бутирилхолинэстераза человека

HHb – глобин человека

HPLС – высокоэффективная жидкостная хроматография

HPLC-ESI MS – высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением

HPLC-UV – высокоэффективная жидкостная хроматография с UV детектором

HSA – сывороточный альбумин человека

HSt – стеариновая кислота

 $IAG-PHOS\text{-}Select^{TM} \text{ Iron Affinity Gel}$

ICP-AES – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

IDА – иминодиуксусная кислота

IgG – иммуноглобулин G

ІМАС – металл-аффинная хроматография

IMAC-MALDI MS – металл-аффинная хроматография с последующим анализом методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

IR – инфракрасный

ISD – распад в источнике

LBF – пленки Ленгмюра-Блоджетт

LDI – лазерная десорбция/ионизация

LDR – линейный динамический диапазон

LMWC – низкомолекулярные соединения

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

МА – метилкарбоксиаспаргиновая кислота

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MALDI MS – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

MALDI-IMS – молекулярная визуализация с использованием MALDI

MALDI-TOF MS – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбци-

ей/ионизацией и времяпролетным масс-анализатором

МеОх – наночастицы оксидов металлов

МО – оксиды металлов

МОАС – металл-оксидная аффинная хроматография

MOSF – кремнезем с макропористой упорядоченной структурой

MPI – многофотонная ионизация

MS-масс-спектрометрия

MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

mSiO₂/Ni – монодисперсные сферические мезопористые частицы кремнезема, содержащие на поверхности пор ионы никеля

МТРFPР – мезо-тетракис(пентафторфенил)порфирин

nanoHPLC-MS – нанопоточная высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-

спектрометрическим детектированием

NGC – теория «нуклеации-роста-столкновения

NMR – ядерный магнитный резонанс

NTА – нитрилотриуксусная кислота

ОР – фосфорорганическое соединение

PDMS – полидиметилсилоксан

РFMP – 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутан

PFOS – гептадекафтороктансульфоновая кислота

РМАА – полиметилакриловая кислота

РМF – метод «отпечатков пептидных масс»

PSD – распад за пределами источника

PVPА – поливинилфосфоновая кислота

QIT-TOF MS – времяпролетный масс-спектрометр с квадрупольной ионной ловушкой

Q-TOF MS – квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр

RE – редкоземельные элементы

REPO4 – фосфаты редкоземельных металлов

Rf – фактор удерживания

RP-HPLC – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

RSD – относительное стандартное отклонение

S/N- соотношение сигнал/шум

SA – синапиновая кислота

SALDI MS – масс-спектрометрия с активируемой поверхностью лазерной десорбцией/ионизацией

SALDI-FT-ICR MS – масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с лазерной десорбцией/ионизацией, активируемой поверхностью

SD – стандартное отклонение

SDS – додецилсульфат натрия

SEM – сканирующая электронная микроскопия

TED – трис-(карбоксиметил) этилендиамин

ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия

TFA – трифторуксусная кислота

ТІ – нанопорошок ТіО₂

TLC – тонкослойная хроматография

TLC/MALDI MS – тонкослойная хроматография/масс-спектрометрия с матрично-

активированной лазерной десорбцией/ионизацией

ТОГ – времяпролетный масс-анализатор

UV – ультрафиолетовый

 $UV/TiO_2\mbox{-}PCO-UV\mbox{-}\varphi$ отокаталитическое окисление в присутствии наночастиц TiO_2

XRD – рентгеновская дифрактометрия

XRF – рентгенофлуоресцентный анализ

КР – комбинационное рассеяние

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ЭРИАД – электрораспылительная ионизация при атмосферном давлении

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК

1. Краснов И.А., Подольская Е.П., Гончаров Н.В., Бабаков В.Н., Глашкина Л.М., Ермолаева Е.Е., Дубровский Я.А., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Смолихина Т.И., Поляков Н.Б., Радилов А.С., Краснов Н.В. Идентификация алкилированного аддукта сывороточного альбумина человека методами масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 4. С. 46-53.

2. Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в токсикологическом анализе // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 4. С. 5-12.

3. Рожкова Е.А., Краснов И.А., Суходолов Н.Г., Иванов Н.С., Янклович А.И., Подольская Е.П., Краснов Н.В. Исследование поверхностных свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра-Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2008. Т. 18. № 4. С. 54-60.

4. Краснов И.А., Корнев Д.И., Краснов Н.В., **Подольская Е.П.**, Мурадымов М.З. Источник ионов наноэлектроспрей для масс-спектрометра мх 5310 // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 108-113.

5. Краснов Н.В., Лютвинский Я.И., Подольская Е.П. Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации в протеомном анализе // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 5-20.

6. Дубровский Я.А., Подольская Е.П., Войтенко Н.Г., Краснов И.А., Гладилович В.Д., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В., Краснов Н.В. Идентификация алкилированных аддуктов глобина крысы методами масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 77-83.

7. Гладилович В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П., Дубровский Я.А., Войтенко Н.Г., Фиронов С.В., Бабаков В.Н., Гончаров Н.В., Краснов Н.В. Идентификация пептидов сывороточного альбумина, модифицированных фосфорорганическими соединениями, с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии // Научное приборостроение. 2010. Т. 20. № 4. С. 84-92.

8. Дубровский Я.А., Гладилович В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П., Мурашко Е.А., Бабаков В.Н. Металл-аффинная хроматография для выделения алкилированных аддуктов гемоглобина крысы // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. № 1. С. 52-57.

9. Мурашко Е.А., Дубровский Я.А., Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Идентификация аддуктов фосфорорганических отравляющих веществ с белками крови методами фосфопротеомики // Медицинский академический журнал. 2012. Т. 12. № 3. С. 77-79.

10. Кельциева О.А., Гладилович В.Д., Прусаков А.Н., Колоницкий П.Д., Суходолов Н.Г., Селютин А.А., Краснов Н.В., Бонитенко Е.Ю., **Подольская Е.П.** Регулярные мультимолекулярные сорбенты (РММС). Получение, изучение поверхностных и сорбционных свойств // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 4. С. 50-55.

11. Jiang W., Masson P., Schopfer L.M., Lockridge O., Murashko E.A., Dubrovskii Y.A., Babakov V.N., Podolskaya E.P., Mikler J., Nachon F. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase // Analytical Biochemistry. 2013. V. 439. № 2. P. 132-141.

12. Гладилович В.Д., Шрейнер Е.В., Дубровский Я.А., Колоницкий П.Д., Краснов К.А., Бабина Е.В., Мурашко Е.А., Бабаков В.Н., Кельциева О.А., Краснов И.А., Ануров М.С., Русских Я.В., Чернова Е.Н., Жаковская З.А., Суходолов Н.Г., Селютин А.А., Александрова М.Л., Подольская Е.П. Исследование специфичных свойств регулярного мультимолекулярного сорбента Fe(III) // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 106-114.

13. Суходолов Н.Г., Гладилович В.Д., Колоницкий П.Д., Шрейнер Е.В., Янклович А.И., Селютин А.А., Краснов Н.В., Подольская Е.П. Исследование электрокинетических свойств регулярных мультимолекулярных сорбентов на основе стеаратов трехвалентных металлов // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 123-129.

14. Селютин А.А., Колоницкий П.Д., Суходолов Н.Г., Шрейнер Е.В., Краснов Н.В., Подольская Е.П. Синтез и характеризация нанорегулярных сорбентов на основе оксида циркония // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 115-122.

15. Кельциева О.А., Гладилович В.Д., **Подольская Е.П.** Металл-аффинная хроматография. основы и применение // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 1. С. 74-85.

16. Суходолов Н.Г., Иванов Н.С., **Подольская Е.П.** Новые материалы, полученные методом Ленгмюра—Блоджетт и их применение в нанотехнологии и приборостроении (Ч.1. Гибридные материалы) // Научное приборостроение. 2013. Т.23. №1. С.86-105.

17. Дубровский Я.А., Мурашко Е.А., **Подольская Е.П.**, Бабаков В.Н., Краснов Н.В., Радилов А.С. Оптимизация условий проведения металл-аффинной хроматографии для

выделения фосфонилированных пептидов // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 3. С. 13-19.

18. Гладилович В.Д., Федорова А.В., **Подольская Е.П.** Металл-оксидный сорбент на основе Fe2O3. Получение, изучение поверхностных и сорбционных свойств // Научное приборостроение. 2013. Т. 23. № 4. С. 63-65.

19. Jiang W., Dubrovskii Y.A., Murashko E.A., Babakov V., **Podolskya E.**, Nachon F., Masson P., Schopfer L.M., Lockridge O. Phos-select iron affinity beads enrich peptides for the detection of organophosphorus adducts on albumin // Chemical Research in Toxicology. 2013. V. 26. № 12. P. 1917–192.

20. Суходолов Н.Г., Кельциева О.А., Федорова А.В., Селютин А.А., **Подольская Е.П.** Поверхностные свойства пленок Ленгмюра-Блоджетт и нанодисперсных оксидов, содержащих никель и медь // Журнал общей химии. 2015. Т. 85. № 8. С. 1387-1388.

21. Шрейнер Е.В., Гладилович В.Д., Кельциева О.А., Колоницкий П.Д., Ефремов Т.А., Струков М.К., Александрова М.Л., Селютин А.А., Суходолов Н.Г., Подольская Е.П. Металл-аффинная хроматография как метод специфичной экстракции вредных химических веществ и их производных из объектов окружающей среды и биологических сред // Medline.ru. 2015. Т. 16. № 2. С. 350-356.

22. Дубровский Я.А., Мурашко Е.А., Бельтюков П.П., Подольская Е.П., Бабаков В.Н. Масс-спектрометрическая идентификация аддуктов бутирилхолинэстеразы с фосфорорганическими соединениями с помощью концентрирования иммунопреципитацией из плазмы крови // Medline.ru. 2015. Т. 16. № 2. С. 481-488.

23. Колоницкий П.Д., Шустов В.Э., Мозгушин И.А., **Подольская Е.П.** Синтез оксида никеля методом микроволнового синтеза и исследование его поверхностных свойств // Научное приборостроение. 2015. Т. 25. № 2. С. 102-107.

24. Шрейнер Е.В., Кельциева О.А., Шустов В.Э., Суходолов Н.Г., Шиловских В.В., Ширкин А.Ю., Александрова М.Л., Жаковская З.А., Подольская Е.П. Разработка металл-хелатного сорбента на основе стеарата никеля(II) // Научное приборостроение. 2015. Т. 25. № 4. С. 19-24.

25. Gladilovich V., Greifenhagen U., Sukhodolov N., Selyutin A., Singer D., Thieme D., Majovsky P., Shirkin A., Hoehenwarter W., Bonitenko E., **Podolskaya E.**, Frolov A. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed langmuir-blodgett iron(iii) stearate films and

iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics // Journal of Chromatography A. 2016. V. 1443. P. 181–190.

26. Shreyner E.V., Alexandrova M.L., Sukhodolov N.G., **Podolskaya E.P.**, Selyutin A.A. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography // Mendeleev Communications. 2017. V. 27. № 3. P. 304-306.

27. Kurdyukov D.A., Eurov D.A., Sokolov V.V., Golubev V.G., Chernova E.N., Russkikh Y.V., Bykova A.A., Shilovskikh V.V., Ubyivovk E.V., Anufrikov Y.A., Fedorova A.V., Selyutin A.A., Sukhodolov N.G., Keltsieva O.A., **Podolskaya E.P.**, Golubev V.G. Ni-Functionalized submicron mesoporous silica particles as a sorbent for metal affinity chromatography // Journal of Chromatography A. 2017. V. 1513. P. 140-148.

28. Podolskaya E.P., Sukhodolov N.G., Serebryakova M.V., Krasnov K.A., Grachev S.A., Gzgzyan A.M. Application of Langmuir–Blodgett technology for the analysis of saturated fatty acids using the MALDI-TOF mass spectrometry // Mendeleev Communications. 2018. V. 28. № 3. P. 337-339.

29. Кельциева О.А., Колпакова Ю.Д., Краснов М.Н., Мурадымов М.З., Суходолов Н.Г., Краснов Н.В., **Подольская Е.П.** Модификация MALDI-мишени наночастицами при электрораспылении суспензии оксида железа(III) в нормальных условиях // Научное приборостроение. 2019. Т. 29. № 2. С. 5-11.

30. Podolskaya E.P, Gladchuk A.S., Keltsieva O.A., Dubakova P.S., Silyavka E.S., Lukasheva E., Zhukov V., Lapina N., Makhmadalieva M.R., Gzgzyan A.M., Sukhodolov N.G., Krasnov K.A., Selyutin A.A., Frolov A. Thin film chemical deposition techniques as a tool for fingerprinting of free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Analytical Chemistry. 2019. V. 91. № 2. P. 1636-1643.

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

32. Гладчук А.С., Батоцыренова Е.Г., **Подольская Е.П.** Оптимизация методики анализа свободных жирных кислот с помощью комбинации МАЛДИ-масс-спектрометрии и технологии получения монослоев Ленгмюра // Научное приборостроение. 2020. Т. 30. № 1. С. 39–49.

33. Gladchuk A., Shumilina J., Kusnetsova A., Bureiko K., Billig S., Tsarev A., Alexandrova I., Leonova L., Zhukov V.A., Tikhonovich I.A., Birkemeyer C., **Podolskaya E.**, Frolov A. High-Throughput Fingerprinting of Rhizobial Free Fatty Acids by Chemical Thin-Film Deposition and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry // Methods and Protocols. 2020. V. 3. P. 36.

34. Шрейнер Е.В., Кельциева О.А., Гафт С.С., Суходолов Н.Г., Рейнюк В.Л., Александрова М.Л., **Подольская Е.П.** Применение металл-оксидных сорбентов для извлечения диазинона из воды // Научное приборостроение. 2020. Т. 30. №. 2. С. 27-32.

35. Gorbunov A.Y., Krasnov K.A., Bardin A.A., Keltsieva O.A., Babakov V.N., Podolskaya E.P. TiO₂-modified MALDI target for in vitro modeling of the oxidative biotransformation of diclofenac // Mendeleev Communications. 2020. V. 30. P. 220-222.

36. Gladchuk A.S., Krasnov K.A., Keltsieva O.A., Kalninia Y.K., Alexandrova M.L., Ivanov N.S., Muradymov M.Z., Krasnov N.V., Reynyuk V.L., Sukhodolov N.G., **Podolskaya E.P.** A new approach for analysis of polyprenols by a combination of thin film chemical deposition and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2021. V. 35. № 21. P. e9185.

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

38. Gladchuk A.S., Silyavka E.S., Shilovskikh V.V., Bocharov V.N., Zorin I.M., Tomilin N.V., Stepashkin N.A., Alexandrova M.L., Krasnov N.V., Gorbunov A.Yu., Babakov V.N., Sukhodolov N.G., Selyutin A.A., **Podolskaya E.P.** Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment // Thin Solid Films. 2022. V. 756. P. 139374.

39. Gorbunov A., Bardin A., Ilyushonok S., Kovach J., Petrenko A., Sukhodolov N., Krasnov K., Krasnov N., Zorin I., Obornev A., Babakov V., Radilov A., **Podolskaya E.** Multiwell photocatalytic microreactor device integrating drug biotransformation modeling and sample preparation on a MALDI target // Microchemical Journal. 2022. V. 178. P. 107362.
40. Ladikan O., Silyavka E., Mitrofanov A., Laptenkova A., Shilovskikh V., Kolonitckii P., Ivanov N., Remezov A., Fedorova A., Khripun V., Pestova O., **Podolskaya E.P.**, Sukhodolov N.G., Selyutin A.A. Thin Films of Lanthanide Stearates as Modifiers of the Q-Sense Device Sensor for Studying Insulin Adsorption // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 24973-24981.

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

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

Патенты

1. Патент 2608529. Российская Федерация, МПК В01Ј 20/28. Регулярные мультимолекулярные сорбенты для металл-аффинной хроматографии, содержащие лабильную ковалентную связь: № 2012117536: заявл. 18.04.2012: опубл. 27.10.2013 / В.Д. Гладилович, Е.П. Подольская, А.А. Селютин, Н.Г. Суходолов – 10 с.

2. Патент 2733530. Российская Федерация, МПК Н01Ј 27/00. Устройство для нанесения наночастиц оксидов металлов на металлическую поверхность при нормальных условиях: № 2019120320: заявл. 27.06.2019: опубл. 05.10.2020 / Е.П. Подольская, О.А. Кельциева, Н.В. Краснов, М.З. Мурадымов, М.Н. Краснов – 11 с.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hawkridge, A.M. Mass spectrometry-based biomarker discovery: toward a global proteome index of individuality / A.M. Hawkridge, D.C. Muddiman // Annu. Rev. Anal. Chem. – 2009. – V. 2. – P. 265-277.

Chang, H.C. Ultrahigh-mass mass spectrometry of single biomolecules and bioparticles
 // Annu. Rev. Anal. Chem. – 2009. – V. 2. – P. 169-185.

3. Burnum, K.E. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for the investigation of proteins and peptides / K. E. Burnum, S.L. Frappier, R. M. Caprioli // Annu. Rev. Anal. Chem. – 2008. – V. 1. – P. 689-705.

4. Александров, М.Л. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении – новый метод масс-спектрометрического анализа / М.Л. Александров, Л.Н. Галль, Н.В. Краснов, В.И. Николаев, В.А. Шкуров // Докл. АН СССР. – 1984. – Т. 277. – № 2. – С. 379-383.

5. Yamashita, M. Electrospray ion-source. Another variation on the free-jet theme / M. Yamashita, J.B. Fenn // J. Phys.Chem. – 1984. – V. 88. – № 20. – P. 4451-4459.

Karas, M. Matrix-assisted ultraviolet–laser desorption of nonvolatile compounds / M.
Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp // Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes. – 1987.
V. 78. – P. 53-68

Aebersold, R. Mass spectrometry-based proteomics / R. Aebersold, M. Mann // Nature.
 2003. - V. 422. - P. 198-207.

8. Peschke, M. Features of the ESI mechanism that affect the observation of multiply charged noncovalent complexes and the determination of the association constant by the titration method / M. Peschke, U.H. Verkerk, P. Kebarle // J. Am. Soc. Mass Spectrom. $-2004. - V. 15. - N_{\rm D} 10. - P. 1424-1434.$

9. Electrospray Ionisation (ESI) URL: http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml (дата обращения 20.10.2022).

10. Winger, B.A. Observations and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry / B.A. Winger, K.J. Light-Wahl, R.R. Ogorzalek Loo, H.R. Udseth, R.D. Smith // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1993. – V. 4. – № 7. – P. 536-545.

11. Tolic, R.P. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric characterization of high molecular mass starburst (TM) dendrimers / R.P. Tolic,

G.A. Anderson, R.D. Smith, H.M. Brothers, R. Spindler, D.A. Tomalia // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. – 1997. – V. 165. – P. 405-418.

12. Chernuschevich, I.V. Measurement of Noncovalent Complexes with High m/z by Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry (in: New Methods for the Study of Biomolecular Complexes) / I.V. Chernuschevich, W. Ens, K.G. Standing (Eds.) – Dordrecht: Elsevier, 1998. P.101-116.

13. Fernandez de la Mora, J. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism / J. Fernandez de la Mora // Anal. Chim. Acta. – 2000. – V. 406. – № 1. – P. 93-104.

Kaltashov, I.A. Estimates of protein areas in solution by electrospray ionization mass spectrometry / I.A. Kaltashov, A. Mohimen // Anal. Chem. – 2005. – V. 77. – № 16. – P. 5370-5379.

15. Hogan, C.J. Charge carrier field emission determines the number of charges on native state proteins in electrospray ionization / C.J. Hogan, J.A. Carroll, H.W. Rohrs, P. Biswas, M.L. Gross // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – V. 130. – № 22. – P. 6926-6927.

16. Ferguson, L.D. Molecular Beams of Macroions / L.D. Ferguson, M.B. Alice, M. Dole,
L.L. Mack, R.L. Hines, L.D. Mobley // J. Chem. Phys. – 1968. – V. 49. – № 5. – P. 2240-2256.

17. Clegg, G.A. Molecular Beams of Macrions-III / G.A. Clegg, M. Dole // Biopolymers. –
 1971. – V. 10. – № 5. – P. 821-826.

Dole, M. Electrospray Mass Spectrometry / M. Dole, H.L. Cox, J. Gienic // Adv. Chem.
 Ser. – 1975. – V. 125. P. 73-84.

19. Kantorowitz, A. High Intensity Source for the Molecular Beam, Part I / A. Kantorowitz,
J. Grey // Rev. Sci. Instrum. – 1951. – V. 22. – № 5. – P. 328.

20. Blades, A.T. Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell / A.T. Blades, M.G. Ikonomou, P. Kebarle // Anal Chem. – 1991. – V. 63. – № 19. – P. 2109-2114.

21. Van Berkel, G.J. Changes in bulk solution pH caused by the inherent controlled-current electrolytic process of an electrospray ion source / G.J. Van Berkel, F. Zhou, J.T. Aronson // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. – 1997. – V. 162. – № 1-3. – P. 55-67.

22. Smith, D.P.H. The electrohydrodynamic atomization of liquids / D.P.H. Smith // Trans
Ind. Appl. – 1986. – V. 22. – № 3. – P. 527-535.

Taylor, G.I. The stability of horizontal fluid interface in a vertical electric field / G.I.
Taylor // J. Fluid Mech. – 1965. – V. 2. – № 1. – P. 1-15.

24. Wampler, F.W. Negative ion electrospray mass spectrometry of nucleotides: Ionization from water solution with SF6 discharge suppression / F.W. Wampler, A.T. Blades, P. Kebarle // J. Am. Soc. Mass Spectrom. $-1993. - V. 4. - N_{2} 4. - P. 289-295.$

25. Wilm, M. Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole's beam of macromolecules at last? / M. Wilm, M. Mann // Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. – 1994. – V. 136. – № 2-3. – P. 167-180.

26. Wilm, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source / M. Wilm, M. Mann // Anal. Chem. – 1996. – V. 68. – № 1. – P. 1-8.

27. Chernushevich, I.V. Nanospray 'taxation' and how to avoid it / I.V. Chernushevich, U.
Bahr, M. Karas // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2004. – V. 18. – № 20. – P. 2479-2485.

28. Juraschek, R. Nanoelectrospray—More than just a minimized-flow electrospray ion source / R. Juraschek, T. Dulks, M. Karas // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1999. – V. 10. – № 4. – P. 300-308.

29. Schmidt, A. Effect of different solution flow rates on analyte signals in nano-ESI-MS, or: when does ESI turn in nano-ESI / A. Schmidt, M. Karas, T. Dulks // J. Am. Soc. Mass-spectrom. $-2003. - V. 14. - N_{\odot} 5. - P. 492-500.$

30. Tanaka K, Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-offlight mass spectrometry / K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1988. – V. 2. – № 8. – P. 151-153.

Stump, M.J. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry / M.J. Stump, R.C.
Fleming, W.H. Gong, A.J. Jaber, J.J. Jones, C.W. Surber, C.L. Wilkins // Appl. Spectrosc.
Rev. - 2002. - V. 37. - № 3. - P. 275-303.

32. Wei, J. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon / J. Wei, J.M. Buriak, G. Siuzdak // Nature. – 1999. – V. 399. – № 6733. – P. 243-246.

Beterson, D.S. Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry /
 D.S. Peterson // Mass Spectrom. Rev. - 2007. - V. 26. - № 1. - P. 19-34.

34. Karas, M. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism / M. Karas, R. Kruger // Chem. Rev. – 2003. –V. 103. – № 2. – P. 427-439.

35. Qiao, L. Photocatalytic redox reactions for in-source peptide fragmentation / L. Qiao,
H. Bi, J.M. Busnel, J. Waser, P. Yang, H.H. Girault, B. Liu // Chem. A Eur. J. – 2009. – V. 15.
– № 27. – P. 6711-6717.

36. Calvano, C.D. MALDI matrices for low molecular weight compounds: An endless story? / C.D. Calvano, A. Monopoli, T.R.I. Cataldi, F. Palmisano // Anal. Bioanal. Chem. – 2018. – V. 410. – № 17. – P. 4015-4038.

37. Horneffer, V. Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid / V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat // Int. J. Mass Spectrom. – 1999. – V. 185–187. – P. 859-870.

38. Fuchs, B.; Schiller, J. Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of apolar compounds / B. Fuchs, J. Schiller // Curr. Org. Chem. – 2009. – V. 13. – № 16. – P. 1664-1681.

39. O'Rourke, M.B. The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry / M.B. O'Rourke, S.P. Djordjevic, M.P. Padula // Mass Spectrom. Rev. – 2018. – V. 37. – № 2. – P. 217-228.

40. Szájli, E. Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS / E. Szájli, T. Fehér,
K.F. Medzihradszky // Mol. Cell. Proteomics. - 2008. - V. 7. - № 12. - P. 2410-2418.

41. Kussmann, M. Sample Preparation Techniques for Peptides and Proteins Analyzed by MALDI-MS (in: Mass Spectrometry of Proteins and Peptides. Methods in Molecular Biology, vol. 146) / M. Kussmann, P. Roepstorff; J.R. Chapman (Ed.) Totowa: Humana Press, 2000. P. 405-424.

42. Fitzgerald, M.C. Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides / M.C. Fitzgerald, G.R. Parr, L.M. Smith // Anal. Chem. – 1993. – V. 65. – № 22. – P. 3204-3211.

43. Leopold, J. Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids / J. Leopold, Y. Popkova, K. M. Engel, J. Schiller // Biomolecules. – 2018. – V. 8. – №4. – P. 173.

44. Liu, B.H. Incoherent production reactions of positive and negative ions in matrixassisted laser desorption/ionization / B.H. Liu, Y.T. Lee, Y.S. Wang // J. Am. Soc. Mass Spectrom. $-2009. - V. 20. - N_{2}6. - P. 1078-1086.$ **45.** Karas, M. Ionization inmatrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors / M. Karas, M. Gluckmann, J. Schafer // J. Mass Spectrom. – 2000. – V. 35. – № 1. – P. 1-12.

46. Lehmann, E. Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: contribution of pre-formed ions / E. Lehman, R. Knochenmuss, R. Zenobi // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1997. – V. 11. – № 14. – P. 1483-1492.

47. Knochenmuss R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / R. Knochenmuss // J. Mass Spectrom. – 2002. – V. 37. – № 8. – P. 867-877.

48. Bae, Y.J. Degree of ionization in MALDI of peptides: thermal explanation for the gasphase ion formation / Y.J. Bae, Y.S. Shin, J.H. Moon, M.S. Kim // J. Am. Soc. Mass Spectrom. $-2012. - V. 23. - N_{2} 8. - P. 1326-1335.$

49. Hillenkamp, F. The MALDI process and method (in: MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation Methods and Applications) / F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic; F. Hillenkamp, M. Karas (Eds.) – Weinheim, Ger.: Wiley, 2007. P. 1-28.

50. Breuker, K. Thermodynamic control of final ion distributions in MALDI: in-plume proton transfer reactions / K. Breuker, R. Knochenmuss, J. Zhang, A. Stortelder, R. Zenobi // Int. J. Mass Spectrom. – 2003. – V. 226. – № 1. – P. 211-222.

51. Spengler, B. Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules / B. Spengler // J. Mass Spectrom. – 1997. – V. 32. – № 10. – P. 1019-1036.

52. Zenobi, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry / R. Zenobi, R. Knochenmuss // Mass Spectrom. Rev. – 1998. – V. 17. – № 5. – P. 337-366.

53. Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI / R. Knochenmuss // Analyst. - 2006. - V. 131. - № 9. - P. 966-986.

54. Land, C.M. Investigation of the mechanism of intracluster proton transfer from sinapinic acid to biomolecular analytes / C.M. Land, G.R. Kinsel // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1998. – V. 9. – № 10. – P. 1060-1067.

55. Kinsel, G.R. Ionization energy reductions in small 2,5-dihydroxybenzoic acid–proline clusters / G.R. Kinsel, R. Knochenmuss, P. Setz, C.M. Land, S.K. Goh, E.F. Archibong, J.H. Hardesty, D.S. Marynick // J. Mass Spectrom. – 2002. – V. 37. – № 11. – P. 1131-1140.

56. Liu, B.H. Initial ionization reaction in matrixassisted laser dosorption/ionization / B.H.
Liu, O.P. Charkin, N. Klemenko, C.W. Chen, Y.S. Wang // J. Phys. Chem. – 2010. – V. 114. – № 33. – P. 10853-10859.

57. Mukamel, S. Many-body approaches for simulating coherent nonlinear spectroscopies of electronic and vibrational excitons / S. Mukamel, D. Abramavicius // Chem. Rev. – 2004. – V. 104. – № 4. – P. 2073-2098.

58. Knochenmuss, R. Molecular dynamics model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes / R. Knochenmuss, L.V. Zhigilei // J. Phys. Chem. $-2005. - V. 109. - N_{2} 48. - P. 22947-22957.$

59. Knochenmuss, R. Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization / R. Knochenmuss, L.V. Zhigilei // J. Mass Spectrom. $-2010. - V.45. - N_{\odot}4. - P.333-346.$

60. Ehring, H. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry / H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp // Org. Mass Spectrom. – 1992. – V. 27. – N_{2} 4. – P. 472-480.

61. Asfandiarov, N.L. Electron capture negative ion mass spectra of some typical matrix-assisted laser desorption/ionization matrices / N.L. Asfandiarov, S.A. Pshenichnyuk, A.I. Fokin, V.G. Lukin, V.S. Fal'ko // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2002. – V. 16. – № 18. – P. 1760-1765.

62. Knochenmuss, R. Photoionization pathways and free electrons in UV-MALDI / R. Knochenmuss // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – № 11. – P. 3179-3184.

63. Karas, M. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules / M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp // Anal. Chem. – 1985. – V. 57. – № 14. – P. 2935-2939.

64. Breuker, K. Gas-phase basicities of deprotonated matrix-assisted laser desorption/ionization matrix molecules / K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi // Int. J. Mass Spectrom. – 1999. – V. 184. – № 1. – P. 25-38.

65. Chen, X. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength /X. Chen, J.A. Carroll, R.C. Beavis // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1998.
– V. 9. – № 9. – P. 885-891.

66. Niu, S. Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelengthmatrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins / S. Niu, W. Zhang, B.T. Chait // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1998. – V. 9. – N_{2} 1. – P. 1-7.

67. Zhu, Y.F. Revisit of MALDI for small proteins / Y.F. Zhu, K.L. Lee, K. Tang, S.L. Allman, N.I. Taranenko, C.H. Chen // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1995. – V. 9. – № 13. – P. 1315-1320.

68. Kruger, R. Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes / R. Kruger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas // Anal. Chem. – 2001. – V. 73. – № 24. – P. 5812-5821.

69. Liao, P.C. Enhanced detection of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry through the use of charge-localized derivatives / P.C. Liao, J. Allison // J. Mass Spectrom. – 1995. – V. 30. – № 3. – P. 511-512.

70. Jaskolla, T.W. Compelling evidence for lucky survivor and gas phase protonation: the unified MALDI analyte protonation mechanism / T.W. Jaskolla, M. Karas // J. Am. Soc. Mass Spectrom. $-2011. - V. 22. - N_{\odot} 6. - P. 976-988.$

71. Moon, J.H. Ion yields for some salts in MALDI: mechanism for the gas-phase ion formation from preformed ions / J.H. Moon, Y.S. Shin, Y.J. Bae, M.S. Kim // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2012. – V. 23. – № 1. – P. 162-170.

72. Ahn, S.H. Quantitative reproducibility of mass spectra in matrix-assisted laser desorption ionization and unraveling of the mechanism for gas-phase peptide ion formation / S.H. Ahn, K.M. Park, Y.J. Bae, M.S. Kim // J. Mass Spectrom. – 2013. – V. 48. – N_{2} 3. – P. 299-305.

73. Bae, Y.J. A Thermal Mechanism of Ion Formation in MALDI / Y.J. Bae, M.S. Kim // Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.). – 2015. – V. 8. – P. 41-60.

Lu, I.C. Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization / I.C.
Lu, C. Lee, Y.T. Lee, C.K. Ni // Annu. Rev. Anal. Chem. – 2015. – V. 8. – P. 21-39.

75. Chu K.Y. Thermal proton transfer reactions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / K.Y. Chu, S. Lee, M.T. Tsai, I.C. Lu, Y.A. Dyakov, Y.H. Lai, Y.T. Lee, C.K. Ni // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2014. – V. 25. – P. 310-318.

76. Lu, I.C. Ion intensity and thermal proton transfer in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization / I.C. Lu, C. Lee, H.Y. Chen, H.Y. Lin, S.W. Hung, Y.A. Dyakov, K.T. Hsu, C.Y. Liao, Y.Y. Lee, C.M. Tseng, Y.T. Lee, C.K. Ni // J. Phys. Chem. – 2014. – V. 118. – P. 4132-4139.

77. Lu, I.C. Ion-to-Neutral Ratios and Thermal Proton Transfer in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization / I.C. Lu, K.Y. Chu, C.Y. Lin, S.Y. Wu, Y.A. Dyakov, J.L. Chen, A. Gray-Weale, Y.T. Lee, C.K. Ni // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2015. – V. 26. – № 7. – P. 1242-1251.

78. Abonnenc, M. Electrochemical Aspects of Electrospray and Laser Desorption/Ionization for Mass Spectrometry / M. Abonnenc, L. Qiao, B. Liu, H.H. Girault // Annu. Rev. Anal. Chem. – 2010. – V. 3. – P. 231-254.

79. Sarver, A. Analysis of peptides and proteins containing nitrotyrosine bymatrix-assisted laser desorption/ionizationmass spectrometry / A. Sarver, N.K. Scheffler, M.D. Shetlar, B.W. Gibson // J. Am. Soc.Mass Spectrom. $-2001. - V. 12. - N_{2} 4. - P. 439-448.$

80. Petersson, A.S. Investigation of tyrosine nitration in proteins by mass spectrometry / A.S. Petersson, H. Steen, D.E. Kalume, K. Caidahl, P. Roepstorff // J. Mass Spectrom. – 2001.
– V. 36. – № 6. – P. 616-625.

81. Kaneko, R. Decomposition of protein nitrosothiols in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry / R. Kaneko, Y. Wada // J. Mass Spectrom. – 2003. – V. 38. – № 5. – P. 526-530.

82. Frankevich, V.E. Role of electrons in laser desorption/ionization mass spectrometry / V.E. Frankevich, J. Zhang, S.D. Friess, M. Dashtiev, R. Zenobi // Anal. Chem. – 2003. – V. 75. – № 22. – P. 6063-6067.

83. Frankevich, V.E. The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR / V.E. Frankevich, R. Knochenmuss, R. Zenobi // Int. J. Mass Spectrom. $-2002. - V. 220. - N_{\odot} 1. - P. 11-19.$

84. Gorshkov, M.V. Characteristics of photoelectrons emitted in matrixassisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance experiments / M.V. Gorshkov, V.E. Frankevich, R. Zenobi// Eur. J. Mass Spectrom. – 2002. – V. 8. – № 1. – P. 67-69.

85. Knochenmuss, R. Ion yields of thin MALDI samples: dependence on matrix and metal substrate and implications for models / R. Knochenmuss, G. McCombie, M. Faderi // J. Phys. Chem. A. -2006. - V. 110. - N = 47. - P. 12728-12733.

86. Gruszecka, A. Role of the support material on laser desorption/ionization mass spectra / A. Gruszecka, M. Szymanska-Chargot, A. Smolira, J. Cytawa, L. Michalak // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2008. – V. 22. – № 7. – P. 925-929.

87. Frankevich, V. Production and fragmentation of multiply charged ions in 'electron-free' matrix-assisted laser desorption/ionization / V. E. Frankevich, J. Zhang, M. Dashtiev, R. Zenobi // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2003. – V. 17. – № 20. – P. 2343-2348.

88. Zhang, J. Reduction of Cu(II) in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / J. Zhang, V. E. Frankevich, R. Knochenmuss, S.D. Friess, R. Zenobi // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2003. – V. 14. – № 1. – P. 42-50.

89. Okuno, S. Reduction of organic dyes in matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption/ionization on porous silicon / S. Okuno, M. Nakano, G. Matsubayashi, R. Arakawa, Y. Wada // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2004. – V. 18. – № 23. – P. 2811-2817.

90. Brown, R.S. Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein peptide ions / R.S. Brown, J.J. Lennon // Anal. Chem. – 1995. – V. 67. – № 21. – P. 3990-3999.

91. Yalcin, T. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the analysis of polydienes / T. Yalcin, D.C. Schriemer, L. Li // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1997. – V. 8. – № 12. – P. 1220-1229.

92. Wong, C.K.L. Cationization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: attachment of divalent and trivalent metal ions / C.K.L. Wong, T.W.D. Chan // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1997. – V. 11. – № 5. – P. 513-519.

93. Masselon, C. Matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry of luteinizing hormone releasing hormone-metal ion complexes / C. Masselon, B. Salih, R. Zenobi // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1999. – V. 10. – № 1. – P. 19-26.

94. Lavanant, H. Formation and fragmentation of α -amino acids complexed by Cu+ / H, Lavanant, Y. Hoppiliard // J. Mass Spectrom. – 1997. – V. 32. – No 10. – P. 1037-1049.

95. Salih, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of noncovalent protein transition metal ion complexes / B. Salih, C. Masselon, R. Zenobi // J. Mass Spectrom. – 1998. – V. 33. – № 10. – P. 994-1002.

96. Kosevich, M.V. Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments / M.V. Kosevich, V.V. Chagovets, I.V. Shmigol, S.V.

Snegir, O.A. Boryak, V.V. Orlov, V.S. Shelkovsky, V.A. Pokrovskiy, A. Gomory // J. Mass Spectrom. – 2008. – V. 43. – № 10. – P. 1402-1412.

97. Sachon, E. Protein desolvation in UV matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) / E. Sachon, G. Clodic, T. Blasco, G. Bolbach // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2007. – V. 18. – № 10. – P. 1880-1890.

98. Hardouin J. Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry // Mass Spectrom. Rev. - 2007. - V. 26. - № 5. - P. 672-682.

99. Demeure, K. Rational selection of the optimum MALDI matrix for top-down proteomics by in-source decay / K. Demeure, L. Quinton, V. Gabelica, E. De Pauw // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – № 22. – P. 8678-8685.

100. Gao, J.L. A programmable fragmentation analysis of proteins by in-source decay in MALDI-TOF mass spectrometry / J.L. Gao, A. Tsugita, M. Takayama, L. Xu // Anal. Chem. – 2002. – V. 74. – № 6. – P. 1449-1457.

101. Reiber, D.C. Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization insource fragmentation data combined with database searching / D.C. Reiber, T.A. Grover, R.S. Brown // Anal. Chem. – 1998. – V. 70. – \mathbb{N} 4. – P. 673-683.

102. Kocher, T. Fragmentation of peptides in MALDI in-source decay mediated by hydrogen radicals / T. Kocher, A. Engstrom, R.A. Zubarev // Anal. Chem. – 2005. – V. 77. – № 1. – P. 172-177.

103. Takayama, M. N-C-αbond cleavage of the peptide backbone via hydrogen abstraction /
M. Takayama // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2001. – V. 12. – № 9. – P. 1044-1049.

104. Go, E.P. Desorption/ionization on silicon nanowires / E.P. Go, J.V. Apon, G. Luo, A. Saghatelian, R.H. Daniels, V. Sahi, R. Dubrow, B.F. Cravatt, A. Vertes, G. Siuzdak // Anal. Chem. $-2005. - V. 77. - N_{\odot} 6. - P. 1641-1646.$

105. Chen, C.T. Molecularly imprinted TiO2-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for selectively detecting α -cyclodextrin / C.T. Chen, Y.C. Chen // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – No 5. – P. 1453-1457.

106. Chen, C.T. Desorption/ionization mass spectrometry on nanocrystalline titania solgeldeposited films / C.T. Chen, Y.C. Chen // Rapid Commun. Mass Spectrom. -2004. - V. 18. $- N_{\rm P} 17. - P. 1956-1964.$ **107.** Lin, Y.S. Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on sol-gelderived 2,5-dihydroxybenzoic acid film / Y.S. Lin, Y.C. Chen // Anal. Chem. – 2002. – V. 74. – № 22. – P. 5793-5798.

Han, M. An activated carbon substrate surface for laser desorption mass spectrometry /
M. Han, J. Sunner // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2002. – V. 11. – № 7. – P. 644-649.

109. Xu, S.Y. Carbon nanotubes as assisted matrix for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / S.Y. Xu, Y.F. Li, H.F. Zou, J.S. Qiu, Z. Guo, B.C. Guo // Anal. Chem. – 2003. – V. 75. – № 22. – P. 6191-6195.

110. Qiao, L. MALDI in-source photooxidation reactions for online peptide tagging / L. Qiao, C. Roussel, J.J. Wan, J. Kong, P.Y. Yang, H.H. Girault, B. Liu // Angew. Chem. Int. Ed. – 2008. – V. 47. – № 14. – P. 2646-2648

111. Qiao, L. In-source photocatalytic reduction of disulfide bonds during laser desorption ionization / L. Qiao, H.Y. Bi, J.M. Busnel, B.H. Liu, H.H. Girault // Chem. Commun. – 2008.
– V. 47. – P. 6357-6359.

112. Schnaible, V. Screening for disulfide bonds in proteins by MALDI in-source decay and LIFT-TOF/TOF-MS / V. Schnaible, S. Wefing, A. Resemann, D. Suckau, A. Bücker, S. Wolf-Kümmeth, D. Hoffmann // Anal. Chem. – 2002. – V. 74. – № 19. – P. 4980-4988.

113. Fukuyama, Y. Rapid sequencing and disulfide mapping of peptides containing disulfide bonds by using 1,5-diaminonaphthalene as a reductive matrix / Y, Fukuyama, S. Iwamoto, K. Tanaka // J. Mass Spectrom. -2006. - V. 41. - N 2. - P. 191-201.

114. Castro, J.A. Matrix-assisted laser desorption/ionization of high-mass molecules by Fourier-transform mass spectrometry / J.A. Castro, C. Köster, C. Wilkins // Rapid Commun Mass Spectrom. – 1992. – V. 6. – № 4. – P. 239-241.

115. Mustafa, D.A. Identification of glioma neovascularization-related proteins by using MALDI-FTMS and nano-LC fractionation to microdissected tumor vessels / D.A. Mustafa, P.C. Burgers, L.J. Dekker, H. Charif, M.K. Titulaer, P.A. Smith, T.M. Luider, J.M. Kros // Mol Cell Proteomics. $-2007. - P. 6. - N_{2}7. - P. 1147-1157.$

116. Dekker, L.J. FTMS and TOF/TOF mass spectrometry in concert: identifying peptides with high reliability using matrix prespotted MALDI target plates / L.J. Dekker, P.C. Burgers, C. Guzel, T.M. Luider // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2007. – V. 847. – N_{01} . – P. 62-64.

117. Franz AH, Molinski TF, Lebrilla CB. MALDI-FTMS characterization of oligosaccharides labeled with 9-aminofluorene / A.H. Franz, T.F. Molinski, C.B. Lebrilla // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2001. – V. 12. – №12. – P. 1254-1261.

118. Dey, M. Determination of molecular weight distributions of polymers by MALDI-FTMS / M. Dey, J.A. Castoro, C.L. Wilkins // Anal. Chem. – 1995. – V. 67. – № 9. – P. 1575-1579.

119. Li, Q. New asymmetric AB(n)-shaped amphiphilic poly(ethylene glycol)-b-[poly(l-lactide)](n) (n = 2, 4, 8) bridged with dendritic ester linkages: I. Syntheses and their characterization / Q. Li, F. Li, L. Jia, Y. Li, Y. Liu, J. Yu, Q. Fang, A. Cao // Biomacromolecules. – 2006. – V. 7. – N $_{2}$ 8. – P. 2377-2387.

120. Senko, M.W. Mass spectrometry of macromolecules: has its time now come? / M.W. Senko, F.W. McLafferty // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. – 1994. – V. 23. – P. 763-785.
121. Fenn, J.B. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules / J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse // Science. – 1989. – V. 246. – № 4926. – P. 64-71.

122. Hager, J.W. Recent trends in mass spectrometer development / J.W. Hager // Anal. Bioanal. Chem. – 2004. – V. 378. – № 4. – P. 845-850.

123. Yergey, A.L. De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF / A.L. Yergey,
J.R. Coorsen, P.S. Backlund Jr, P.S. Blank, G.A. Humphrey, J. Zimmerberg, J.M. Campbell,
M.L. Vestal // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2002. – V. 13. – № 7. – P. 784-791.

124. Hunnam, V. Ionization and fragmentation of neutral and acidic glycosphingolipids with a Q-TOF mass spectrometer fitted with a MALDI ion source / V. Hunnam, D.J. Harvey, D.A. Priestman, R.H. Bateman, R.S. Bordoli, R. Tyldesley // J. Am. Soc. Mass Spectrom. $-2001. - V. 12. - N_{\rm P}11. - P. 1220-1225.$

125. Suzuki, Y. Convenient structural analysis of glycosphingolipids using MALDI-QIT-TOF mass spectrometry with increased laser power and cooling gas flow / Y. Suzuki, M. Suzuki, E. Ito, N. Goto-Inoue, K. Miseki, J. Iida, Y. Yamazaki, M. Yamada, A. Suzuki // J. Biochem. – 2006. – V. 139. – N_{2} 4. – P. 771-777.

126. Vestal, M.L. Tandem time-of-flight mass spectrometry / M.L. Vestal, J.M. Campbell // Methods Enzymol. – 2005. – V. 402. – P. 79-108.

127. Cohen, L.H. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry / L.H. Cohem, A.I.
Gusev // Anal. Bioanal. Chem. – 2002. – V. 373. – № 7. – P. 571-586.

Blackstock, W.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins /
W.P. Blackstock, M.P. Weir // Trends Biotechnol. – 1999. – V. 17. – № 3. – P. 121-127.

129. Eisenstein E. Biological function made crystal clear — annotation of hypothetical proteins via structural genomics / E. Eisenstein, G.L. Gilliland, O. Herzberg, J. Moult, J. Orban, R.J. Poljak, L. Banerjei, D. Richardson, A.J. Howard // Curr. Opin. Biotechnol. – 2000. – V. $11. - N_{\rm D} 1. - P. 25-30.$

130. Shevchenko A. Deciphering protein complexes and protein interaction networks by tandem affinity purification and mass spectrometry: analytical perspective / A. Shevchenko, D. Schaft, A. Roguev, W.W. Pijnappel, A.F. Stewart, A. Shevchenko // Mol. Cell. Proteomics. – $2002. - V. 1. - N_{2} 3. - P. 204-212.$

131. Ong S.E. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics / S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann // Mol. Cell. Proteomics. – 2002. – V. 1. – № 5. – P. 376-386.

132. Page M.J. Proteomics: a major new technology for the drug discovery process / M.J.
Page, B. Amess, C. Rohlff, C. Stubberfield, R. Parekh // Drug Discov. Today. – 1999. – V. 4. – № 2. – P. 55-62.

133. Washburn, M.P. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology / M.P. Washburn, D. Wolters, J.R. Yates III // Nat. Biotechnol. – 2001. - V. 19. - N = 3. - P. 242-247.

134. Schmelzer, C.E. Mass spectrometric characterization of human skin elastin peptides produced by proteolytic digestion with pepsin and thermitase / C.E. Schmelzer, M. Getie, R.H. Neubert // J. Chromatogr. A. -2005. -V. 1083. -N 1-2. -P. 120-126.

Mann, M. Proteomic analysis of posttranslational modifications / M. Mann, O.N. Jensen
// Nat. Biotechnol. - 2003. - V. 21. - № 3. - P. 255-261.

136. Aslam, B. Proteomics: Technologies and Their Applications / B. Aslam, M. Basit, M.A. Nisar, M. Khurshid, M.H. Rasool // J. Chromatogr. Sci. – 2017. – V. 55. – № 2. – P. 182-196.

137. Holm, L. Removing near-neighbour redundancy from large protein sequence collections / L. Holm, C. Sander // Bioinformatics. – 1998. – V. 14. – № 5. – P. 423-429.

138. Perkins, D.N. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data / D.N. Perkins, D.J. Pappin, D.M. Creasy, J.S. Cottrell // Electrophoresis. – 1999. – V. 20. – № 18. – P. 3551-3567.

139. Eng, J.K. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database / J.K. Eng, A.L. McCormack, J.R. Yates III // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1994. – V. 5. – № 11. – P. 976-989.

140. Craig R. TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra / R. Craig, R.C. Beavis // Bioinformatics. – 2004. – V. 20. – № 9. – P. 1466-1467.

141. Тюряева, И.И. Выявление и идентификация ламинина в составе плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела крысы / И.И. Тюряева, О.А. Миргородская, О.А. Черепанова, Е.П. Подольская, А.В. Новиков, М.А. Ходорковский, В.А. Иванов // Цитология. – 2005. – Т. 47. – № 2. – С. 150-163.

142. Тюряева, И.И. Взаимодействие ламинина с компонентами плазматических мембран клеток асцитной гепатомы Зайдела / И.И. Тюряева, О.А. Миргородская, О.А. Черепанова, Е.П. Подольская, М.В. Серебрякова, В.А. Иванов // Цитология. – 2005. – Т. 47. – № 12. – С. 1039-1048.

143. Roepstorff, P. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides / P. Roepstorff, J. Fohlman // Biomed. Mass Spectrom. – 1984. – V. 11. – № 11. – P. 601.

144. . Демидов, Е.А. Протеомика / Е.А. Демидов, С.Е. Пельтек // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – № 1. – С.166-174.

145. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – № 5259. – P. 680-685.

146. Guércio, R.A.P. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake
Bothrops atrox / R.A.P. Guércio, A. Shevchenko, A. Shevchenko, J.L. López-Lozano, J. Paba,
M.V. Sousa, C.A.O. Ricart // Proteome Sci. – 2006. – V. 4. – P. 11.

147. Preston, G.W. Protein Adductomics: Analytical Developments and Applications in Human Biomonitoring / G.W. Preston, D.H. Phillips // Toxics. – 2019. – V. 7. – № 2. – P. 29.

148. Rappaport, S.M. Adductomics: Characterizing exposures to reactive electrophiles / S.M. Rappaport, H. Li, H. Grigoryan, W.E. Funk, E.R. Williams // Toxicol. Lett. – 2012. – V. 213. – № 1. – P. 83-90.

149. Carlsson, H.; Rappaport, S.M.; Tornqvist, M. Protein Adductomics: Methodologies for Untargeted Screening of Adducts to Serum Albumin and Hemoglobin in Human Blood Samples / H. Carlsson, S.M. Rappaport, M. Tornqvist // High Throughput. – 2019. – V. 8. – № 1. – P. 6.

150. Scheepers, P.T.J. The use of biomarkers for improved retrospective exposure assessment in epidemiological studies: Summary of an ECETOC workshop / P.T.J. Scheepers // Biomarkers. $-2008. - V. 13. - N \circ 7. - P. 734-748.$

151. Ahmed, M.H. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery / M.H. Ahmed, M.S. Ghatge, M.K. Safo // Subcell. Biochem. – 2020. – V. 94. – P. 345-382.

152. Rubino, F.M. Toward an "omic" physiopathology of reactive chemicals: Thirty years of mass spectrometric study of the protein adducts with endogenous and xenobiotic compounds / F.M. Rubino, M. Pitton, D. Di Fabio, A. Colombi // Mass Spectrom. Rev. $-2009. - V. 28. - N_{\odot} 5. - P. 725.784.$

153. Turesky, R.J. Metabolism and Biomarkers of Heterocyclic Aromatic Amines in Molecular Epidemiology Studies: Lessons Learned from Aromatic Amines / R.J. Turesky, L. Le Marchard // Chem. Res. Toxicol. – 2011. – V. 24. – № 8. – P. 1169-1214.

154. Bryant, M.S. Hemoglobin adducts of aromatic amines: Associations with smoking status and type of tobacco / M.S. Bryant, P. Vineis, P.L. Skipper, S.R. Tannebaum // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1988. – V. 85. – № 24. – P. 9788-9791.

155. Levitt, D. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements / D. Levitt, M. Levitt // Int. J. Gen. Med. -2016. -V. 9. -P. 229-255.

156. Sabbioni, G.; Turesky, R.J. Biomonitoring Human Albumin Adducts: The Past, the Present, and the Future / G. Sabbioni, R.J. Turesky // Chem. Res. Toxicol. – 2017. – V. 30. – № 1. – P. 332-366.

157. Day, B.W. Benzo[a]pyrene anti-diol epoxide covalently modifies human serum albumin carboxylate side chains and imidazole side chain of histidine(146) / B.W. Day, P.L. Skipper, J. Zaia, S.R. Tannenbaum // J. Am. Chem. Soc. – 1991. – V. 113. – № 22. – P. 8505-8509.

158. Lindh, C.H. Characterization of adducts formed between human serum albumin and the butadiene metabolite epoxybutanediol / C.H. Lindh, M.H. Kristianson, U.A. Berg-Anderson, A.S. Cohen // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2005. – V. 19. – № 18. – P. 2488-2496.

159. Sabbioni, G. Chemical and physical properties of the major serum albumin adduct of aflatoxin B1 and their implications for the quantification in biological samples / G. Sabbioni // Chemico-Biol. Interact. – 1990. – V. 75. – N_{2} 1. – P. 1-15.

160. Guengerich, F.P. Reaction of Aflatoxin B1 Oxidation Products with Lysine / F.P. Guengerich, K.O. Arneson, K.M. Williams, Z. Deng, T.M. Harris // Chem. Res. Toxicol. – $2002. - V. 15. - N_{2} 6. - P. 780-792.$

161. Turell, L. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes / L. Turell, R. Radi, B. Alvarez // Free Radic. Biol. Med. – 2013. – V. 65. – P. 244-253.

162. He, X.M. Atomic structure and chemistry of human serum albumin / X.M. He, D.C.
Carter // Nature. – 1992. – V. 358. – № 6383. – P. 209-215.

163. Aldini, G. A tandem MS precursor-ion scan approach to identify variable covalent modification of albumin Cys34: A new tool for studying vascular carbonylation / G. Aldini, L. Regazzoni, M. Orioli, L, Rimoldi, R.M. Facino, M. Carini // J. Mass Spectrom. – 2008. – V. 43. – N_{2} 11. – P. 1470-1481.

164. Noort, D. Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard in vitro and in vivo: Mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure / D. Noort, A.G. Hulst, L.P. de Jong, H.P. Benschop // Chem. Res. Toxicol. – 1999. – V. 12. – N_{2} 8. – P. 715-721.

165. Peng, L. Mapping Serum Albumin Adducts of the Food-Borne Carcinogen 2-Amino-1methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by Data-Dependent Tandem Mass Spectrometry / L. Peng, S. Dasari, D.L. Tabb, R.J. Turesky // Chem. Res. Toxicol. – 2012. – V. 25. – № 10. – P. 2179-2193.

166. Li, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411 / B. Li, L.M. Schopfer, S.H. Hinrichs, P. Masson, O. Lockridge // Anal. Biochem. – 2007. – V. 361. – № 2. – P. 263-272.

167. Li, B. Binding and hydrolysis of soman by human serum albumin / B. Li, F. Nachon,
M.T. Froment, L. Verdier, J.C. Debouzy, B. Brasme, E. Gillon, L.M. Schopfer, O. Lockridge,
P. Masson // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – V. 21. – № 2. – P. 421-431.

168. Means, G.E. The reactive tyrosine residue of human serum albumin: characterization of its reaction with diisopropylfluorophosphate / G.E. Means, H.L. Wu // Arch. Biochem. Biophys. $-1979. - V. 194. - N_{\odot} 2. - P. 526-530.$

169. Ding, S.J. Five tyrosines and two serines in human albumin are labeled by the organophosphorus agent FP-biotin / S.J. Ding, J. Carr, J.E. Carlson, L. Tong, W. Xue, Y. Li, L.M. Schopfer, B. Li, F. Nachon, O. Asojo, C.M. Thompson, S.H. Hinrichs, P. Masson, O. Lockridge // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – V. 21. – № 9. – P. 1787-1794.

170. Read, R.W. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphylated butyrylcholinesterase and phosphylated albumin after oxime therapy / R.W. Read, J.R. Riches, J.A. Stevens, S.J. Stubbs, R.M. Black // Arch Toxicol. – 2010. – V. 84. – $N_{\rm P}$ 1. – P. 25-36.

171. Lockridge, O. Review of tyrosine and lysine as new motifs for organophosphate binding to proteins that have no active site serine / O. Lockridge, L.M. Schopfer // Chem. Biol. Interact. $-2010. - V. 187. - N_{2} 1-3. - P. 344-348.$

Mangas, I. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases / I. Mangas, J. Estervez, E. Vilanova, T.C. França // Toxicology. – 2017. – V. 376. – P. 30-43.

173. Carini, M. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins / M. Carini, G. Aldini, R.M. Facino // Mass Spectrom. Rev. – $2004. - V. 23. - N_{2}4. - P. 281-305.$

174. Wu, Q. Interaction of bisphenol A 3, 4-quinone metabolite with human hemoglobin, human serum albumin and cytochrome c in vitro / Q. Wu, H. Zhao, X. Chen, Z. Cai // Chemosphere. – 2019. – V. 220. – P. 930-936.

175. Chu, S. Exploring adduct formation between human serum albumin and eleven organophosphate ester flame retardants and plasticizers using MALDI-TOF/TOF and LC-Q/TOF / S. Chu, M.R. Baker, G. Leong, R.J. Letcher, S.J. Gee, B.D. Hammock, Q.X. Li // Chemosphere. - 2017. - V. 180. - P. 169-177.

176. Chu, S. Covalent binding of the organophosphate insecticide profenofos to tyrosine on α - and β -tubulin proteins / S. Chu, M.R. Baker, G. Leong, R.J. Letcher, Q.X. Li // Chemosphere. – 2018. – V. 199. – P. 154-159.

177. Anhalt, J.P. Identification of bacteria using mass spectrometry / J.P. Anhalt, C. Fenselau
// Anal. Chem. – 1975. – V. 47. – № 2. – P. 219-225.

178. Seng, P. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry / P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.E. Fourmier, J.M. Rolain, D. Raoult // Clin. Infect. Dis. – 2009. – V. 49. – Nº 4. – P. 543-551.

179. Fenselau, C. Characterization of intact microorganisms by Maldi mass spectrometry / C.
Fenselau, P.A. Demirev // Mass Spectrom. Rev. – 2001. – V. 20. – № 4. – P.157-171.

180. Cherkaoui, A. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level / A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois, J. Schrenzel // J. Clin. Microbiol. $-2010. - V. 48. - N_{2} 4. - P. 1169-1175.$

181. van Baar, B.L. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry / B.L. van Baar // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. - V. 24. - N = 2. - P. 193-219.

182. Sandrin, T.R. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review / T.R.
Sandrin, J.E. Goldstein, S. Schumaker // Mass Spectrom. Rev. – 2013. – V. 32. – №3. –
P. 188-217.

183. Wieser, A. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review) / A. Wieser, L. Schneider. J. Jung, S. Schubert // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 93. – № 3. – P. 965-974.

184. Fenselau, C. Proteomic strategies for rapid characterization of microorganisms / C. Fenselau, S. Russel, S. Swatkoski, N. Edwards // Eur. J. Mass Spectrom. – 2007. – V. 13. – №1. – P. 35-39.

185. Hathout, Y. Identification of Bacillus Spores by Matrix-Assisted LaserDesorption Ionization–Mass Spectrometry / Y. Hathout, P.A. Demirev, Yen-Peng Ho, J.L. Bundy, V. Ryzhov, L. Sapp, J. Stutler, J. Jackman, C. Fenselau // Appli. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65. – № 10. – P. 4313-4319.

186. Lasch, P. Identification of Bacillus anthracis by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks / P. Lasch, W. Beyer, H. Nattermann, M. Stammler, E. Siegbrecht, R. Grunow, D. Naumann // Appli. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – № 22. – P. 7229-7242.

187. Lohmann, C. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry / C. Lohmann, M. Sabou, W. Moussaoui, G. Prévost, J.-M. Delarbre, E. Candolfi, A. Gravet, V. Letscher-Bru // J. Clin. Microbiol. – 2013. – V. 51. – № 4. – P. 1231-1236.

188. Alby, K. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis / K. Alby, P.H. Gilligan, M.B. Miller // J. Clin. Microbiol. – 2013. – V. 51. – $N_{2}11.$ – P. 3852-3854.

189. Kaltashov, I.A. Studies of biomolecular conformations and conformational dynamics by mass spectrometry / I.A. Kaltashov, S.J. Eyles // Mass Spectrom. Rev. – 2002. – V. 21. – № 1. – P. 37-71.

190. Idelevich, E.A. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay / E. A. Idelevich, K. Sparbier, M. Kostrzewa, K. Becker // Clin. Microbiol. Infect. – 2018. – V. 24. – № 7. – P. 738-743.

191. Kostrzewa, M. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms / M. Kostrzewa, K. Sparbier, T. Maier, S. Schubert // Proteom. – Clin. Appl. – 2013. – V. 7. – № 11-12. – P. 767-778.

192. Calderaro, A. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification / A. Calderaro, M.C. Arcangeletti, I. Rodighiero, M. Buttrini, C. Gorrini, F. Motta, D. Germini, M.C. Medici, C. Chezzi, F. De Conto // Sci. Rep. $-2014. - V. 4. - N \ge 1. - P. 1-10.$

193. Cobo, F. Application of maldi-tof mass spectrometry in clinical virology: a review / F. Cobo // Open Virol. J. – 2013. – V. 7. – № 1. – P. 84-90.

194. Singhal, N. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects / N. Singhal, M. Kumar, J.S. Virdi // Parasitology. – 2016. – V. 143. – № 12. – P. 1491-1500.

195. Huguenin, A. MALDI TOF mass spectrometry: a new tool for rapid identification of cercariae (Trematoda, Digenea) / A. Huguenin, J. Depaquit, I. Villena, H. Fertre // Parasite. – 2019. – V. 26. – P. 11

196. Cassagne, C. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification / C.
Cassagne, A.-C. Normand, C. L'Ollivier, S. Ranque, R. Piarroux // Mycoses. – 2016. – V. 59.
– № 11. – P. 678-690.

197. Patel, R. A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification / R. Patel // J. Fungi. $-2019. - V. 5. - N_{2} 1. - P. 4.$

198. Ouedraogo, R. "Whole-cell MALDI-TOF MS: a new tool to assess the multifaceted activation of macrophages / R. Ouedraogo, A. Daumas, E. Ghigo, C. Capo, J.-L. Mege, J. Textoris // J. Proteom. – 2012. – V. 75. – № 18. – P. 5523-5532.

199. Westphal, Y. MALDI-TOF MS and CE-LIF fingerprinting of plant cell wall polysaccharide digests as a screening tool for Arabidopsis cell wall mutants / Y. Westphal, H. A. Schols, A. G. J. Voragen, H. Gruppen // J. Agric. Food Chem. – 2010. – V. 58. – \mathbb{N} 8. – P. 4644-4652.

200. Majchrzykiewicz-Koehorst, J.A. Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry / J.A. Majchrzykiewicz-Koehorst, E. Heikens, H. Trip, A.G. Hulst, A.L. de Jong, M.C. Viveen, N.J.A. Sedee, J. van der Plas, F.E.J. Coenjaerts, A. Paauw // J. Virol. Methods. – 2015. – V. 213. – P. 75-83.

201. Iles, R.K. Development of a clinical MALDI-ToF mass spectrometry sssay for SARS-CoV-2: rational design and multi-disciplinary team work / R.K. Iles, R. Zmuidinaite, J.K. Iles, G. Carnell, A. Sampson, J.L. Heeney // Diagnostics. – 2020. – V. 10. – P. 746.

202. Yan, L. Rapid detection of COVID-19 using MALDI-TOF-based serum peptidome profiling / L. Yan, J. Yi, C. Huang, J. Zhang, S. Fu, Z. Li, Q. Lyu, Y. Xu, K. Wang, H. Yang, Q. Ma, X. Cui, L. Qiao, W. Sun, P. Liao // Anal. Chem. – 2021. – V. 93. – № 11. – P. 4782-4787.

203. Tran, N. Novel application of automated machine learning with Maldi-Tof-Ms for rapid high-throughput screening of COVID-19: a proof of concept / N. Tran, T. Howard, R. Walsh, J. Pepper, J. Loegering, B. Phinney, M. Salemi, H. Rashidi // Sci. Rep. – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 8219.

204. Sivanesan, I. Consolidating the potency of matrix-assisted laser desorption/ionizationtime of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in viral diagnosis: Extrapolating its applicability for COVID diagnosis? / I. Sivanesan, J. Gopal, R.S. Vinay, E.H. Luke, J.W. Oh, M. Muthu // TrAC Trends Anal. Chem. – 2022. – V. 150. – P. 116569.

205. Bader, O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology / O. Bader // Proteomics. – 2013. – V. 13. – № 5. – P. 788-799.

206. Vella, A. Potential use of MALDI-ToF mass spectrometry for rapid detection of antifungal resistance in the human pathogen Candida glabrata / A. Vella, E. De Carolis, E. Mello, D.S. Perlin, D. Sanglard, M. Sanguinetti, B. Posteraro // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – $N_{\rm P}$ 1. – P. 1-9. 207. Culha, G. Leishmaniasis in Turkey: determination of Leishmania species by matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) / G. Culha, I. Akyar, F.Y. Zeyrek, Ö. Kurt, C. Gündüz, S.Ö. Töz, I. Östan, I. Cavus, B. Gülkan, T. Kocagöz, Y. Özbel, A. Özbilgin // Iran. J. Parasitol. – 2014. – V. 9. – № 2. – P. 239-248.

208. Magnuson, M.L. Characterization of Cryptosporidium parvum by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / M.L. Magnuson, J.H. Owens, C.A. Kelty // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66. – № 11. – P. 4720-4724.

209. Kim, J. Comparative proteomic analysis of trophozoites versus cysts of Giardia lamblia / J. Kim, S.-S. Bae, M.-H. Sung, K.-H. Lee, S.-J. Park // Parasitol. Res. – 2009. – V. 104. – № 2. – P. 475-479.

210. Calderaro, A. MALDI-TOF mass spectrometry for the detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar / A. Calderaro, M. Piergianni, M. Buttrini, S. Montecchini, G. Piccolo, C. Gorrini, S. Rossi, C. Chezzi, M.C. Arcangeletti, M.C. Medici, F. De Conto // PLoS One. $-2015. - V. 10. - N_{\odot} 4. - P. e0122448.$

211. Zhang, A.Y. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in faecal bacteria from 30 Giant pandas / A.Y. Zhang, H.N. Wang, G.B. Tian, Y. Zhang, X. Yang, Q.Q. Xia, J.N. Tang, L.K. Zou // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2009. – V. 33. – № 5. – P. 456-460.

212. Alizadeh, N. Aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens / N.
Alizadeh, M.Y. Memar, S.R. Moaddab, H.S. Kafil // Biomed. Pharmacother. – 2017. – V. 93.
– P. 737-745.

213. Soro-Yao, A.A. The Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry, Ribotyping and Phenotypic Tests to Identify Lactic Acid Bacteria from Fermented Cereal Foods in Abidjan (Côte d'Ivoire) / A.A. Soro-Yao, P. Schumann, P. Thonart, K.M. Djè, R. Pukall // Open Microbiol. J. $-2014. - V. 8. - N_{2} 1. - P. 78-86.$

214. Böhme, K. Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Grampositive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting / K. Böhme, I. C. Fernández-No, J. Barros-Velázquez, J. M. Gallardo, B. Cacas, P. Calo-Mata // Electrophoresis. – 2011. – V. 32. – № 21. – P. 2951-2965.

215. Fernández-Olmos, A. MALDI-TOF MS improves routine identification of nonfermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients / A. Fernández-Olmos, M. García-Castillo, M.-I. Morosini, A. Lamas, L. Máiz, R. Cantón // J. Cyst. Fibr. – 2012. – V. 11. – № 1. – P. 59-62.

216. Bille, E. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, Aspergillus spp. and positive blood cultures / E. Bille, B. Dauphin, J. Leto, M.E. Bougnoux, J.L. Beretti, A. Lotz, S. Suarez, J. Meyer, O. Join-Lambert, P. Descamps, N. Grall, F. Mory, L. Dubreuil, P. Berche, X. Nassif, A. Ferroni // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – V. 18. – № 11. – P. 1117-1125.

217. Veloo, A.C.M. The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS / A.C.M. Veloo, G.W. Welling, J.E. Degener // Anaerobe. -2011. - V. 17. - N = 4. - P. 211-212.**218.** Sun, L. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of Lactobacillus plantarum / L. Sun, K. Teramoto, H. Sato, M. Torimura, H. Tao, T. Shintani // Rapid Commun. Mass Spectrom. -2006. - V. 20. - N = 24. - P. 3789-3798.

219. Deng, C. Exploring serological classification tree model of active pulmonary tuberculosis by magnetic beads pretreatment and MALDI-TOF MS analysis / C. Deng, M. Lin, C. Hu, Y. Li, Y. Gao, X. Cheng, F. Zhang, M. Dong, Y. Li // Scand. J. Immunol. – 2011. – V. 74. – № 4. – P. 397-405.

220. Kuehne, S.A. The role of toxin A and toxin B in Clostridium difficile infection / S.A. Kuehne, S.T. Cartman, J.T. Heap, M.L. Kelly, A. Cockayne, N.P. Minton // Nature. – 2010. – V. 467. – № 7316. – P. 711-713.

221. Rauchhaus, M. The endotoxinlipoprotein hypothesis / M. Rauchhaus, A.J. Coats, S.D. Anker // Lancet. – 2000. – V. 356. – № 9233. – P. 930-933.

222. Kim, B.S. Spatiotemporal regulation of Vibrio exotoxins by HlyU and other transcriptional regulators / B.S. Kim // Toxins. $-2020. - V. 12. - N_{\odot} 9. - P. 544.$

223. Labandeira-Rey, M. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia / M. Labandeira-Rey, F. Couzon, S. Boisset, E.L. Brown, M. Bes, Y. Benito, E.M. Barbu, V. Vazquez, M. Höök, J. Etienne, F. Vandenesch, M.G. Bowden // Science. – 2007. – V. 315. – № 5815. – P. 1130-1133.

224. Bittar, F. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin / F. Bittar, Z. Ouchenane, F. Smati, D. Raoult, J.-M. Rolain // Int. J. Antimicrob. Agents. $-2009. - V. 34. - N_{\odot} 5. - P. 467-470.$

225. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 2010. - V. 74. - № 3. - P. 417-433.

226. Idelevich, E.A. Rapid Direct Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures by the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay / E.A. Idelevich, L.M. Storck, K. Sparbier, O. Drews, M. Kostrzewa, K. Becker // J. Clin. Microbiol. – 2018. – V. 56. – № 10. – P.e00913-18.

227. Lu, W.-J. Determination of drug efflux pump efficiency in drug-resistant bacteria using MALDI-TOF MS / W.-J. Lu, H.-J. Lin, P.-H. Hsu, H.-T. V. Lin // Antibiotics. – 2020. – V. 9. – № 10. – Р. 639.

228. Wilke, M.S. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective / M. S. Wilke, A. L. Lovering, N. C. Strynadka // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – V. 8. – No 5. – P. 525-533.

229. Edwards-Jones, V. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillinresistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry / V. Edwards-Jones, M. A. Claydon, D. J. Evason, J. Walker, A. J. Fox, D. B. Gordon // J. Med. Microbiol. – 2000. – V. $49. - N_{2} 3. - P. 295-300.$

Welker, M. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research / W.
Welker, J. Fastner, M. Erhard, H. von Döhren // Environ. Toxicol. – 2002. – V. 17. – № 4. –
P. 367-374.

231. Grant, G.A. Comparison of MALDI-TOF mass spectrometric to enzyme colorimetric quantification of glucose from enzyme-hydrolyzed starch / G.A. Grant, S.L. Frison, J. Yeung, T. Vasanthan, P. Sporns // J. Agric. Food Chem. – 2003. – V. 51. – № 21. – P. 6137-6144.

232. Harvey, D.J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of phospholipids / D.J. Harvey // J. Mass Spectrom. – 1995. – V. 30. – № 9. – P.1333–1346.

233. Griffiths, W.J. Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids / W.J. Griffiths // Mass Spectrom. Rev. – 2003. – V. 22. – № 2. – P. 81-152.

234. Guo, Z. A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry / Z. Guo, Q. Zhang, H. Zou, B. Guo, J. Ni // Anal. Chem. -2002. - V. 74. - N ? 7. - P. 1637-1641.

235. Yang, H. Isoliquiritigenin (4,2',4'-trihydroxychalcone): a new matrix-assisted laser desorption/ionization matrix with outstanding properties for the analysis of neutral oligosaccharides / H. Yang, J. Wang, F. Song, Y. Zhou, S. Liu // Anal. Chim. Acta. – 2011. – V. 701. – № 1. – P. 45-51.

236. Pan, C. Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS / C. Pan, S. Xu, H. Zhou, Y. Fu, M. Ye, H. Zou // Anal. Bioanal. Chem. $-2007. - V.387. - N \ge 1. - P.193-204.$

237. Wang, C.H. High-sensitivity matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry analyses of small carbohydrates and amino acids using oxidized carbon nanotubes prepared by chemical vapor deposition as matrix / C.H. Wang, J. Li, S.J. Yao, Y.L. Guo, X.H. Xia // Anal. Chim. Acta. $-2007. - V. 604. - N_{\odot} 2. - P. 158-164.$

238. Tholey, A. Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives / A. Tholey, E. Heinzle // Anal. Bioanal. Chem. – $2006. - V.386. - N_{2} 1. - P.24-37.$

239. van Kampen, J.J. Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry / J.J. van Kampen, P. C. Burgers, R. de Groot, T.M. Luider // Anal. Chem. $-2006. - V. 78. - N_{2} 15. - P. 5403-5411.$

240. Ayorinde, F.O. Use of meso- tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry / F.O. Ayorinde, P. Hambright, T.N. Porter, Q.L. Keith Jr // Rapid. Commun. Mass Spectrom. – 1999. – V. 13. – N_{2} 24. – P. 2474-2479.

241. Dong, X. Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS / X. Dong, J. Cheng, J. Li, Y. Wang // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – № 14. – P. 6208-6214.

242. Lu, M. Matrix interference-free method for the analysis of small molecules by using negative ion laser desorption/ionization on graphene flakes / M. Lu, Y. Lai, G. Chen, Z. Cai // Anal. Chem. $-2011. - V. 83. - N_{\odot} 8. - P. 3161-3169.$

243. Tholey, A. Derivatization of small biomolecules for optimized matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / A. Tholey, C. Wittman, M.J. Kang, D. Bungert, K. Hollemeyer, E. Heinzle // J. Mass Spectrom. – 2002. – V. 37. – № 9. – P. 963-973.

244. Denekamp, C. Tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)methyl carbenium ion for charge derivatization of amines and amino acids / C. Denekamp, J. Lacour, B. Laleu, E. Rabkin // J. Mass Spectrom. $-2008. - V. 43. - N_{2} 5. - P. 623-627.$

245. Wang, H. N-Alkylpyridinium isotope quaternization for matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of cholesterol and fatty alcohols in human hair / H. Wang, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, Y. Guo // Anal. Chim. Acta. $-2011. - V.690. - N_{\rm P} 1. - P.1-9.$

246. Wang, H. Improvement and extension of the application scope for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis-oriented N-alkylpyridinium isotope quaternization / H. Wang, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, J. Leng, T. Cai, Y. Guo // Anal. Chim. Acta. – 2011. – V. 707. – № 1-2. – P. 100-106.

247. Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides / J. Zaia // Mass Spectrom. Rev. – 2004.
- V. 23. – № 3. – P. 161-227.

248. Gouw, J.W. Derivatization of small oligosaccharides prior to analysis by matrixassisted laser desorption/ionization using glycidyltrimethylammonium chloride and Girard's reagent T / J.W. Gouw, P.C. Burgers, M.A. Trikoupis, J.K. Terlouw // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2002. –V. 16. – No 10. – P. 905-912.

Yerra, N.V. 2- cyano-3-(2-thienyl)acrylic acid as a new MALDI matrix for the analysis of a broad spectrum of analytes / N.V. Yerra, B. Dyaga, S.B. Dadinaboyina, S. Pandeti, J.R. Vaidya, J.C. Tabet, J.R. Thota // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2021. – V. 32. – № 1. – P. 387-393.

250. Zhang, Y. Ammonia-treated N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride as a novel matrix for rapid quantitative and qualitative determination of serum free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry / Y. Zhang, Y. Wang, S. Guo, Y. Guo, H. Liu, Z. Li // Anal. Chim. Acta. – 2013. – V. 794. – P. 82-89.

251. Ayorinde, F.O. Use of meso- tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry / F.O. Ayorinde, P. Hambright, T.N. Porter, Q.L. Keith Jr. // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1999. – V. 13. – N24. – P. 2474-2479.

252. van Kampen, J.J. Metal ion attachment to the matrix mesotetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin, related matrices and analytes: an experimental and theoretical study / J.J. van Kampen, T.M. Luider, P.J. Ruttink, P.C. Burgers // J. Mass Spectrom. – $2009. - V. 44. - N_{2} 11. - P. 1556-1564.$ **253.** Ayorinde, F.O. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / F.O. Ayorinde, K. Garvin, K. Saeed // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. –V. 14. – № 17. – P. 608-615.

254. Schiller, J. Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and 31P NMR spectroscopy / J. Schiller, R. Süß, M. Petković, K. Arnold // J. Food Lipids. – 2002. – V. 9. – № 3. – P. 185-200.

255. Capomacchia, A.C. Valence tautomerism of singly protonated 9-aminoacridine and its implications for intercalative interactions with nucleic acids / A.C. Capomacchia, S. Schulamn // J. Pharm. Sci. – 1974. – V. $63. – N_{\odot} 8. – P. 1272-1276.$

256. Shroff, R. Analysis of low molecular weight acids by negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / R. Shroff, A. Muck, A. Svatoš // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2007. – V. 21. – № 20. – P. 3295-3300.

257. Li, B. 3-Aminophthalhydrazide (Luminol) as a matrix for dual-polarity MALDI MS imaging / B. Li, R. Sun, A. Gordon, J. Ge, Y. Zhang, P. Li, H. Yang // Anal. Chem. – 2019. – V. 91. – № 13. – P. 8221-8228.

258. Shroff, R. 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene: a novel superbasic matrix for MALDI-TOF/MS analysis of fatty acids / R. Shroff, A. Svatoš // Rapid Commun. Mass Spectrom. –
2009. – V. 23. – № 15. – P. 2380-2382.

259. Eibisch, M. Time-dependent intensity changes of free fatty acids detected by matrixassisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry in the presence of 1,8-bis-(dimethylamino)naphthalene - a cautionary note / M. Eibisch, R. Süß, J. Schiller // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2012. – V. 26. – Nº 13. – P. 1573-1576.

260. Weißflog, J. 1,8-Di(piperidinyl)-naphthalene - rationally designed MAILD/MALDI matrix for metabolomics and imaging mass spectrometry / J. Weißflog, A. Svatoš // RSC Adv. – 2016. – V. 6. – № 79. – P. 75073-75081.

261. Calvano, C.D. 1,8-bis(dimethylamino) naphthalene/9-aminoacridine: a new binary matrix for lipid fingerprinting of intact bacteria by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry / C.D. Calvano, A. Monopoli, N. Ditaranto, F. Palmisano // Anal. Chim. Acta. – 2013. – V. 798. – P. 56-63.

262. Kobylis, P. Review of the applicability of ionic liquid matrices for the quantification of small molecules by MALDI MS / P. Kobylis, P. Stepanowski, M. Caban // Microchem. J. – 2021. –V. 164. – P. 1059-1083.

263. Park, K.H. Analysis of fatty acids by graphite plate laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry / K.H. Park, H.J. Kim // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2001. – V. 15. – № 16. – P. 1494-1499.

264. Ren, J. Simultaneous quantification of serum nonesterified and esterified fatty acids as potential biomarkers to differentiate benign lung diseases from lung cancer / J. Ren, D. Zhang, Y. Liu, R. Zhang, H. Fang, S. Guo, D. Zhou, M. Zhang, Y. Xu, L. Qiu, Z. Li // Sci. Rep. – 2016. –V. 6. – P. 34201.

265. Budimir, N. The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of negative ions for fatty acids / N. Budimir, J.C. Blais, F. Fournier, J.C. Tablet // Rapid Commun. Mass Spectrom. $-2006. - V. 20. - N \cdot 4. - P. 680-684.$

266. Jaschinski, T. Laser desorption/ionization mediated by bionanostructures from microal-gae / T. Jaschinski, A. Svatoš, G. Pohnert // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2013. – V. 27.
– № 1. – P. 109-116.

267. Pirkl, A. Analysis of free fatty acids by ultraviolet laser desorption ionization mass spectrometry using insect wings as hydrophobic sample substrates / A. Pirkl, M. Meier, Y. Popkova, M. Letzel, A. Schnapp, J. Schiller, K. Dreisewerd // Anal Chem. – 2014. – V. 86. – N_{2} 21. – P. 10763-10771.

268. Aichler, M. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice / M. Aichler, A. Walch // Lab. Invest. – 2015. – V. 95. – № 4. – P. 422-431.

269. Norris, J.L. Imaging mass spectrometry: a new tool for pathology in a molecular age / J.L. Norris, R.M. Caprioli // Proteomics. Clin. Appl. – 2013. – V. 7. – № 11-12. – P. 733-738.

270. Norris, J.L. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research / J.L. Norris, R.M. Caprioli // Chem. Rev. $-2013. - V. 113. - N_{2} 4. - P. 2309-2342.$

271. Caprioli, R.M. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS / R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile // Anal. Chem. – 1997. – V. 69. – № 23. – P. 4751-4760.

272. Stoeckli, M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues / M. Stoeckli, P. Chaurand, D.E. Hallahan, R.M. Caprioli // Nat. Med. $-2001. - V. 7. - N_{2} 4. - P. 493-496.$

273. Schwamborn, K. Molecular imaging by mass spectrometry–looking beyond classical histology / K. Schwamborn, R.M. Caprioli // Nat. Rev. Cancer. – 2010. – V. 10. – № 9. – P. 639-646.

274. Römpp, A. Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space / A. Römpp, B. Spengler // Histochem. Cell Biol. – 2013. – V. 139. – № 6. – P. 759-783.

275. Espina, V. Laser capture microdissection technology / V. Espina, M. Heiby, M. Pierobon, L.A. Liotta // Expert Rev. Mol. Diagn. $-2007. - V. 7. - N_{\odot} 5. - P. 647-657.$

276. Poté, N. Imaging mass spectrometry reveals modified forms of histone H4 as new biomarkers of microvascular invasion in hepatocellular carcinomas / N. Poté, T. Alexandrov, J. Le Faouder, S. Laouirem, T. Léger, M. Mebarki, J. Belghiti, J.M. Camadro, P. Bedossa, V. Paradis // Hepatology. – 2013. – V. 58. – № 3. – P. 983-994.

277. Djidja, M.C. Novel molecular tumour classification using MALDI-mass spectrometry imaging of tissue micro-array / M.C. Djidja, E. Claude, M.F. Snel, S. Francese, P. Scriven, V. Carolan, M. R. Clench // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – V. 397. – № 2. – P. 587-601.

278. Groseclose, M.R. High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffinembedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry / M.R. Groseclose, P.P. Massion, P. Chaurand, R.M. Caprioli // Proteomics. – 2008. – V. 8. – № 18. – P. 3715-3724.

279. Morita, Y. Imaging mass spectrometry of gastric carcinoma in formalin-fixed paraffinembedded tissue microarray / Y. Morita, K. Ikegami, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, N. Zaima, H. Tanaka, T. Uehara, T. Setoguchi, T. Sakaguchi, H. Igarashi, H. Sugimura, M. Setou, H. Konno // Cancer Sci. – 2010. – V. 101. – No 1. – P. 267-273.

280. Quaas, A. MALDI imaging on large-scale tissue microarrays identifies molecular features associated with tumour phenotype in oesophageal cancer / A. Quaas, A.S. Bahar, K. von Loga, A.S. Seddiqi, J.M. Singer, M. Omidi, O. Kraus, M. Kwiatkowski, M. Trusch, S. Minner, E. Burandt, P. Stahl, W. Wilczak, M. Wurlitzer, R. Simon, G. Sauter, A. Marx, H. Schlüter // Histopathology. – 2013. –V. 63. – № 4. – P. 455-462.

281. Steurer, S. MALDI mass spectrometric imaging based identification of clinically relevant signals in prostate cancer using large-scale tissue microarrays / S. Steurer, C. Borkowski,

S. Odinga, M. Buchholz, C. Koop, H. Huland, M. Becker, M. Witt, D. Trede, M. Omidi, O. Kraus, A.S. Bahar, A.S. Seddiqi, J.M. Singer, M. Kwiatkowski, M. Trusch, R. Simon, M. Wurlitzer, S. Minner, T. Schlomm, G. Sauter, H. Schlüter // Int. J. Cancer. – 2013. – V. 133. – № 4. – P. 920-928.

282. Steurer, S. MALDI imaging on tissue microarrays identifies molecular features associated with renal cell cancer phenotype / S. Steurer, A.S. Seddiqi, J.M. Singer, A.S. Bahar, C. Eichelberg, M. Rink, Roland Dahlem, Hartwig Huland, Guido Sauter, R. Simon, S. Minner, E. Burandt, P.R. Stahl, T. Schlomm, M. Wurlitzer, H. Schlüter // Anticancer Res. – 2014. – V. 34. – $N_{\rm D}$ 5. – P. 2255-2261.

283. Steurer, S. MALDI imaging-based identification of prognostically relevant signals in bladder cancer using large-scale tissue microarrays / S. Steurer, J.M. Singer, M. Rink, F. Chun, R. Dahlem, R. Simon, E. Burandt, P. Stahl, L. Terracciano, T. Schlomm, W. Wagner, W. Höppner, M. Omidi, O. Kraus, M. Kwiatkowski, O. Doh, M. Fisch, A. Soave, G. Sauter, M. Wurlitzer, H. Schlüter, S. Minner // Urol. Oncol. – 2014. – V. 32. – № 8. – P. 1225-1233.

284. Aichler, M. Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria / M. Aichler, M. Elsner, N. Ludyga, A. Feuchtinger, V. Zangen, S.K. Maier, B. Balluff, C. Schöne, L. Hierber, H. Braselmann, S. Meding, S. Rauser, H. Zischka, M. Aubele, M. Schmitt, M. Feith, S.M. Hauck, M. Ueffing, R. Langer, B. Kuster, H. Zitzelsberger, H. Höfler, A.K. Walch // J. Pathol. – 2013. – V. 230. – № 4. – P. 410419.

285. Rujoi, M. In situ MALDI-TOF MS regional analysis of neutral phospholipids in lens tissue / M. Rujoi, R. Estrada, M.C. Yappert // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – № 6. – P. 1657-1663.

286. Astigarraga, E. Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrixassisted laser desorption/ ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix / E. Astigarraga, G. Barreda-Gómez, L. Lombardero, O. Fresnedo, F. Castaño, M.T. Giralt, B. Ochoa, R. Rodríguez-Puertas, J.A. Fernández // Anal. Chem. – 2008. – V. 80. – № 23. – P. 9105-9114.

287. Meriaux, C. Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids / C. Meriaux, J. Franck, M. Wisztorski, M. Salzet, I. Fournier // J. Proteomics. – 2010. – V. 73. – № 6. – P. 1204-1218.

Wang, X. Comprehensive imaging of porcine adrenal gland lipids by MALDI-FTMS using quercetin as a matrix / X. Wang, J. Han, J. Pan, C.H. Borchers // Anal. Chem. – 2014. – V. 86. – № 1. – P. 638-646.

289. Kurabe, N. Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4 / N. Kurabe, T. Hayasaka, M. Ogawa, N. Masaki, Y. Ide, M. Waki, T. Nakamura, K. Kurachi, T. Kahyo, K. Shinmura, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, M. Setou, H. Sugimura // Cancer Sci. – 2013. – V. 104. – № 10. – P. 1295-1302.

290. Pirman, D.A. Quantitative MALDI tandem mass spectrometric imaging of cocaine from brain tissue with a deuterated internal standard / D.A. Pirman, R.F. Reich, A. Kiss, R.M.A. Heeren, R.A. Yost // Anal. Chem. -2013 - V. 85 - N = 2 - P. 1081-1089.

291. Drexler, D.M. Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues / D.M. Drexler, T.J. Garrett, J.L. Cantone, R.W. Diters, J.G. Mitroka, M.C.P. Conaway, S.P. Adams, R.A. Yost, M. Sanders // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. $-2007. - V.55. - N_{2}3. - P.279-288.$

292. Reyzer, M.L. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by MAL-DI imaging mass spectrometry / M.L. Reyzer, P. Chaurand, P.M. Angel, R.M. Caprioli // Methods Mol. Biol. – 2010. – V. 656. – P. 285-301.

293. Sugiura, Y. Imaging mass spectrometry for visualization of drug and endogenous metabolite distribution: toward in situ pharmacometabolomes / Y. Sugiura, M. Setou // J. Neuroimmune Pharmacol. – 2010. – V. 5. – \mathbb{N} 1. – P. 31-43.

294. Prideaux, B. Applications of MALDI-MSI to pharmaceutical research / B. Prideaux, D. Staab, M. Stoeckli // Methods Mol. Biol. – 2010. – V. 656. – P. 405-413.

295. Miura, D. Ultrahighly sensitive in situ metabolomic imaging for visualizing spatiotemporal metabolic behaviors / D. Miura, Y. Fujimura, M. Yamato, F. Hyodo, H. Utsumi, H. Tachibana, H. Wariishi // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – № 23. – P. 9789-9796.

296. Bao, Y. Energy management by enhanced glycolysis in G1-phase in human colon cancer cells in vitro and in vivo / Y. Bao, K. Mukai, T. Hishiki, A. Kubo, M. Ohmura, Y. Sugiura, T. Matsuura, Y. Nagahata, N. Hayakawa, T. Yamamoto, R. Fukuda, H. Saya, M. Suematsu, Y.A. Minamishima // Mol. Cancer Res. – 2013. – V. 11. – № 9. – P. 973-985.

297. Huber, K. A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies in tissues / K. Huber, A. Feuchtinger, D.M.

Borgmann, Z. Li, M. Aichler, S.M. Hauck, H. Zitzelsberger, M. Schwaiger, U. Keller, A. Walch // Anal. Chem. – 2014. – V. 86. – № 21. – P. 10568-10575.

298. Porath, J. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation / J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage // Nature. $-1975. - V. 258. - N_{\text{P}} 5536. - P. 9-49.$

299. Pearson, R.G. Hard and soft acids and bases / R.G. Pearson // J. Am. Chem. Soc. – 1963. – V. 85. – № 22. – P. 3533-3539.

300. Chaga, G. Isolation and characterization of catalase from Penicillium chrysogenum / G. Chaga, A. Medin, S. Chaga, J. Porath // J. Chromatogr. – 1992. – V. 604. – № 1. – P. 177-183.

301. Andersson, L. Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal (Fe3+) Affinity Chromatography / L. Andersson, J. Porath // Anal. Biochem. – 1986. – V. 154. – № 1. – P. 250-254.

302. Fanou, A. Metal-chelate affinity chromatography as a separation tool / A. Fanou, M. Vijayalakshmi // Acad. Sci. – 1983. – V. 413. – P. 300-306.

303. Porath, J. Cascade-mode multiaffinity chromatography: fractionation of human serum proteins / J. Porath, P. Hansen // J. Chromatogr. – 1991. – V. 550. – № 1-2. – P. 751-764.

304. Bacolod, M. High-performance metal chelate interaction chromatography of proteins with silica-bound ethylenediamine-N,N'-diacetic acid / M. Bacolod, Z. el Rassi // J. Chromatogr. A. – 1990. – V. 512. – P. 237-247.

305. Chaouk, H. Examination of the protein binding behaviour of immobilised copper (II)-2,6-diaminomethylpyridine and its application in the immobilised metal ion affinity chromatographic separation of several human serum proteins / H. Chaouk, M.T. Hearn // J. Biochem. Biophys. Methods. – 1999. – V. 39. – N_{0} 3. – P. 61-77.

306. Hansen, P. Immobilized metal ion affinity chromatography of synthetic peptides. Binding via the alpha-amino group / P. Hansen, G. Lindenberg, L. Andersson // J. Chromatogr. – 1992. – V. 627. – № 1-2. – P. 125-135.

307. Andersson, L. Evaluation of the interaction of protein alpha-amino groups by immobilized metal ion affinity chromatography / L. Andersson, E. Sulkowski // J. Chromatogr. – 1992. – V. 604. – № 1. – P. 13-27.

308. Smith, R.M. Critical stability constants, enthalpies and entropies for the formation of metal complexes of aminopolycarboxylic acids and carboxylic acids / R.M. Smith, A.E. Martell // Sci. Total Environ. – 1987. – V. 64. – N_{2} 1-2. – P. 125-147.

309. McCurley, M.F. On the nature of immobilized tris(carboxymethyl)ethylenediamine / M.F. McCurley, W.R. Seitz // Talanta. – 1989. – V. 36. – № 1-2. – P. 341-346.

310. Bunescu, A. Fate of the nitrilotriacetic acid-Fe(III) complex during photodegradation and biodegradation by Rhodococcus rhodochrous / A. Bunescu, P. Besse-Hoggan, M. Sancelme, G. Mailhot, A.M. Delort // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – № 20. – P. 6320-6326.

311. Chaga, G.S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future / G.S. Chaga // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2001. – V. 49. – № 1-3. – P. 313-334.

312. Li, Y. Preparation of Fe3O4-ZrO2 core-shell microspheres as affinity probes for selective enrichment and direct determination of phosphopeptides using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry / Y. Li, T. Leng, H. Lin, C. Deng, X. Xu, N. Yao, P. Yang, X. Zhang // J. Proteome Res. $-2007. - V. 6. - N_{2} 11. - P. 4498-4510.$

313. Ritter, S. Immobilized metal affinity chromatography for the separation of photosystems I and II from the thermophilic cyanobacterium Synechococcus elongates / S. Ritter, J. Komenda, E. Setlíkova I. Setlik, W. Welte // J. Chromatogr. – 1992. – V. 625. – N_{2} 1. – P. 21-31.

314. Muszyńska, G. Model studies on iron(III) ion affinity chromatography. II. Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins / G. Muszyńska, G. Dobrowolska, A. Medin, P. Ekman, J.O. Porath // J. Chromatogr. – 1992. – V. 604. – № 1. – P. 19-28.

315. Chavan, A.J. NAD+ binding site of Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase.
Identification of peptide in the adenine ring binding domain using 2-azido NAD / A.J. Chavan,
Y. Nemoto, S. Narumiya, S. Kozaki, B.E. Haley // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267. – № 21. –
P. 14866-14870.

316. el Rassi, Z. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminodiacetic acid-bonded stationary phases on silica support / Z. el Rassi, C. Horváth // J. Chromatogr. A. – 1986. – V. 359. – P. 241-253.

317. Horváth, Zs. Imino-diacetic-acid-ethyl-cellulose and its chelate forming behaviour—I / Zs. Horváth, Gy. Nagydiósi // J. Inorg. Nucl. Chem. – 1975. – V. 37. – № 3. – P. 767-769.

318. Sulkowski, E. Immobilized metal ion affinity chromatography of proteins on IDA-Fe3+ / E. Sulkowski // Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia. – 1988. – V. 17. – № 1. – P. 335-348.

319. Beitle, R. Immobilized metal affinity chromatography and related techniques (in: New Developments in Bioseparanon) / R. Beitle, M. Ataai; M. Ataai, S. Sikdar (Eds.) New York: American Institute of Chemical Engineers, 1992. P. 34-44.

320. Leitner, A. Phosphopeptide Enrichment Using Metal Oxide Affinity Chromatography // Trend. Anal. Chem. – 2010. – V. 29. – № 2. – P. 177-185.

321. Hasan, N. Highly Selective and Sensitive Enrichment of Phosphopeptides via NiO Nanoparticles Using a Microwave-Assisted Centrifugation on-Particle Ionization/Enrichment Approach in MALDI-MS / N. Hasan, H.F. Wu //Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – V. 400. – № 10. – P. 3451-3462.

322. Chen, W.Y. Functional Fe3O4@ZnO Magnetic Nanoparticle-Assisted Enrichment and Enzymatic Digestion of Phosphoproteins from Saliva / W.Y. Chen, Y.C. Chen // Anal. Bio-anal. Chem. – 2010. – V. 398. – № 5. – P. 2049-2057.

323. Li, Y. Fe3O4@Al2O3 Magnetic Core-Shell Microspheres for Rapid and Highly Specific Capture of Phosphopeptides with Mass Spectrometry Analysis / Y. Li, Y.C. Liu, J. Tang, H.Q. Lin, N. Yao, X.Z. Shen, C.H. Deng, P.Y. Yang, X.M. Zhang // J. Chromatogr. A. – 2007. – V. 1172. – № 1. – P. 57-71.

324. Han, L. Mesoporous Fe2O3 Microspheres: Rapid and Effective Enrichment of Phosphopeptides for MALDI-TOF MS Analysis / L. Han, Z. Shan, D.H. Chen, X.J. Yu, P.Y. Yang, B. Tu, D.Y. Zhao // J. Colloid. Interface Sci. – 2008. – V. 318. – № 2. – P. 315-321.

325. Li, Y. Highly Selective and Rapid Enrichment of Phosphorylated Peptides Using Gallium Oxide-Coated Magnetic Microspheres for MALDI-TOF-MS and Nano-LC-ESI-MS/MS/MS Analysis / Y. Li, H.Q. Lin, C.H. Deng, P.Y. Yang, X.M. Zhang // Proteomics. – 2008. – V. 8. – № 2. – P. 238-249.

326. Larsen, M.R. Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns / M.R. Larsen, T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff, T.J. Jorgensen // Mol. Cell. Proteomics. – 2005. – V. 4. – № 7. – P. 873-886.

327. Kweon, H.K. Selective Zirconium Dioxide-Based Enrichment of Phosphorylated Peptides for Mass Spectrometric Analysis / H.K. Kweon, K. Håkansson, // Anal. Chem. – 2006. – V. 78. – № 6. – P. 1743-1749.

328. Sturm, M. Tin Dioxide Microspheres as a Promising Material for Phosphopeptide Enrichment Prior to Liquid Chromatography-(Tandem) Mass Spectrometry Analysis / M. Sturm, A. Leitner, J.-H. Smått, M. Lindén, W. Lindner // Adv. Funct. Mater. – 2008. – V. 18. – № 16. – P. 2381-2389.

329. Rivera, J.G. Enrichment/Isolation of Phosphorylated Peptides on Hafnium Oxide Prior to Mass Spectrometric Analysis / J.G. Rivera, Y.S. Choi, S. Vujcic, T.D. Wood, L.A. Colon // Analyst. – 2009. – V. 134. – № 1. – P. 31-33.

330. Ficarro, S.B. Niobium(V) Oxide (Nb2O5): Application to Phosphoproteomics / S.B. Ficarro, J.R. Parikh, N.C. Blank, A.J. Marto // Anal. Chem. – 2008. – V. 80. – № 12. – P. 4606-4613.

331. Qi, D.W. Development of Core-Shell Structure Fe3O4@Ta2O5 Microspheres for Selective Enrichment of Phosphopeptides for Mass Spectrometry Analysis / D.W. Qi, J. Lu, C.H. Deng, X.M. Zhang // J. Chromatogr. A. – 2009. – V. 1216. – № 29. – P. 5533-5539.

332. Winzerling, J.J. How to use immobilized metal ion affinity chromatography / J.J. Winzerling, P. Berna, J. Porath // Methods. $-1992. - V. 4. - N_{2} 1. - P. 4-13.$

333. Vargas-Cortez, T. Expression and purification of recombinant proteins in Escherichia coli tagged with a small metal-binding protein from Nitrosomonas europaea / T. Vargas-Cortez, J.R. Morones-Ramirez, I. Balderas-Renteria, X. Zarate // Protein Expr. Purif. – 2016. – V. 118. – P. 49-54.

334. Bornhorst, J.A. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags / J.A. Bornhorst, J.J. Falke // Methods Enzymol. – 2000. – V. 326. – P. 245.

335. Металл-хелатная аффинная хроматография: учебно-методич. пособие / сост.: И.С. Охрименко и В.В. Чупин. – М.: МФТИ, 2014. – 24 с.

336. Magdeldin, S. Affinity chromatography: Principles and applications (in: Affinity chromatography) / S. Magdeldin, A. Moser; S. Magdeldin (Ed.) London: Intech Open, 2012.

337. Todorova-Balvay, D. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments / D. Todorova-Balvay, O. Pitiot, M. Bourhim, T. Srikrishnan, M. Vijayalakshmi // J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci. – 2004. – V. 808. – N_{2} 1. – P. 57-62.
338. González-Ortega, O. Purification of human serum immunoglobulins using immobilized metal affinity chromatography with ethylenediamine triacetic acid as chelating agent / O. González-Ortega, R. Guzmán // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technolog. – 2015. – V. 38. – № 1. – P. 74-81.

339. Bakhshpour, M. [PHEMA/PEI]–Cu(II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma / M. Bakhshpour, A. Derazshamshir, N. Bereli, A. Elkak, A. Denizli // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. – 2016. – V. 61. – P. 824-831.

340. Thygesen, C. Characterizing disease-associated changes in post-translational modifications by mass spectrometry / C. Thygesen, I. Boll, B. Finsen, M. Modzel, M.R. Larsen // Expert Rev. Proteomics. $-2018. - V. 15. - N_{2} 3. - P. 245-258.$

341. Yin, X. Phosphoproteomics: Protein Phosphorylation in Regulation of Seed Germination and Plant Growth / X. Yin, X. Wang, S. Komatsu // Curr. Protein Pept. Sci. – 2018. – V. 19. – № 4. – P. 401-412.

342. Lampe, P.D. The Effects of Connexin Phosphorylation on Gap Junctional Communication / P.D. Lampe, A.F. Lau // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2004. – V. 36. – № 7. – P. 1171-1186.

343. Mayr, B. Transcriptional Regulation by The Phosphorylation-Dependent Factor CREB /
B. Mayr, M. Montminy // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2001. – V. 2. – № 8. – P. 599-609.

344. O'Connor, D.S. Regulation of Apoptosis at Cell Division by p34cdc2 Phosphorylation of Survivin / D.S. O'Connor, D. Grossman, J. Plescia, F. Li, H. Zhang, A. Villa, S. Tognin, P.C. Marchisio, D.C. Altieri // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2000. – V. 97. – № 24. – P. 13103-13107.

345. Piovesana, S. Magnetic materials for the selective analysis of peptide and protein biomarkers / S. Piovesana, A.L. Capriotti // Curr. Med. Chem. – 2017. – V. 24. – № 5. – P. 438-453.

346. La Barbera, G. Development of an enrichment method for endogenous phosphopeptide characterization in human serum / G. La Barbera, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, F. Ferraris, M. Laus, S. Piovesana, K. Sparnacci, A. Laganà // Anal. Bioanal. Chem. – 2018. – V. 410. – № 3. – P. 1177-1185.

347. La Barbera, G. Saliva as a source of new phosphopeptide biomarkers: Development of a comprehensive analytical method based on shotgun peptidomics / G. La Barbera, A.L. Capriot-

ti, C. Cavaliere, F. Ferraris, C.M. Montone, S. Piovesana, R.Z. Chiozzi, A. Laganà // Talanta. – 2018. – V. 183. – P. 245-249.

348. Mann, M. Analysis of Protein Phosphorylation Using Mass Spectrometry: Deciphering the Phosphoproteome / M. Mann, S.E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O.N. Jensen, A. Pandey // Trends Biotechnol. – 2002. – V. 20. – № 6. – P. 261-268.

349. Beltran, L. Advances in Phosphopeptide Enrichment Techniques for Phosphoproteomics / L. Beltran, P.R. Cutillas // Amino Acids. – 2012. – V. 43. – № 3. – P. 1009-1024.

350. Yao, J. Recent advances in mesoporous materials for sample preparation in proteomics research / J. Yao, N. Sun, C. Deng // TrAC Trends Anal. Chem. – 2018. – V. 99. – P. 88-100.

351. Li, X.S. Recent advances in phosphopeptide enrichment: Strategies and techniques / X.S. Li, B.F. Yuan, Y.-Q. Feng // TrAC Trends Anal. Chem. – 2016. – V. 78. – P. 70-83.

352. Osinalde, N. Targeted mass spectrometry: An emerging powerful approach to unblock the bottleneck in phosphoproteomics / N. Osinalde, K. Aloria, M.J. Omaetxebarria, I. Kratchmarova // J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2017. – V. 1055–1056. – P. 29-38.

353. Jiang, J. Facile synthesis of Fe3O4@PDA core-shell microspheres functionalized with various metal ions: A systematic comparison of commonly-used metal ions for IMAC enrichment / J. Jiang, X. Sun, Y. Li, C. Deng, G. Duan // Talanta. – 2018. – V. 178. – P. 600-607.

354. Shi, C. Immobilized metal ion affinity chromatography ZipTip pipette tip with polydopamine modification and Ti4+ immobilization for selective enrichment and isolation of phosphopeptides / C. Shi, C. Deng // Talanta. – 2015. – V. 143. – P. 464-468.

355. Su, J. Adenosine Phosphate Functionalized Magnetic Mesoporous Graphene Oxide Nanocomposite for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides / J. Su, X. He, L. Chen, Y. Zhang // ACS Sustain. Chem. Eng. – 2018. – V. 6. – № 2. – P. 2188-2196.

356. Zhang, L. Synthesis of adenosine functionalized metal immobilized magnetic nanoparticles for highly selective and sensitive enrichment of phosphopeptides /L. Zhang, Q. Zhao, Z. Liang, K. Yang, L. Sun, L. Zhang, Y. Zhang // Chem. Commun. – 2012. – V. 48. – № 50. – P. 6274-6276.

357. Capriotti, A.L. New Ti-IMAC magnetic polymeric nanoparticles for phosphopeptide enrichment from complex real samples / A.L. Capriotti, C. Cavaliere, F. Ferraris, V. Gianotti,

M. Laus, S. Piovesana, K. Sparnacci, R.Z. Chiozzi, A. Laganà // Talanta. – 2018. – 178. – P. 274-281.

358. Capriotti, A.L. Effect of shell structure of Ti-immobilized metal ion affinity chromatography core-shell magnetic particles for phosphopeptide enrichment / A.L. Capriotti, M. Antonelli, D. Antonioli, C. Cavaliere, R. Chiarcos, V. Gianotti, S. Piovesana, K. Sparnacci, M. Laus, A. Laganà // Sci. Rep. – 2019. – V. 9. – N_{2} 1. – P. 15782.

359. Wang, Z.G. Development of the Affinity Materials for Phosphorylated Proteins/Peptides Enrichment in Phosphoproteomics Analysis / Z.G. Wang, N. Lv. W.Z. Bi, J.L. Zhang, J.Z. Ni // ACS Appl. Mater. Interfaces. $-2015. - V. 7. - N_{\text{P}} 16. - P. 8377-83792.$

360. Yang, D.S Design and synthesis of an immobilized metal affinity chromatography and metal oxide affinity chromatography hybrid material for improved phosphopeptide enrichment / D.S. Yang, X.Y. Ding, H.P. Min, Li B., M.X. Su, M.M. Niu, B. Di, F. Yan // J. Chromatogr. A. – 2017. V. 1505. – P. 56-62.

361. Xie, Y. Designed synthesis of a "One for Two" hydrophilic magnetic aminofunctionalized metal-organic framework for highly efficient enrichment of glycopeptides and phosphopeptides / Y. Xie, C. Deng // Sci. Rep. $-2017. - V. 7. - N_{\text{P}} 1. - P. 1162.$

362. Sharafeldin M. Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins / M. Sharafeldin, G.W. Bishop, S. Bhakta, A. El-Sawy, S.L. Suib, J.F. Rusling // Biosens. Bioelectron. – 2017. – V. 91. – P. 359-366.

363. Kinoshita, E. Phosphate-Binding Tag, a New Tool to Visualize Phosphorylated Proteins
/ E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, T. Koike // Mol. Cell Proteomics. – 2006. –
V. 5. – № 4. – P. 749-757.

364. Thingholm, T. E. Phosphopeptide Enrichment by Immobilized Metal Affinity Chromatography/ T. E. Thingholm, M. R. Larsen // Methods Mol. Biol. – 2016. – V. 1355. – P. 123-133.

365. Ficarro, S.B. Magnetic Bead Processor for Rapid Evaluation and Optimization of Parameters for Phosphopeptide Enrichment / S.B. Ficarro, G. Adelmant, M.N. Tomar, Y. Zhang, V.J. Cheng, J.A. Marto // Anal. Chem. – 2009. – V. 81. – № 11. – P. 4566-4575.

366. Wang, X. A new Ti-based IMAC nanohybrid with high hydrophilicity and enhanced absorption capacity for the selective enrichment of phosphopeptides / X. Wang, J. Yu, H.

Yang, J. Shen, H. Liu, J. Zhou // J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci. – 2021. – V. 1179

367. Huang, J. Dual-Functional Ti(IV)-IMAC Material Enables Simultaneous Enrichment and Separation of Diverse Glycopeptides and Phosphopeptides /J. Huang, X. Liu, D. Wang, Y. Cui, X. Shi, J. Dong, M. Ye, L. Li // Anal. Chem. – 2021. – V. 93. – № 24. – P. 8568-8576.
368. Diez, I.A. Zirconium(IV)-IMAC Revisited: Improved Performance and Phosphoproteome Coverage by Magnetic Microparticles for Phosphopeptide Affinity Enrichment / I.A. Diez, I. Govender, P. Naicker, S. Stoychev, J. Jordaan, O.N. Jensen // J. Proteome Res. – 2021. – V. 20. – N. 1. – P. 453-462.

369. Zhao, P.X. Zirconium Arsenate-Modified Silica Nanoparticles for Specific Capture of Phosphopeptides and Direct Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry / P.X. Zhao, X.F. Guo, H. Wang, C.B. Qi, H.S. Xia, H.S. Zhang // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – V. 402. – № 3. – P. 1041-1056.

370. Qin, Z. N. Preparation of zirconium arsenate-modified monolithic column for selective enrichment of phosphopeptides / Z. N. Qin, X. Chen, W.Q. Yu, J. Ding, Y. Q. Feng // J. Sep. Sci. -2021. - V. 44. - N 2. - P. 609-617.

371. Stanghellini, P.L. Vibrational Study of Some Layered Structures Based on Titanium and Zirconium Phosphates / P.L. Stanghellini, E. Boccaleri, E. Diana, G. Alberti, R. Vivani // Inorg. Chem. – 2004. – V. 43. – № 18. – P. 5698-5703.

372. Nonglaton, G. New Approach to Oligonucleotide Microarrays Using Zirconium Phosphonate-Modified Surfaces / G. Nonglaton, I.O. Benitez, I. Guisle, M. Pipelier, J. Léger, D. Dubreuil, C. Tellier, D. R. Talham, B. Bujoli // J. Am. Chem. Soc. – 2004. – V. 126. – № 5. – P. 1497-1502.

373. Zhou, H.J. Zirconium Phosphonate-Modified Porous Silicon for Highly Specific Capture of Phosphopeptides and MALDI-TOF MS Analysis / H.J. Zhou, S.Y. Xu, M.L. Ye, S. Feng, C.S. Pan, X.G. Jiang, X. Li, G.H. Han, Y. Fu, H.F. Zou // J. Proteome Res. – 2006. – V. 5. – № 9. – P. 2431-2437.

374. Wei, J.Y. Highly Efficient Enrichment of Phosphopeptides by Magnetic Nanoparticles Coated with Zirconium Phosphonate for Phosphoproteome Analysis / J.Y. Wei, Y.J. Zhang, J.L. Wang, F. Tan, J.F. Liu, Y. Cai, X.H. Qian // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2008. – V. 22. – № 7. – P. 1069-1080.

375. Qin, W.J. Surface Initiated Atom Transfer Radical Polymerization: Access to Three Dimensional Wavelike Polymer Structure Modified Capillary Columns for Online Phosphopeptide Enrichment / W.J. Qin, W.J. Zhang, L.N. Song, Y.J. Zhang, X.H. Qian // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – № 22. – P. 9461-9468.

376. Zhao, L. A Poly(ethylene glycol)-Brush Decorated Magnetic Polymer for Highly Specific Enrichment of Phosphopeptides / L. Zhao, H.Q. Qin, Z.Y. Hu, Y. Zhang, R.A. Wu, H.F. Zou // Chem. Sci. – 2012. – V. 3. – № 9. – P. 2828-2838.

377. Hucknall, A. Simple Fabrication of Antibody Microarrays on Nonfouling Polymer Brushes with Femtomolar Sensitivity for Protein Analytes in Serum and Blood / A. Hucknall, D.-H. Kim, S. Rangarajan, R. T. Hill, W. M. Reichert, A. Chilkoti // Adv. Mater. – 2009. – V. 21. – № 19. – P. 1968-1971.

378. Lu, J. Facile Synthesis of Zirconium Phosphonate-Functionalized Magnetic Mesoporous Silica Microspheres Designed for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides / J. V. 3. Lu, Υ. Li, C.H. Deng // Nanoscale. _ 2011. – 3. _ № P. 1225-1233.

379. Wang, P.Y. Phosphonic Acid Functionalized Periodic Mesoporous Organosilicas and Their Potential Applications in Selective Enrichment of Phosphopeptides / P.Y. Wang, L. Zhao, R.A. Wu, H. Zhong, H.F. Zou, J. Yang, Q.H. Yang // J. Phys. Chem. C. $-2009. - V. 113. - N_{2} 4. - P. 1359-1366.$

380. Zhou, H.J. Specific Phosphopeptide Enrichment with Immobilized Titanium Ion Affinity Chromatography Adsorbent for Phosphoproteome Analysis / H.J. Zhou, M.L. Ye, J. Dong, G.H. Han, X.N. Jiang, R.A. Wu, H.F. Zou // J. Proteome Res. – 2008. – V. 7. – № 9. – P. 3957-3967.

381. Ma, W.F. Ti4+-Immobilized Magnetic Composite Microspheres for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides / W.F. Ma, Y. Zhang, L.L. Li, Y.T. Zhang, M. Yu, J. Guo, H.J. Lu, C.C. Wang // Adv. Funct. Mater. – 2013. – V. 23. – № 1. – P. 107-115.

382. Shen, F. Ti4+-Phosphate Functionalized Cellulose for Phosphopeptides Enrichment and Its Application in Rice Phosphoproteome Analysis / F. Shen, Y.F. Hu, P. Guan, X.Q. Ren // J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed Life Sci. – 2012. – V. 902. – P. 108-115.

383. Shen, F. Facile Preparation of Titanium Phosphate-Modified Chitosan for Selective Capture of Phosphopeptides / F. Shen, Y.F. Hu, P. Guan, X.Q. Ren // J. Sep. Sci. – 2013. – V. 36. – № 3. – P. 540-547.

384. Wang, Z.G. Novel Ti4+- Chelated Magnetic Nanostructured Affinity Microspheres Containing N-methylene Phosphonic Chitosan for Highly Selective Enrichment and Rapid Separation of Phosphopeptides / Z.G. Wang, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // J. Mater. Chem. B. – 2014. – V. 2. – № 39. – P. 6886-6892.

385. Zhang, L.Y. Synthesis of Adenosine Functionalized Metal Immobilized Magnetic Nanoparticles for Highly Selective and Sensitive Enrichment of Phosphopeptides / L.Y. Zhang, Q. Zhao, Z. Liang, K.G. Yang, L.L. Sun, L.H. Zhang, Y.K. Zhang // Chem. Commun. – 2012. – V. 48. – № 50. – P. 6274-6276.

386. Tan, S. A porous graphene sorbent coated with titanium(IV)-functionalized polydopamine for selective lab-in-syringe extraction of phosphoproteins and phosphopeptides / S. Tan, J. Wang, Q. Han, Q. Liang, M. Ding // Mikrochim. Acta. – 2018. – V. 185. – № 7. – P. 316.

387. Sturm, M. Tin Dioxide Microspheres as a Promising Material for Phosphopeptide Enrichment Prior to Liquid Chromatography-(Tandem) Mass Spectrometry Analysis / M. Sturm, A. Leitner, J.-H. Smått, M. Lindén, W. Lindner // Adv. Funct. Mater. – 2008. – V. 18. – № 16. – P. 2381-2389.

388. Lu, Z.D. Mesoporous TiO2 Nanocrystal Clusters for Selective Enrichment of Phosphopeptides / Z.D. Lu, J.C. Duan, L. He, Y.X. Hu, Y.D. Yin // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – № 17. – P. 7249-7258.

389. Lu, Z.D. Self-Assembled TiO2 Nanocrystal Clusters for Selective Enrichment of Intact Phosphorylated Proteins / Z.D. Lu, M.M. Ye, N. Li, W.W. Zhong, Y.D. Yin // Angew. Chem., Int. Ed. – 2010. – V. 49. – № 10. – P. 1862-1866.

390. Zhang, L.Y. Mesoporous TiO2 Aerogel for Selective Enrichment of Phosphopeptides in Rat Liver Mitochondria / L.Y. Zhang, Q. Zhao, Z. Liang, K.G. Yang, S.M. Xia, Q. Wu, L.H. Zhang, Y.K. Zhang // Anal. Chim. Acta. – 2012. – V. 729. – P. 26-35.

391. Zhang, L.Y. Zirconium Oxide Aerogel for Effective Enrichment of Phosphopeptides with High Binding Capacity / L.Y. Zhang, J. Xu, L.L. Sun, J.F. Ma, K.G. Yang, Z. Liang, L.H. Zhang, Y.K. Zhang // Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – V. 399. – № 10. – P. 3399-3405.

392. Batalha, Í. L. Phosphopeptide Enrichment Using Various Magnetic Nanocomposites:
An Overview / Í. L. Batalha, A. C. Roque // Methods Mol. Biol. – 2016. – V. 1355. –
P. 193-209.

393. Zhong, H.Y. Mass Spectrometric Analysis of Mono- and Multi-Phosphopeptides by Selective Binding with NiZnFe2O4 Magnetic Nanoparticles / H.Y. Zhong, X. Xiao, S. Zheng,

W.Y. Zhang, M.G. Ding, H.Y. Jiang, L.L. Huang, J. Kang // Nat. Commun. – 2013. – V. 4. – P. 1656-1662.

394. Kweon, H.K. Selective Zirconium Dioxide-Based Enrichment of Phosphorylated Peptides for Mass Spectrometric Analysis / H.K. Kweon, K. Håkansson // Anal. Chem. 2006. – V. 78. – № 6. – P. 1743-1749.

395. Yu, Q.W. Sequential enrichment with titania-coated magnetic mesoporous hollow silica microspheres and zirconium arsenate-modified magnetic nanoparticles for the study of phosphoproteome of HL60 cells / Q.W. Yu, X.S. Li, Y. Xiao, L. Guo, F. Zhang, Q. Cai, Y.Q. Feng, B.F. Yuan, Y. Wang // J. Chromatogr. A. – 2014. – V. 1365. – P. 54-60.

396. Li, L.P. SnO2-ZnSn(OH)6: a Novel Binary Affinity Probe for Global Phosphopeptide Detection / L.P. Li, T. Zheng, L.N. Xu, Z. Li, L.D. Sun, Z.X. Nie, Y. Bai, H.W. Liu // Chem. Commun. – 2013. – V. 49. – № 17. – P. 1762-1764.

397. Li, X. Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications / X. Li, J. Wei, K.E. Aifantis, Y. Fan, Q. Feng, F.Z. Cui, F.J. Watari // Biomed. Mater. Res. A. – 2016. – V. 104. – № 5. – P. 1285-1296.

398. Li, W.W. Facile Synthesis of Fe3O4@TiO2-ZrO2 and Its Application in Phosphopeptide Enrichment / W.W. Li, Q.L. Deng, G.Z. Fang, Y. Chen, J. Zhan, S. Wang // J. Mater. Chem. B. – 2013. – V. 1. – № 14. – P. 1947-1961.

399. Qi, D.W. Magnetically Responsive Fe3O4@C@SnO2 Core-Shell Microspheres: Synthesis, Characterization and Application in Phosphoproteomics / D.W. Qi, J. Lu, C.H. Deng, X.M. Zhang // J. Phys. Chem. C. – 2009. – V. 113. – № 36. – P. 15854-15861.

400. Ma, W.F. Magnetic MSP@ZrO2 Microspheres with Yolk-Shell Structure: Designed Synthesis and Application in Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides / W.F. Ma, C. Zhang, Y.T. Zhang, M. Yu, J. Guo, Y. Zhang, H.J. Lu, C.C. Wang // Langmuir. – 2014. – V. 30. – № 22. – P. 6602-6611.

401. Zhang, Y. Titania Composite Microspheres Endowed with a Size-Exclusive Effect Toward the Highly Specific Revelation of Phosphopeptidome / Y. Zhang, W.F. Ma, C. Zhang, C.C. Wang, H.J. Lu // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2014. – V. 6. – № 9. – P. 6290-6299.

402. Sun, X.Y. Magnetic boronate modified molecularly imprinted polymers on magnetite microspheres modified with porous TiO2 (Fe3O4@pTiO2@MIP) with enhanced adsorption capacity for glycoproteins and with wide operational pH range / X.Y. Sun, R.T. Ma, J. Chen, Y.P. Shi // Mikrochim. Acta. $-2018. - V. 185. - N_{2} 12. - P. 565$

403. Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon / S. Iijima // Nature. – 1991. – V. 354. – № 6348. – P. 56-58.

404. Allen, M.J. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene / M.J. Allen, V.C. Tung, R.B. Kaner // Chem. Rev. – 2010. – V. 110. – № 1. – P. 132-145.

405. Pang, H. Graphene Oxide Induced Growth of One-Dimensional Fusiform Zirconia Nanostructures for Highly Selective Capture of Phosphopeptides / H. Pang, Q.Y. Lu, F. Gao // Chem. Commun. – 2011. – V. 47. – № 42. – P. 11772-11774.

406. Fang, G. Highly Selective Capture of Phosphopeptides Using a Nano Titanium Dioxide-Multiwalled Carbon Nanotube Nanocomposite / G. Fang, W. Gao, Q. Deng, K. Qian, H. Han, S. Wang // Anal. Biochem. – 2012. – V. 423. – № 2. – P. 210-217.

407. Tang, L.A. High-Performance Graphene- Titania Platform for Detection of Phosphopeptides in Cancer Cells / L.A. Tang, J. Wang, T.K. Lim, X. Bi, W.C. Lee, Q. Lin, Y.T. Chang, C.T. Lim, K.P. Loh // Anal. Chem. – 2012. – V. 84. – № 15. – P. 6693-6700.

408. Cheng, G. Graphene-Templated Synthesis of Magnetic Metal Organic Framework Nanocomposites for Selective Enrichment of Biomolecules / G. Cheng, Z.G. Wang, S. Denagamage, S.Y Zheng // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2016. – V. 8. – № 16. – P. 10234-10242.

409. Yao, J. Designed synthesis of Graphene @titania @mesoporous silica hybrid material as size-exclusive metal oxide affinity chromatography platform for selective enrichment of endogenous phosphopeptides / J. Yao, N. Sun, C. Deng, X. Zhang // Talanta. – 2016. – V.150. – P. 296-301.

410. Stöber, W. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range / W. Stöber, A. Fink // J. Colloid Interface Sci. – 1968. – V. 26. – № 1. – P. 62-69.

411. He, X.M. Rapid Enrichment of Phosphopeptides by SiO2/TiO2 Composite Fibers / X.M. He, G. Zhu, X.S. Li, B.F. Yuan, Z. Shi, Y.Q. Feng // Analyst. – 2013. – V. 138. – № 18. – P. 5495-5502.

412. Li, X.S. Titanium-containing magnetic mesoporous silica spheres: effective enrichment of peptides and simultaneous separation of nonphosphopeptides and phosphopeptides / X.S. Li, X. Su, G.T. Zhu, Y. Zhao, B.F. Yuan, L. Guo, Y.Q. Feng // J. Sep. Sci. – 2012. – V. 35. – № 12. – P. 1506-13.

413. Yan, Y. Hierarchically ordered macro/mesoporous alumina nanoreactor with multifunctions in phosphoproteomics / Y. Yan, C. Deng, X. Zhang, P. Yang // Anal. Methods. – 2013. – V. 5. – №23. – P. 6572.

414. Lu, J. Hydrothermal Synthesis of α-Fe2O3@SnO2 Core-Shell Nanotubes for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides for Mass Spectrometry Analysis / J. Lu, D.W. Qi, C.H. Deng, X.M. Zhang, P.Y. Yang // Nanoscale. – 2010. – V. 2. – № 10. – P. 1892-1900.

415. Zhang, Y. Comparison of A Novel TiO2/Diatomite Composite and Pure TiO2 for the Purification of Phosvitin Phosphopeptides / Y. Zhang, J.H. Li, F.G. Niu, J. Sun, Y. Dou, Y.T. Liu, Y.J. Su, Y.J. Yang //J. Chromatogr. B. – 2014. – V. 960. – P. 52-58.

416. Duan, J.J. Magnetic Cellulose-TiO2 Nanocomposite Microspheres for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides / J.J. Duan, X.M. He, L.N. Zhang // Chem. Commun. – 2015. – V. 51. – № 2. – P. 338-341.

417. Wang, F.Q. Tuning of Ti-Doped Mesoporous Silica for Highly Efficient Enrichment of Phosphopeptides in Human Placenta Mitochondria / F.Q. Wang, Z.H. Shi, F. Hu, Z.R. Xia, L. Wang // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – V. 405. – № 5. – P. 1683-1693.

418. Xu, B. Selective Capture of Phosphopeptides by the Hierarchical Tialuminophosphate-5 Molecular Sieves / B. Xu, L.P. Zhou, F.J. Wang, H.Q. Qin, J. Zhu, H.F. Zou // Chem. Commun. – 2011. – V. 48. – № 12. – P. 1802-1804.

419. Lamprou, A. Preparation of Highly Porous Coordination Polymer Coatings on Macroporous Polymer Monoliths for Enhanced Enrichment of Phosphopeptides / A. Lamprou, H. Wang, A. Saeed, F. Svec, D. Britt, F. Maya // J. Vis. Exp. – 2015. – V. 101. – P. e52926.

420. Liu, Q. Magnetic Binary Metal–Organic Framework As a Novel Affinity Probe for Highly Selective Capture of Endogenous Phosphopeptides / Q. Liu, N. Sun, M. Gao, C. Deng // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2018. – V. 6. – № 3. – P. 4382-4389.

421. Eichhorn, G.L. Interactions of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. III. Degradation of Polyribonucleotides by Lanthanum Ions / G.L. Eichhorn, J.J. Butzow // Biopolymers. $-1965. - V. 3. - N_{2} 1. - P. 79-94.$

422. Ogata, H. Effect of Treating Hyperphosphatemia With Lanthanum Carbonate vs Calcium Carbonate on Cardiovascular Events in Patients With Chronic Kidney Disease Undergoing Hemodialysis: The LANDMARK Randomized Clinical Trial / H. Ogata, M. Fukagawa, H. Hirakata, T. Kagimura, M. Fukushima, T. Akizawa // JAMA. – 2021. – V. 325. – № 19. – P. 1946-1954. **423.** Guzel, Y. Highly Selective Recovery of Phosphopeptides Using Trypsin-Assisted Digestion of Precipitated Lanthanide-Phosphoprotein Complexes / Y. Guzel, M. Rainer, M.R. Mirza, C.B. Messner, G.K. Bonn // Analyst. – 2013. – V. 138. – № 10. – P. 2897-2905.

424. Jabeen, F. In-Tip Lanthanum Oxide Monolith for the Enrichment of Phosphorylated Biomolecules / F. Jabeen, M. Najam-Ul-Haq, M. Rainer, C.W. Huck, G.K. Bonn // Anal. Chem. – 2017. – V. 89. – № 19. – P. 10232-10238.

425. Pink, M. Precipitation by Lanthanum Ions: A Straightforward Approach to Isolating Phosphoproteins / M. Pink, N. Verma, F. Polato, G.K. Bonn, H.A. Baba, A.W. Rettenmeier, S. Schmitz-Spanke // J. Proteomics. – 2011. – V. 75. – № 2. – P. 375-383.

426. Li, Y. Cerium Ion-Chelated Magnetic Silica Microspheres for Enrichment and Direct Determination of Phosphopeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry / Y. Li, D.W. Qi, C.H. Deng, P.Y. Yang, X.M. Zhang // J. Proteome Res. – 2008. – V. 7. – N_{2} 4. – P. 1767-1777.

427. Wang, Z.G. Novel core-shell Ce(IV)-Immobilized Magnetic Polymeric Microspheres for Selective Enrichment and Rapid Separation of Phosphopeptides / Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // J. Colloid Interface Sci. – 2014. – V. 417. – P. 217-226.

428. Mirza, M. R. A New Type of Metal Chelate Affinity Chromatography Using Trivalent Lanthanide Ions for Phosphopeptide Enrichment / M.R. Mirza, M. Rainer, C.B. Messner, Y. Guezel, D. Schemeth, T. Stasyk, M.I. Choudhary, L.A. Huber, B.M. Rode, G.K. Bonn // Analyst. – 2013. – V. 138. – № 10. – P. 2995-3004.

429. Jabeen, F. Silica-Lanthanum Oxide: Pioneer Composite of Rare-Earth Metal Oxide in Selective Phosphopeptides Enrichment / F. Jabeen, D. Hussain, B. Fatima, S.G. Musharraf, C.W. Huck, G.K. Bonn, M. Najam-Ul-Haq // Anal. Chem. – 2012. – V. 84. – № 23. – P. 10180-10185.

Wang, M.M. Immobilization of a Ce (IV)-substituted polyoxometalate on ethylenediamine-functionalized graphene oxide for selective extraction of phosphoproteins / M.M. Wang,
S. Chen, D.D Zhang, Y.L. Yu, J.H. Wang // Mikrochim. Acta. – 2018. – V. 185. – №12. – P. 553.

431. Jia, W. Novel mass spectrometric method for phosphorylation quantification using cerium oxide nanoparticles and tandem mass tags / W. Jia, A. Andaya, Y.A. Leary // Anal. Chem. - 2012. - V. 84. - №5. - P. 2466-2473. **432.** Wang, Z.G. Facet-Dependent Effect of Well-Defined CeO2 Nanocrystals on the Adsorption and Dephosphorylation of Phosphorylated Molecules / Z.G. Wang, W.Z. Bi, S.C. Ma, N. Lv, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // Part. Part. Syst. Charact. – 2015. – V. 32. – № 6. – P. 652-660.

433. Cheng, G. Monodisperse REPO4 (RE = Yb, Gd, Y) Hollow Microspheres Covered with Nanothorns as Affinity Probes for Selectively Capturing and Labeling Phosphopeptides / G. Cheng, J.L. Zhang, Y.L. Liu, D.H. Sun, J.Z. Ni // Chem. Eur. J. -2012. -V. 18. -N 7. -P. 2014-2020.

434. Wang, Z.G. Fabrication of Novel Hierarchical Structured Fe3O4@LnPO4(Ln=Eu, Tb, Er) Multifunctional Microspheres for Capturing and Labeling Phosphopeptides / Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // Small. – 2012. – V. 8. – № 22. – P. 3456-3464.

435. Sun, Y. Ultrathin-yttrium phosphate-shelled polyacrylate-ferriferrous oxide magnetic microspheres for rapid and selective enrichment of phosphopeptides / Y. Sun, H.F. Wang // J. Chromatogr. A. – 2013. – V. 1316. – P. 62-68.

436. Cheng, G. A Graphene-Based Multifunctional Affinity Probe for Selective Capture and Sequential Identification of Different Biomarkers from Biosamples / G. Cheng, Z.G. Wang, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // Chem. Commun. – 2012. – V. 48. – № 82. – P. 10240-10242.

437. Cheng, G. Lanthanum Silicate Coated Magnetic Microspheres as a Promising Affinity Material for Phosphopeptide Enrichment and Identification / G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – V. 404. – № 3. – P. 763-770.

438. Wang, Z.G. Magnetic γ-Fe2O3@REVO4(RE=Sm, Dy, Ho) Affinity Microspheres for Selective Capture, Fast Separation and Easy Identification of Phosphopeptides / Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // J. Mater. Chem. B. – 2013. – V. 1. – № 10. – P. 1491-1500.

439. Wang, Z.G. Novel 3D Flowerlike Hierarchical γ -Fe2O3@xNH4F·yLuF3 Core-Shell Microspheres Tailor-Made by a Phase Transformation Process for the Capture of Phosphopeptides / Z.G. Wang, G. Cheng, Y.L. Liu, J.L. Zhang, D.H. Sun, J.Z. Ni // J. Mater. Chem. B. – 2013. – V. 1. – No 37. – P. 4845-4854.

440. Li, L.P. GdF3 as a Promising Phosphopeptide Affinity Probe and Dephospho-Labelling Media: Experiments and Theoretically Explain / L.P. li, J.Z. Liu, L.N. Xu, Z. Li, Y. Bai, Y.L. Xiao, H.W. Liu // Chem. Commun. – 2014. – V. 50. – № 78. – P. 11572-11575.

441. Xie, Y. Highly efficient enrichment of phosphopeptides by a magnetic lanthanide metal-organic framework / Y. Xie, C. Deng // Talanta. – 2016. – V. 159. – P. 1-6.

442. Urban, P.L. Lab-on-a-plate: Extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets / P.L. Urban, A. Amantonico, R. Zenobi // Mass Spectrom. Rev. $-2011. - V. 30. - N_{\odot} 3. - P. 435-478.$

443. Chen, X. Composite PVK/SLGO As Matrix for MALDI-TOF MS Detection of Small Molecules in Dual-Ion Mode / X. Chen, Y. Wang, Y. Luo, Z. Gao, T. Han, H. Zhou // ACS Omega. – 2022. – V. 7. – № 43. – P. 39028-39038.

444. McComb, M.E. Evaluation of an on-target sample preparation system for matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in conjunction with normal-flow peptide high-performance liquid chromatography for peptide mass fingerprint analyses / M.E. McComb, D.H. Perlman, H. Huang, C.E. Costello // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2007. – V. 21. – No 1. – P. 44-58.

445. Perlman, D.H. Coupling of protein HPLC to MALDI-TOF MS using an on-target device for fraction collection, concentration, digestion, desalting, and matrix/analyte cocrystallization / D.H. Perlman, H. Huang, C. Dauly, C.E. Costello, M.E. McComb // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – No 5. – P. 2058-2066.

446. Endres, K.J. Surface Layer Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging: A Surface Imaging Technique for the Molecular-Level Analysis of Synthetic Material Surfaces / K.J. Endres, J.A. Hill, K. Lu, M.D. Foster, C. Wesdemiotis // Anal. Chem. – 2018. – V. 90. – № 22. – P. 13427-13433.

447. Marmur, A. Super-hydrophobicity fundamentals: Implications to biofouling prevention / A. Marmur // Biofouling. – 2006. – V. 22. – № 1-2. – P. 107-115.

448. Yong, J. Superoleophobic surfaces / J. Yong, F. Chen, Q. Yang J. Huo, X. Hou // Chem. Soc. Rev. – 2017. – V. 46. – №14. – P.4168-4217.

449. Tuteja A. Robust omniphobic surfaces / A. Tuteja, W. Choi, J.M. Mabry, G.H. McKinley, R.E. Cohen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – № 47. – P. 18200-18205.

450. Hung, K.C. Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins / K.C. Hung, H. Ding, B. Guo // Anal. Chem. – 1999. – V. 71. – № 2. – P. 518-521.

451. Wang, J. MALDI MS sample preparation by using paraffin wax film: Systematic study and application for peptide analysis / J. Wang, R. Chen, M. Ma, L. Li // Anal. Chem. – 2008. – V. 80. – № 2. – P. 491-500.

452. Owen, S.J. Increasing sensitivity and decreasing spot size using an inexpensive, removable hydrophobic coating for matrix-assisted laser desorption/ionisation plates / S.J. Oswen, F.S. Meier, S. Brombacher, D.A. Volmer // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2003. – V. 17. – № 21. – P. 2439-2449.

453. Zhuo, H.Q. Mineral oil-, glycerol-, and vaseline-coated plates as matrix-assisted laser desorption/ionization sample supports for high-throughput peptide analysis / H.Q. Zhuo, L. Huang, L.J. Feng, H.Q. Huang // Anal. Biochem. -2008. - V. 378. - N 2. - P. 151-157.

454. Tucker, B. Hydrophobic/hydrophilic patterned surfaces for directed evaporative preconcentration / B. Tucker, M. Hermann, A. Mainguy, R. Oleschuk // Analyst. – 2020. – V. 145. – № 2. – P. 643-650.

455. Leung, S.M. A novel approach using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and prestructured sample supports (AnchorChip Technology) for proteomic profiling and protein identification / S.M. Leung, R.L. Pitts // Methods Mol. Biol. – 2008. – V. 441. – P. 57-70.

456. Ressine, A. Fabrication of sample target plate for MALDI-TOF MS using proton beam writing / A. Ressine, V. Auzelyte, P. Krisiansson, G. Marko-Varga, T. Laurell // Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B. – 2006. – V. 249. – № 1-2. – P. 715-718.

457. Jespersen, S. Attomole detection of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with the use of picolitre vials / S. Jespersen, W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, J. van der Greef, E. Litborn, U. Lindberg, J. Roeraade // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1994. – V. 8. – No 8. – P. 581-584.

458. Tu, T. Miniaturizing sample spots for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / T. Tu, M.L. Gross // TrAC Trends Anal. Chem. – 2008. – V. 28. – №7. – P. 833-841.

459. Marko-Varga, G. Disposable polymeric high-density nanovial arrays for matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry: I. Microstructure development

and manufacturing / G. Marko-Varga, S. Ekström, G. Heildin, J. Nilsson, T. Laurell // Electrophoresis. – 2001. – V. 22. – № 18. – P. 3978-3983.

460. Ekström, S. Integrated selective enrichment target – A microtechnology platform for matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry applied on protein biomarkers in prostate diseases / S. Ekström, L. Wallman, J. Malm, C. Becker, H. Lilja, T. Laurell, G. Marko-Varga // Electrophoresis. – 2004. – V. 25. – № 21-22. – P. 3769-3777.

461. Adler, B. Optimizing nanovial outlet designs for improved solid-phase extraction in the integrated selective enrichment target — ISET / B. Adler, T. Laurell, S. Ekström // Electrophoresis. – 2012. – V. 33. – № 21. – P. 3143-3150.

462. Greis, K.D. Mass spectrometry for enzyme assays and inhibitor screening: An emerging application in pharmaceutical research // Mass Spectrom. Rev. $-2007. - V. 26. - N \ge 3. - P.$ 324-339.

463. Monroe, E.B. Measuring salty samples without adducts with MALDI MS / E.B. Monroe, B.A. Koszczuk, J.L. Losh, J.C. Jurchen, J.V. Sweedler // Int. J. Mass Spectrom. – 2007. – V. 260. – № 2-3. – P. 237-242.

464. Longobardi, S. Hydrophobin-coated plates as matrix-assisted laser desorption/ionization sample support for peptide/protein analysis / S. Longobardi, A.M. Gravagnuolo, I. Rea, L. De Stefano, G. Marino, P. Giardina // Anal. Biochem. – 2014. – V. 449. – P. 9-16.

465. Trauger, S.A. High sensitivity and analyte capture with desorption/ionization mass spectrometry on silylated porous silicon / S.A. Trauger, E.P. Go, Z. Shen, J.V. Apon, B.J. Compton, E.S.P. Bouvier, M.G. Finn, G. Siuzdak // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – № 15. – P. 4484-4489.

466. Go, E.P. Selective metabolite and peptide capture/mass detection using fluorous affinity tags / E.P. Go, W. Uritboonthai, J.V. Apon, S.A. Trauger, A. Nordstrom, G. O'Maille, S.M. Brittain, E.C. Peters, G. Siuzdak // J. Proteome Res. – 2007. – V. 6. – № 4. – P. 1492-1499.

467. Jia, W. Rapid and automatic on-plate desalting protocol for MALDI-MS: Using imprinted hydrophobic polymer template / W. Jia, H. Wu, H. Lu, N. Li, Y. Zhang, R. Cai, P. Yang // Proteomics. – 2007. – V. 7. – № 15. – P. 2497-2506.

468. Zeng, Z. On-plate selective enrichment and self-desalting of peptides/proteins for direct MALDI MS analysis / Z. Zeng, Y. Wang, S. Shi, L. Wang, X. Guo, N. Lu // Anal. Chem. – 2012. – V. 84. – № 5. - P. 2118-2123.

469. Nelson, W.C. Incubated protein reduction and digestion on an electrowetting-ondielectric digital microfluidic chip for MALDI-MS / W.C. Nelson, I. Peng, G.A. Lee, J.A. Loo, R.L. Garrell, C.J. Kim // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – № 23. – P. 9932-9937.

470. Sorensen, M. Rapid microbial identification and colistin resistance detection via MAL-DI-TOF MS using a novel on-target extraction of membrane lipids / M. Sorensen, C.E. Chandler, F.M. Gardner, S. Ramadan, P.D. Khot, L.M. Leung, C.E. Farrance, D.R. Goodlett, R.K. Ernst, E. Nilsson // Sci. rep. – 2020. – V. 10. – N_{2} 1. – P. 21536.

471. Müller, W. H. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review / W.H. Müller, A. Verdin, E. De Pauw, C. Malherbe, G. Eppe // Mass spectrometry reviews. – 2022. – V. 41. – № 3. – P. 373-420.

472. Lazar, I.M. Microfluidic devices with mass spectrometry detection (in: Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques) / I.M. Lazar; J.P. Landers (Ed.) Boca Raton: CRC Press, 2007. P.1459-1505.

473. Reyes-Garcés, N. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions / N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G.A. Gómez-Ríos, M.N. Alam, E. Boyaci, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy, J. Pawliszyn // Anal. Chem. – 2018. – V. 90. – № 1. – P. 302-360.
474. Sachon, E. Characterization of N-palmitoylated human growth hormone by in situ liquid-liquid extraction and MALDI tandem mass spectrometry / E. Sachon, P.F. Nielsen, O.N. Jensen // J. Mass Spectrom. – 2007. – V. 42. – №6. – P. 724-734.

475. Hu, S. Lectin microarray / S. Hu, D.T. Wong // Proteomics. Clinical applications. – 2009. – V. 3. – № 2. – P.148-154.

476. Yang, C. Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics / C. Yang, X. Zhong, L. Li // Electrophoresis. – 2014. – V. 35. – № 24. – P. 3418-3429.

477. Zhou H. Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis / H. Zhou, R. Tian, M. Ye, S. Xu, S. Feng, C. Pan, X. Jiang, X. Li, H. Zou // Electrophoresis. – 2007. – V. 28. – № 13. – P. 2201-2215.

478. Blacken, G. In situ enrichment of phosphopeptides on MALDI plates functionalized by reactive landing of zirconium(IV)–n-propoxide ions / G. Blacken, M. Volný, T. Vaisar, M. Sadilek, F. Turecek // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – № 14. – P. 5449-5456.

479. Blacken, G. Reactive landing of gas-phase ions as a tool for the fabrication of metal oxide surfaces for in situ phosphopep-tide enrichment / G. Blacken, M. Volný, M. Diener, K. Jackson, P. Ranjitkar, D. Maly, F. Turecek // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2009. – V. 20. – № 6. – P. 915-926.

480. Krásný, L. In-situ enrichment of phosphopeptides on MALDI plates modified by ambient ion landing / L. Krásný, P. Pompach, M. Strohalm, V. Obsilova, M. Strnadová, P. Novák, M. Volný // J. Mass Spectrom. – 2012. – V. 47. – № 10. – P. 1294-1302.

481. Kannen, H. Improvement in Ionization Efficiency Using Metal Oxide Nanoparticles in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of a Cancer Drug / H. Kannen, Y. Miyoshi, H. Hazama, K. Awazu // Mass spectrometry (Tokyo, Japan). – 2021. – V. 10. – № 1. – P. A0099.

482. Arakawa, R. Functionalized nanoparticles and nanostructured surfaces for surfaceassisted laser desorption/ionization mass spectrometry / R. Arakawa, H. Kawasaki // Anal. Sci. - 2010. - V. 26. - № 12. - P. 1229-1240.

483. Chen, C. A novel titanium dioxide-polydimethylsiloxane plate for phosphopeptide enrichment and mass spectrometry analysis / C. Chen, C. Lai, M. Tseng, Y.C. Liu, Y.H. Liu, L. Chiou, F. Tsai // Anal. Chim. Acta. – 2014. – V. 812. – P. 105-113.

484. Dunn, J. Phosphopeptide enrichment using MALDI plates modified with high-capacity polymer brushes / J. Dunn, E. Igrisan, A. Palumbo, G. Reid, M. Bruening // Anal. Chem. – 2008. – V. 80. – № 15. – P. 5727-5735.

485. Lin, H. Preparation of a TiO2-NH2 modified MALDI plate for on-plate simultaneous enrichment of phosphopeptides and glycopeptides / H. Lin, K. Yuan, C. Deng // Talanta – 2017. – V. 175. – P. 427-434.

486. Cheng, G. REPO4 (RE=La, Nd, Eu) Affinity Nanorods Modified on a MALDI Plate for Rapid Capture of Target Peptides from Complex Biosamples / G. Cheng, S.M. Li, Y. Wang, Z.G. Wang, J.L. Zhang, J.Z. Ni // Chem. Commun. – 2013. – V. 49. – № 76. – P. 8492-8494.

487. Bi, H. TiO2 printed aluminum foil: single-use film for a laser desorption/ionization target plate / H. Bi, L. Qiao, J. Busnel, V. devaud, B. Liu, H. Girault // Anal. Chem. – 2009. – V. 801. – № 3. – P. 1177-1183.

488. Dunn, J. Detection of phosphopeptides using Fe(III)-nitrilotriacetate complexes immobilized on a MALDI plate / J. Dunn, J. Watson, M. Bruening // Anal. Chem. – 2006. – V. 78. – № 5. – P. 1574-1580.

489. Mrksich, M. Mass spectrometry of self-assembled monolayers: A new tool for molecular surface science / M. Mrksich // ACS Nano. – 2008. – V. 2. – № 1. – P. 7-18.

490. Rowe, W. Advances and perspectives in aptamer arrays / W. Rowe, M. Platt, P.J.R. Day // Integr. Biol. – 2009. – V. 1. – № 1. – P. 53-58.

491. Evans-Nguyen, K.M. Protein arrays on patterned porous gold substrates interrogated with mass spectrometry: Detection of peptides in plasma / K.M. Evans-Nguyen, S.C. Tao, H. Zhu, R.J. Cotter // Anal Chem. $-2008. - V. 80. - N_{\odot} 5. - P. 1448-1458.$

492. Saxena, C. Identification of protein binding partners of small molecules using label-free methods / C. Saxena // Expert opinion on drug discovery. – 2016. – V. 11. – № 10. – P. 1017-1025.

493. Vestling, M.M. Poly(vinylidene difluoride) membranes as the interface between laserdesorption mass-spectrometry, gel-electrophoresis, and in-situ proteolysis / M.M. Vestling, C. Fenselau // Anal. Chem. – 1994. – V. 66. – \mathbb{N} 4. – P. 471-477.

494. Zaluzec, E.J. Direct matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometric analysis of proteins immobilized on nylon-based membranes / E.J. Zaluzec, D.A. Gage, J. Allison, J.T. Watson // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1994. – V. 5. – № 4. – P. 230-237.

495. Wang, S. Rapidly quantitative analysis of γ -glutamyltranspeptidase activity in the lysate and blood via a rational design of the molecular probe by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry / S. Wang, C. Xiao, L. Guo, L. Ling, M. Li, H. Li, X. Guo // Talanta. – 2019. – V. 205. – P. 120141.

496. Leboeuf, E. High-throughput functional assessment of polysaccharide-active enzymes using matrixassisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry as exemplified on plant cell wall polysaccharides / E. Leboeuf, P. Immerzeel, Y. Gibon, M. Steup, M. Pauly // Anal. Biochem. $-2008. - V. 373. - N_{\odot} 1. - P. 9-17.$

497. Melchior, K. Protein - versus peptide fractionation in the first dimension of twodimensional high-performance liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for qualitative proteome analysis of tissue samples / K. Melchior, A. Tholey, S. Heisel, A. Keller, H.P. Lenhof, E. Meese, C.G. Huber // J. Chromatogr. A. – 2010. – V.1217. – Nº 40. – P. 6159-6168.

498. Vitorino, R. Protein identification using nano-HPLC-MS: ESI-MS and MALDI-MS interfaces / R. Vitorino, Krenkova, F. Foret, P. Domingues, F. Amado // Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.). – 2011. – V. 790. – P. 31-46.

499. Ericsson, D. Downsizing proteolytic digestion and analysis using dispenseraided sample handling and nanovial matrix-assisted laser/desorption ionization-target arrays / D. Ericsson, S.

Ekström, J. Nilsson, J. Bergquist, G. Marko-Varga, T. Laurell // Proteomics. – 2001. – V. 1. – № 9. – P. 1072-1081.

500. Romson, J. Simple and Environmentally Friendly Fabrication of Superhydrophobic Alkyl Ketene Dimer Coated MALDI Concentration Plates / J. Romson, J. Jacksén, A. Emmer // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2017. – V. 28. – № 8. – P. 1733-1736.

501. Getie-Kebtie M, Franke P, Aksamit R, Alterman MA. 2008. Experimental evaluation of protein identification by an LC/MALDI/on-target digestion approach / M. Getie-Kebtie, P. Franke, R. Aksamit, M.A. Alterman // J. Proteome Res. – 2008. – V. 7. – № 9. – P. 3697-3707.
502. Ahmad-Tajudin, A. MALDI-target integrated platform for affinity-captured protein digestion / A. Ahmad-Tajudin, B. Adler, S. Ekström, G. Marko-Varga, J. Malm, H. Lilja, T. Laurell // Anal. Chim. Acta. – 2014. – V. 807. – P. 1-8.

503. Li, Y. On-plate digestion of proteins using novel trypsin-immobilized magnetic nanospheres for MALDI-TOF-MS analysis / Y. Li, B. Yan, C. Deng, J. Tang, J. Liu, X. Zhang // Proteomics. – 2007. – V. 7. – № 20. – P. 3661-3671.

504. Guisan, J.M. Correction to: Immobilization of Enzymes and Cells / J.M. Guisan, J.M. Bolivar, F. López-Gallego, J. Rocha-Martín // Methods Mol. Biol. – 2020. – V. 2100. – P. C1.
505. Bao, H. Immobilization of trypsin via graphene oxide-silica composite for efficient microchip proteolysis / H. Bao, L. Zhang, G. Chen // J. Chromatogr. A. – 2013. – V. 1310. – P. 74-81.

506. Xu, S. Enzymatic reaction of the immobilized enzyme on porous silicon studied by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry / S. Xu, C. Pan, L. Hu, Y. Zhang, Z. Guo, X. Li, H. Zou // Electrophoresis. – 2004. – V. 25. – № 21-22. – P. 3669-3676.

507. Emmer, Å. Enzymatic protein digest in chip-based nanovials with immobilized proteolytic enzymes / Å. Emmer, J. Roeraade // Anal. Chim. Acta. – 2005. – V. 542. – № 2. – P. 137-143.

508. Longobardi, S. A simple MALDI plate functionalization by Vmh2 hydrophobin for serial multi-enzymatic protein digestions / S. Longobardi, A.M. Gravagnuolo, R. Funari, B. Della Ventura, F. Pane, E. Galano, A. Amoresano, G. Marino, P. Giardina // Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – V. 407. – № 2. – P. 487-496.

509. Chen, X. Sample preparation for MALDI mass spectrometry using an elastomeric device reversibly sealed on the MALDI target / X. Chen, A. Murawski, G. Kuang, D.J. Sexton, W. Galbraith // Anal. Chem. – 2006. – V. 78. – № 17. – P. 6160-6168.

510. Northen, T.R. A nanostructure-initiator mass spectrometrybased enzyme activity assay / T.R. Northen, J.C. Lee, L. Hoang, J. Raymond, D.R. Hwang, S.M. Yannone, C.H. Wong, G. Siuzdak // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – V. 105. – № 10. – P. 3678-3683.

511. Hooff, G. P. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry / G.P. Hooff, J.J. van Kampen, R.J. Meesters, A. van Belkum, W.H. Goessens, T.M. Luider // J. Proteome Res. – 2012. – V. 11. – No 1. – P. 79-84.

512. Parker, L.L. Photocleavable peptide hydrogel arrays for MALDI-TOF analysis of kinase activity / L.L. Parker, S.B. Brueggemeier, W.J. Rhee, D. Wu, S.B. Kent, S.J. Kron, S.P. Palecek // Analyst. – 2006. – V. 131. – № 10. – P. 1097-1104.

513. Lazar, I. M. Microfluidic LC device with orthogonal sample extraction for on-chip MALDI-MS detection. / I.M. Lazar, J.L. Kabulski // Lab on a chip. – 2013. – V. 13. – № 11. – P. 2055-2065.

514. Brivio, M. Integrated microfluidic system enabling (bio)chemical reactions with on-line MALDI-TOF mass spectrometry / M. Brivio, R.H. Fokkens, W. Verboom, D.N. Reinhoudt, N.R. Tas, M. Goedbloed, A. van der Berg // Anal. Chem. – 2002. – V. 74. – № 16. – P. 3972-3976.

515. Simon F Recent Advances in Microfluidic Technology for Bioanalysis and Diagnostics
/ F. Simon. Berlanda, Maximilian Breitfeld, L. Claudius Dietsche, S. Petra Dittrich // Anal.
Chem. – 2021. – V. 93. – № 1. – P. 311-331.

516. Nichols, K.P. Enzyme kinetics by directly imaging a porous silicon microfluidic reactor using desorption/ionization on silicon mass spectrometry / K.P. Nichols, S. Azoz, H.J.G.E. Gardeniers // Anal. Chem. – 2008. – V. 80. – № 21. – P. 8314-8319.

517. Mhatre, R. Strategies for locating disulfide bonds in a monoclonal antibody via mass spectrometry / R. Mhatre, J. Woodard, C. Zeng // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1999. – V. 13. – № 24. – P. 2503-2510.

518. Su, J. Using mass spectrometry to characterize selfassembled monolayers presenting peptides, proteins, and carbohydrates / J. Su, M. Mrksich // Angew. Chem. Int. Ed. $-2002. - V. 41. - N_{2} 24. - P. 4715-4718.$

519. Zhou, Q. Recent developments of novel matrices and on-tissue chemical derivatization reagents for MALDI-MSI / Q. Zhou, A. Fülöp, C. Hopf // Anal. Bioanal. Chem. – 2021. – V. 413. – № 10. – P. 2599-2617.

520. Bollineni, R. C. Qualitative and quantitative evaluation of derivatization reagents for different types of protein-bound carbonyl groups / R.C. Bollineni, M. Fedorova, R. Hoffmann // The Analyst. – 2013. – V. 138. – № 17. – P. 5081-5088.

521. Wu, Q. On-Tissue Derivatization via Electrospray Deposition for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Fatty Acids in Rat Brain Tissues / Q. Wu, T.J. Comi, B. Li, S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler // Anal. Chem. – 2016. – V. 88. – № 11. – P. 5988–5995.

522. Franck, J. On-tissue Nterminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies / J. Franck, M.E. Ayed, M. Wisztorski, M. Salzet, I. Fournier // Anal. Chem. – 2009. – V. 81. – № 20. – P. 8305-8317.

523. O'Neill, K.C. Enhancing Metabolite Coverage for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging Through Multiple On-Tissue Chemical Derivatizations / K.C. O'Neill, M.E. Dueñas, E. Larson, T.T. Forsman, Y.J. Lee // Methods Mol. Biol. – 2022. – V. 2437. – P. 197-213.

524. Manier, M.L. A Derivatization and Validation Strategy for Determining the Spatial Localization of Endogenous Amine Metabolites in Tissues using MALDI Imaging Mass Spectrometry / M.L. Manier, J.M. Spraggins, M.L. Reyzer, J.L. Norris, R.M. Caprioli // J. Mass Spectrom. $-2014. - V. 49. - N_{2} 8. - P. 665-673.$

525. Liu, Y. Nanosecond Photochemical Reaction for Enhanced Identification, Quantification, and Visualization of Primary Amine-Containing Metabolites by MALDI-Mass Spectrometry / Y. Liu, G. Li, T.J. Gu, L. Li // Anal. Chem. – 2022. – V. 94. – № 9. – P. 3774-3781.

526. Kroslakova, I. Direct Coupling of HPTLC with MALDI-TOF MS for Qualitative Detection of Flavonoids on Phytochemical Fingerprints / I. Kroslakova, S. Pedrussio, E. Wolfram // Phytochemical analysis. -2016. - V. 27. - N = 3-4. - P. 222-228.

527. Morschheuser, L. High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides / L. Morschheuser, S. Mükusch, M. Riedner, H. Seitz, S. Rohn, // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2016. – V. 1008. – P. 198-205.

528. Treblin, M. Two-dimensional high-performance thin-layer chromatography for the characterization of milk peptide properties and a prediction of the retention behavior - a proof-

of-principle study / M. Treblin, T. von Oesen, L.C. Class, G. Kuhnen, I. Clawin-Rädecker, D. Martin, J. Fritsche, S. Rohn // J. Chromatogr. A. – 2021. – V. 1653. – P. 462442.

529. St Hilaire, P.M. Analysis of organic reactions by thin layer chromatography combined with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / P.M. St Hilaire, L. Cipolla, U. Tedebark, M. Meldal // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1998. – V. $12. - N_{2} 20. - P. 1475-1484.$

530. Salo, P.K. Twodimensional ultra-thin-layer chromatography and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in bioanalysis / P.K. Salo, S. Vilmunen, H. Salomies, R.A. Ketola, R. Kostiainen // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – № 5. – P. 2101-2108.

531. Borisov, R. Recent Advances in Combinations of TLC With MALDI and Other Desorption/Ionization Mass-Spectrometry Techniques / R. Borisov, A. Kanateva, D. Zhilyaev // Front. Chem. – 2021. – V. 9. – P. 771801.

532. Borisov, R.S. Simple Approach to Derivatization of Alcohols and Phenols for the Analysis by Matrix(surface)-Assisted Laser Desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry / R.S. Borisov, D.I. Zhilyaev, N.Y. Polovkov, V.G. Zaikin // Rapid Commun. Mass. Spectrom. – 2014. – V. 28. – № 21. – P. 2231-2236.

533. Esparza, C. Post-chromatographic Fixed-Charge Derivatization for the Analysis of Hydroxyl-Containing Compounds by a Combination of Thin-Layer Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry / C. Esparza, R.S. Borisov, N.Y. Polovkov, V.G. Zaikin // J. Chromatogr. A. – 2018. – V. 1560. – P. 97-103.

534. Borisov, R. An Approach to Analysis of Primary Amines by a Combination of Thinlayer Chromatography and Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry in Conjunction with post-chromatographic Derivatization / R. Borisov, C. Esparza, N. Polovkov, A. Topolyan, V. Zaikin // J. Sep. Sci. – 2019. – V. 42. – Nº 22. – P. 3470-3478.

535. Esparza, C. Suitable Analysis of α-amino Acids by a Direct Combination of Thin-Layer Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry in Conjunction with post-chromatographic Fixed-Charge Derivatization / C. Esparza, N. Polovkov, A. Topolyan, R. Borisov, V. Zaikin // J. Chromatogr. A. – 2020. – V. 1626. – P. 461335.

536. Kouzel, I. U. Progress in detection and structural characterization of glycosphingolipids in crude lipid extracts by enzymatic phospholipid disintegration combined with thin-layer chromatography immunodetection and IR-MALDI mass spectrometry / I.U. Kouzel, A. Pirkl,

G. Pohlentz, J. Soltwisch, K. Dreisewerd, H. Karch, J. Müthing // Anal. Chem. – 2014. – V. 86. – № 2. – P. 1215-1222.

537. Souady, J. Structural profiling of individual glycosphingolipids in a single thin-layer chromatogram by multiple sequential immunodetection matched with direct IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry / J. Souady, J. Soltwisch, K. Dreisewerd, J. Haier, J. Peter-Katalinić, J. Müthing // Anal. Chem. – V. 81. – No 22. – P. 9481-9492.

538. Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids / I. Langmuir // J. Am. Chem. Soc. – 1917. – V. 39. – № 9. – P. 1848-1906.

539. Langmuir, I. The mechanism of the surface phenomena of flotation / I. Langmuir // Trans. Faraday Soc. – 1920. – V. 15. – P. 62-74.

540. Hönig, D. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster-Angle Microscopy / D. Hönig, D. Möbius // J. Phys. Chem. – 1991. – V. 95. – № 12. – P. 4590-4592.

541. Grandbois, M. Polarization-Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Measurement of Phospholipid Monolayer Hydrolysis by Phospholipase C / M. Grandbois, B. Desbat, D. Blaudez, C. Salesse // Langmuir. – 1999. – V. 15. – № 19. – P. 6594-6597.

542. Penfold, J. The application of the specular reflection of Neutrons to the study of surfaces and interfaces / J. Penfold, R. Thomas // J. Phys.: Condens. Matter. – 1990. – V. 2. – № 6. – P. 1369–1412.

543. Kaganer, V.M. Crystallization phase transitions and phase diagram of Langmuir monolayers / V.M. Kaganer, E.B. Loginov // Phys. Rev. Lett. – 1993. – V. 71. – № 16. – P. 2599-2602.

544. Bohanon, T.M. Surface tension anisotropy and relaxation in uniaxially compressed Langmuir monolayers / T.M. Bohanon, A.M. Lee, J.B. Ketterson, P. Dutta // Langmuir. – 1992. – V. 8. – № 10. – P. 2497-2500.

545. Bohm, C. Packing characteristics of crystalline monolayers of fatty acid salts, at the airsolution interface, studied by grazing incidence X-ray diffraction / C. Bohm, F. Leveiller, D. Jacquemain, H. Mohwald, K. Kjaer, J. Als-Nielsen, I. Weissbuch, L. Leiserowitz // Langmuir. -1994. - V. 10. - N = 3. - P. 830-836.

546. Адамсон, А. Физическая химия поверхностей / А. Адамсон. – М.: Мир, 1979. – 568 с.

547. Phan, M.D. A Langmuir Monolayer: Ideal Model Membrane to Study Cell / M.D. Phan,
K. Shin // J. Chem. Bio. Interfaces. – 2014. – V. 2. – № 1. – P. 1-5.

548. Lee, K.Y.C. Collapse mechanisms of Langmuir monolayers // Annu. Rev. Phys. Chem. – 2008. – V. 59. – P. 771-791.

549. Vollhardt, D. Nucleation in insoluble monolayers. 1. Nucleation and growth model for relaxation of metastable monolayers / D. Vollhardt, U. Retter // J. Phys. Chem. – 1991. – V. 95. – N_{2} 9. – P. 3723-3727.

550. González-Delgado, A. M. Reversible collapse of insoluble monolayers: new insights on the influence of the anisotropic line tension of the domain / A.M. González-Delgado, M. Pérez-Morales, J.J. Giner-Casares, E. Munoz, M.T. Martín-Romero, L. Camacho // J. Phys. Chem. B. – 2009. – V. 113. – № 40. – P. 13249-13256.

551. Diamant, H. Topography and instability of monolayers near domain boundaries / H. Diamant, T. Witten, C. Ege, A. Gopal, K. Lee // Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. $-2001. - V. 63. - N_{\odot} 6. - P. 061602.$

552. Gopal, A. Morphology and collapse transitions in binary phospholipid monolayers / A. Gopal, K.Y.C. Lee // J. Phys. Chem. B. – 2001. – V. 105. – № 42. – P. 10348-10354.

553. Hatta, E. Topologial manifestations of surface- roughening collapse in Langmuir monolayers / E. Hatta, J. Nagao // Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. – 2003. – V. 67. – № 4. – P. 041604.

554. Joos, P. Effect of the pH on the collapse pressure of fatty acid monolayers evaluation of the surface dissociation constant // Bull. Soc. Chim. Belg. – 1971. – V. 80. – № 3-4. – P. 277-281.

555. McFate, C. Organized collapse of fatty acid monolayers / C. McFate, D. Ward, J. Olmsted III // Langmuir. – 1993. – V. 9. – № 4. – P. 1036-1039.

556. Angelova, A. 2D-3D transformations of amphiphilic monolayers influenced by intermolecular interactions: A Brewster angle microscopy study / A. Angelova, D. Vollhardt, R. Ionov // J. Phys. Chem. – 1996. – V. 100. – № 25. – P. 10710-10720.

557. Hatta, E. Morphology transition and slow dynamics in the collapse of amphiphilic monolayers at the air-water interface / E. Hatta, D. Suzuki, J. Nagao // Eur. Phys. J. B. – 1999. – V. 11. – P. 609-614.

558. Nikomarov, E. A slow collapse of a monolayer spread on an aqueous surface // Langmuir. – 1990. – V. 6. – № 2. – P. 410-414. 559. Hatta, E. Sequential collapse transitions in a Langmuir monolayer // Langmuir. – 2004.
- V. 20. - № 10. - P. 4059-4063.

560. Gourier, C. Collapse of monolayer of 10, 12-pentacosadiynoic acid: kinetics and structure / C. Gourier, C.M. Knobler, J. Daillant, D. Chatenay // Langmuir. – 2002. – V. 18. – № 24. – P. 9434-9440.

561. Левашова, Л.Г. Исследование электроповерхностных свойств Лэнгмюровских пленок стеариновой кислоты и её солей в растворах электролитов / Л.Г. Левашова, Н.Г. Суходолов, А.И. Янклович // Биологические мембраны. – 1990. – Т. 7. – № 12. – С. 52-56.

562. Negroni, L. Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography / L. Negroni, S. Claverol, J. Rosenbaum, E. Chevet, M. Bonneu, J.-M. Schmitter // J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 2012. – V. 891-892. – P. 109-112.

563. Hedhammar, M. Chromatographic methods for protein purification / M. Hedhammar,A.E. Karlström, S. Hober // Stockholm: Royal Institute of Technology. – 2006. – P. 1-31.

564. Dunn, J.D. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry / J.D. Dunn, G.E. Reid, M.L. Bruening // Mass Spectrom. Rev. $-2010. - V. 29. - N \ge 1. - P. 29-54.$

565. Aryal, U.K. Optimization of immobilized gallium (III)ion affinity chromatography for selective binding and recovery of phosphopeptides from protein digests / U.K. Aryal, D.J.H. Olson, A.R.S. Ross // J. Biomol. Tech. – 2008. – V. 19. – N_{2} 5. – P. 296-310.

566. Lingg, N. Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: Influence of ligand and metal ions / N. Lingg, C. Öhlknecht, A. Fischer, M. Mozgovicz, T. Scharl, C. Oostenbrink, A. Jungbauer // J. Chromatogr. A. – 2020. – V. 1633. – P. 461649.

567. Vanetsev, A.S. Microwave-assisted synthesis of individual and multicomponent oxides /
A.S. Vanetsev, Y.D. Tretyakov // Russ. Chem. Rev. – 2007. – V. 76. – № 5. – P. 397–413.

568. Schütz, M.B. Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline binary and ternary metal oxides / M.B. Schütz, L. Xiao, T. Lehnen, T. Fischer, S. Mathur // Int. Mater. Rev. – 2018. – V. 63. – № 6. – P. 341-374.

569. Tang, J. ZnO nanorods with low intrinsic defects and high optical performance grown by facile microwave-assisted solution method / J. Tang, J. Chai, J. Huang, L. Deng, X.S. Ngu-

yen, L. Sun, T. Venkatesan, Z. Shen, C.B. Tay, S.J. Chua // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2015. – V. 7. – № 8. – P. 4737-4743.

570. Dallinger, D. Microwave-assisted synthesis in water as solvent / D. Dallinger, C.O. Kappe // Chem. Rev. – 2007. – V. 107. – № 6. – P. 2563-2591.

571. Tischer, S. Thermodynamics and reaction mechanism of urea decomposition / S. Tischer, M. Börnhorst, J. Amsler, G. Schoch, O. Deutschmann // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2019. – V. 21. – № 30. – P. 16785-16797.

572. Брунауэр, С. Адсорбция газов и паров. Т. 1. / С. Брунауэр. – Москва: Издательство иностранной литературы, 1948. – 783 с.

573. Barrett, E.P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms / E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda // J. Am. Chem. Soc. $-1951. - V.73. - N_{2}1. - P.373-380.$

574. Horváth, G. Method for the calculation of effective pore size distribution in molecular sieve carbon / G. Horváth, K. Kawazoe // J. Chem. Eng. Japan. – 1983. – V. 16. – № 6. – P. 470-475.

575. Ravikovitch, P.I. Density functional theory model for calculating pore size distributions: pore structure of nanoporous catalysts / P.I. Ravikovitch, G.L. Haller, A.V. Neimark // Adv. Colloid Interface Sci. – 1998. – V. 76-77. – P. 203-226.

576. deBoer, J.H. Thet-curve of multimolecular N2-adsorption / J.H. deBoer, B.C. Lippens,
B.G. Linsen, J.C.P. Broekhoff, A. van den Heuvel, T.V. Osinga // J. Colloid Interface Sci. –
1966. – V. 21. – № 4. – P. 405-414.

577. Langmuir, I. Mechanical properties of monomolecular films / I. Langmuir // J. Franklin Inst. – 1934. – V. 218. – № 2. – P. 143-171.

578. Stickland, F.G.W. The formation of monomolecular layers by spreading a copper stearate solution / F.G.W. Stickland // J. Colloid Interface Sci. – 1972. – V. 40. – № 2. – P. 142-153.

579. Рожкова, Е.А. Исследование свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра – Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии / Е.А. Рожкова, И.А. Краснов, Н.Г. Суходолов, Н.С Иванов., А.И. Янклович, Е.П. Подольская, Н.В. Краснов // Научное приборостроение. – 2008. – Т. 18. – № 4. – С. 54-61.

580. Рожкова, Е.А. Ленгмюровские пленки, содержащие ионы железа, меди и алюминия. (часть II) / Е.А. Рожкова, Н.Г. Суходолов, А.И. Янклович // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 4: Физика. Химия. – 2012. – Т. 4. – С. 95-100.

581. Heikaus, L. Sample displacement batch chromatography of proteins. In: Protein Downstream Processing / L. Heikaus, S. Hidayah, M. Gaikwad, M. Kotasinska, V. Richter, M. Kwiatkowski, H. Schlüter // Methods in Molecular Biology. – 2021. – V. 2178. – P.285-299.

582. Costar® Spin-X® centrifuge tube filters [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/General-

Labware/Tubes/Microcentrifuge-Tubes/Spin-X%C2%AE-Centrifuge-Tube-

Filters/p/spinXCentrifugeTubeFilters (дата обращения: 04.07.2021).

583. Spink, J. Soap formation in Monomolecular Films on aqueous Solutions / J. Spink, J. Sanders // Trans. Faraday Soc. – 1955. – V. 51. – P. 1154-1165.

584. Sanders, J. Ionization in Fatty Acid Monolayers on Pure Water / J. Sanders, J. Spink // Nature. – 1955. – V. 175. – P. 644-645

585. Sasaki, T. The effect of metallic ions on the monomolecular films of stearic acid / T. Sasaki, R. Matuura // Bull. Chem. Soc. Jpn. – $1951. - V. 24. - N_{\odot} 6. - P. 274-278.$

586. Antipina, M. Structural control of Langmuir–Blodgett films containing metal cations by ligands exchange / M.N. Antipina, I.V. Bykov, R.V. Gainutdinov, Yu.A. Koksharov, A.P. Malakho, S.N. Polyakov, A.L. Tolstikhina, T.V. Yurova, G.B. Khomutov // Mater. Sci. Eng. C. – 2002. – V. 22. – № 2. – P. 171-176.

587. Cozzone, A.J. Protein phosphorylation in prokaryotes / A.J. Cozzone // Annu. Rev. Microbiol. – 1988. – V. 42. – P. 97-125.

588. Hanks, S.K. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains / S.K. Hanks, A.M. Quinn, T. Hunter // Science. – 1988. – V. 241. – № 4861. – P. 42-52.

589. Cohen, P. The origins of protein phosphorylation / P. Cohen // Nat. Cell Biol. $-2002. - V. 4 - N_{2} 5. - P. 127-130.$

590. Olsen, J.V. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks / J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, M. Mann // Cell. – 2006. – V. 127. – № 3. – P. 635-648.

591. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation / G. Krauss (Ed.) – Weinheim: Wiley-VCH, 2008. – 626 p.

592. Johnson, L.N. The regulation of protein phosphorylation / L.N. Johnson // Biochem. Soc. Trans. – 2009. – V. 37. – № 4. – P. 627-641.

593. Block, H. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review / H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schäfer // Methods Enzymol. – 2009. – V. 463. – P. 439-473.

594. Montoya, A. Characterization of a TiO2 enrichment method for label-free quantitative phosphoproteomics / A. Montoya, L. Beltran, P. Casado, J.C. Rodríguez-Prados, P.R. Cutillas // Methods (San Diego, Calif.). $-2011. - V.54. - N_{2}4. - P.370-378.$

595. Tape, C.J. Reproducible automated phosphopeptide enrichment using magnetic TiO2 and Ti-IMAC / C.J. Tape, J.D. Worboys, J. Sinclair, R. Gourlay, J. Vogt, K.M. McMahon, M. Trost, D.A. Lauffenburger, D.J. Lamont, C. Jørgensen // Anal. Chem. – 2014. – V. 86. – № 20. – P. 10296-10302.

596. van der Schans, M.J. New tools in diagnosis and biomonitoring of intoxications with organophosphorothioates: case studies with chlorpyrifos and diazinon / M.J. van der Schans, A.G. Hulst, D. van der Riet-van Oeveren, D. Noort, H.P. Benschop, Ch. Dishovsky // Chem. Biol. Interact. – 2013. – V. 203. – $N_{\rm P}$ 1. – P. 96-102.

597. Tarhoni, M.H. Albumin binding as a potential biomarker of exposure to moderately low levels of organophosphorus pesticides / M.H. Tarhoni, T. Lister, D.E. Ray, W.G. Carter // Biomarkers. -2008. - V. 13. - N = 4. - P. 343-363.

598. Xie, J. Green synthesis of a novel hybrid sorbent of zeolite/lanthanum hydroxide and its application in the removal and recovery of phosphate from water / J. Xie, Z. Wang, D. Fang, C. Li, D. Wu // J. Colloid Interface Sci. – 2014. – V. 423. – P. 13-19.

599. Rocchetti, M.T. Two dimensional gel phosphoproteome of peripheral blood mononuclear cells: comparison between two enrichment methods / M.T. Rocchetti, M. Alfarano, L. Varraso, S. Di Paolo, M. Papale, E. Ranieri, G. Grandaliano, L. Gesualdo // Proteome Sci. – $2014. - V. 12. - N_{\rm P} 1. - P. 46.$

600. Wagner, M.S. Characterization of adsorbed protein films by time-of-flight secondary ion mass spectrometry with principal component analysis / M.S. Wagner, D.G. Castner // Langmuir. – 2001. – V. 17. – № 15. – P. 4649-4660.

601. Kuo, L.Y. Stereochemical inversion of phosphonothioate methanolysis by La(III) and Zn(II): mechanistic implications for the degradation of organophosphate neurotoxins / L.Y. Kuo, S.K. Glazier // Inorg. Chem. – 2012. – V. 51. – $N_{\rm D}$ 1. – P. 328-335.

602. Tsang, J.S.W. La3+-catalyzed methanolysis of hydroxypropyl-p-nitrophenyl phosphate as a model for the RNA transesterification reaction / J.S.W. Tsang, A.A. Neverov, R.S. Brown // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – V. 125. – № 6. – P. 1559-1566.

603. Walker, C. H. Organic pollutants: an ecotoxicological perspective / C. H. Walker. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. – 414 p.

604. Huang, Z. Micro-solid-phase extraction of organochlorine pesticides using porous metal-organic framework MIL-101 as sorbent / Z. Huang, H.K. Lee // J. Chromatogr. A. – 2015. – V. 1401. – P. 9-16.

605. Avancini, R.M. Organochlorine compounds in bovine milk from the state of Mato Grosso do Sul – Brazil / R.M. Avancini, I.S. Silva, A.C.S. Rosa, P.N. Sarcinelli, S.A. de Mesquita // Chemosphere. – 2013. – V. 90. – N_{2} 9. – P. 2408-2413.

606. Wong, J.W. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) Chemistry and Bioseparation Applications / J.W. Wong, R.L. Albright, N.H.L. Wang // Sep. Purif. Methods. – 1991. – V. 20. – № 1. – P. 49-106.

607. Ambient Water Quality Criteria for Aldrin/Dieldrin / United States Environmental Protection Agency // USA EPA. – 1980. 152 p.

608. Garber, K. Problem Formulation for the Environmental Fate and Ecological Risk, Endangered Species and Drinking Water Assessments in Support of the Registration Review of Diazinon / K. Garber, T. Steeger // USA EPA. – 2008.– P. 2-5.

609. Reregistration Eligibility Decision (RED) Diazinon; EPA 738-R-04-006; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2006.

610. Аль-Тавил, Е.А. Электрораспыление проводящего раствора при нормальных условиях в широком диапазоне объемных скоростей / Е.А. Аль-Тавил, М.З. Мурадымов, Н.В. Краснов, М.Н. Краснов // Научное приборостроение. – 2017. – Т. 27. – № 2. – С. 3-12.

611. Arseniev, A.N. Investigation of electrospray stability with dynamic liquid flow splitter / A.N. Arseniev, N.V. Krasnov, M.Z. Muradymov // J. Anal. Chem. – 2014. – V. 69. – № 14. – P. 30-32.

612. Лайнер, В.И. Справочное руководство по гальванотехнике. Перевод с немецкого / В.И. Лайнер (ред.) – М.: Машиностроение, 1969: Часть 1. – 418 с.

613. Бабков, А.В. Химия в медицине: учебник для вузов / А.В. Бабков, О.В. Нестерова; Попков В.А. (ред.) – М.: Издательство Юрайт, 2019. – 403 с.

614. Wulfsberg, G. Relative and Borderline Hardness and Softness (In: Principles of descriptive inorganic chemistry) / G. Wulfsberg (Ed.) – Sausalito, CA: University Science Books, 1991. – P. 270-273.

615. Baillie, T.A. Drug-protein adducts: past, present, and future / T.A. Baillie // Med. Chem. Res. – 2020. – V. 29. – P. 1093-1104.

616. Wei, Z. Accelerated Reaction Kinetics in Microdroplets: Overview and Recent Developments / Z. Wei, Y. Li, R.G. Cooks, X. Yan // Annu. Rev. Phys. Chem. – 2020. – V. 71. – P. 31-51.

617. Shannon, R.D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides / R.D. Shannon // Acta Crystallogr. A. – 1976. – V. 32. – N_{2} 5. – P. 751-767.

618. Bertha, S.L. Hydration thermodynamics of the lanthanide ions / S.L. Bertha, G.R. Choppin // Inorg. Chem. – 1969. – V. 8. – № 3. – P. 613-617.

619. Masson, M. The Raman study of ultrathin films of barium stearate / M. Masson, M. Caillaud, Peng Zhi-Nan, R. Dupeyrat // Opt. Commun. – 1985. – V. 53. – № 1. – P. 33-35.

620. van der Schans, M.J. Verification of exposure to cholinesterase inhibitors: generic detection of OPCW Schedule 1 nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase / M.J. van der Schans, A. Fidder, D. van Oeveren, A.G. Hulst, D. Noort // J. Anal. Toxicol. – 2008. – V. $32. - N_{\rm P} 1. - P. 125-129.$

621. Marsillach, J. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds / J. Marsillach, L.G. Costa, C.E. Furlong // Toxicology. – 2013. – V. 307. – P. 46-54.

622. Peeples, E.S. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry / E.S. Peeples, L.M. Schopfer, E.G. Duysen, R. Spaulding, T. Voelker, C.M. Thompson, O. Lockridge // Toxicol. Sci. – 2005. – V. 83. – No 2. – P. 303-312.

623. Bao, Y. Quantification of nerve agent adducts with albumin in rat plasma using liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry / Y. Bao, Q. Liu, J. Chen, Y. Lin, B.Wu, J. Xie // J. Chromatogr. A. – 2012. – V. 1229. – P. 164-171.

624. John, H. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network / H. John, M. J.van der Schans, M. Koller, H.E.T. Spruit, F. Worek, H. Thiermann, D. Noort // Forensic Toxicol. – 2018. – V. 36. – P. 61-71.

625. Schopfer, L.M. Analytical approaches for monitoring exposure to organophosphorus and carbamate agents through analysis of protein adducts / L.M. Schopfer, O. Lockridge // Drug. Test. Anal. – 2012. – V. 4. – P. 246-261.

626. Masson, P. Structural approach to the aging of phosphylated cholinesterases / P. Masson, F. Nachon, O. Lockridge // Chem. Biol. Interact. – 2010. – V. 187. – P. 157-162.

627. Sporty, J.L.S. Immunomagnetic separation and quantification of butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum / J.L.S. Sporty, S.W. Lemire, E.M. Jakubowski, J.A. Renner, R.A. Evans, R.F. Williams, J.G. Schmidt, M.J. van der Schans, D. Noort, R.C. Johnson // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – № 15. – P. 6593-6600.

628. Costa, L.G. Current issues in organophosphate toxicology / L.G. Costa // Clin. Chim. Acta. – 2006. – V. 366. – P. 1-13.

629. Баренбойм, Г.М. Загрязнение природных вод лекарствами / Г.М. Баренбойм, М. А. Чиганова // Наука – 2015. – С. 283.

630. HELCOM 2014, BASE project 2012–2014: pilot activity to identify sources and flow patterns of pharmaceuticals in St. Petersburg to the Baltic Sea URL: http://www.helcom.fi/Lists/Publications/Pharmaceuticals%20in%20waste%20water%20in%20 St.%20Petersburg%20-%20BASE%20final%20report.pdf (дата обращения 20.02.2022).

631. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy URL: http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj (дата обращения 20.02.2022).

632. Vieno, N. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review / N. Vieno, M. Sillanpää // Environ. Int. – 2014. – V. 69. – P. 28-39.

633. Faber, H. Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/(liquid chromatography/)mass spectrometry / H. Faber, D. Melles, C. Brauckmann, C.A. Wehe, K. Wentker, U. Karst // Anal. Bioanal Chem. – 2012. – V. 403. – № 2. – P. 345-354.

634. Syed, M. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI) / M. Syed, C. Skonberg, S.H. Hansen // Toxicol. In Vitro. – 2016. – V. 31. – P. 93-102.

635. Tang, W. The Metabolism of Diclofenac - Enzymology and Toxicology Perspectives /
W. Tang // Curr. Drug Metab. - 2003. - V. 4. - P. 319-329.

636. Tailor, A. Mass Spectrometric and Functional Aspects of Drug-Protein Conjugation / A. Tailor, J.C. Waddington, X. Meng, B.K. Park // Chem. Res. Toxicol. – 2016. – V. 29. – № 12. – P. 1912-1935.

637. Gawlik, M. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies - A review / M. Gawlik // Acta Chromatogr. $-2018. - V. 30. - N_{\rm D} 1. - P. 1-8.$

638. Calza, P. Photocatalytic degradation study of diclofenac over aqueous TiO2 suspensions
/ P. Calza, V.A. Sakkas, C. Medana, C. Baiocchi, A. Dimou, E. Pelizzetti, T. Albanis // Appl.
Catal. B Environ. Elsevier. - 2006. - V. 67. - № 3-4. - P. 197-205.

639. Jurva, U. Electrochemical Generation of Electrophilic Drug Metabolites: Characterization of Amodiaquine Quinoneimine and Cysteinyl Conjugates by MS, IR, and NMR / U. Jurva, A. Holmén, G. Grönberg, C. Masimirembwa, L. Weidolf // Chem. Res. Toxicol. – 2008. – V.21. – № 4. – P. 928-935.

640. Yi, L. Simultaneously quantitative measurement of comprehensive profiles of esterified and non-esterified fatty acid in plasma of type 2 diabetic patients / L. Yi, J. He, Y. Liang, D. Yuan, H. Gao, H. Zhou // Chem. Phys. Lipids. – 2007. – V. 150. – P. 204-216.

641. Han, L. D. A new metabonomics method for simultaneous determination of EFAs and NEFAs in plasma using GC–MS and its application / L.D. Han, Q.L. Liang, Y.M. Wang, P. Hu, G.A. Luo // Chin. Chem. Lett. – 2009. – V. 20. – P. 1103-1106.

642. Figueiredo, I. L. Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis / I.L. Figueiredo, T. Claus, O. Oliveira Santos Júnior, V.C. Almeida, T. Magon, J.V. Visentainer // J. Chromatogr. A. – 2016. – V. 1456. – P. 235–241.

643. Krylov, A. I. Gas chromatographic determination of free fatty acids of blood using extractive alkylation / A.L. Krylov, S.N. Khlebnikova, S.K. Poluyaktova // J. Anal. Chem. – 1991. – V. 46. – P. 2428-2435.

644. Christie, W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis / W.W Christie // Advances in Lipid Methodology – Two. – 1993. – P. 69-111.

645. Wei, G. Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids / G. Wei, E.Y. Zeng // Trends Anal. Chem. -2011. - V. 30. - P. 1429-1436.

646. Milman, B. L. Comparative determination of fatty acid composition of low-molecular components of blood plasma by three mass spectrometry techniques: the 'old-new' exercise in

lipidomics / B.L, Milman, V.A. Utsal', N.V. Lugovkina, I.A. Kotryakhov, I.K. Zhurkovich // J. Anal. Chem. – 2015. – V. 70. – P. 1601-1613.

647. Ling, L. DBDA as a Novel Matrix for the Analyses of Small Molecules and Quantification of Fatty Acids by Negative Ion MALDI-TOF MS / L. Ling, Y. Li, S. Wang, L. Guo, C. Xiao, X. Chen // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2018. – V. 29. – P. 704-710.

648. Zhou, D. Mass spectrometry imaging of small molecules in biological tissues using graphene oxide as a matrix / D. Zhou, S. Guo, M. Zhang, Y. Liu, T. Chen, Z. Li // Anal. Chim. Acta. – 2017. – V. 962. – P. 52-59.

649. Hale, O. J. Collision-induced dissociation of doubly-charged barium-cationized lipids generated from liquid samples by atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization provides structurally diagnostic product ions / O.J. Hale, R. Cramer // Anal. Bioanal. Chem. -2018. - V.410. - P.1435-1444.

650. Yu, H. Quantitative analysis of free fatty acids in rat plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with meso-tetrakis porphyrin as matrix / H. Yu, E. Lopez, S.W. Young, J. Luo, H. Tian, P. Cao // Anal. Biochem. – 2006. – V. 354. – P. 182-191.

651. Cohen, S. L. Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins / S.L. Cohen, B.T. Chait // Anal. Chem. – 1996. – V. 68. – P. 31-37.

652. Megriche, A. Microwave dielectric properties of binary solvent water-alcohol, alcoholalcohol mixtures at temperatures between -35°C and +35°C and dielectric relaxation studies / A. Megriche, A. Belhadj, A. Mgaidi // Mediterr. J. Chem. – 2012. – V. 1. – P. 200-209.

653. Berglund, M. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report) / M. Berglund, M.E. Wieser // Pure Appl. Chem. – 2011. – V. 83. – P. 397-410.

654. Spink, J. A. Ionization of monolayers of fatty acids from C14 to C18. J / J.A. Spink // Colloid Sci. – 1963. – V. 18. – P. 512-525.

655. Kelly, J. R. Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs / J.R. Kelly, R.E. Scheibling // Mar. Ecol.: Prog. Ser. – 2012. – V. 446. – P. 1-22.

656. Keller, B. O. Three-Layer Matrix/Sample Preparation Method for MALDI MS Analysis of Low Nanomolar Protein Samples / B.O. Keller, L. Li // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 2006. – V. 17. – P. 780-785.

657. Yang, M. Quantitative Analysis of Free Fatty Acids in Human Serum Using Biexciton Auger Recombination in Cadmium Telluride Nanoparticles Loaded on Zeolite / M. Yang, T. Fujino // Anal. Chem. – 2014. – V. 86. – P. 9563-9569.

658. Li, X. Improved LC-MS Method for the Determination of Fatty Acids in Red Blood Cells by LC-Orbitrap MS / X. Li, A.A. Franke //. Anal. Chem. – 2011. – V. 83. – P. 3192-3198.

659. Lee, S. H. LC/ESI/MS Analysis of Saturated and Unsaturated Fatty Acids in Rat Intestinal Epithelial Cells / S.H. Lee, C. Pettinella, I.A. Blair // Curr. Drug Metab. – 2006. – V. 7. – P. 929-937.

660. Pettinella, C. Targeted quantitative analysis of fatty acids in atherosclerotic plaques by high sensitivity liquid chromatography/tandem mass spectrometry / C. Pettinella, S.H. Lee, F. Cipollone, I.A. Blair // J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2007. – V. 850. – P. 168-176.

661. Cui, Y. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of the free fatty acids in serum obtained from patients with Alzheimer's disease / Y. Cui, X. Chen, L. Liu, W. Xie, Y. Wu, Q. Wu // Bio-Med. Mater. Eng. – 2015. – V. 26. – P. 2165-2177.

662. Yang, W. C. Enhancement of the LC/MS Analysis of Fatty Acids through Derivatization and Stable Isotope Coding / W.C. Yang, J. Adamec, F.E. Regnier // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – P. 5150-5157.

663. Kloos, D. P. Comprehensive gas chromatography–electron ionisation mass spectrometric analysis of fatty acids and sterols using sequential one-pot silylation: quantification and isotopologue analysis / D.P. Kloos, E. Gay, H. Lingeman, F. Bracher, C. Müller, O.A. Mayboroda // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2014. – V. 28. – P. 1507-1514.

664. Pichini, S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts / S. Pichini, M. Pellegrini, J. Gareri, G. Koren, O. Garcia-Algar, O. Vall, F. Vagnarelli, P. Zuccaro, E. Marchei // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2008. – V. 48. – №3. – P. 927-933.

665. Ubhayasekera, S.J. Free fatty acid determination in plasma by GC-MS after conversion to Weinreb amides / S.J. Ubhayasekera, J. Staaf, A. Forslund, P. Bergsten, J. Bergquist // Anal. Bioanal. Chem. – 2013. – V. 405. – P. 1929-1935.

666. Abdelmagid, S.A. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy canadian adults / S.A. Abdelmagid, S.E. Clarke, D.E. Nielsen, A. Badawi, A. El-Sohemy, D.M. Mutch, D.W.L. Ma // PLoS ONE. – 2015. – V. 10. – № 2. – P. e0116195.

667. Crockett, J.S. Collisional Activation of a Series of Homoconjugated Octadecadienoic Acids with Fast Atom Bombardment and Tandem Mass Spectrometry / J.S. Crockett, M.L. Gross, W.W Christie, R.T. Holman // J. Am. Soc. Mass Spectrom. – 1990. – V. 1. – P. 183-191.

ПРИЛОЖЕНИЕ А



внедрения способа анализа фосфонилированных пептидов сывороточного альбумина и бутирилхолинэстеразы человека с помощью метода МАЛДИ массспектрометрии в плазме крови человека в ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России от « 14 » ноября 2022 г.

Настоящий Акт составлен о том, что способ анализа фосфонилированных пептидов сывороточного альбумина и бутирилхолинэстеразы с помощью метода МАЛДИ масс-спектрометрии в плазме крови человека

(название объекта интеллектуальной собственности)

Автор: Подольская Екатерина Петровна

(ФИО каждого автора)

Внедрены с «30» ноября 2021 г.

в лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ»

(наименование структурного подразделения)

для разработки методик скринингового анализа аддуктов фосфорганических отравляющих веществ с сывороточным альбумином и ферментом бутирилхолинэстеразой, выделенных из плазмы крови человека. Способ был применен при выполнении 7 квалификационного теста Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО) по анализу биомедицинских проб в 2022 г лабораторией химико-аналитического контроля и биотестирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

Руководитель структурного подразделения: (по профилю деятельности, при которой внедрен объект) Зам. заведующего отделом токсикологии, к.х.н.

/А.И. Уколов/

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

/ С.А. Дулов/

И.о. директора ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, д.м.н., профессор /А.С.Радилов/ AKT Nº

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

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

(название объекта интеллектуальной собственности)

Автор: <u>Подольская Екатерина Петровна</u> (ФИО каждого автора)

Внедрены с «1» апреля 2022 г.

в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии

(наименование структурного подразделения)

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

Руководитель структурного подразделения: (по профилю деятельности, при которой внедрен объект) Зам. заведующего отделом токсикологии, к.х.н.

/А.И. Уколов/

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

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



Акт внедрения способа анализа свободных жирных кислот с помощью метода МАЛДИ масс-спектрометрии в биологических жидкостях и тканях N 2 – 2h

в ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта" от « 24 » ноября 2022 г.

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

(название объекта интеллектуальной собственности)

Автор: Подольская Екатерина Петровна

(ФИО каждого автора)

Внедрен с «24» ноября 2022 г. в лаборатории раннего эмбриогенеза_____

(наименование структурного подразделения)

для определения влияния концентрации свободных жирных кислот на компетентность ооцитов.

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

Заведующий отделом репродуктологии, д.м.н., профессор

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Список фосфорилированных пептидов, идентифицированных по значениям t_R и m/z, а также наличию характеристичных сигналов в тандемных масс-спектрах, в результате проведения nanoHPLC-ESI-MS/MS анализа комбинированных FFe-, FeOx-, TI-, и IAG-IMAC элюатов (n = 4)

Nē	Последова- тельность	Protein Accessions	Ion Score	Z	z/m	+HM	t к, ми н	FFe	FeOx	IAG	IT
1	SSGSPYGGGYGSGGGSGGY GSR	P51991	96,89	2	995,883	1990,758	92,55	+		+	
2	AESPESSAIESTQSTPQK	Q9NTI5	92,26	2	978,923	1956,839	80,47	+	+		
3	SSSVGSSSSYPISPAVSR	Q15149	72,11	2	917,915	1834,822	113,07	+	+	+	+
4	SISADDDLQESSR	P18615	70,54	2	751,803	1502,599	96,00	+			
5	AESGESGGPPGSQDSAAGA EGAGAPAAAASAEPK	Q9UMX 0	69,94	3	997,424	2990,258	66,82	+	*		
6	GGVTGSPEASISGSK	Q09666	68,11	2	707,319	1413,631	100,35	+	+		
7	SGEDEQQEQTIAEDLVVTK	Q9UQ80	64,46	3	733,660	2198,957	126,15	+			+
8	DAPTSPASVASSSSTPSSK	Q04726	63,85	2	922,400	1843,792	76,54	+	+	1	+
9	SEPGGGGGGEDGSAGLEVSA VQNVADVSVLQK	Q14204	58,64	3	998,457	2993,364	130,47	+			+
10	QLSSGVSEIR	P04792	56,75	2	578,273	1155,538	130,03	+	+		*
11	FNDSEGDDTEETEDYR	Q9NYF8	56,73	2	1001,346	2001,684	94,27	+		1	
12	SGAQASSTPLSPTR	P02545	55,23	2	720,329	1439,650	104,44	+	+	+	+
13	ESSANNSVSPSESLR	Q04726	55,22	2	822,349	1643,691	99,09	+		1	
14	AGGSAALSPSK	Q92522	54,76	2	513,236	1025,465	92,53	+	+		
15	AETLSGLGDSGAAGAAALS SASSETGTR	Q15424	54,54	3	859,054	2575,148	118,92	+	*		+
16	TSQVGAASAPAKEsPR	Q13428	53,25	2	818,891	1636,774	121,33	+	+	1	+
17	SAGEEEDGPVLTDEQK	Q66PJ3	51,33	2	892,367	1783,726	93,55	+			
18	ATVVVEATEPEPSGSIANPA ASTSPSLSHR	P46821	50,95	4	761,365	3042,435	157,69	+	+		+
19	ASSLSESSPPK	Q9UHB6	50,14	2	585,259	1169,506	75,03	+	+		+
20	LAEDEGDSEPEAVGQSR	Q9UIG0	47,18	2	934,883	1868,758	97,07	+			
21	VEEEQEADEEDVSEEEAESK	Q9H3N1	47,02	2	1195,450	2389,892	71,59	+			
22	STDSSSVSGSLQQETK	Q9H8G2	46,27	2	860,865	1720,720	77,89	+	*		
23	ETPAATEAPSSTPK	P80723	45,91	2	733,823	1466,643	65,15	+	+		+
24	SPAVATSTAAPPPPSSPLPSK	Q14157	45,71	2	1020,504	2040,000	115,02		+		+
25	AGTVVLDDVELR	P25205	45,58	3	456,222	1366,656	155,62	+	+		+
26	AMSTTSISSPQPGK	Q9UJU6	45,21	2	736,328	1471,648	99,36	+			
27	LSMTCRSHLDEEEEQQKQK	Q13371	44,98	3	819,363	2456,073	19,24	+			
28	AASAAAASAAAASAASGSP GPGEGSAGGEKR	Q13263	44,97	4	656,546	2623,162	136,94				
29	TASPPPPPK	Q8IYB3	44,71	2	486,234	971,460	85,20		+		
30	ILTDKLKEAETR	P06753	43,94	2	748,889	1496,770	116,39	*			+
31	SQSSDTEQQSPTSGGGK	P23588	43,91	2	880,852	1760,696	15,17		+		
32	KGAGDGSDEEVDGKADGA EAKPAE	P35579	42,93	3	795,002	2382,991	25,45	+	*		+

33	GPPASSPAPAPK	Q15942	42,22	2	578,774	1156,538	75,08	+	+		+
34	RGGGSGGGEESEGEEVDED	Q96QR8	42,17	2	966,342	1931,678	72,01	+			
35	AEDGATPSPSNETPK	P29966	42,09	2	790,825	1580,645	78,27	+	+		
36	WDGSEEDEDNSK	O60841	41,61	2	745,752	1490,497	77,84	+			
37	GADNDGSGSESGYTTPK	Q7Z417	41,58	2	861,828	1722,648	72,72	+			
38	GGSYSQAASSDSAQGSDVS LTA	Q31612	41,53	2	1063,431	2125,854	56,65	+	+		
39	LSPSPTSQR	P02545	40,24	2	526,743	1052,477	94,54	+	+	+	+
40	DNKIHGEILVTSAIDKLK	P26639	39,72	3	692,032	2074,082	173,45	+	+		
41	LASRYLQPR	Q495B1	39,33	2	592,302	1183,597	118,70	*			+
42	TALLDAAGVASLLTTAEVV VTEIPKEEKDPGMGAMGGM GGGMGGGMF	P10809	39,15	5	921,640	4604,169	177,61	*			+
43	SATDGNTSTTPPTSAK	Q13620	37,42	2	808,344	1615,680	49,59				+
44	CDFTEDQTAEFK	P60660	37,39	2	785,795	1570,583	65,47		+		
45	STSAPQMSPGSSDNQSSSPQ PAQQK	Q14157	37,27	3	871,369	2612,090	72,59	+			
46	MEPAAGSSMEPSADWLATA AAR	P42771	36,80	3	767,328	2299,969	149,71	+	*		+
47	DYDDMSPR	P61978	36,31	2	547,678	1094,348	21,86	+	*		
48	KCIYQQLVR	P05305	35,43	2	644,318	1287,628	105,42	+	+		+
49	GAGTGGLGLAIEGPSEAK	Q14315	35,27	2	832,894	1664,780	115,14	+			
50	SYTSGPGSR	P05787	34,90	2	496,198	991,388	75,06	+	+	+	
51	MNENNETLTR	Q8NHC8	34,03	2	659,256	1317,505	138,04	+	*		
52	QQQKQQQQQQQQQQDLS GQSSHPCERPATSSGALGSD LGK	P54252	33,96	4	1136,774	4544,073	23,71	+			
53	SNTTVVPSTAGPGPSGGPGG GGGGGGGGGGGGGTEVIQVTNV SPSASSEQMR	Q05519	33,61	4	1098,499	4390,972	99,41	+			
54	SSQKESAVQR	Q9C0C2	33,25	2	600,276	1199,547	97,19				+
55	MERSVFMPRPQAVGSSNYA STSAGLKYPGSGADLPPPQR	Q15018	33,19	4	1095,488	4378,930	43,42	+			
56	YPGVSNYQVEEDIGK	Q13564	33,12	2	889,382	1777,756	124,56	*	+		
57	LLMTPRAAPTSAPPSK	Q13123	32,51	2	859,434	1717,862	156,18	+	+	+	+
58	LVLNTAVPDRLPAR	Q99741	32,36	2	807,945	1614,883	171,25	+	+		
59	ETKELTIPTK	Q9Y6D6	31,94	2	620,316	1239,624	170,94	+	+		
60	KMPASQR	P54132	31,79	2	449,202	897,397	75,77	+	*		
61	NQGGYGGSSSSSSYGSGR	P09651	31,50	2	887,835	1774,664	74,82	+			
62	ASSSGNDDDLTIPR	Q01658	31,34	3	509,879	1527,623	90,95	+			
63	QGSPVAAGAPAK	Q9NZI8	31,25	2	567,271	1133,536	82,16	<u> </u>	+		+
64	ESLKEEDESDDDNM	P25788	31,09	2	876,295	1751,584	23,97	+	*		
65	SLDSDESEDEEDDYQQK	Q13442	30,70	2	1096,357	2191,707	43,51	+			
66	YILEMSENNAPWTVLLASV DPKATSVTVK	Q58EX2	30,52	3	1224,828	3672,471	179,41				+
67	SETAPAAPAAAPPAEKAPV K	P16403	30,40	4	489,245	1953,958	135,07	+	*		
68	YNQELKAK	095563	30,38	2	537,259	1073,510	66,09	<u> </u>	+	<u> </u>	
69	GSDAMPEIMVKIIGSK	Q8N0U7	30,06	2	894,413	1787,820	118,27	<u> </u>		+	
70	RTGQEVAQAQES	Q9H098	29,77	2	692,295	1383,581	154,36	+	+		+

71	VMVLDFVTPTPLGTRWGLG	Q16881	29,76	4	835,907	3340,607	160,04				+
72	AETLPGSGDSGPGTASLGPG	Q14151	29,72	3	841,382	2522,132	102,22	+			
73	MEPSSLELPADTVQR	Q16719	29,44	3	584,931	1752,779	131,36	+	*		+
74	TSSNNNSMVSNTLAK	O60934	29,40	2	872,340	1743,673	176,08	+	*		
75	NNPYLIK	Q08AM6	29,30	2	471,225	941,443	78,67	+			
76	HYQSYMQLIQQK	Q6ZMN 7	29,13	3	549,588	1646,749	168,78		+		
77	KTPPVRSTAPASLSR	P35658	29,12	3	549,954	1647,847	159,66	+			
78	CYITLAQALGMSMGGAPAG PAGTGKTETTKDMGR	Q8TE73	28,93	4	974,612	3895,426	155,54	+	*		
79	VERPPSPFSMAPQASLPPVPP RLDLLPQRVCVPSSASALGT ASK	P22681	28,92	4	1232,831	4928,302	59,81	+	*		
80	MKIGSGFLSGGGGGGSSGGS GSGGGGSGGGGGGGSSGR	Q9Y2X9	28,91	4	817,294	3266,153	165,70				+
81	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQ HVTSWPGKQVETLR	Q14119	28,82	4	1026,467	4102,845	26,37	+			
82	LSAMMGAVAEK	Q86U44	28,75	2	602,263	1203,519	79,09	*	*		+
83	LYGPGGGRLLQGAAAAAA AAAAAAAAAAATATAGPR	Q96QS3	28,59	3	1046,840	3138,504	91,32				+
84	MELQPPEASIAVVSIPR	P08195	28,54	3	639,657	1916,955	147,89	+	*		
85	MLGTEGGEGFVVK	P31943	28,27	3	468,550	1403,637	124,38				+
86	QTIETEEVNKTLK	P98171	28,23	2	846,882	1692,758	134,88	+			
87	EAQTLDSQIQETSI	P27816	28,03	2	821,862	1642,716	79,41	+			
88	MGAKQSGPAAANGRTR	Q8NHG 8	27,84	4	413,950	1652,780	157,08	+			
89	VSSVSFSSIVPDAPK	Q96RW7	27,84	4	420,692	1679,744	157,11		+		+
90	KAFGEFNVQTAKHYGNLGR	Q92624	27,52	2	1109,031	2217,054	180,47				+
91	TFKGRGTPSIEDAESWHAKP MPR	P51854	27,48	5	552,449	2758,215	151,12		+		
92	TLAPMDVLNEWTAEITVYS PQQIIK	Q17RG1	27,45	3	986,151	2956,437	149,30				+
93	GCSGHGSRTPASALVAASSP GASSAESSSGSETLSEEGEPG GFSR	015021	27,43	5	915,357	4572,755	182,85				+
94	SASSGAEGDVSSEREP	Q8TEA8	27,43	2	822,823	1644,638	78,51	+			
95	LLQLQNFNTLMAVVGGLSH SSISRLKETHSHVSPETIK	Q7LDG7	27,41	4	1227,739	4907,932	184,95				+
96	NNKYIVTGSGDKK	Q04725	27,40	2	752,362	1503,717	92,87				+
97	SATSVLVGEPTTSPISSGSTE TTALPGSTTTAGLSEK	Q9UKN 1	27,36	3	1308,198	3922,578	113,27	+			
98	SPSVSLSQSK	Q5VT06	27,30	3	420,484	1259,436	117,61				+
99	TAQNHPMLVELKNGETYNG HLVSCDNWMNINLREVICT SR	Q9Y4Z0	27,22	4	1223,305	4890,197	36,56	+			
100	ADQLTEEQIAEFK	P62158	27,20	3	534,572	1601,700	127,25			+	
101	IYSSSFPK	Q93075	27,19	2	504,724	1008,441	135,44	+			+
102	ESQLNLTVMAKPTNWIEGT QAVLRAKK	Q15223	27,18	2	1561,801	3122,594	106,57	+			
103	SAATREMGSATSVAGVVNG ESLEDIR	P54198	27,15	3	928,402	2783,191	59,29	+			
104	TVKSFLSK	P49758	27,10	2	495,260	989,512	154,74				+
105	EAPAEGEAAEPGSPTAAEGE	P29966	27,08	3	999,089	2995,253	89,64	+			

	AASAASSTSSPK										
106	QNADNLSGTLLLK	B2RXH4	27,08	2	773,849	1546,690	112,34				+
107	EQSEVSVSPR	Q7L4I2	27,05	2	599,265	1197,522	96,59	+			
108	MTERGDELQQAGQQEQLLR	Q9NRC6	26,86	3	776,018	2326,042	21,48	+			
109	SRFLCGKEIK	Q5T6S3	26,83	2	659,321	1317,634	165,41			+	
110	KRSYESANGR	Q9Y383	26,55	3	416,522	1247,551	168,74				+
111	AELLEQSR	075113	26,51	2	513,238	1025,468	71,29	+			
112	SSRYDPSISFSGMSLSDTMT LR	Q9Y4K1	26,37	2	1475,462	2949,918	181,84	+			
113	DSSGNLHGYVAEGGAK	Q8IZ83	26,35	2	821,348	1641,689	38,50	+			+
114	YKWDAWNSLGKMSR	Q8NC06	26,34	3	639,933	1917,784	178,43			+	
115	YIEEAIEK	P15104	26,33	2	537,742	1074,477	69,50	+			
116	MSMLKPSGLKAPTKILKPGS TALK	P30622	26,23	3	891,796	2673,372	183,06	+			
117	LCGASSGIIDLLPSPSAATN WTAGLLVDSSEMIFK	Q9H4D0	26,20	4	990,179	3957,693	179,91		+		
118	SSQGASNFDKLMDGTSQAL AK	Q7Z5K2	26,18	3	772,656	2315,954	140,64	+			+
119	SRPTDPRRGAVSSALGGSAP QLLVESESLDPPK	Q5VV67	26,12	4	884,427	3534,685	181,99			+	
120	SSPELPPSGGSTTSGSRR	Q96D31	26,07	3	640,601	1919,787	48,96		+		
121	TVHLTWQPSAGATHYLVR	Q9P218	26,00	3	733,004	2196,998	12,96	+			
122	IIFVLLLSGIVSISASSTTGVA MHTSTSSSVTK	P15421	25,96	5	726,934	3630,639	168,67	+			
123	YRLQGTIPR	Q96H15	25,96	2	592,301	1183,597	127,39				+
124	LLLSGPPQIGKTGAYLQFLS VLSRMLVR	Q4ZG55	25,94	3	1078,565	3233,681	183,20		+		
125	TTQSGQMSGEGKAGPPGGS SRAAFPQGGR	Q16630	25,89	4	755,052	3017,186	181,05		+		
126	DSMILLGSVERSELQALLQR	P35523	25,88	3	780,061	2338,168	173,91				+
127	AFLRSGGMEALTTQLGPGR	P84550	25,84	4	515,250	2057,977	167,25	*	+		
128	SAALVLASNLTELKEQQEM ECNEATFQLQLTETSLAEVQ R	Q9BXU2	25,84	4	1191,536	4763,120	43,28	+			
129	AKGTMAER	P48029	25,81	2	472,209	943,411	38,26		+		+
130	ISLNTLTLNVKSEK	O75955	25,73	2	860,420	1719,832	163,55				+
131	APPAGGGGGGSAAAAASAGG TEVRPR	095622	25,66	4	564,000	2252,979	156,79	+			
132	VEWSGAILAHCIVDLPSSSD PPTSASHFSGLQAHTTTAR	Q8N2A0	25,66	3	1421,971	4263,898	100,13	+			
133	ELVSDTNQHVKSALASVIM GLSTILGKENTIEHLLPLFLA QLK	P30154	25,63	3	1584,516	4751,532	146,23			+	
134	QSQESRMPETVPQEEMPGPP LNSESGEEAPTGR	015446	25,62	3	1258,513	3773,523	113,57	+			
135	SRYETSLNLTTKR	Q01094	25,53	2	904,878	1808,749	121,05		+		
136	DYVNSLLVQGGVGSLPGTS NSMPPLDVENIQKR	P42166	25,51	4	895,943	3580,749	178,61	+			
137	ATVNRTSSDLEALR	Q9UFE4	25,45	2	846,872	1692,737	102,80				+
138	SQQQPTPVTPK	O95251	25,45	2	645,808	1290,609	96,71		+		
139	CEQIVNCTALESPEHGSLVC SHPLGNFSYNSSCSISCDR	P16581	25,38	3	1571,281	4711,828	109,99	+			
140	NGSGDSGDSSEEESHR	Q5XG99	25,35	2	865,304	1729,601	72,17	+			

141	TSRHSSGGGGGGGGGGGGGG	P55198	25,33	3	900,346	2699,023	178,62		+		
142	MGGGGGSGFISGR NEALPSAHGTPASASALPEP	095696	25 32	3	1246 238	3736 698	100.13	+			
112	KVRIVEYSPPSAPR	0,20,0	23,32	5	1210,230	5750,070	100,15				
143	NSSNTSVGSPSNTIGR	Q7Z460	25,32	2	829,363	1657,719	94,84	+			
144	TLSSGPSSNLPLPLSSSATMP SMOCK	Q9ULK0	25,31	4	714,307	2854,205	183,22	+	*		
145	SSTTQSEFQQQIKNLSIQVG KSNTGAAIDOMR	A8TX70	25,14	4	934,672	3735,666	28,94	+			
146	LQSEPESIR	P09496	25,07	2	569,760	1138,513	74,88	+	+	+	
147	QLDKCSIER	Q14149	25,06	2	614,775	1228,543	86,90				+
148	TTAAIAAAAAAAYAAATSS AAQAAKVAAK	A6NNT2	25,06	4	714,306	2854,203	149,23		+		
149	HSAPDSLKAK	Q92618	24,99	2	567,275	1133,542	63,52		+		
150	MTTTSSVEGKQNLVIMGR	Q86XF0	24,85	4	532,737	2127,928	152,42		+		
151	SPQGPSPVLAEDSEGEG	Q99638	24,84	2	868,357	1735,707	61,73	+			
152	VAQTTGAWIITGGSHTGVM KOVGFAVRDFSLSSSYK	O94759	24,83	3	1422,236	4264,693	167,81				+
153	GGVGKSTTAVNLALALAAN DSSK	Q8TB37	24,82	3	769,034	2305,088	96,57	*	*		+
154	LCLTLGIPQATDPDKTYELT TDNMLK	Q63HN8	24,82	3	1016,485	3047,441	187,14			+	
155	NASRDQVVYGSGTKTDR	Q7Z404	24,80	4	484,224	1933,873	169,02				+
156	STSTPTSPGPR	Q8WW M7	24,80	2	584,255	1167,502	81,90	+			
157	APSSSAEAKSK	Q15111	24,76	3	408,165	1222,480	117,47				+
158	RTICTFDSSGFESMSPIKETV SSR	Q69YH5	24,74	3	993,402	2978,190	59,04				+
159	YFMEANRNTVTCHHELAVL SHETFEKASLSSSSSGAASL K	Q6ZWH 5	24,74	4	1120,015	4477,038	177,54			+	
160	DDQPSAASSVNKASTVTKR	Q6ZS17	24,73	2	1021,483	2041,959	82,52				+
161	YLTTSLFPR	P86790	24,70	2	589,288	1177,568	128,66		+		+
162	LRSAAEPVASTPASR	P49674	24,69	3	531,597	1592,775	158,87	+			
163	KEDSVSQSSSDAGLGSDHES DTLTIDVSAISNLIRK	O95477	24,68	3	1361,237	4081,698	160,33				+
164	KTMADRNLDQLLSNLEDLS NSIQK	Q9BUN5	24,67	3	948,121	2842,348	173,91				+
165	AEGRAVLVHCHAGVSRSVA IITAFLMK	Q9UNI6	24,64	3	997,176	2989,512	183,74			+	
166	METPFYGDEALSGLGGGAS GSGGSFASPGR	P17535	24,64	3	999,073	2995,204	17,55	+			
167	RRQLTCTEEMAQR	Q15599	24,61	2	919,877	1838,747	72,95		+		
168	SGVISGGASDLK	Q14683	24,56	2	585,776	1170,545	90,61	+			
169	TVVEELDQIGNLLSLRVHSV EEK	Q7Z3Y9	24,55	3	896,463	2687,373	178,98		+	+	
170	SEKSGAITSP	Q8TAV0	24,53	2	528,733	1056,459	31,60	+			
171	AESDWDTVTVLR	O60869	24,50	3	491,218	1471,638	147,85				+
172	SLPAFPTSSLLTQSQKLTGSL GCSIDRLQNIADTYVATQSK	Q99698	24,44	3	1519,734	4557,187	187,21		+		
173	IHALTSENTNLKK	Q9BZF9	24,42	2	814,879	1628,750	70,10		+		
174	NKSSSPEDPGAEV	Q9Y5U2	24,42	2	698,784	1396,561	96,95	+			
175	SDSSKTIHTNK	Q7Z401	24,41	2	649,292	1297,577	82,75	+			
176	SSSKSLER	P33076	24,36	2	487,218	973,430	80,15				+

177	LEQSQKMVIEK	Q5T9S5	24,33	2	714,842	1428,676	104,31	+			
178	VDLKELGQSQK	Q5T2W1	24,26	2	662,828	1324,649	125,15		+		
179	QTVEDYPR	Q5VTA0	24,25	2	544,227	1087,447	83,20	+			
180	VIKTSGSMPDDASLNSTTLS DASQDK	Q9P2N2	24,18	4	691,809	2764,213	164,39		+		
181	LIEEENMLAPSLK	Q9UGJ1	24,12	3	522,924	1566,758	155,17	+			
182	QTAISQL	Q9H156	24,12	2	420,696	840,384	58,26				+
183	ELLFLGPVGLIMYLGGVFFI NRQRSSTAMTVMADLGER	O15120	24,11	3	1497,371	4490,099	105,27	+			
184	AGRSVPTTTAGATEAGPLR K	P98171	24,08	4	506,012	2021,026	170,47		+		
185	MSSNIVSNGISMTDILGSTSQ DVKEFK	Q9UIU6	24,05	4	790,833	3160,311	181,01	+			
186	TKEIQSVYIREGMGQLVAA NDG	Q9BRQ0	24,05	3	852,376	2555,112	121,30	+			
187	MSSKVSR	P62906	24,04	2	437,698	874,390	26,86	+	+		+
188	NQTQLSNK	O94804	24,03	2	506,724	1012,440	78,36				+
189	MAQVAMSTLPVEDEESSES RMVVTFLMSALESMCK	P78347	23,98	3	1532,502	4595,491	177,88				+
190	GGLSPANDTGAK	P30419	23,96	2	584,254	1167,501	95,80		+		
191	RNSNVSQASMSSRMVPGLP ANGK	Q9NY46	23,95	3	887,362	2660,070	179,63		+		
192	MSCRQFSSSYLSRSGGGGG GGLGSGGSIR	P35527	23,92	3	1026,742	3078,210	174,98	+			
193	SISLSQSAENVPASKFSLQKT LSMPSGPSGK	Q4ADV 7	23,88	3	1087,207	3259,608	183,40				+
194	TVGATALPR	P50990	23,87	2	523,231	1045,455	44,08	+	+		+
195	APDEQGSMLTPLSASDPLAV TSLSSSSAHPFISNLHTR	A8K0R7	23,84	3	1393,280	4177,824	147,22	+			
196	ASDPASPHIGRSNEEEETSDS SLEK	095425	23,84	2	1536,518	3072,028	119,97	+			
197	RDAEAWFNEKSASLQQQIS EDVGATTSAR	Q7Z3Z0	23,83	3	1119,167	3355,485	31,42	+			
198	MAAEEGVASAASAGGSWG TAAMGR	Q96JI7	23,81	5	478,389	2387,914	182,74	+			
199	QAALTVLAQGLHDPSPEVR VLSLQGLSNILFHPDK	Q6ZUA9	23,76	4	981,747	3923,966	186,95		+		
200	TPTLMMQPSLDIKPFMSFPV DSSSAVGLFPNFNTMDPVQ K	Q569K4	23,74	4	1216,488	4862,930	184,71				+
201	LGVHILDTCSRDTYALEQSL EFVR	Q14832	23,71	3	1048,102	3142,291	136,58			+	
202	TSDNSKNLLSVGR	O15021	23,66	2	735,846	1470,685	118,95		+		
203	LQGFAAVLAIGSSR	Q5T4S7	23,65	2	735,380	1469,752	114,53				+
204	LSALETYFIPK	Q9P225	23,63	2	721,322	1441,636	68,59	+			
205	DMGGHSGGLSGTTTLTVTL TDVNDNPPK	P55286	23,59	4	741,072	2961,267	181,11	+			
206	APENHADTIGSGRAIPIKQG MLLK	Q5VUJ5	23,57	3	866,443	2597,314	165,50	+	*		
207	GSPGSDGPKGEK	P12110	23,57	2	638,240	1275,472	69,80	+			
208	LNVSTGLPKK	Q96NR3	23,53	2	608,791	1216,574	72,12	+			
209	SETAPAETATPAPVEK	P16401	23,51	2	839,883	1678,758	72,01				+
210	GIVAASGSETEDEDSMDIPL DLSSSAGSGKR	Q15583	23,50	2	1581,204	3161,400	116,18	+	*		
211	SPNSGLICPPSEMPATPHSGD LMDSISQQK	Q6Q759	23,50	2	1711,190	3421,374	111,08	+			

212	AMSSGGSGGGGVPEQEDSVL FR	Q16637	23,49	3	721,637	2162,897	120,07				+
213	YAALSVDGEDENEGEDYAE	P23588	23,48	2	1078,396	2155,785	74,41	+			
214	SSQETRDKSER	Q9H7D0	23,46	2	701,800	1402,592	91,10		+		
215	DKKSISDIPVSK	Q5CZC0	23,45	2	738,844	1476,680	91,05	*	+		
216	LLNSASDPSLK	Q9BQI7	23,41	2	612,797	1224,588	80,09		+		
217	LAAEKTK	Q9P1Y6	23,37	2	420,714	840,421	55,44	+			
218	LLQEGGGGVAAVVVLDQG SR	Q16690	23,36	3	669,012	2005,022	137,75	+	+	*	*
219	STLALQLGQRLGGEIVSADS MQVYEGLDIITNKVSAQEQ R	Q9H3H1	23,32	4	1140,296	4558,163	185,58			+	
220	ADGYEPPVQESV	P61247	23,30	2	685,778	1370,549	63,61	+			
221	ELTDQKSK	Q7Z7A1	23,28	2	514,734	1028,461	50,02		+		
222	IVNLVNDIFGAGFDTVTTAIS WSLMYLVTKPEIQR	P05177	23,28	4	1062,740	4247,939	26,20	+			
223	LQEISVVSAADTPDK	Q8WWN 8	23,23	3	551,600	1652,785	158,88		+		
224	QGVSPADMYRWKLSSHEPC SATCTTGVMSAYAMCVR	Q86TH1	23,22	3	1514,886	4542,642	138,02				+
225	FTRSQEEARK	Q9UKV 3	23,19	3	444,541	1331,608	141,55	+	+		+
226	SLTDLQLLLESLQEEKCR	015482	23,17	3	779,022	2335,053	160,42	+			*
227	LQTLLASSETTGK	Q6IPM2	23,15	3	503,563	1508,674	151,14				+
228	DAGLGQLATMAGIDQSDFQ LLGHPQMTSTVSNPPKEEK K	Q5JTW2	23,12	5	895,983	4475,887	153,92	+			
229	HMAKASEIR	Q96JY0	23,12	2	569,760	1138,513	74,73			+	
230	FYEGSELVADSGVTIDTTMR GGR	P35443	23,11	3	853,049	2557,132	140,63	+			
231	DYVCLSSSDTLKEDLSSESS SNEVPWTRR	A6H8Z2	23,07	3	1303,105	3907,301	37,61	+	*		
232	SADGAEADGSTQVTVEEPV QQPSVVDR	O60664	23,06	3	951,089	2851,252	85,91	+			
233	MKTSRHSSGGGGGGGAGGG GGSMGGGGGSGFISGR	P55198	23,05	3	965,413	2894,225	41,75	+			
234	DCSSILSQDPNRVELVSSNT K	Q68DQ2	22,96	3	863,685	2589,042	17,86	+			
235	HAFNAKDMNSLVYR	P51957	22,95	2	881,387	1761,767	108,22		+		
236	IFSQETLTKAQILKLFLSYDY AVK	Q9UHG 3	22,89	2	1490,245	2979,483	126,79	+			
237	AGMTSSPDATTGQTFG	Q9UQR1	22,85	2	804,813	1608,618	62,09	+			
238	AGAISASGPELQGAGHSKLQ VTMPGIKVGGSGVNVNAK	Q09666	22,84	4	917,722	3667,867	179,05	+			
239	TATNIIKKSSDNLGK	Q86SQ4	22,82	2	835,427	1669,847	155,16	+			
240	LTMDLCSKLK	Q7Z5Q5	22,76	2	652,807	1304,607	74,82		+		
241	SETAPAAPAAAPPAEK	P16403	22,73	2	779,859	1558,710	79,31	*	+		
242	LDDFFKVTGSLSSAKR	P39748	22,71	3	617,637	1850,897	173,59		+		
243	IQKTKADINATK	Q86X02	22,67	2	705,870	1410,733	84,10	+			
244	SGPRSAQR	P84996	22,66	2	469,716	938,424	64,96	+			
245	EADAATSFLR	P16157	22,65	2	580,752	1160,497	78,97		+		
246	SSYNEKTPR	Q9NX62	22,63	2	581,254	1161,501	76,36		+		
247	SEPQPIIIGR	Q9HCK4	22,61	2	595,307	1189,606	136,40		+		

	248	LAESGSSLGK	Q8NFF5	22,56	2	514,736	1028,464	38,35		+		
ľ	249	YEEKTQKQLPLK	Q12965	22,56	2	832,887	1664,767	158,03				+
	250	DLYFEGGVSSVYLWDLDHG FAGVILIKK	P47756	22,54	2	1651,284	3301,561	154,10			+	
	251	GGAGVAMAVWSLLSARAV TAFLLLFLPR	Q5HYA 8	22,53	4	746,659	2983,614	185,28		+	+	
Ì	252	LSSTPPLSALGR	Q8N201	22,49	3	426,884	1278,637	158,64			+	
Ì	253	IQASLHR	O95905	22,42	2	452,722	904,437	51,86	+			
	254	DQLQGMLYSLVGGQGSERL SSMNLGYK	Q68CR1	22,41	2	1642,147	3283,287	113,28	+			
ľ	255	YEITTIHNLFR	P05546	22,41	2	783,841	1566,676	97,41				+
I	256	SRSESETSTMAAKK	Q96B23	22,40	2	796,857	1592,706	114,13	+			
ľ	257	KSASEGSSK	O76031	22,37	2	480,708	960,408	72,81	+			
ľ	258	RISEQPLPNK	Q7Z591	22,37	2	631,317	1261,627	78,36			+	
ľ	259	EEDATLSSPAVVMPTMGR	Q02252	22,36	2	993,937	1986,867	124,12		+		
İ	260	EDSQILKIR	A6NHR9	22,35	2	591,299	1181,590	91,54				+
ľ	261	YCDNLLK	Q13617	22,29	2	503,206	1005,404	77,46		+		+
ľ	262	TRNGFPLPLAREVSNK	P22079	22,28	2	939,982	1878,956	172,42	+	+		
ľ	263	ATVVSIQR	Q8IZT6	22,27	2	477,245	953,482	113,40	+			
ľ	264	EASPMPGAK	Q3T8J9	22,23	2	492,201	983,392	45,81		+		
I	265	QNSVNSGMLLPMSK	Q6ZVD8	22,16	2	793,364	1585,721	128,78		+		
	266	YSWPSVKPQQEQSDCPPPPE LRVSTSGQK	P0C7V6	22,12	3	1238,154	3712,449	62,80				+
	267	GPGFKYASNLPGSLLK	Q8NHM 5	22,11	2	864,941	1728,875	165,57	+	+		
	268	TMMPARYEDLLK	Q15652	22,10	2	774,352	1547,697	117,07	+			
	269	ATVLLSMSKGGK	Q53EL6	22,03	2	636,322	1271,636	113,69	+			
	270	YASSGELSQGSSQLSEDFDP DEHSLQGSDMEDERDR	Q9UPW 8	22,03	3	1447,176	4339,513	162,49	+			
	271	KIYEEPIILSR	Q9Y620	22,02	2	720,875	1440,742	106,84				+
	272	SLETDEEDSPSEGNSSRK	Q9P212	21,94	2	1063,888	2126,768	175,37	+			
	273	EMEGTKPHQQLK	Q6ZMW 3	21,93	2	753,348	1505,689	77,14	+			
	274	MEAGSSLPPNSDR	Q9Y5F3	21,91	2	728,797	1456,586	138,14		+		
	275	TIFTELQLMGLEKK	Q9UMQ 3	21,90	2	913,919	1826,830	129,35	+			
	276	VGMKEYELESLFEHYCYSR GGMR	P12955	21,90	2	1557,089	3113,170	101,98	+			
	277	KSLEDLLSEK	Q9ULD2	21,85	2	661,286	1321,564	136,93	+			
	278	TSFSTTTLLPPIK	Q9NRM 6	21,83	2	783,362	1565,716	154,49				+
	279	RRPYILTLGVMMLVGMALY LNGATVVAALIANPRR	Q9UMX 9	21,82	5	789,227	3942,105	153,88			+	
	280	SSDREGTR	Q8WWI 1	21,78	2	494,197	987,388	64,03	+			
	281	FDQTGLMKQMMTK	Q16706	21,73	3	557,573	1670,705	142,92				+
ľ	282	NPETCQLFTTELGR	Q8N7N1	21,72	2	953,346	1905,685	123,92			+	
ľ	283	MSGPVPSRAR	P68400	21,69	2	617,246	1233,484	76,87	+			
I	284	ATLLEDQQDPSPSS	Q9HC35	21,66	2	784,330	1567,652	59,45	+			
	285	SSALQVSGSTRGMVCSCR	P12838	21,65	2	1059,908	2118,809	175,11	+			
	286	TASFSESR	P53396	21,63	2	482,692	964,378	94,80	+			
1												_

287	DVMAKTESPR	014733	21,62	2	607,269	1213,531	89,67				+
288	VSVTPGEK	O43897	21,59	2	448,710	896,413	145,73	*		+	
289	MAFSGSQAPYLSPAVPFSGT IQGGLQDGLQITVNGTVLSS SGTR	O00182	21,57	4	1144,042	4573,145	184,27			+	
290	HRYTPSTVSSRASGSKPSPSP ENK	Q9NR99	21,56	3	986,375	2957,111	54,28				+
291	AHTPTPGIYMGRPTHSGGG GGGGGGGGGGGGGGR	Q13595	21,52	4	762,552	3047,184	181,73	+			
292	TVEPLTVK	Q8N7W 2	21,52	2	483,752	966,496	169,28	*	+		
293	SQRVCASGPSMLNSAR	Q9NV92	21,45	2	900,902	1800,797	76,07				+
294	MTGRKLIR	Q7L590	21,41	2	535,778	1070,548	110,35				+
295	TNMMTHLSK	Q4G0X9	21,41	2	571,742	1142,478	143,95	+			
296	LSSSSMMSESTQMTITTQKS SPGATAQSTLTLATTTAPLA R	Q8WXI7	21,39	4	1212,455	4846,800	150,56		+		
297	AYRNSIK	Q8TF72	21,33	2	506,209	1011,411	72,51				+
298	CAEAGANMIVSGSAIMR	Q96AT9	21,33	3	606,600	1817,784	89,33				+
299	MEGVDLLGFLIITLNCNVTM VGKLWFVLTMLLR	Q96KN9	21,30	4	977,259	3906,016	183,45	*	+		
300	VTTHELKEGGESIR	O00308	21,29	2	818,393	1635,779	109,67				+
301	TCRSSGSKSR	O95677	21,28	2	603,258	1205,509	70,06				+
302	DQYNLLK	O60763	21,27	2	487,220	973,433	72,17	+			
303	HDTAAVDRSVK	Q9H900	21,22	2	639,796	1278,582	98,27				+
304	KYLTSNTAYGK	Q8TE04	21,22	2	703,298	1405,589	100,26	+			
305	QMLYVGSRLGVAQLR	Q9NS98	21,19	2	885,953	1770,899	168,85		+		
306	NAADKERAAGGGAGSSED DAQSR	Q9H4A6	21,18	4	595,732	2379,905	181,40	+			
307	DMDTGLGDSICFSPSISSTTIP K	Q5VUJ5	21,17	4	668,013	2669,028	174,90			+	
308	LLPYLTLLPGRDFR	Q6RSH7	21,17	3	611,974	1833,907	182,91	+			
309	SMHKLQSGIGR	O94929	21,17	2	655,310	1309,612	135,66	+	*		
310	VHHPDYNNELTQFLPRTITL KKPPGAQLGFNIR	Q5EBL8	21,10	4	974,512	3895,025	152,42		+		
311	VTKEEARK	Q6ZVL6	21,07	2	520,760	1040,512	63,31		+		
312	DPYGFLTTVILALTPLFLASA VLSWKLAKMIEAR	Q7Z3B0	21,06	4	962,022	3845,066	153,67			+	
313	EKGSSNHNLLAAPR	P83436	21,06	2	827,356	1653,705	174,63	+			
314	YAENIMLK	Q7Z5J8	21,06	2	531,241	1061,475	46,34				+
315	YSLGTSLSR	Q9H799	21,03	2	532,244	1063,480	54,63				+
316	TLQSLPAGTLLHLELSSVAA GK	Q96HA7	21,02	3	869,361	2606,068	147,20			+	
317	AEEAEMQAYGVGAGQAEP PVTGTTNMEATGSR	Q8TF21	20,90	3	1236,088	3706,249	181,27		+		
318	MMLGTEGGEGFVVK	P31943	20,89	3	512,225	1534,661	159,15	+			
319	KEEECESYTVR	P18433	20,87	3	503,868	1509,589	173,39			+	
320	AALLRPSFIPQEVK	P0C7T5	20,82	2	824,947	1648,886	168,87				+
321	DAEAGRSLSK	Q674X7	20,82	2	557,248	1113,490	84,06	+			
322	GGDYLQIK	A2CJ06	20,79	2	487,220	973,433	74,40				+
323	SSLYLLMETLNATTPHYVR	Q9NQX 4	20,78	2	1352,975	2704,943	144,24	+			

	324	FRGQREGSR	Q9NR30	20,75	2	586,768	1172,528	114,13	+			
ľ	325	MNMTSLDAMDISCAYSGSY PMAITPTOKR	Q96GX5	20,74	3	1208,774	3624,306	180,91		+		
	326	LALGSTDTLSNGQKADLEA AORLAK	A5PKW 4	20,73	3	884,455	2651,351	182,78			+	
	327	MADAAATAGAGGSGTRSG SK	Q7Z7C8	20,71	2	950,368	1899,729	58,57				+
ľ	328	ELDSEASTILK	Q8NB66	20,67	2	643,302	1285,596	135,82				+
ŀ	329	TAAVSAIATK	Q14894	20,67	2	546,738	1092,468	139,77	+			
	330	LSEILYDSTRVSFTYDETAG VLK	Q9P273	20,63	3	1083,021	3247,047	178,16	+			
l	331	SSDEKGISPAHK	Q9BZF3	20,61	2	708,284	1415,561	66,72		+		
	332	ELMSGVHLEMMSPGGEGDL HTPMLKLSYSTSQEFSSR	Q5VUB5	20,60	6	793,611	4756,629	168,55				+
	333	FSSRYQKSR	Q9UKA 4	20,60	3	440,180	1318,525	103,96	+			
	334	NALSSMDPEVR	Q3T8J9	20,53	2	657,775	1314,543	136,28		+		
I	335	FGVSLKSCR	Q96A70	20,51	2	567,266	1133,524	80,35				+
	336	SPPGWEVGVYAAGALALLG IAAVSLWK	Q8IV01	20,48	4	694,865	2776,455	147,82		+		
	337	FSGRTEYQATHGSR	Q9H329	20,47	2	878,851	1756,695	125,56		+		
ľ	338	MAETAAGVGR	Q12788	20,47	2	529,724	1058,441	110,67	+			
	339	DVLAASSDMSTATLLSSGK DEEAEKK	Q9P2D3	20,42	3	1033,717	3099,137	152,82		+		
	340	WSDEACRSSK	075596	20,42	2	653,253	1305,499	139,26		+		
I	341	SDGIPMYK	Q9UGI8	20,38	2	503,698	1006,388	82,73				+
	342	DNLYRHAVPCTTR	Q96QZ7	20,37	2	881,862	1762,716	123,06	+			
I	343	VENMSSNQDGNDSDEFM	Q86WR0	20,34	2	1007,839	2014,670	51,80	+			
ľ	344	SFSTSGSLK	Q9UL36	20,29	2	497,219	993,432	106,62				+
	345	LMGSSPASSFMGSFLTSSLG SAASTHPSGPSSSPPEQAYR	Q9P281	20,26	5	955,703	4774,487	164,35			+	
Ī	346	SASRSGGPSSPK	Q93075	20,26	2	639,254	1277,500	137,87	+		-	
I	347	TTQRRQSAMNESSK	Q9Y2Z2	20,25	3	648,551	1943,639	165,51	+			
ŀ	348	FSEDMENMLRR	Q7Z3S7	20,24	2	770,306	1539,604	71,42		+		
ŀ	349	LSDYAEQVR	Q92805	20,24	2	580,752	1160,496	77,44		+		
ŀ	350	ETSMNGLSGGVGANSGLLK	O60281	20,22	5	410,361	2047,776	180,08	+			
ŀ	351	SSSFTSGER	P0C1S8	20,17	2	519,199	1037,391	98,28	+			
	352	IKAYTQLK	Q8WWZ	20,12	2	522,781	1044,555	155,02				+
ŀ	353	MLPSQEASK	, Q7Z7J7	20,10	2	583,712	1166,417	72,02	1	+	<u> </u>	
ŀ	354	YFSOESEVSE	O6KB66	20.06	2	642,737	1284,466	52.04		+		
ŀ	355	TQLSSLSR	Q8IXR5	20,02	2	526,213	1051,418	73,44	+		<u> </u>	
ŀ	356	MSLTKTER	P02008	20,00	2	523,243	1045,479	88,99				+
ŀ	357	LEDTKLIK	P48643	19,38	2	520,278	1039,548	167,26	+			
ŀ	358	TLDQSPELR	P42345	19,01	2	569,760	1138,513	87,07				+
ŀ	359	NEISEMNR	P08729	18,97	2	544,711	1088,415	60,83				+
ĺ	360	FSSCGGGGGGSFGAGGGFGS R	P04264	18,94	2	963,337	1925,666	168,83	+			
ľ	361	GGSGGSYGRGSRGGSGGSY GGGGSGGGYGGGSGSR	P35527	18,77	4	798,272	3190,064	150,54			+	
	362	SSSIIGSSSASHTSQATSGAN SK	P54132	18,64	2	1396,382	2791,756	164,68				+
ĺ	363	SWVSKSQR	P30613	18,36	2	529,248	1057,488	137,15	+			
-												

364	GFGAGRGGSGGTR	Q96E39	18,11	2	608,767	1216,527	74,43				+
365	SAGSRTSSSVSSTSATINGGL	O15195	18,04	2	1479,932	2958,856	181,89	+			
	RR										
366	TNSTGGSSGSSVGGGSGK	Q8IUD2	17,97	3	575,194	1723,566	164,60	+			
367	SGYSTARSAYSSYSAPVSSS	P07196	15,32	3	1090,624	3269,858	158,01	+			
	LSVR										
368	ANSEHNGPMDGQSGTETKS	O95757	15,27	3	905,298	2713,879	159,40		+		
	DSTK										
369	GYYSPYSVSGSGSTAGSR	Q15149	14,29	3	701,557	2102,658	148,78				+
370	GSPSTVSSSYKR	P07197	13,56	3	552,491	1655,459	159,33		+		
371	SSSSSEDRNRMK	P15056	13,28	2	852,249	1703,490	173,88			+	
372	SGAHSSASPPRSR	P18615	13,17	3	566,158	1696,460	154,42				+
При	мечание: фосфопептиды,	идентис	рициро	эва	иные по	результ	атам М	S/M	[S a	нали	13a

примечание: фосфонентиды, идентифицированные по результатам MS/MS анализа хотя бы в одной из фракций отмечены "+"; идентификация фосфонентидов по значениям m/z и t_R (*) в отдельных фракциях подтверждалась результатами MS/MS анализа для тех же сигналов в других группах образцов

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Идентификация пептидов глобина человека, модифицированных модельными алкилирующими агентами ряда хлорацетамидов и

продуктами окисления амодиахина



Рисунок В.1 – Протокол идентификации пептида LLGNVLVC_{XAn}VLAHHFGK бетасубъединицы глобина человека, модифицированного по C-112 CCAn (A), CC2An (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot



Рисунок В.2 – Протокол идентификации пептида GTFATLSELHC_{XAn}DK бетасубъединицы глобина человека, модифицированного по C-93 CCAn (A), CC2An (Б) по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

373



Рисунок В.3 – Протокол идентификации пептида GTFATLSELHC_{XAn}DKLHVDPENFR бета-субъединицы глобина человека, модифицированного по С-93 ССАп (А), СС2Ап (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot



Рисунок В.4 – Протокол идентификации пептида LHVDPENFRLLGNVLVC_{XAn}VLAHHFGK бета-субъединицы глобина человека, модифицированного по C-112 CCAn (A), CC2An (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

A MATRIX MASCENCE Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of LLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQK Fotad in HBB_HUMAN in SwistPred, Henoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2 Match to Query 2814; 3245.660020 from(50:139400,5+) intensity(111616.0000) riinseconds(2776.61) rawscans (2937; 2033:24036) index(22179) The: Coppd 22115, ~MSI2(50:1394), 32.1eV, 46.3min, 1:K0=0.919, #25033-25036 Data file DATATX



375

Б

Mascot Score Histogram

Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event Protein scores greater than 56 are significant (p<0.05).



Concise Protein Summary Report

Format As	Concise Protein Summary	Help	
	Significance threshold p< 0.05	Max. number of hits 50	
	Preferred taxonomy All entries		~
Re-Search A	Search Unmatched		

 Mixture 1 Total score: 132 Expect: 1.3z-009 Matches: 22 Components (only one family member shown for each component): <u>HBB HUCAN</u> Mass: 15988 Score: 107 Expect: 4.1e-007 Matches: 14 Hemoglobin subunit beta 05=Homo sapiens 0X=9606 GN=HBB PE=1 SV=2 <u>HBA HUCAN</u> Mass: 15248 Score: 60 Expect: 0.0028 Matches: 8 Hemoglobin subunit alpha 05=Homo sapiens 0X=9606 GN=HBA PE=1 SV=2 Protein sequence coverage: 83%

otein sequence coverage: 83% tthed peptides shown in *bold red.* 1 ievalierzes artailmaren winwonkalo alluvroweg apersekalo

51 TEORMANNE TLACKAULA AFECLANDE HAUTETELE ELLOOKLANN 101 EBUTHLLAN LUCULANNES RETURNAN YORVANDAN ALANKTH Uluformatted sequence string: 147 residues (for pathia (nto other applications)). Sort peptings by C Residue Number * Increasing Mass C Decreasing Mass

Show predicted peptides also

10	tart	-	Med	Observed	Mc(uspt)	Mr(calo)	ppm	н	Peptide
	97	-	105	1129.5383	1125.5311	1125.5587	-22.8		A. LEVEPENFR, 1
	32		41	1274.7126	1273,7063	1273.7193	-11-42	٠	R. LLVVYPW2GR. P
	19	-	31	1314,6650	1313,6577	1313 6575	0.15		R. UNVDEVCCEALCR. L.
	1.22	-	1.33	1378.6950	1377.0888	2371.0929	-2.90	•	K. EPTPPVQAAYON, V
	1.34		1.47	1440,7740	1442.7677	1446.7000	-14-6	3	K. VVADVAMALAHREN
	19	-	31	1515.6326	1514 6259	1614.6924	-4.58	٠	R. VEVDEVOGEALGE. L 4 COMMENCES (CDE)
	84	-	De	1027.0402	1621.0329	1021.0405	-4.07	٠	K. OFFNTLSELHCEN, L + COMMONLY (CDE)
	68		83	1669.8956	1668,0883	1668,8835	2.80		R. VLOAFSEOLANLONER. O
	67		8.3	1797.9014	1795,0041	1796.9795	3.14	1	K.KYLONPSDOLAHLINER.O
	106	-	121	1920.9451	1919.9378	1919.9402	-1.20		R. LLONVENCVEAMMPOR . E + CRESNOCLY (CDE)
	42		60	2058.9401	2057,9400	2057.9405	0.10	•	R. FTRAPGELSTPDAVMONPR. V
	84		105	2529.2340	2528.2075	2525.2110	-1.71	2	R. OTPATLABLICORLIVOPENPR, L.
	84	-	105	2730.1993	2729.1520	2729.1866	1.96	1	K. OTFATLSELHCDKEHVDPENPR. L + CHEMOC12 (CDE)
	105		133	3200.6274	3279.8202	3279.6225	-0.73	1	R. LLONVENCYLAUPIPOREPTPPYCAATON, V + CHENROCLE (C

Рисунок В.5 – Протокол идентификации пептида LLGNVLVC_{XAn}VLAHHFGKEFTPPVQAAYQK бета-субъединицы глобина человека, модифицированного по C-112 CCAn (A), CC2An (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot



Рисунок В.6 – Протокол идентификации пептида LLSHC_{XAn}LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDK альфа-субъединицы

глобина человека, модифицированного по C-104 CCAn (A), CC2An (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot



Рисунок В.7 – Протоколы идентификации пептида VDPVNFKLLSHC_{XAn}LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDK альфа-субъединицы глобина человека, модифицированного по C-104 CCAn (A), CC2An (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot



Рисунок В.8 – Протоколы идентификации пептида LLSHC_{XAn}LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSK альфа-субъединицы глобина человека, модифицированного по C-104 CCAn (A), CC2An (Б), по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

377

MATRIX Mascot Search Results

Database Taxonomy Protein hits:	: SvissFord 2020 03 (52725 sequences: 202298189 residues) : None appines [Duman] (20169 sequences) ED5 ED505 memorylation submart beta GS-Mono appient GX-9606 GM-HER FL-1 SV-2 ED512 HEM94 Myterive size finger protein 170 Goldmon septens GX-9606 GM-HER FL-1 SV-1 ACSS2 HEM94 Solimur/lateose Asynchetage ACSM5, mitochoodrial 05-Kono appiens 0X-9606 GM-ACSM3 FE-1 SV-3 SCDA2 HEM94 Solimur/lateose acottanporter 2 GS-Hono appiens 0X-9606 GM-HER FL-1 SV-1 HEA1 HEM94 Hondows/lysecome-arsociated appictus; and atochapy requirisor 10-SHONO septens 0X-9606 GM-HER FL-1 SV-1 KNI: NOM49 Cinc phospholisetrame ELAC protein 1 GS-Hono appiens 0X-9606 GH-HER FL-1 SV-1 ECGE HEM94 Trifunctional enzyme submart beta, mitochondrial 05-Hono appiens 0X-9606 GH-HER FL-1 SV-1 ECGE HEM944 Trifunctional enzyme submart beta, mitochondrial 05-Hono appiens 0X-9606 GH-HER FL-1 SV-3 CSNA HEM948 COP9 signaloscue complex submart 4 03-Hono appiens 0X-9606 GH-HER FL-1 SV-3
Search Param	neters
Type of search Enzyme Variable modil Mass values Protein Mass Peptide Mass Pragment Mass Max Missed Ch Instrument typ Number of que Lascot Score H	h : MS/MS Ion Search : Trypsin fications : A-ML-73 (C) : Monoisetopic : Drestriated Tolerance : # 50 ppm Tolerance : # 0.5 Da eavages : 1 HALD-TOP-TOP rise : 1
ons score is -10*1 dividual ions sco cotein scores are	Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. ores > 2.6 indicate identity or extensive homology (p=0.05). derived from ions scores as a non-probabilitic basis for ranking protein hits.
	25 50 73 Protein score N Mass: 15985 Score: 26 Matches: 1(1) Semences: 1(1)
Hemoglobi Query C 1 19 Peptide	mass. 1990 SOIE: 09 MacLues. 1(1) Sequences. 1(2) in subunit beta OSHEMOD sapiens OX-9606 ON-HBS EPI SV-2 Daserved Mr(expt) Mr(calc) ppm Miss Score Expect Rank Unique Peptide 399.9900 1998.9827 1999.0058 -11.53 0 86 5.5e-008 1 U R.LLONVLVCVLAHHFOK.E + AQ-M1-73 (2 VIew
MS/MS I Found in Match to Data file	Fragmentation of LLGSVLVCVLAHHFGK HBB_HUMAN in SwissProt, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2 (Quary 1: 1998.982724 from(1999.990000,1+) index(0) DATA.TXT
80 -	

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(cale): 1999.0058 Variable modifications: C8 : AC-MI-73 (C) Ions Score: 86 Expect: 5.5e-008 Matches : 41/218 fragment ions using 47 most intense peaks

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

m/z

Рисунок В.9 – Протокол идентификации пептида LLGNVLVC112VLAHHFGK бета-субъединицы глобина человека (m/z 1999,971), модифицированного MA1, по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

SwissFrot 2020_03 (562755 sequences; 202599198 residues) Homo sapiens (human) (20369 sequences) Halm BUMAN Hemogichin suburit bets 05-Homo sepiens 0X-9606 GM-HBB PE-1 SV-2 <u>SELE HUMAN</u> Selencovateine-apecific elongation factor 05-Bomo sapiens 0X=9606 GM-EEFSEC PE-1 SV=4 Database Taxonomy Protein hit:

Search Parameters

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

Mascot Score Histogram

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



HBB_HUMAN Mass: 15988 Score: 66 Matches: 1(1) Seguences: 1(1)

Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2 Ouerv

 Observed
 Mr (expt)
 Mr (calc)
 ppm
 Miss
 Score
 Expect
 Rank
 Unique
 Peptide

 2015.9620
 2014.9547
 2015.0007
 -22.80
 0
 66
 4.1e-006
 1
 U
 R.LLGNVLVCVLAHHFGK.E + AQ-M4 (C)
Peptide View

MS/MS Fragmentation of LLGNVLVCVLAHHFGK Found in <mark>HBB_HUMAN</mark> in <mark>SwissProt</mark>, Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HBB PE=1 SV=2

Match to Query 1: 2014.954724 from(2015.962000,1+) index(0) Data file DATA.TXT



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

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

Рисунок В.10 – Протокол идентификации пептида LLGNVLVC112VLAHHFGK бета-субъединицы глобина человека (m/z 2015,943), модифицированного MA4, по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot



Рисунок В.11 – Протокол идентификации пептида LLGNVLVC₁₁₂VLAHHFGK бета-субъединицы глобина человека (m/z 2037,977), модифицированного МА7, по результатам обработки данных программным обеспечением Mascot

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Дополнительные материалы, полученные при разработке способа формирования металл-аффинных сорбентов на мишени МАЛДИ



Рисунок Г.1 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FCu



Рисунок Г.2 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FCu, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	17,1	0	249	7325354				
2 монослоя	427740	48,8	0	251	20871827				
4 монослоя	427740	100,5	0	251	43005178				
6 монослоев	427740	80,5	0	250	34436701				
8 монослоев	427740	104,1	0	251	44509941				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	31,1	0	250	13308737				
2 монослоя	427740	51,2	0	250	21880091				
4 монослоя	427740	73,0	0	250	31244374				
6 монослоев	427740	116,1	2	250	49651541				
8 монослоев	427740	106,4	1	250	45514799				

Таблица Г.1 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FCu



Рисунок Г.3 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FNi



Рисунок Г.4 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FNi, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	19,6	0	249	8390369				
2 монослоя	427740	43,8	0	250	18714266				
4 монослоя	427740	63,1	0	250	27008595				
6 монослоев	427740	97,9	0	250	41883003				
8 монослоев	427740	108,3	2	250	46307342				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	34,6	0	250	14815692				
2 монослоя	427740	31,5	0	250	13472183				
4 монослоя	427740	63,0	0	250	26957760				
6 монослоев	427740	90,2	0	251	38592683				
8 монослоев	427740	119,9	1	250	51275249				

Таблица Г.2 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FNi



Рисунок Г.5 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FCo



Рисунок Г.6 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FCo, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	10,8	0	249	4607735				
2 монослоя	427740	85,4	0	250	36542818				
4 монослоя	427740	99,5	0	250	42542030				
6 монослоев	427740	103,6	0	250	44326847				
8 монослоев	427740	138,9	3	250	59426685				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	49,2	0	250	21036850				
2 монослоя	427740	78,4	1	250	33552674				
4 монослоя	427740	133,2	3	250	569533870				
6 монослоев	427740	87,5	1	250	37425936				
8 монослоев	427740	123.0	2	250	52604455				

Таблица Г.3 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FCo



Рисунок Г.7 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FFe



Рисунок Г.8 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FFe, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	12,3	0	249	5254772				
2 монослоя	427740	78,2	0	251	33455993				
4 монослоя	427740	74,8	0	250	32015250				
6 монослоев	427740	82,6	0	250	35342318				
8 монослоев	427740	134,7	4	250	57628235				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	23,9	0	250	10221474				
2 монослоя	427740	72,5	0	250	31030010				
4 монослоя	427740	78,2	0	250	33449592				
6 монослоев	427740	101,3	1	250	43332663				
8 монослоев	427740	163,2	8	250	69823747				

Таблица Г.4 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FFe



Рисунок Г.9 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FGa



Рисунок Г.10 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FGa, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	24,5	0	249	10498733				
2 монослоя	427740	33,5	0	250	14347953				
4 монослоя	427740	54,2	0	250	23195964				
6 монослоев	427740	90,2	0	250	38582725				
8 монослоев	427740	85,1	0	250	36406632				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	19,7	0	250	8405627				
2 монослоя	427740	52,5	0	249	22435986				
4 монослоя	427740	32,3	0	249	13803821				
6 монослоев	427740	135,6	2	250	58017632				
8 монослоев	427740	122,3	2	251	52293988				

Таблица Г.5 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FGa



Рисунок Г.11 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FIn



Рисунок Г.12 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FIn, промытых водой

Таблица Г.О	лачения ярко	лети лческ в	Минимум Максимум Суммарная яркость						
Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	29,7	0	250	12724978				
2 монослоя	427740	24,1	0	249	10317315				
4 монослоя	427740	42,4	0	250	18148314				
6 монослоев	427740	58,2	0	250	24896265				
8 монослоев	427740	92,8	0	250	39709329				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	10,9	0	249	4649392				
2 монослоя	427740	29,2	0	250	12473338				
4 монослоя	427740	56,3	0	250	24086597				
6 монослоев	427740	69,6	0	250	29768642				
8 монослоев	427740	81,2	0	250	34746611				

Таблица Г.6 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FIn



Рисунок Г.13 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FEu



Рисунок Г.14 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FEu, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная				
монослоев		яркость			яркость				
Непромытые									
1 монослой	427740	21,7	0	249	9264638				
2 монослоя	427740	31,2	0	249	13324844				
4 монослоя	427740	48,4	0	250	20705310				
6 монослоев	427740	89,7	0	251	38376660				
8 монослоев	427740	49,1	0	251	21018104				
		Пром	ытые						
1 монослой	427740	10,8	0	249	4607735				
2 монослоя	427740	40,0	0	249	17108821				
4 монослоя	427740	70,4	0	250	30103448				
6 монослоев	427740	84,1	0	250	35970984				
8 монослоев	427740	101,1	0	250	43253471				

Таблица Г.7 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FEu



Рисунок Г.15 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FLa



Рисунок Г.16 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FLa, промытых водой

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная			
монослоев		яркость			яркость			
	Непромытые							
1 монослой	427740	38,8	0	255	16605099			
2 монослоя	427740	62,7	0	255	26807472			
4 монослоя	427740	111,0	2	255	47468813			
6 монослоев	427740	145,9	0	255	62395142			
8 монослоев	427740	143,4	4	255	61317125			
Промытые								
1 монослой	427740	51,2	0	255	21916697			
2 монослоя	427740	76,2	1	255	32599742			
4 монослоя	427740	133,1	3	255	56922464			
6 монослоев	427740	157,4	7	255	67311583			
8 монослоев	427740	107,1	3	255	45820348			

Таблица Г.8 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FLa



Рисунок Г.17 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FBa



Рисунок Г.18 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями FBa, промытых водой

тиолици г.у опи тепих хркоети х теек мишени, модифицированных г.Ва								
Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная			
монослоев		яркость			яркость			
	Непромытые							
1 монослой	427740	78,7	10	255	33595286			
2 монослоя	427740	92,5	7	255	39454046			
4 монослоя	427740	112,6	4	255	48057796			
6 монослоев	427740	106,6	5	255	45490482			
8 монослоев	427740	129,8	4	255	55387512			
Промытые								
1 монослой	427740	52,2	8	255	22283036			
2 монослоя	427740	53,7	5	255	22920360			
4 монослоя	427740	76,2	8	255	32509644			
6 монослоев	427740	85,7	7	255	36567976			
8 монослоев	427740	90,1	8	255	38428543			

Таблица Г.9 – Значения яркости ячеек мишени, модифицированных FBa



Рисунок Г.19 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями стеариновой кислоты



Рисунок Г.20 – Изображения ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных одним (А), двумя (Б), четырьмя (В), шестью (Г) и восемью (Д) монослоями стеариновой кислоты, промытых водой

Таблица Г.10 –	Значения	яркости	ячеек	мишени,	модифицированн	ых стеаринов	вой кис-
лотой							

Количество	Площадь	Удельная	Минимум	Максимум	Суммарная	
монослоев		яркость			яркость	
Непромытые						
1 монослой	427740	27,1	0	255	11412180	
2 монослоя	427740	39,5	0	255	16636121	
4 монослоя	427740	82,3	0	255	34654408	
6 монослоев	427740	121,9	0	255	51289809	
8 монослоев	427740	117,1	1	255	49264667	
Промытые						
1 монослой	427740	30,4	0	255	12797632	
2 монослоя	427740	18,1	0	255	7629905	
4 монослоя	427740	35,4	0	255	14905468	
6 монослоев	427740	70,3	0	255	29569702	
8 монослоев	427740	111,3	1	255	46844597	



Рисунок Г.21 – Зависимость удельной яркости ячеек МАЛДИ мишени, модифицированных FCu (A), FNi (Б), FCo (В), FFe (Г), FGa (Д), FIn (Е), FEu (Ж), FLa (З), FBa (И), HSt (К), от числа нанесенных монослоев

390

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Оценка эффективности металл-аффинных сорбентов на основе монослоев

Ленгмюра для экстракции галогенсодержащих аддуктов ксенобиотиков

алкилирующего действия с белками крови на мишени МАЛДИ

Таблица Д.1 – Значения отношения сигнал/шум (S/N) для сигналов, соответствующих аддуктам глобина человека с CCAn, в масс-спектрах, полученных до и после обогащения образца с использованием FLa

L'anna anna	S/N							
концентрация	молярное соотношение		S/IN					
алкилирующего	алкилирующего агента	Оощии	Сороент	Проскок				
агента		гидролизат						
m/z 1588,6861; GTFATLSELHC _{CAn} DK; бета-субъединица; С-93								
10 мкг/мл	1:1,2	22	9	7				
1 мкг/мл	1:12	3	-	5				
100 нг/мл	1:120	-	-	-				
10 нг/мл	1:1200	-	-	-				
1 нг/мл	1:12000	-	-	-				
m/z 2	1886,9858; LLGNVLVC _{CAn}	VLAHHFGK; бета	а-субъединиі	ца; C-112				
10 мкг/мл	1:1,2	159	1036	314				
1 мкг/мл	1:12	15	188	9				
100 нг/мл	1:120	4	23	4				
10 нг/мл	1:1200	-	21	-				
1 нг/мл	1:12000	-	5	-				
m/z 2690	5,2322; GTFATLSELHC _{CAr}	DKLHVDPENFR	бета-субъед	циница; C-93				
10 мкг/мл	1:1,2	366	66	63				
1 мкг/мл	1:12	23	8	31				
100 нг/мл	1:120	4	-	3				
10 нг/мл	1:1200	_	_					
1 нг/мп	1:12000	-	-	_				
m/z 3134.6256	m/z 3134 6256: LI SHCCATLI VTLAAHI PAFFTPAVHASI DK: att da_cv65entaturus: C_104							
10 мкг/мп	1:1.2	4	42	7				
<u>1 мкг/мп</u>	1:12	-	5	-				
100 нг/мп	1:120	_	-					
10 нг/мп	1:120		-					
<u>1 нг/мп</u>	1:1200		_	_				
m/z 30	34 0484: VDPVNFKI I SH		ΡΔΕΕΤΡΔΙ	HASIDK				
11VZ 3734,0404; VDr VINFKLLSΠCCAnLLV ILAAΠLPAEFIFAV ΠΑSLDK;								
<u>10 мкг/мп</u>	1·1 2	-	4	_				
	1:12	_	-	_				
100 нг/мп	1:12			_				
10 нг/мп	1.120	_		_				
	1.1200		_					
1 HI/MJI m/z 1268	2224: LI SHC LI VTL A		A SI DVEL A					
альфа-субъединица; С-104								
10 мкг/мл	1:1,2	-	19	-				
1 мкг/мл	1:12	-	-	-				
100 нг/мл	1:120	-	-	-				
10 нг/мл	1:1200	_	_	-				
1 нг/мл	1:12000	_	_	-				

Таблица Д.2 – Значения отношения сигнал/шум (S/N) для сигналов, соответствующих аддуктам глобина человека с CC2An, в масс-спектрах, полученных до и после обогащения образца с использованием FLa

Концентрация	Молярное соотноше-	S/N						
алкилирующего	ние алкилирующего	Общий гидро-	Сорбент	Проскок				
агента	агента и белка	лизат	1	1.				
m/z 1622,6472; GTFATLSELHC _{C2An} DK; бета-субъединица; С-93								
10 мкг/мл	1:1,5	78	15	26				
1 мкг/мл	1:15	9	-	5				
100 нг/мл	1:150	-	-	-				
10 нг/мл	1:1500	-	-	-				
1 нг/мл	1:15000	-	-	-				
m/z 1	920,9469; LLGNVLVC _{C2}	_{An} VLAHHFGK; бе	та-субъединица; С-	112				
10 мкг/мл	1:1,5	196	504	68				
1 мкг/мл	1:15	21	70	10				
100 нг/мл	1:150	6	11	4				
10 нг/мл	1:1500	-	3	-				
1 нг/мл	1:15000	-	-	-				
m/z 2730	,1933; GTFATLSELHC _{C2}	AnDKLHVDPENF	R; бета-субъединиц	a; C-93				
10 мкг/мл	1:1,5	271	58	133				
1 мкг/мл	1:15	29	7	16				
100 нг/мл	1:150	3	-	3				
10 нг/мл	1:1500	-	-	-				
1 нг/мл	1:15000	-	-	-				
m/z 3168,5867;	m/z 3168,5867; LLSHC _{C2An} LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDK; альфа-субъединица; C-104							
10 мкг/мл	1:1,5	6	27	4				
1 мкг/мл	1:15	-	4	-				
100 нг/мл	1:150	-	-	-				
10 нг/мл	1:1500	-	-	-				
1 нг/мл	1:15000	-	-	-				
m/z 39	68,0095; VDPVNFKLLSI	HC _{C2An} LLVTLAAH	ILPAEFTPAVHASI	LDK;				
	альфа-с	убъединица; С-104	4					
10 мкг/мл	1:1,5	-	-	-				
1 мкг/мл	1:15	-	-	-				
100 нг/мл	1:150	-	-	-				
10 нг/мл	1:1500	-	-	-				
1 нг/мл	1:15000	-	-	-				
m/z 4402,2835; LLSHC _{C2An} LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSK;								
альфа-субъединица; С-104								
10 мкг/мл	1:1,5	-	-	3				
1 мкг/мл	1:15	-	-	-				
100 нг/мл	1:150	-	-	-				
10 нг/мл	1:1500	-	-	-				
1 нг/мл	1:15000	-	-	-				

приложение е





Рисунок Е.1 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 310,0032 (MD1)



Рисунок Е.2 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 279,9927 (MD2)

393



Рисунок Е.3 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 325,9980 (MD3)



Рисунок Е.4 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 323,9824 (MD4)



Рисунок Е.5 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 354,144 (MA1)



Рисунок Е.6 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 326,413 (MA2)



Рисунок Е.7 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 328,144 (MA3)



Рисунок Е.8 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 299,095 (MA4)


Рисунок Е.9 – Тандемный масс-спектр иона-предшественника m/z 315,103 (MA5)

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

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

технологии Ленгмюра

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

Для приготовления раствора X1 навеску пальмитиновой кислоты растворяли в 11 мл нгексана.

Для приготовления раствора X4 навески лауриновой, тридекановой, миристиновой и пентадекановой кислот объединяли и растворяли в отдельной порции (45 мл) н-гексана. Таблица Ж.2 – Схема смешивания растворов X1 и X4

No officiatio	Смешиваемые	Смешиваемые соотно-	Объёмы смешиваемых
л⊴ ооразца	растворы	шения, об/об	растворов, мкл
1	X4/10:X1	1:9	10:90
2	X4/10:X1	1:1	50:50
3	X4:X1	1:1	50:50
4	X4:X1	9:1	90:10
5	X4:X1/10	9:1	90:10

Х1/10 и Х4/10, обозначают разбавленные в 10 раз растворы Х1 и Х4 соответственно.

	С(0) Концентрация в образце моль/п										
Wupung guanome		Концентра	ция в обр <mark>аз</mark> ц	е, моль/л							
жирная кислота	1	2	3	4	5						
Лауриновая	8,33E-06	4,16E-05	4,16E-04	7,49E-04	7,49E-04						
Тридекановая	7,78E-06	3,89E-05	3,89E-04	7,00E-04	7,00E-04						
Миристиновая	7,21E-06	3,60E-05	3,60E-04	6,49E-04	6,49E-04						
Пентадекановая	6,88E-06	3,44E-05	3,44E-04	6,19E-04	6,19E-04						
Пальмитиновая	6,87E-04	3,82E-04	3,82E-04	7,63E-05	7,63E-06						
	(C(0)/10									
210		Концентра	ция в образи	е, моль/л							
жирная кислота	1	2	3	4	5						
Лауриновая	8,33E-07	4,16E-06	4,16E-05	7,49E-05	7,49E-05						
Тридекановая	7,78E-07	3,89E-06	3,89E-05	7,00E-05	7,00E-05						
Миристиновая	7,21E-07	3,60E-06	3,60E-05	6,49E-05	6,49E-05						
Пентадекановая	6,88E-07	3,44E-06	3,44E-05	6,19E-05	6,19E-05						
Пальмитиновая	6,87E-05	3,82E-05	3,82E-05	7,63E-06	7,63E-07						
	С	(0)/100									
		Концентра	ция в образи	е, моль/л							
жирная кислота	1	2	3	4	5						
Лауриновая	8,33E-08	4,16E-07	4,16E-06	7,49E-06	7,49E-06						
Тридекановая	7,78E-08	3,89E-07	3,89E-06	7,00E-06	7,00E-06						
Миристиновая	7,21E-08	3,60E-07	3,60E-06	6,49E-06	6,49E-06						
Пентадекановая	6,88E-08	3,44E-07	3,44E-06	6,19E-06	6,19E-06						
Пальмитиновая	6,87E-06	3,82E-06	3,82E-06	7,63E-07	7,63E-08						
	C(0)/1000										
Marian	Концентрация в образце, моль/л										
жирная кислота	1	2	3	4	5						
Лауриновая	8,33E-09	4,16E-08	4,16E-07	7,49E-07	7,49E-07						
Тридекановая	7,78E-09	3,89E-08	3,89E-07	7,00E-07	7,00E-07						
Миристиновая	7,21E-09	3,60E-08	3,60E-07	6,49E-07	6,49E-07						
Пентадекановая	6,88E-09	3,44E-08	3,44E-07	6,19E-07	6,19E-07						
Пальмитиновая	6.87E-07	3.82E-07	3.82E-07	7.63E-08	7.63E-09						

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

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

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

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

Winning Muonomo	Нормирс	ванные кон	центрации Сан	алита/Спальмитино	вая кислота
жирная кислота	1	2	3	4	5
Лауриновая	0,012	0,109	1,091	9,821	98,209
Тридекановая	0,011	0,102	1,020	9,178	91,783
Миристиновая	0,010	0,094	0,944	8,500	84,997
Пентадекановая	0,010	0,090	0,902	8,116	81,161
Пальмитиновая	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Значения в Таблице Ж.4 рассчитывались на основе значений молярных концентраций, перечисленных в Таблице Ж.3.Номера образцов (1, 2, 3, 4, 5) соответствуют указанным в Таблице Ж.2.

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

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

Значения в Таблице Ж.5 рассчитывались на основе значений молярных концентраций, перечисленных в Таблице Ж.3, с учётом того, что на мишень наносили 1,2 мкл смеси СЖК. В Таблицах Ж.6-Ж.9 представлены экспериментальные данные, полученные при исследовании образцов в концентрациях C(0), C(0)/10, C(0)/100, C(0)/1000.

	70 10	»، ۱	11,7	8,9	4,7	1 4,9		10	8,8	1 8	1 6,6		1 7,6	1 5,7	1 4,9	2 4,6		2,3	1 3,5	1	3 4,6		1 5,2	2 9,2	4 9,4	3 3,4	
41112	U U U		0	0	0	0,0		0	0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0		0	0,0	0	0,0		0,0	0,0	0,0	0,0	
		среднее	0,003	0,002	0,073	0,152		0,026	0,034	0,129	0,2		0,097	0,129	0,227	0,317		0,141	0,269	0,457	0,632		0,125	0,218	0,459	0,734	
	юсти	Спектр 4	0,003	0,002	0,076	0,158		0,029	0,033	0,139	0,209		0,098	0,127	0,231	0,325		0,14	0,262	0,459	0,647		0,118	0,208	0,439	0,729	
	интенсивн	Спектр 3	0,003	0,001	0,077	0,159		0,027	0,031	0,137	0,212		0,1	0,135	0,228	0,316		0,138	0,261	0,462	0,662		0,126	0,195	0,41	0,716	
	ированные	Спектр 2	0,003	0,002	0,07	0,147		0,023	0,034	0,117	0,184		0,086	0,12	0,211	0,297		0,142	0,271	0,452	0,623		0,122	0,234	0,509	0,771	
	Hopm	Спектр 1	0,003	0,002	0,071	0,144		0,025	0,038	0,124	0, 193		0,103	0,136	0,237	0,33		0,145	0,281	0,455	0,596		0,134	0,236	0,478	0,721	
	ед	Спектр 4	663	318	15395	32075	202939	9853	11390	47577	71565	342778	15259	19798	35984	50562	155553	46504	87135	152709	215105	332462	21666	37959	80248	133357	182840
	гь сигнала,	Спектр 3	462	221	11513	23815	150235	13343	15377	68545	106058	500106	28246	38068	64365	89221	282156	35761	67754	119944	171822	259564	13193	20522	43124	75240	105063
	тенсивност	Спектр 2	566	381	15353	32215	219452	7633	11504	39494	62031	337495	13259	18445	32502	45694	153910	46944	89595	149444	206041	330533	10580	20240	43965	90999	86414
	Ин	Спектр 1	364	247	9786	19971	138321	4588	6898	22627	35165	181745	26506	34919	60995	85002	257683	28849	55891	90304	118366	198592	43307	76328	154551	233171	323597
		Z/III	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393.1
	Жирная	кислота	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая
C(U)	$\mathcal{N}_{\bar{0}}$	образца			1					2					Э					4					5		

ациси	ZV 0/2	UV, /0	17,9	20,2	19,7	6,6		7,5	7,3	13,6	12,2		7,5	10,2	3,2	3,7		16,9	10,7	6,6	3,8		12,5	15,2	5,3	2,3	
центр	C.S	ПС	0,001	0,001	0,017	0,007		0,001	0,001	0,021	0,026		0,002	0,003	0,008	0,012		0,008	0,007	0,023	0,017		0,010	0,014	0,024	0,013	
UB C KUH	Chemica	Среднее	0,006	0,003	0,086	0,111		0,010	0,007	0,153	0,216		0,025	0,027	0,247	0,314		0,048	0,068	0,351	0,448		0,084	0,095	0,447	0,557	
r oopasii	ности	Спектр 4	0,007	0,003	0,103	0,112		0,011	0,008	0,171	0,233		0,022	0,025	0,237	0,308		0,055	0,070	0,370	0,464		0,075	0,087	0,431	0,554	
сдовании	с интенсивн	Спектр 3	900'0	0,003	0,098	0,104		0,009	0,007	0,160	0,225		0,026	0,029	0,247	0,311		0,044	0,071	0,318	0,435		0,078	0,082	0,433	0,548	
ри иссле	ированные	Спектр 2	0,005	0,004	0,073	0,120		0,009	0,007	0,160	0,229		0,026	0,029	0,247	0,307		0,054	0,074	0,364	0,460		0,084	0,096	0,440	0,552	
снныс ш	мdоН	Спектр 1	0,006	0,002	0,069	0,107		600'0	0,007	0,123	0,176		0,027	0,024	0,257	0,331		0,038	0,057	0,351	0,430		0,098	0,114	0,482	0,576	
, 11011 y	ед	Спектр 4	185	82	2578	2817	25123	2826	2033	45112	61302	263568	3445	3893	36456	47258	153610	3256	4150	21914	27508	59245	27586	31789	158461	203406	367246
и налов	гь сигнала,	Спектр 3	131	68	1991	2108	20322	1578	1197	26769	37704	167818	8414	2647	30875	101844	327773	3372	5400	24177	33086	25988	20488	21536	113985	144083	263098
	тенсивност	Спектр 2	26	47	863	1417	11784	1621	1170	27976	40144	175231	6887	8153	69334	86136	280889	5344	7355	36283	45802	20966	14770	16973	77764	97526	176785
нтенсив	Ин	Спектр 1	101	41	1190	1828	17137	2304	1656	30869	44235	250673	3007	2694	29015	37401	112932	1121	1702	10403	12748	29613	10604	12325	51874	62050	107664
икин	2/111	111/2	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1
М. / – Эначс	вендиЖ	кислота	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая
гаолица С(0)/10	$\mathcal{N}_{\bar{0}}$	образца			1					2	1				С					4					5		

шей Ē ς Ę Ś Þ Ś E Ĕ F LILL èŭ V TIT Зчапения Таблина Ж 7

щией	10.11	V, %	7,9	7,1	7,5	3,1		6,3	11,4	6,3	6,5		9,2	7,6	7,3	3,3		9,3	15,9	6,7	3,7		15,0	12,9	6,0	4,5	
центра	4		0,001	0,001	0,015	0,009		0,003	0,006	0,018	0,022		0,004	0,004	0,025	0,013		0,005	0,014	0,027	0,018		0,013	0,014	0,030	0,026	
de c kohi	C	Среднее	0,015	0,021	0,197	0,284		0,040	0,050	0,284	0,334		0,045	0,058	0,339	0,397		0,058	0,090	0,409	0,491		0,084	0,108	0,498	0,582	
образце	ости	Спектр 4	0,016	0,023	0,190	0,294		0,040	0,052	0,298	0,344		0,050	0,062	0,359	0,411		0,059	0,085	0,384	0,481		0,072	0,093	0,490	0,583	
довании	интенсивн	Спектр 3	0,016	0,021	0,210	0,283		0,042	0,055	0,300	0,357		0,040	0,053	0,305	0,381		0,054	0,073	0,390	0,473		0,101	0,121	0,531	0,602	
ы иссле	ированные	Спектр 2	0,013	0,019	0,179	0,288		0,042	0,042	0,269	0,307		0,044	0,055	0,336	0,392		0,054	0,106	0,442	0,498		0,086	0,119	0,461	0,545	
знные пр	Норм	Спектр 1	0,015	0,020	0,207	0,273		0,036	0,049	0,268	0,327		0,047	0,062	0,355	0,403		0,065	0,096	0,421	0,513		0,078	0,099	0,510	0,598	
, получе	ед	Спектр 4	240	343	2876	4450	15152	1394	1794	10295	11876	34543	4188	5161	30044	34396	83628	1636	2373	10660	13354	27773	4685	6093	31971	38044	65210
игналов	гь сигнала,	Спектр 3	1090	1439	14447	19415	68633	1489	1976	10749	12771	35778	1425	1877	10750	13434	35256	2115	2846	15223	18436	30068	6138	7359	32292	36603	60783
ностей с	тенсивност	Спектр 2	152	217	2025	3262	11317	654	660	4230	4823	15724	1818	2300	13956	16245	41484	870	1725	7184	8086	16245	1938	2692	10427	12344	22637
нтенсив	Ин	Спектр 1	1369	1896	19514	25776	94371	992	1342	7318	8927	27315	2809	3682	21100	24005	59514	1345	1989	8677	10583	20626	3134	3993	20523	24091	40260
и вин	_/	m/z	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393,1	337,1	351,1	365,1	379,1	393.1
Ж.8 – Значе	Жирная	кислота	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая	Лауриновая	Тридекановая	Миристиновая	Пентадекановая	Пальмитиновая
Таблица С(0)/100	No	образца			1					2					3					4					5		

404

C(0)/100	0												
N ^o	Жирная		Ин	тенсивносл	гь сигнала,	, ед	Норм	ированные	: интенсивн	ости		CD CD	/0 /10/
образца	кислота	m/z	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Спектр 1	Спектр 2	Спектр 3	Спектр 4	Среднее		٧, %
	Лауриновая	337,1	93	161	105	255	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	3,2
	Тридекановая	351,1	58	117	71	209	0,003	0,003	0,003	0,004	0,003	0,000	9,3
1	Миристиновая	365,1	1943	3424	2051	5281	0,103	0,098	0,093	0,096	0,098	0,004	4,5
	Пентадекановая	379,1	3737	6711	4551	11460	0,199	0, 192	0,206	0,209	0,201	0,007	3,7
	Пальмитиновая	393,1	18806	34932	22119	54946							
	Лауриновая	337,1	1974	2384	476	1273	0,009	0,010	0,011	0,010	0,010	0,001	5,0
	Тридекановая	351,1	2301	2740	475	1291	0,011	0,012	0,011	0,010	0,011	0,001	5,6
2	Миристиновая	365,1	32309	38165	6871	18905	0,155	0,161	0,154	0,148	0,154	0,005	3,4
	Пентадекановая	379,1	55479	64878	11241	33449	0,266	0,274	0,252	0,262	0,263	0,009	3,4
	Пальмитиновая	393,1	208918	236893	44597	127618							
	Лауриновая	337,1	2549	3361	1955	1656	0,016	0,014	0,014	0,014	0,015	0,001	8,2
	Тридекановая	351,1	2349	3042	1701	1736	0,015	0,013	0,012	0,015	0,014	0,002	11,8
ю	Миристиновая	365,1	28332	40374	23284	24296	0,181	0,170	0,161	0,210	0,181	0,021	11,7
	Пентадекановая	379,1	46867	68676	41342	38201	0,299	0,289	0,287	0,330	0,301	0,020	6,6
	Пальмитиновая	393,1	156494	237824	144219	115767							
	Лауриновая	337,1	7040	9957	4291	4875	0,018	0,016	0,019	0,015	0,017	0,002	10,0
	Тридекановая	351,1	6723	9716	4024	4692	0,017	0,015	0,017	0,014	0,016	0,001	8,6
4	Миристиновая	365,1	85689	129647	47581	63525	0,215	0,204	0,206	0,196	0,205	0,008	3,9
	Пентадекановая	379,1	147011	226295	80724	110199	0,369	0,355	0,349	0,340	0,353	0,012	3,5
	Пальмитиновая	393,1	398664	636692	231097	324537							
	Лауриновая	337,1	882	2739	856	1038	0,025	0,023	0,025	0,022	0,024	0,001	6,2
	Тридекановая	351,1	086	2526	840	1074	0,027	0,021	0,024	0,022	0,024	0,003	10,9
5	Миристиновая	365,1	9235	29494	10557	13866	0,257	0,250	0,305	0,288	0,275	0,026	9,4
	Пентадекановая	379,1	15148	47435	15449	21327	0,422	0,402	0,446	0,443	0,428	0,020	4,8
	Пальмитиновая	393,1	35920	117996	34658	48154							

Таблица Ж.9 – Значения интенсивностей сигналов, полученные при исследовании образцов с концентрацией

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

		\mathbf{C}	1~(C /	Нормир	ованные	интенси	вности
CMCR	N⁰	Саналит/	lg(С _{аналит} /	(Іан	алит/Імоноп	альмитат бари	(я)
CAK	образца	Спальмитино-	Спальмитиновая	C(0)	C(0)/	C(0)/	C(0)/
		вая кислота	кислота)	C(0)	10	100	1000
	1	0,012	-1,916	0,003	0,006	0,015	0,005
	2	0,109	-0,962	0,026	0,010	0,040	0,010
Лауриновая	3	1,091	0,038	0,097	0,025	0,045	0,015
	4	9,821	0,992	0,141	0,048	0,058	0,017
	5	98,209	1,992	0,125	0,084	0,084	0,024
	1	0,011	-1,946	0,002	0,003	0,021	0,003
	2	0,102	-0,991	0,034	0,007	0,050	0,011
Тридекановая	3	1,020	0,009	0,129	0,027	0,058	0,014
	4	9,178	0,963	0,269	0,068	0,090	0,016
	5	91,783	1,963	0,218	0,095	0,108	0,024
	1	0,010	-1,979	0,073	0,086	0,197	0,098
	2	0,094	-1,025	0,129	0,153	0,284	0,154
Миристиновая	3	0,944	-0,025	0,227	0,247	0,339	0,181
	4	8,500	0,929	0,457	0,351	0,409	0,205
	5	84,997	1,929	0,459	0,447	0,498	0,275
	1	0,010	-1,999	0,152	0,111	0,284	0,201
п	2	0,090	-1,045	0,200	0,216	0,334	0,263
пентадекано-	3	0,902	-0,045	0,317	0,314	0,397	0,301
вая	4	8,116	0,909	0,632	0,448	0,491	0,353
	5	81,161	1,909	0,734	0,557	0,582	0,428

	N⁰	С _{ана-} _{лит} /С _{пал}	lg(C _{аналит} /	І _{аналит} /І _{мс} ба	нопальмитат рия	Ожида-	Pe-	Точ-	Сред- няя
Жирная кислота	об- разца	ьмитино- вая кисло- та	Спальмити- новая кислота)	C(0)/10	C(0)/100	емое значе- ние	зуль- тат	ность, %	точ- ность, %
	1	0,012	-1,916	-	0,015	0,017	0,015	85,9	
	2	0,109	-0,962	-	0,040	0,033	0,040	122,5	
Лауриновая	3	1,091	0,038	-	0,045	0,049	0,045	93,4	99,6
	4	9,821	0,992	-	0,058	0,064	0,058	90,8	
	5	98,209	1,992	-	0,084	0,080	0,084	105,3	
	1	0,011	-1,946	-	0,021	0,022	0,021	92,1	
	2	0,102	-0,991	-	0,050	0,044	0,050	113,9	
Тридекановая	3	1,020	0,009	-	0,058	0,066	0,058	88,6	99,7
	4	9,178	0,963	-	0,090	0,087	0,090	104,2	
	5	91,783	1,963	-	0,108	0,109	0,108	99,6	
	1	0,010	-1,979	0,086	-	0,074	0,086	116,5	
	2	0,094	-1,025	0,153	-	0,163	0,153	93,8	
Миристиновая	3	0,944	-0,025	0,247	-	0,258	0,247	95,9	101,7
	4	8,500	0,929	0,351	-	0,347	0,351	101,0	
	5	84,997	1,929	0,447	-	0,441	0,447	101,2	
	1	0,010	-1,999	0,111	-	0,105	0,111	105,2	
	2	0,090	-1,045	0,216	-	0,215	0,216	100,3	
Пентадекановая	3	0,902	-0,045	0,314	-	0,330	0,314	95,1	100,6
	4	8,116	0,909	0,448	-	0,440	0,448	101,7	
	5	81,161	1,909	0,557	-	0,555	0,557	100,4	

Таблица Ж.11 – Расчет точности

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





Рисунок Ж.2 – Тридекановая кислота



