

На правах рукописи



Гладчук Алексей Сергеевич

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ФОРМИРОВАНИЯ
САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ РЕГУЛЯРНЫХ МОНОСЛОЕВ ЛЕНГМЮРА
НА ПОВЕРХНОСТИ ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКИ ДЛЯ АНАЛИЗА
АМФИФИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ МАЛДИ-МС

1.3.2 «Приборы и методы экспериментальной физики»

1.4.2 «Аналитическая химия»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА России» и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научные руководители:

Подольская Екатерина Петровна

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химической и токсикологической диагностики-испытательного центра экологических исследований ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России

Суходолов Николай Геннадьевич

доктор химических наук, доцент кафедры коллоидной химии Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Официальные оппоненты:

Ганеев Александр Ахатович

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

Мухин Иван Сергеевич

доктор физико-математических наук, доцент, директор Высшей инженерно-физической школы Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Ведущая организация:

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

Защита состоится «24» марта 2023 г. в 14:30 ч. на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН) по адресу: 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31–33 лит. А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу и на сайте http://www.iairas.ru/synopsises/gladchuk_disser.pdf

Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Институт аналитического приборостроения РАН, а/я 207.

Автореферат разослан « ___ » _____ 202_ года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук



Буляница А.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ-МС) является хорошо зарекомендовавшим себя методом для чувствительного, высокопроизводительного и экономически эффективного определения широкого спектра аналитов, относящихся к макромолекулам и молекулярным комплексам. При этом анализ низкомолекулярных соединений затруднен, так как при классическом МАЛДИ-МС анализе в масс-спектре в диапазоне низких значений m/z ($m/z < 1000$) преобладают сигналы низкомолекулярных матричных ионов. Следовательно, наиболее серьезной проблемой для МАЛДИ-МС при непосредственном анализе низкомолекулярных соединений являются помехи в масс-спектре, создаваемые сигналами матрицы. Одним из подходов, позволяющих нивелировать интерференцию матричных сигналов в диапазоне низких значений m/z , является дериватизация аналитов. С одной стороны дериватизация позволяет «переместить» сигнал аналита в область более высоких масс, а с другой – избирательное введение в состав молекулы хорошо ионизируемых групп позволяет значительно повысить чувствительность и селективность анализа. Этот подход очень актуален при определении амфифильных соединений, имеющих низкую способность к ионизации, таких как длинноцепочечные спирты и жирные кислоты. Такой анализ востребован как для контроля качества пищевых продуктов, лекарственных средств и биологически активных добавок, так и в медицине, в том числе при диагностике заболеваний. Так было показано, что введение в состав молекулы атомов металлов, например, бария, в ряде случаев позволяет повысить выход ионов амфифильных соединений в виде их солей при ионизации, в том числе и под воздействием лазера. Зачастую дериватизация является достаточно долгим и трудоемким процессом пробоподготовки, а реакция введения функциональной группы редко проходит полностью. В то же время известно, что технология Ленгмюра, позволяет проводить реакцию солеобразования с образованием самоорганизующихся регулярных монослоев карбоксилатов металлов количественно. Однако при использовании такого подхода в аналитических целях потребуются специальная установка для получения монослоев, перенос монослоя в пробирку, а также подбор условий его растворения для нанесения образца на мишень, что может нивелировать одно из основных достоинств МАЛДИ-МС – экспрессность.

Следует отметить, что в последние годы все чаще предлагаются подходы в формате «Лаборатория на мишени», которые предполагают интеграцию одного или нескольких этапов пробоподготовки непосредственно на поверхности МАЛДИ мишени, и позволяют тем самым сократить время эксперимента, снизить затраты на реактивы и уменьшить количество требуемого образца. Проведение дериватизации амфифильных соединений на поверхности мишени при формировании самоорганизующихся монослоев Ленгмюра бариевых солей амфифильных соединений с их последующим коллапсированием может позволить значительно повысить выход ионов при МАЛДИ-МС анализе этого класса соединений. Соответственно, поиск решения, позволяющего проводить реакцию образования солей амфифильных соединений непосредственно на МАЛДИ мишени, является весьма актуальным.

Цель и задачи

Цель работы – Разработка метода формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности

водной субфазы для расширения возможностей анализа амфифильных соединений методом МАЛДИ-МС.

Для достижения поставленной цели следовало решить следующие **задачи**:

1. Выявить механизм формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей свободных жирных кислот, полученных по технологии Ленгмюра на плоской поверхности водной субфазы.

2. Исследовать возможность МАЛДИ-МС анализа бариевых солей амфифильных соединений в составе монослоя, полученного на плоской поверхности водной субфазы.

3. Разработать метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени при нанесении н-гексанового раствора аналита на каплю водной субфазы.

4. Исследовать механизм формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений путем изучения структуры и состава пленок, сформированных на поверхности МАЛДИ мишени с использованием технологии Ленгмюра, адаптированной к полусферической поверхности водной субфазы.

5. Разработать методику МАЛДИ-МС анализа бариевых солей амфифильных соединений в монослоях, сформированных на поверхности МАЛДИ мишени, и оценить количественные характеристики методики определения свободных жирных кислот.

6. Исследовать механизм образования ионов при МАЛДИ-МС анализе монослоев бариевых солей амфифильных соединений на примере полипренолов.

7. Провести апробацию методики анализа амфифильных соединений с использованием биологических образцов различной природы.

Научная новизна

1. Разработан метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы.

2. Показано, что механизмом образования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений, полученных на поверхности МАЛДИ мишени, является самопроизвольное перемещение монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести, где происходит образование мультимолекулярных структур, аналогичных коллапсированным монослоям.

3. Установлено, что ионизация бариевых солей амфифильных соединений происходит за счет отщепления нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса с образованием иона $[M-H+Ba]^+$.

4. Доказано, что при нанесении н-гексанового раствора полипренолов на поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария, на границе раздела фаз образуются алкоголяты бария, которые детектируются методом МАЛДИ-МС.

5. Разработана оригинальная методика МАЛДИ-МС анализа амфифильных соединений в виде их бариевых солей в составе монослоев, формирующихся непосредственно на поверхности МАЛДИ мишени.

Практическая значимость

Предложенный метод формирования самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений непосредственно на МАЛДИ мишени позволил увеличить чувствительность анализа амфифильных соединений методом МАЛДИ-МС и сократить время пробоподготовки. Разработанная методика анализа свободных жирных кислот в виде их монокарбоксилатов бария была внедрена и ис-

пользуется в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России (акт № 1/22 от 14.11.2022) и в лаборатории раннего эмбриогенеза ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (акт № 1-22 от 24.11.2022).

Полученные результаты могут быть использованы для скрининга амфифильных соединений в целях контроля качества лекарственных средств, биологически активных добавок и продуктов питания, а также в научно-исследовательских медицинских учреждениях для разработки новых методов диагностики заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Технология Ленгмюра, адаптированная к поверхности капли, позволяет при нанесении раствора стеариновой кислоты в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы бария, формировать на поверхности МАЛДИ мишени мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев стеарата бария по механизму самопроизвольного перемещения монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести.

2. Нанесение смеси свободных жирных кислот в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы бария, приводит к формированию регулярного монослоя, состоящего из монокарбоксилатов бария, что позволяет проводить анализ свободных жирных кислот методом МАЛДИ-МС с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

3. Формирование структур на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев бариевых солей амфифильных соединений на МАЛДИ мишени позволяет проводить анализ амфифильных соединений, неспособных образовывать твердый монослой.

4. Образование бариевых солей полипренолов происходит на границе раздела фаз при нанесении н-гексанового раствора полипренолов на поверхность водной субфазы, содержащей ионы бария.

5. Основным механизмом образования иона $[M-H+Ba]^+$ при МАЛДИ-МС анализе ненасыщенных спиртов является отщепление нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса.

Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается корректностью применяемых для решения поставленных задач подходов; проведением комплексных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа; воспроизводимостью экспериментальных данных; соответствием результатов современному уровню знаний в исследуемой области науки, а также результатами практической апробации разработанных подходов и методик.

Личный вклад

Экспериментальная работа, обработка и представление экспериментальных данных проводились лично автором диссертации. Автор диссертации принимал непосредственное участие в разработке аналитических методик, обсуждении полученных результатов и обосновании новых научных гипотез.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях: Международная научно-техническая конференция «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2018-2021 гг.); Республиканская конференция с международным участием, посвященная 110-летию со дня рождения В.А. Бандарина «Физико-химическая биология

как основа современной медицины» (Минск, 2019 г.); IX съезд общества физиологов растений России «Физиология растений - основа создания растений будущего» (Казань, 2019 г.); Республиканская конференция с международным участием, посвященная 80-летию со дня рождения Т.С. Морозкиной «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2020 г.); Республиканская конференция с международным участием, посвященная 75-летию со дня рождения Е.В. Барковского «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2021 г.); XXII Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера, посвященная 125-летию со дня основания Томского политехнического университета (Томск, 2021 г.); Конференция «Липиды 2021» (Москва, 2021 г.); XXV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022 г.).

Публикации

По результатам работы опубликованы 5 статей (среди которых 4 статьи в журналах, входящих в базы данных Web of Science или Scopus, и 1 в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций).

Структура и объём работы

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка литературы и 3 приложений.

Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 47 рисунков и 12 таблиц. Библиографический список включает 156 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

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

В первой главе приведен обзор литературы, посвященный общей характеристике метода МАЛДИ-МС; механизмам образования ионов при ионизации методом МАЛДИ; подходам к анализу амфифильных соединений на примере свободных жирных кислот (СЖК) и полипренолов методами масс-спектрометрии; механизмам формирования монослоев Ленгмюра на основе амфифильных соединений.

Во второй главе описаны условия проведенных экспериментов и способы обработки полученных данных. Представлены: а) методика формирования монослоев бариевых солей СЖК в чашке Петри; б) методики исследования мультимолекулярной структуры, образующейся в результате нанесения n-гексанового раствора стеариновой кислоты на каплю водного раствора, содержащего ионы бария, методами оптической тензиометрии, инфракрасной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, МАЛДИ-МС, атомно-силовой, световой и сканирующей электронной микроскопии; в) методика формирования монослоев бариевых солей СЖК непосредственно на МАЛДИ мишени; г) методики экстракции СЖК из биологических образцов различной природы; д) методика определения СЖК и полипренолов в виде бариевых солей в составе монослоев, формируемых непосредственно на МАЛДИ мишени, методом МАЛДИ-МС.

Третья глава, состоящая из 4 разделов, посвящена полученным результатам и их обсуждению.

Раздел «Классическая технология Ленгмюра формирования монослоев для анализа насыщенных СЖК методом МАЛДИ-МС» посвящена исследованиям состава монослоев, сформированных на плоской поверхности водной субфазы, содержащей ионы бария.

МАЛДИ-МС анализ СЖК является сложной аналитической задачей при использовании распространенных органических матриц ввиду перекрывания сигналов СЖК и сигналов матричных ионов. Введение в состав молекулы атома бария (получение соли ЖК) позволяет сдвинуть m/z аналита на 137 единиц в область более высоких значений m/z . Кроме того, барий обладает большим ионным радиусом, что определяет выраженный ионный характер связи в его соединениях и имеет характерное изотопное распределение, упрощающее идентификацию соединений, имеющих в своем составе этот элемент. Однако в связи с нерастворимостью ЖК в воде, получение бариевых солей затруднено. На примере стеариновой кислоты (HSt) неоднократно было показано, что реакция солеобразования СЖК может практически количественно проходить на границе раздела фаз при нанесении *n*-гексанового раствора HSt на поверхность водной субфазы, содержащей ионы металла. При этом на границе раздела фаз формируется нерастворимый в воде монослой, состоящий из стеаратов металла. Для успешного масс-спектрометрического анализа важно, чтобы на границе раздела фаз образовывались соли, содержащие только один остаток СЖК, иначе при нанесении раствора, содержащего смесь СЖК, интерпретация масс-спектров будет практически невозможна из-за сигналов смешанных солей. Поэтому важным было определить, сколько остатков СЖК способны связаться с ионом бария при нанесении насыщенного раствора HSt в *n*-гексане на водную подложку, содержащую ионы бария.

Для исследования процессов, протекающих между молекулами HSt и ионами бария, были проведены электрокинетические исследования монослоев в трех модельных системах «электролит/поверхность капилляра»: 1мМ KCl / пленки Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ) HSt (1), 1мМ BaCl₂ / ПЛБ дистеаратов бария (2) и 1мМ BaCl₂ / ПЛБ HSt (3). Результаты представлены на рисунке 1. Если в первом случае образования солей жирных кислот не происходило, и по мере увеличения pH электролита росло число диссоциированных карбоксильных групп на поверхности сформированных пленок, то в случае, когда через капилляр с нанесенными монослоями дистеарата ба-

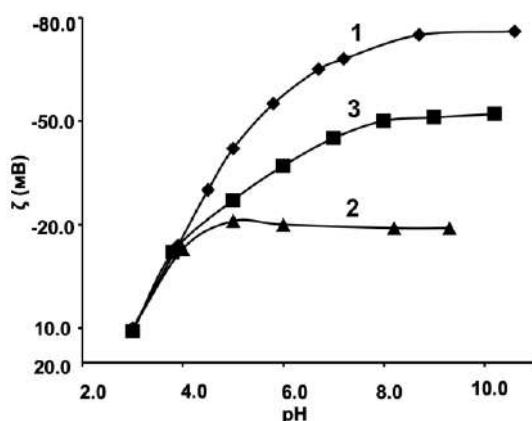


Рисунок 1 – Зависимость ζ -потенциала ПЛБ от pH электролита: 1 – ПЛБ стеариновой кислоты в 1мМ растворе KCl; 2 – ПЛБ дистеарата бария в 1мМ растворе BaCl₂; 3 – ПЛБ стеариновой кислоты в 1мМ растворе BaCl₂

рия, пропускали раствор BaCl₂, при pH > 5 на графике наблюдалось плато, свидетельствующее об отсутствии изменений в количестве диссоциированных групп. В системе, когда ПЛБ HSt вступали в соприкосновение с раствором BaCl₂, значения ζ -потенциала были выше, чем в системе (2), но ниже, чем в системе (1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в результате межфазной реакции HSt с ионами бария в водной субфазе формируется монослой, состоящий преимущественно из моностеаратов бария (BaSt⁺), где вторая валентность занимает или кислотным остатком исходной соли бария, или гидроксильной группой. Соответственно, можно было ожидать, что при воздействии лазерного импульса будет происходить отщепление второго кислотного остатка с обра-

зованием иона $BaSt^+$, что позволит значительно увеличить выход ионов по сравнению со стеариновой кислотой. Действительно, после нанесения насыщенного раствора HSt в н-гексане на водную субфазу, содержащую ацетат бария в концентрации 10^{-4} моль/л (эксперимент проводили в ванной Ленгмюра), сформированный монослой коллапсировали с помощью подвижных барьеров, переносили в микропробирку, растворяли в ацетонитриле и анализировали методом МАЛДИ-МС. В масс-спектре присутствовал сигнал, соответствующий $BaSt^+$, как по значению m/z (421,170), так и по изотопному распределению.

На следующем этапе исследования был сформирован монослой, состоящий из смеси насыщенных СЖК. В качестве объектов исследования были выбраны шесть СЖК: лауриновая (C12:0), тридекановая (C13:0), миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты. Монослой получали в чашке Петри (аналог ванны Ленгмюра меньшего объема), заполненной водным раствором ацетата бария ($C=1$ мг/мл). Для формирования монослоя на поверхность водной фазы наносили раствор смеси СЖК, растворенных в н-гексане. Образованный монослой коллапсировали с помощью подвижных барьеров, собирали металлическим шпателем и анализировали также, как и в предыдущем эксперименте. В полученном масс-спектре (рис. 2) были достоверно зарегистрированы (с интенсивностью, достаточной для того, чтобы зафиксировать характерное изотопное распределение) только 4 сигнала, соответствующих монокарбоксилатам бария (C14:0, C15:0, C16:0 и C18:0). По всей видимости, для воспроизводимого образования твердых монослоев, которые могут быть сколлапсированы на поверхности водной фазы, необходимо наличие в молекуле СЖК насыщенного углеводородного «хвоста», содержащего не менее 14 атомов углерода. Ненасыщенные и насыщенные СЖК, содержащие меньшее количество атомов углерода, практически не обладают способностью к формированию твердых монослоев, в то время как жидкий монослой собрать с поверхности водной фазы

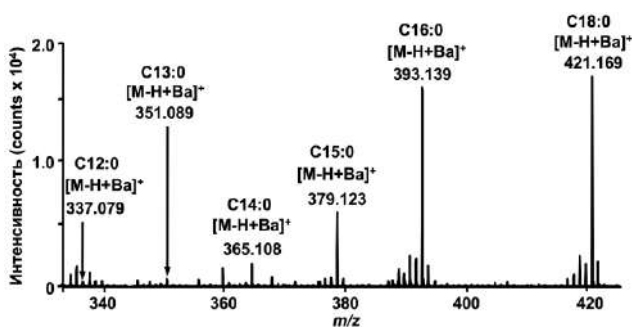


Рисунок 2 – МАЛДИ масс-спектр смеси стандартов СЖК при формировании монослоев в чашке Петри

не представляется возможным. В связи с этим, был сделан вывод, что классическую технологию Ленгмюра необходимо адаптировать к полусферической поверхности водной субфазы (капле), так как формирование монослоев карбоксилатов бария непосредственно на ячейке МАЛДИ мишени может позволить не только исключить потери аналитов, неспособных образовывать твердый монослой, но и значительно снизить количество образца, требуемого для анализа.

В Разделе «*Самоорганизация бариевой соли стеариновой кислоты на полусферической поверхности водной субфазы*» представлены результаты изучения процесса самоорганизации молекул стеарата бария на полусферической поверхности водной субфазы, а также исследования состава, структуры и морфологии пленок стеарата бария, сформированных на поверхности МАЛДИ мишени.

Процесс формирования структуры на основе стеарата бария изучали при нанесении насыщенного раствора HSt в н-гексане (0,7 мкл) на поверхность капли водного раствора нитрата бария ($C=10^{-2}$ моль/л, 0,7 мкл), помещенной на твердую подложку. Методом оптической тензиометрии осуществляли 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 уменьшался с 64° (рис. 3А) до 31° (рис. 3Б) за счет образования на поверхности пленки поверхностно-активного вещества (ПАВ), что приводило к снижению поверхностного натяжения, и как следствие угла смачивания. Через 5 секунд после нанесения раствора HSt в н-гексане капля принимала первоначальный вид, и значение угла смачивания возвращалось к исходному значению (рис. 3В). На основании этого был сделан вывод о том, что образовавшаяся пленка перемещается с поверхности капли на подложку и накапливается за пределами капли водной субфазы (рис. 3Г).

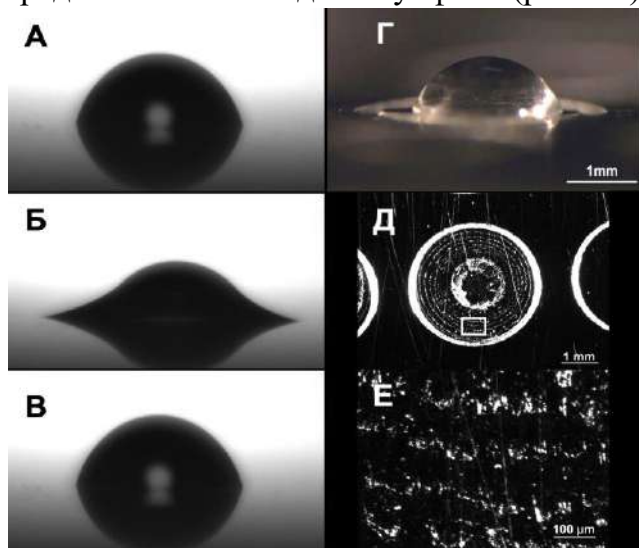


Рисунок 3 – Формирование пленки стеарата бария на твердой подложке: А – капля перед нанесением н-гексанового раствора HSt; Б – капля сразу после нанесения н-гексанового раствора HSt; В,Г – капля после испарения н-гексана; Д,Е – изображения ячейки МАЛДИ мишени после испарения водной капли

структуры водой для избавления от избытка нитрата бария была исследована методом световой микроскопии с использованием рассеянного света. Как показано на рисунке 3 Д,Е, структура нанесенного на ячейках мишени материала состоит из упорядоченных концентрических кругов яркосветящегося материала со скоплением по периметру водной капли. Такое распределение вещества позволяет предположить волнообразный характер формирования пленки вследствие комплекса процессов, связанных с перемещением образовавшейся пленки по поверхности водной субфазы и испарением н-гексана.

Для подтверждения перехода HSt в соль бария было проведено исследование методом инфракрасной (ИК) спектроскопии следующих объектов: а) порошок HSt; б) поликристаллический стеарат бария; в) монослой стеарата бария, коллапсированный в ванне Ленгмюра; г) пленка, сформированная на капле водного раствора нитрата бария (рис. 4). В ИК спектрах поликристаллического стеарата бария, коллапсированного монослоя стеарата бария и плёнки, полученной на капле, отсутствовала или практически отсутствовала полоса поглощения неионизированной карбоксильной группы (C=O) в области 1700 см^{-1} , в отличие от свободной HSt. Однако во всех спектрах, кроме спектра HSt, присутствовала полоса в области 1513 см^{-1}

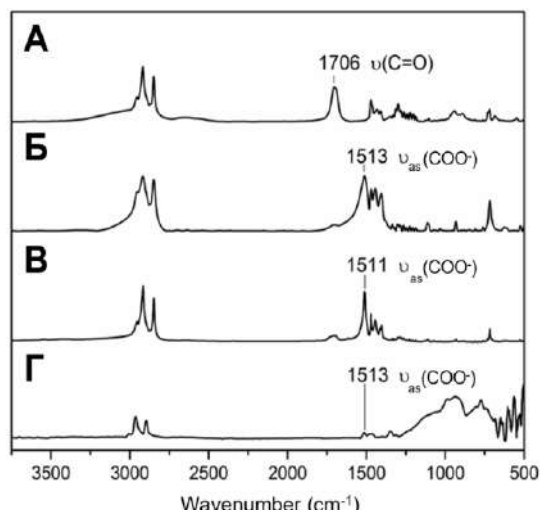


Рисунок 4 – ИК спектры: А – стеариновая кислота; Б – поликристаллический стеарат бария; В – коллапсированный монослой стеарата бария; Г – плёнка стеарата бария, полученная на капле водной субфазы

Поверхность ячейки мишени после формирования пленки, удаления капли субфазы и промывки полученной

см⁻¹, которая соответствует асимметричным валентным колебаниям ионизированной карбоксильной группы (COO⁻). Таким образом, был сделан 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 подтверждено методом энергодисперсионной рентгеновской (EDX) спектроскопии (рис. 5).

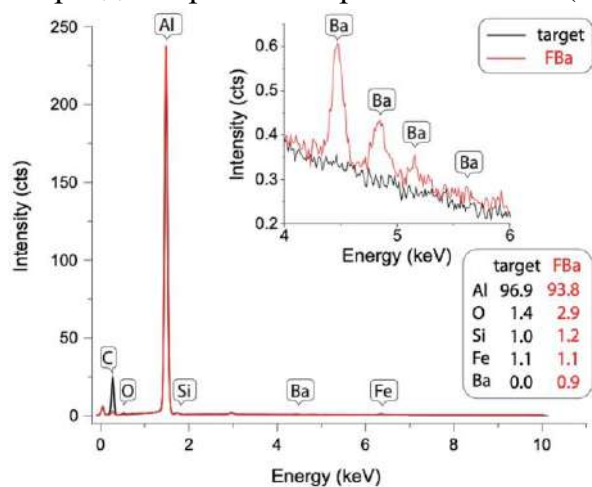


Рисунок 5 – EDX спектры пустой ячейки МАЛДИ мишени (черный) и коллапсированных слоев стеарата бария, сформированных на поверхности ячейки МАЛДИ мишени (красный)

Для исследования структурного звена пленки был проведен МАЛДИ-МС анализ полученных на ячейке мишени структур. В масс-спектре присутствовал сигнал с m/z 421,169, соответствующий положительно заряженному иону моностеарата бария $[M-H+Ba]^+$ (рис. 6А) и имеющий характерное для соединения, содержащего этот металл, изотопное распределение (рис. 6Б). При этом сигналов, соответствующих депротонированной форме HSt ($m/z_{расч}$ 283,263) или протонированному дистеарату бария ($m/z_{расч}$ 705,440), обнаружено не было. По результатам тандемного масс-спектрометрического (МС/МС) анализа в спектре наблюдалась серия сигналов, относящихся к разрывам σ -связей C-C в углеводородной цепи, характеризующаяся инкрементом m/z 14, соответствующего метиленовым группам (рис. 6В). Результаты МАЛДИ-МС анализа позволили 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.

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) были проанализированы: а) коллапсированные монослои стеарата бария, полученные в ванне Ленгмюра; б) плёнки, нанесённые на подложку по классической технологии Ленгмюра-Блоджетт (ПЛБ); в) пленка моностеарата бария, сформированная на твердой подложке в результате нанесения раствора HSt в н-гексане на каплю водного раствора нитрата бария. Спектры КР, представленные на рисунке 7, одинаковы для

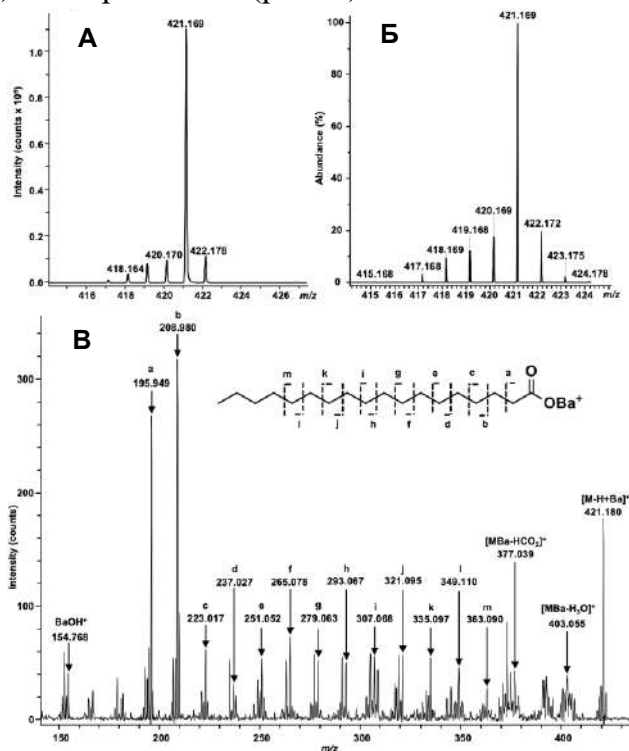


Рисунок 6 – Результаты МАЛДИ-МС анализа пленки, сформированной на капле субфазы, содержащей ионы бария: А – сигнал иона моностеарата бария в МАЛДИ масс-спектре; Б – рассчитанный масс-спектр моностеарата бария; В – тандемный масс-спектр моностеарата бария

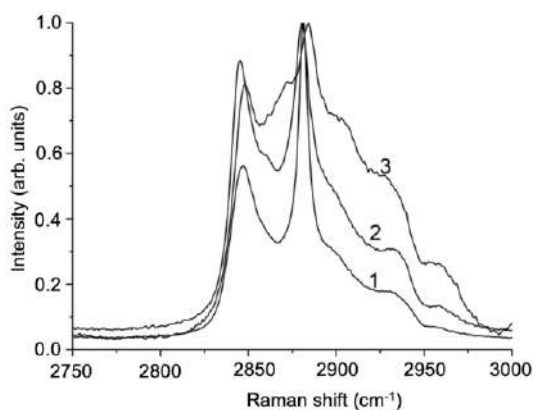


Рисунок 7 – Спектры КР, полученные при исследовании классических ПЛБ стеарата бария (1); монослоя стеарата бария, коллапсированного в ванне Ленгмюра (2); структуры, сформированной у периметра водной капли, после испарения н-гексана (3)

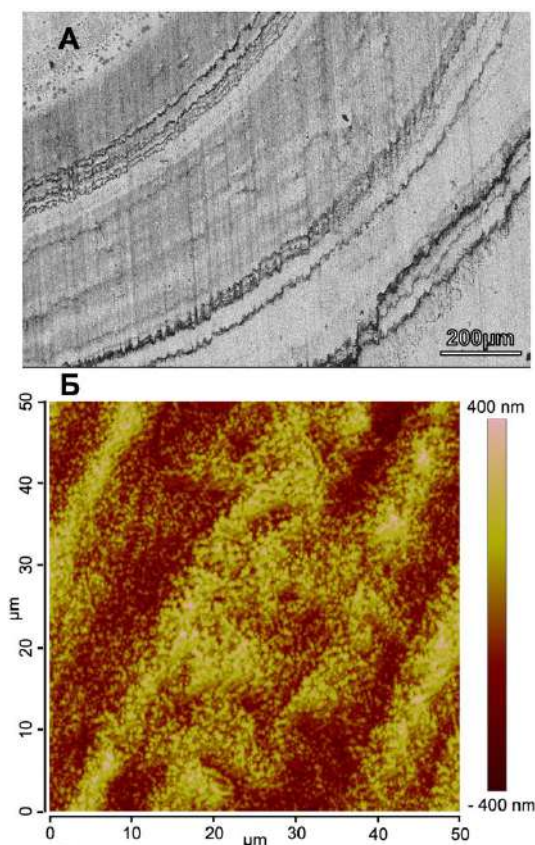


Рисунок 8 – СЭМ изображение пленок стеарата бария, сформированных на МАЛДИ мишени (А); АСМ изображение пленок стеарата бария, сформированных на графитовой подложке (Б)

трех рассмотренных структур вне зависимости от способа получения материала. На основании этого можно сделать вывод, что на капле формируется структура, подобная классическим ПЛБ, образующимся при многократном наслаивании одного монослоя на другой, или при коллапсировании одного монослоя. Таким образом, пленка, образующаяся на поверхности капли водной субфазы, является монослоем моностеарата бария, который при самопроизвольном передвижении на подложку коллапсируется, образуя мультиструктуру. Результаты дополнительного исследования методом спектроскопии КР в режиме реального времени с помощью микроскопической приставки свидетельствовали об образовании мультиструктуры уже за пределами капли из монослоя, сформированного на ней.

Исследование морфологии сформированных на капле пленок методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) представило более детальную картину формирования упорядоченных концентрических кругов стеарата бария (рис. 8А). По всей видимости, процесс самопроизвольного коллапсирования не ограничивается пространством близким к периметру водной капли, а распространяется на всю область растекания н-гексана. Неравномерная яркость затемненных участков на изображении свидетельствует о различном количестве монослоев, образующих мультиструктуру. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) была исследована морфология пленок стеарата бария, сформированных на графитовой подложке, в области близкой к границе испарения н-гексана (рис. 8Б). Образец характеризовался развитой поверхностью с формированием структур различных масштабов. Наиболее крупным структурным элементом поверхности является волнообразный рельеф с перепадом высот 300-500 нм и периодом около 10 мкм, 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. На основании полученных результатов можно сделать вывод о механизме формирования структуры: 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.

Таким образом, комплекс исследований показал, что при нанесении раствора HSt в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы бария, образуется монослой на основе моностеарата бария, который при передвижении вниз под действием силы тяжести самопроизвольно коллапсируется на подложке, формируя мультиструктуры аналогичные ПЛБ или коллапсированным монослоям, полученным в ванне Ленгмюра.

В Разделе «Анализ СЖК в виде монокарбоксилатов бария при формировании монослоев на поверхности МАЛДИ мишени» описывается разработанная методика, включающая в себя дериватизацию СЖК на поверхности МАЛДИ мишени, очистку полученных структур и анализ СЖК в виде монокарбоксилатов бария. Приводятся количественные характеристики методики, а также результаты ее апробации.

Исследование самоорганизации молекул стеарата бария на полусферической поверхности водной субфазы при формировании пленок на МАЛДИ мишени показало, что на границе раздела фаз достигается практически количественная диссоциация СЖК с переходом кислоты в соль. Соответственно, было сделано предположение, что нанесение на водную фазу смеси СЖК, растворенной в н-гексане, приведет к образованию монослоя Ленгмюра, состоящего из солей всех СЖК, входящих в состав смеси. Для проведения эксперимента использовали набор тех же шести СЖК, для которых монослои получали в чашке Петри: C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0 и C18:0. В связи с ограниченностью поверхности водной фазы, концентрацию СЖК в исследуемой смеси снизили в 100 раз по сравнению с экспериментом по получению монослоев в чашке Петри (до 250 нг/мл каждой кислоты). Оптимальное формирование монослоя наблюдалось в случае, когда на каплю водного раствора ацетата бария (C=1 мг/мл) объемом 0,5-0,75 мкл наносили образец в н-гексане такого же объема. При таком соотношении н-гексан, стекая с поверхности водной капли, не распространялся за границы области, предназначенной для нанесения образца. После испарения органической фазы, на поверхности мишени образовывалась тонкая пленка. 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. Оптимальным объемом, который необходимо наносить на мишень, было выбрано значение 0,6 мкл.

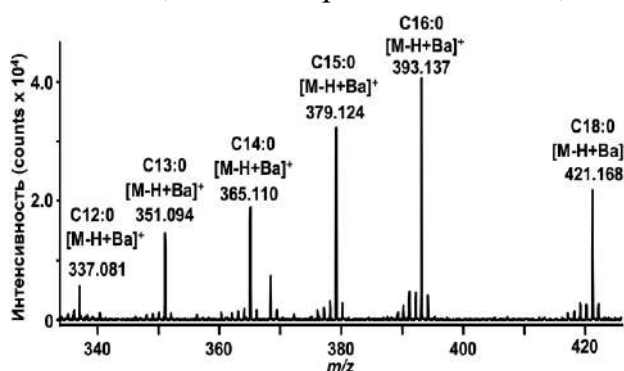


Рисунок 9 – МАЛДИ масс-спектр смеси стандартов СЖК при формировании монослоев на ячейке МАЛДИ мишени

МАЛДИ-МС анализ полученных монослоев показал, что при таких условиях нанесения образца, в отличие от эксперимента с плоской поверхностью водной субфазы, в масс-спектре регистрируются сигналы, соответствующие бариевым солям всех шести СЖК (рис. 9). Несмотря на значительное снижение концентрации СЖК, монокарбоксилаты бария были идентифицированы, как по значению m/z , так и по характерному изотопному распределению. Таким образом, процедура формирования монослоев была успешно

перенесена из ванны непосредственно на мишень, что значительно снизило требования к количеству образца и сократило время, необходимое для пробоподготовки.

Для оптимизации методики (на примере экстракта из *Fucus vesiculosus*) с целью снижения мощности лазера, требующейся для ионизации, к водной субфазе была добавлена водорастворимая матрица, 2,5-дигидроксibenзойная кислота (ДНВ), в концентрации 0,25 мг/мл, концентрация ацетата бария была снижена до 0,25 мг/мл, и введена стадия обработки сформированных монослоев 90% водным ацетонитрилом для частичного разрушения структуры и удаления избытка матрицы и других соединений, не входящих в состав монослоя. Анализ проводили при 28000-30000 лазерных импульсах ячейки с образцом по всей поверхности коллапсированных монослоев.

С использованием оптимизированной методики были проведены эксперименты по определению чувствительности и параметров линейности предложенного подхода для смеси пяти стандартов СЖК в н-гексане (С12:0, С13:0, С14:0, С15:0, С16:0). Нормирование интенсивностей сигналов проводили по значению интенсивности пика, соответствующего монопальмитату бария (m/z 393,14). 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 (табл. 1).

Таблица 1- Чувствительность и параметры линейности МАЛДИ-МС метода для анализа СЖК

| СЖК | m/z [M-H+Ba] ⁺ | LOD, фмоль | LOQ, фмоль | LDR | Угловой коэффициент | Точка пересечения с осью ординат | R ² | Точность |
|-------|-----------------------------|------------|------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|----------------|----------|
| С12:0 | 337,075 | 0,05 | 0,50 | 1 x 10 ⁴ | 1,60E-02 | 4,80E-02 | 0,95 | 99,6 |
| С13:0 | 351,091 | 0,05 | 0,47 | 1 x 10 ⁴ | 2,20E-02 | 6,54E-02 | 0,98 | 99,7 |
| С14:0 | 365,106 | 0,01 | 0,04 | 1 x 10 ⁴ | 9,41E-02 | 2,60E-01 | 0,99 | 101,7 |
| С15:0 | 379,122 | 0,01 | 0,04 | 1 x 10 ⁴ | 1,15E-01 | 3,35E-01 | 0,99 | 100,6 |
| С16:0 | 393,138 | 0,01 | 0,09 | - | - | - | - | - |

Линейный динамический диапазон (LDR) для компонентов смеси СЖК определяли в соответствии с графиками нормированных интенсивностей сигналов аналитов от отношений концентраций, отложенных в логарифмическом масштабе. Для всех исследованных аналитов LDR составил четыре порядка (табл. 1). Важно отметить, что полученные значения LDR (10⁴) не противоречат тому, что LDR использованного в работе масс-спектрометра составляет только 10², так как они обусловлены выбранной стратегией нормализации, при которой концентрации аналитов, нормированные на значение концентрации пальмитиновой кислоты, охватывали диапазон в 4 порядка. В тоже время значения коэффициента детерминации (R²) были не ниже 0,95, а точность находилась в диапазоне от 99,6 до 101,7 % (табл. 1). При оценке влияния изотопного распределения бария на возможность полуколичественного анализа СЖК внутри одного кластера (С16:0/С16:1, С18:0/С18:1, отличие по значению m/z на 2 единицы) было определено, что отношения интенсивностей моноизотопных пиков изменялись линейно в зависимости от процентного содержания мононенасыщенных СЖК в образце (R² ≥ 0,99). Соответственно, изотопное распределение бария не вносило существенных искажений при оценке содержания вещества в случае наличия интерферирующих компонент. При исследовании сходимостей, оцениваемых по величине коэффициента вариации (CV), на примере экстрактов из *F. vesiculosus* было выявлено, что внутрячечная и внутривнедневная сходимость не превышают 14%, а междневная – 18%. Также

экстракт из *F. vesiculosus* параллельно был проанализирован с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Полученные результаты свидетельствовали о хорошей согласованности данных между собой, при этом разработанная методика позволила определить на 6 СЖК больше. Исследование образцов различной природы на примере экстрактов из *F. vesiculosus*, семян и клубеньков гороха (*Pisum sativum* L), дафний (*Daphnia magna*), мидий (*Mytilus edulis*), икры беломорской сельди (*Clupea pallasii marisalbi*), человеческой фолликулярной жидкости, а также плазмы крови кролика и человека показало, что образцы имеют различные по составу наборы СЖК, причем отличия наблюдались как в количестве сигналов, соответствующих монокарбосилатам бария, так и в их относительных интенсивностях в масс-спектрах. Высокая чувствительность и широкий LDR в совокупности с хорошей точностью и сходимостью делают данный метод отличным инструментом для скрининга биологических образцов различной природы.

На следующем этапе для экономии времени работы и усилий оператора разработанную методику усовершенствовали за счет автоматизации процесса регистрации масс-спектров. Для этого водно-органическую каплю, которая образуется при обработке ячейки мишени 90% водным ацетонитрилом, после приобретения ею ровной круглой формы выводили за пределы ячейки с помощью наконечника дозатора. В результате при стохастическом лазерном облучении образца попадание лазерного импульса в область, содержащую нецелевые компоненты, практически исключается.

В качестве модельного объекта использовали *n*-гексановый экстракт из штамма бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3, в котором были достоверно идентифицированы 7 СЖК: C14:0, C15:0, C16:1, C16:0, C18:2, C18:1, C18:0. Эксперимент проводили в 9 технических повторях. Регистрацию спектров проводили как в ручном, так и автоматизированном режиме. При оценке сходимости для каждой серии измерений интенсивности сигналов нормировали на значение интенсивности пика моноолеата бария (m/z 419,16). Как показано в таблице 2, результаты хорошо согласуются между собой, и при автоматическом режиме облучения CV не превышает 10%.

Таблица 2 – Значения внутрисуточной сходимости результатов, полученные для *n*-гексанового экстракта из бактерий *Rhizobium leguminosarum* KVI3 при двух различных режимах регистрации масс-спектров

| СЖК | m/z [M-H+Ba] ⁺ | Нормированная интенсивность | | | |
|-------|--------------------------------|---------------------------------|------|--|------|
| | | Регистрация спектров вручную | | Автоматический режим регистрации спектров | |
| | | Среднее±SD | CV,% | Среднее±SD | CV,% |
| C14:0 | 365,106 | 0,086±0,008 | 9,2 | 0,068±0,004 | 6,2 |
| C15:0 | 379,124 | 0,102±0,009 | 8,8 | 0,095±0,005 | 5,2 |
| C16:1 | 391,124 | 0,283±0,016 | 5,8 | 0,372±0,034 | 9,1 |
| C16:0 | 393,137 | 0,548±0,031 | 5,6 | 0,531±0,032 | 6,1 |
| C18:2 | 417,145 | 0,381±0,020 | 5,3 | 0,358±0,024 | 6,7 |
| C18:0 | 421,169 | 1,661±0,167 | 10,1 | 1,964±0,114 | 5,8 |

Чтобы проиллюстрировать потенциал предлагаемого подхода, было проведено сравнительное исследование состава и относительного количественного содержания СЖК двух близких видов ризобий, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1026 и *Sinorhizobium meliloti* RCAM1021. Эксперимент проводили в 4 биологических и 9 технических повторях (всего 36 масс-спектров для каждого вида). По результатам МАЛДИ-МС анализа экстрактов было установлено наличие 9 СЖК, причем при сравнении спектров, полученных для разных видов при одинаковых условиях, не бы-

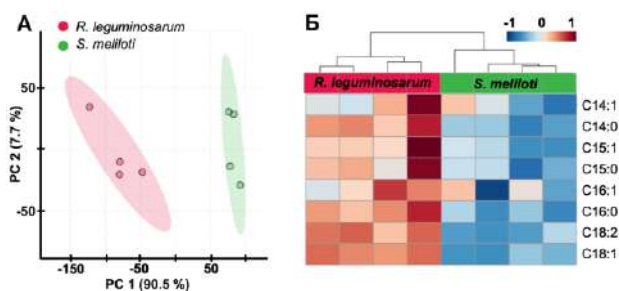


Рисунок 10 – Результаты анализа методом PCA (А) и тепловая карта (Б) различий в содержании СЖК между образцами *R. leguminosarum* и *S. meliloti*

видов ризобий (рис. 10А) при низкой дисперсии между биологическими повторами, что проиллюстрировано соответствующей тепловой картой (рис. 10Б).

Таким образом, можно сделать вывод, что использование технологии Ленгмюра в комбинации с МАЛДИ-МС позволяет анализировать большие группы образцов, а проведение масс-спектрометрического анализа в режиме автоматической регистрации масс-спектров позволяет значительно снизить трудозатраты оператора и получить воспроизводимые результаты.

Раздел «**Исследование механизма образования ионов при МАЛДИ-МС анализе полипренолов в виде моноалкоголятов бария**» посвящен адаптации разработанной методики анализа СЖК к длинноцепочечным ненасыщенным спиртам на примере полипренолов и исследованию механизма образования ионов моноалкоголятов бария.

С точки зрения масс-спектрометрического анализа вследствие крайне низкой способности к ионизации особый интерес представляет такой класс соединений, как жирные спирты, в том числе полипренолы. Мы предположили, что полипренолы в силу наличия у них амфифильных свойств, так же как и СЖК, способны образовывать мономолекулярные пленки на поверхности водной субфазы. В качестве объекта исследования был использован экстракт из хвои пихты сибирской (*Abies sibirica* L.) с содержанием полипренолов 90%. На первом этапе представлялось немаловажным определить способность полипренолов формировать монослой на поверхности водной субфазы. При исследовании зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на одну молекулу, было установлено, что при уменьшении значения площади наблюдается рост поверхностного давления, что свидетельствовало об образовании ориентированного конденсированного монослоя полипренолов на границе раздела фаз. Соответственно, на следующем этапе смесь полипренолов в н-гексане была проанализирована в полном соответствии с разработанной для анализа СЖК методикой.

Несмотря на то, что полипренолы относятся к неионогенным ПАВ, в масс-спектре (рис. 11), полученном при анализе монослоев полипренолов, сформированных на ячейке мишени, было обнаружено 9 сигналов с близким к гауссовому распределением полимер гомологов ($\Delta m/z$ 68). Значение m/z основного пика в масс-спектре (m/z 1243,911) соответствовало расчетному значению для иона $[M-H+Ba]^+$ полипренола с 16 изопреновыми звеньями (Pre-16, $m/z_{расч}$ 1243,910), что было подтверждено результатами МС/МС анализа (рис. 12). Соответственно, в масс-спектрах полипренолы регистрировались именно в форме ионов моноалкоголятов бария. При оценке чувствительности было выявлено, что предел обнаружения полипренолов при

ло выявлено различий в наборе сигналов. Для нормализации интенсивности сигналов был использован сигнал с m/z 421 (моностеарат бария). Гомогенность групп и различия между двумя видами оценивались методами многомерной статистики. Было выявлено 6 статистически значимо отличающихся ($p < 0,05$) по содержанию СЖК между двумя видами. По результатам статистической обработки нормализованных данных методом главных компонент (PCA) достигалось разделение двух

использовании разработанной методики составил 6 пг, что было достаточно неожиданным. В связи с этим представляли интерес возможные механизмы образования $[M-H+Ba]^+$ ионов полипренолов. Было сделано предположение о двух вероятных механизмах образования ионов: 1) так же как и в случае СЖК, образование смешанной соли в ходе реакции на границе раздела органической и водной фаз с отщеплением под воздействием лазерного импульса нежирного кислотного остатка; 2) в результате ион-молекулярных реакций в газовом облаке после облучении образца лазером.

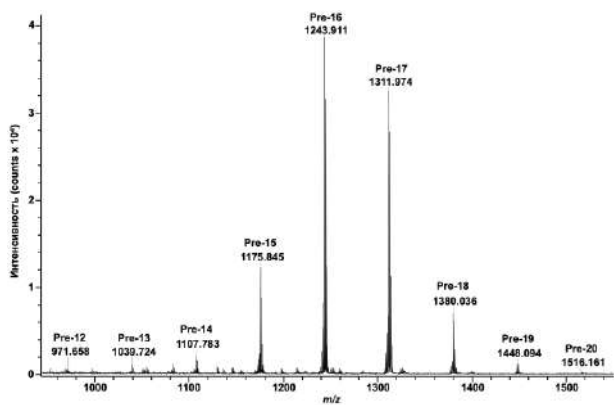


Рисунок 11 – МАЛДИ масс-спектр н-гексанового раствора смеси полипренолов из *Abies sibirica* L.

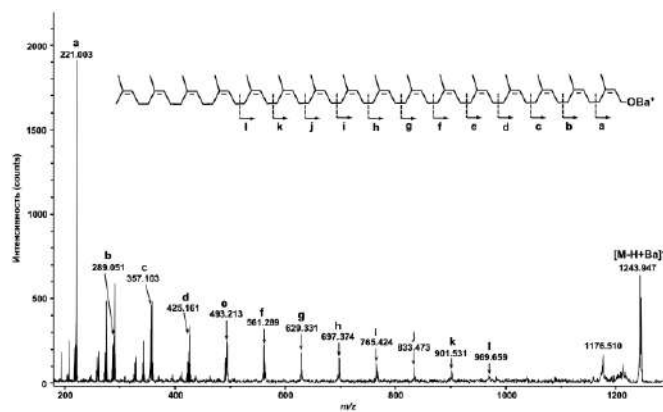


Рисунок 12 – Тандемный масс-спектр m/z 1243,947, соответствующий $[M-H+Ba]^+$ Pre-16

Для того, чтобы выяснить, какой из механизмов дает основной вклад при образовании моноалкоголятов бария, был проведен эксперимент, определяющий чувствительность анализа при минимизации вероятности прохождения реакции на границе раздела фаз. Нами были рассмотрены четыре способа нанесения образца на мишень, отличавшиеся между собой как по свойствам используемого растворителя в органической фазе (неполярный н-гексан; полярный изопропанол), так и по свойствам поверхности, с которой вступают в контакт молекулы полипренола (поверхность водной капли раствора соли бария и ДНВ; кристаллы соли бария и ДНВ, образовавшиеся после высыхания водной капли).

На первом этапе была произведена замена органического растворителя с неполярного (н-гексан) на полярный (изопропанол), что привело к снижению чувствительности (от 5 нг/мл для гексана до 20 нг/мл для изопропанола) за счет уменьшения количества молекул полипренолов в ориентированном монослое на поверхности капли. Затем был исследован вариант системы, при котором смесь полипренолов в изопропанол наносили на кристаллы соли бария и ДНВ, практически исключая возможность протекания реакции образования моноалкоголятов на поверхности раздела фаз ввиду отсутствия условий для ориентации амфифильного соединения. Целевые сигналы моноалкоголятов бария были зарегистрированы только при концентрации 10 мкг/мл, что отличалось на несколько порядков в большую сторону по сравнению с результатами, полученными в предыдущих случаях. Так как в таких условиях образование ориентированного монослоя на границе раздела фаз практически неосуществимо, образование $[M-H+Ba]^+$ ионов может проходить в результате реакций в газовой фазе при облучении образца лазером в условиях МАЛДИ-МС анализа.

Наиболее интересным оказался случай, когда пробоподготовка включала нанесение раствора полипренолов в н-гексане на высушенные смешанные кристаллы ацетата бария и ДНВ, так как чувствительность анализа оказалась такой же высокой

(5 нг/мл), как в случае с нанесением н-гексанового раствора на водную каплю. Можно предположить, что при испарении н-гексанового раствора полипренолов на поверхности кристаллов ацетата бария происходит ориентация молекул полипренола, и полярная гидроксильная группа вступает в контакт с ионом бария. За счет этого при испарении образца под действием лазерного излучения достигается высокий выход моноалкоголятов бария, а соответственно и высокая чувствительность анализа.

Соответственно, можно сделать вывод, что основной вклад при образовании ионов $[M-H+Ba]^+$ вносит отщепление нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса, а методика, основанная на формировании на МАЛДИ мишени монослоев бариевых солей, может быть успешно использована для анализа неионогенных ПАВ (полипренолов).

Таким образом, разработанный метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы позволяет значительно повысить выход ионов при МАЛДИ-МС анализе по сравнению с исходными соединениями, особенно в случае неионогенных ПАВ. Разработанная методика анализа может быть эффективно использована в экспериментах, требующих значительного количества, как экспериментальных, так и технических повторов в том числе для профилирования свободных жирных кислот и полипренолов в составе биологических образцов различной природы.

В ЗАКЛЮЧЕНИИ обобщены основные результаты:

1. Разработан метод формирования монослоев бариевых солей амфифильных соединений на поверхности МАЛДИ мишени за счет адаптации технологии Ленгмюра к полусферической поверхности водной субфазы для дальнейшего масс-спектрометрического анализа, позволяющий сократить время пробоподготовки и увеличить выход ионов при анализе амфифильных соединений методом МАЛДИ-МС.

2. Доказано, что технология Ленгмюра, адаптированная к поверхности капли, позволяет формировать мультимолекулярные структуры на основе коллапсированных самоорганизующихся регулярных монослоев стеарата бария в пределах ячейки МАЛДИ мишени по механизму самопроизвольного перемещения монослоев с полусферической поверхности водной субфазы на подложку под действием силы тяжести.

3. Продемонстрировано, что нанесение смеси свободных жирных кислот в н-гексане приводит к образованию регулярного монослоя монокарбоксилатов бария, что позволяет проводить профилирование свободных жирных кислот методом МАЛДИ-МС с высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью.

4. Установлено, что при МАЛДИ-МС анализе амфифильных соединений в виде их солей бария основным механизмом образования иона $[M-H+Ba]^+$ является отщепление нежирного кислотного остатка (или гидроксильной группы) под воздействием лазерного импульса.

5. На примере полипренолов с помощью метода МАЛДИ-МС показано, что образование солей амфифильных соединений, относящихся к неионогенным ПАВ, происходит на границе раздела фаз при нанесении н-гексанового раствора ПАВ на поверхность водной субфазы, содержащей ионы металла.

6. Определены условия проведения эффективного МАЛДИ-МС анализа амфифильных соединений в виде их солей бария. Показано, что использование в качестве водной субфазы водного раствора ацетата бария в концентрации 0,25 мг/мл, содержащего органическую матрицу, 2,5-дигидроксибензойную кислоту, в концентрации 0,25 мг/мл, позволяет проводить эффективный масс-спектрометрический анализ сво-

бодных жирных кислот и жирных спиртов в составе монослоев, сформированных на МАЛДИ мишени. Установлено, что пределы обнаружения для смеси стандартов 5 насыщенных СЖК составили от 10 до 50 фмоль, а пределы количественного определения СЖК не превышали 500 фмоль. Для полипrenoлов предел обнаружения составил 6 пг смеси полипrenoлов, выделенных из пихты сибирской.

7. Показано, что разработанная методика анализа амфифильных соединений в виде их солей бария методом МАЛДИ-МС может быть успешно использована для профилирования свободных жирных кислот и полипrenoлов в составе биологических образцов различной природы.

Список публикаций по теме диссертации в ведущих рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК при Минобрнауки РФ, и в журналах, входящих в базы данных Web of Science или Scopus

1. Podolskaya, E.P. 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 / E.P. Podolskaya, **A.S. Gladchuk**, O.A. Keltsieva, P.S. Dubakova, E.S. Silyavka, E. Lukashova, V. Zhukov, N. Lapina, M.R. Makhmadaliev, A.M. Gzgzyan, N.G. Sukhodolov, K.A. Krasnov, A.A. Selyutin, A. Frolov // *Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 91, № 2. – P. 1636-1643.
2. **Гладчук, А.С.** Оптимизация методики анализа свободных жирных кислот с помощью комбинации МАЛДИ-масс-спектрометрии и технологии получения монослоев Ленгмюра / **А.С. Гладчук**, Е.Г. Батоцыренова, Е.П. Подольская // *Научное приборостроение*. – 2020. – Т. 30, № 1. – С. 39–49.
3. **Gladchuk, A.** High-Throughput Fingerprinting of Rhizobial Free Fatty Acids by Chemical Thin-Film Deposition and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry / **A. Gladchuk**, J. Shumilina, A. Kusnetsova, K. Bureiko, S. Billig, A. Tsarev, I. Alexandrova, L. Leonova, V.A. Zhukov, I.A. Tikhonovich, C. Birkemeyer, E. Podolskaya, A. Frolov // *Methods and Protocols*. – 2020. – V. 3. – P. 36.
4. **Gladchuk, A.S.** 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 / **A.S. Gladchuk**, K.A. Krasnov, O.A. Keltsieva, Y.K. Kalninia, M.L. Alexandrova, N.S. Ivanov, M.Z. Muradymov, N.V. Krasnov, V.L. Reynyuk, N.G. Sukhodolov, E.P. Podolskaya // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2021. – V. 35, № 21. – P. e9185.
5. **Gladchuk, A.S.** Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment / **A.S. Gladchuk**, E.S. Silyavka, V.V. Shilovskikh, V.N. Bocharov, I.M. Zorin, N.V. Tomilin, N.A. Stepashkin, M.L. Alexandrova, N.V. Krasnov, A.Yu. Gorbunov, V.N. Babakov, N.G. Sukhodolov, A.A. Selyutin, E.P. Podolskaya // *Thin Solid Films*. – 2022. – V. 756. – P. 139374.

Благодарности

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