

Шамраева Мария Александровна

**МЕТОД ПРЯМОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, ОСНОВАННЫЙ НА ГЕНЕРАЦИИ
ИОНОВ ПРИ ПЕРЕХОДЕ ИЗ ЖИДКОЙ ФАЗЫ В ГАЗООБРАЗНУЮ С
ПОВЕРХНОСТИ ПОРИСТОГО СФЕРИЧЕСКОГО ПРОБООТБОРНИКА**

1.4.4 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

Москва – 2022

Работа прошла апробацию в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Московский физико-технический технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный руководитель: Пеков Станислав Игоревич, кандидат химических наук, доцент, департамент молекулярной и биологической физики, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Защита состоится **«23» декабря 2022 года в 10 часов 00 минут** на заседании диссертационного совета **ФЭФМ.1.4.4.01**, созданного на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ, Физтех)

по адресу: 14170, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МФТИ и на сайте организации <https://mipt.ru>

Автореферат разослан **«23» ноября 2022 г.**

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

Некипелов Вячеслав Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

Методы масс-спектрометрического профилирования биологических объектов, вследствие развития аналитических характеристик масс-спектрометров, в частности, разрешающей способности, скорости сканирования и диапазона регистрируемых масс, активно применяются как физико-химический метод анализа сложных биологических смесей и позволяют проводить высокоинформативные исследования.

Однако остаётся актуальным направление развития масс-спектрометрии, связанное с уменьшением времени анализа и его упрощением, включая упрощение предварительных процедур подготовки пробы, поскольку экспресс-идентификация необходима при решении широкого класса задач: для выявления токсических веществ в отделении неотложной медицинской помощи; в клиническом анализе для высокопроизводительного мониторинга терапевтических препаратов; для быстрого тестирования пищевых продуктов на предмет обнаружения в них пестицидов, что особенно актуально для пищевой и сельскохозяйственной промышленности; для идентификации контаминаントов и их количественного определения в почве и воде. Классические методики, используемые для количественного анализа, требуют транспортировки больших объёмов проб в лабораторию с последующими процедурами тщательной и трудоёмкой очистки перед проведением анализа. Кроме того, традиционные аналитические методы, такие как газовая хроматография и жидкостная хроматография, не являются универсальными для ряда областей, например криминалистики, поскольку требуют инвазивной подготовки проб и в конечном итоге приводят к разрушению пробы, вследствие чего невозможно сохранение материалов, имеющих отношение к уголовным расследованиям и национальной безопасности. Необходима также и возможность проведения анализа молекул в их нативном состоянии для анализа сложных биологических материалов, начиная от бактерий и заканчивая тканями растений и животных.

Современные разработки в области прямой масс-спектрометрии позволили снизить сложность аналитических рабочих процессов за счёт упрощения процедуры подготовки проб и сокращения общего времени анализа, благодаря чему данные методы стали применяться в различных областях: токсикологии, фармакокинетике, допинг-контроле, контроле при проведении хирургических операций, а также в областях медицинских исследований: протеомике, метаболомике и липидомике.

Однако для разработки быстрого полуколичественного метода прямой масс-спектрометрической экстракционной ионизации, в котором реализуется исследование биологического образца в его нативной форме, требуется оптимизация физико-химических параметров процесса: экстракции и ионизации в режиме генерации положительных и отрицательных ионов, для улучшения чувствительности и воспроизводимости проводимого исследования.

Целью данной работы является исследование физико-химических закономерностей электрораспылительной ионизации молекул со сферической поверхности пробоотборника для разработки быстрого количественного метода анализа биологических образцов с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- Изучение процессов электрораспылительной ионизации с поверхности пробоотборников различной формы под воздействием электрического поля в присутствии электролитов. Выявление особенностей ионизации и фрагментации, влияющих на аналитические характеристики разрабатываемого метода;
- Исследование процессов электрораспылительной ионизации на поверхности сферических пробоотборников в присутствии различных биологических матриц. Выявление закономерностей экстракции экзогенных метаболитов, определяющих аналитические характеристики разрабатываемого метода;
- Разработка метода прямого полуколичественного масс-спектрометрического анализа биологических образцов на основе экстракции ионов без предварительной пробоподготовки и хроматографического разделения, основанного на тандемной масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения с преобразованием Фурье. Валидация разработанного метода на модельных объектах;
- Изучение аналитических возможностей разработанного метода для анализа лекарственных препаратов и их метаболитов.

Методология и методы исследования. Предметом исследования являлся процесс электрораспылительной ионизации с поверхности объёмных пробоотборников различной формы. Объектами исследования являлись экзогенные молекулы и их метаболиты в различных матрицах, нанесённые на пробоотборники из спрессованного волокнистого полиэтилентерефталата сферической и конической формы. Для подтверждения структуры эмиттеров были использованы физико-химические методы анализа: ИК-спектроскопия, твердотельная спектроскопия ЯМР ^{13}C , рамановская спектроскопия и дифференциальная сканирующая калориметрия. Изучение процессов электрораспыления для ионных источников

различной геометрии, в том числе оценка надёжности и стабильности метода на основе прямой ионизации электрораспылением в режиме генерации положительных и отрицательных ионов, проведено с использованием вольт-амперных характеристик. Для исследования аналитических возможностей разработанного метода прямой ионизации с поверхности сферических пробоотборников была применена масс-спектрометрия высокого разрешения и tandemная масс-спектрометрия.

Воспроизводимость и согласованность полученных результатов подтверждают достоверность результатов, обладающих следующей научной новизной:

- Впервые исследованы закономерности формирования «конусно-струйного» режима электрораспыления с поверхности сферического пробоотборника в присутствии электролитов различной силы, и показано, что режим электрораспыления с поверхности сферического пробоотборника характеризуется более широким диапазоном рабочих напряжений, чем аналогичный режим, получаемый в результате экстракции ионов с поверхности объёмных пробоотборников конической формы или с поверхности бумажных пробоотборников, используемых в методе Paper Spray.
- Впервые продемонстрировано, что использование сферических пробоотборников обеспечивает более стабильные процессы ионизации и позволяет существенно уменьшить колебания ионных токов от образца к образцу как в режиме регистрации положительных ионов, так и в режиме регистрации отрицательных ионов. Выявленные физико-химические закономерности позволили создать чувствительный метод анализа, основанный на прямой масс-спектрометрической ионизации.
- Показано, что использование объёмных пробоотборников для сбора биологических проб *in vivo* с последующим хранением высушенных образцов непосредственно на поверхности сферического пробоотборника обеспечивает стабильное отношение интегральных интенсивностей PRM-переходов экзогенных молекул.

Результаты работы обладают как теоретической, так и практической значимостью в областях физической химии и аналитической химии. Показана высокая эффективность экстракции и ионизации с поверхности пробоотборников сферической поверхности, в результате чего был разработан быстрый и чувствительный метод анализа, основанный на tandemной прямой масс-спектрометрии, который может быть широко использован в области физической и аналитической химии, а также биохимии для проведения количественного масс-спектрометрического анализа целевых анализаторов. Кроме того, возможность подтверждения метаболитов по одновременному присутствию в масс-спектре пиков, соответствующих как исследуемому веществу, так и одному (или нескольким) его метаболитам делает возможным

использование разработанного подхода для изучения фармакокинетики. Разработанный метод позволяет проводить сбор проб *in vivo*, поскольку не требует специальных условий для хранения или транспортировки образцов, высушенных на поверхности сферических пробоотборников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность исследования, обсуждаются её научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов работы, сформулированы цель и задачи работы.

В **главе 1 представлен** обзор литературы по теме работы. **Глава 1.1** посвящена механизмам образования ионов в методе ионизации электрораспылением, в том числе модели ионного испарения, модели остаточного заряда и модели выброса цепи. **В главе 1.2** обобщена информация об основных современных методах масс-спектрометрии с прямой ионизацией, рассмотрены различные типы материалов пробоотборников/источников ионов, используемых для масс-спектрометрии с прямой ионизацией и приведены области их применения. Рассмотрены подходы исследования физико-химических процессов с поверхности бумажных пробоотборников (Paper Spray), которые стали важным инструментом для анализа как больших, так и малых молекул в сложных смесях, в том числе в биологических матрицах, приведены основные виды транспорта растворов анализаторов по бумажной поверхности бумажных пробоотборников: 1) капиллярный транспорт/смачивание, 2) электрофорез и 3) формирование тонкой адсорбированной плёнки на поверхности бумажной подложки. Приведены способы модификации бумажных пробоотборников, используемых для повышения чувствительности и эффективности ионизации. Рассмотрен метод пятен сухой крови (Dried blood spot, DBS), широко используемый в клинических условиях для скрининга заболеваний и токсикологических исследований, приведены недостатки, ограничивающие применение DBS для проведения количественного биоанализа.

В **главе 2** описывается разработка метода прямого полуколичественного масс-спектрометрического анализа биологических образцов на основе экстракции ионов без предварительной пробоподготовки и хроматографического разделения, основанного на тандемной масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения с преобразованием Фурье.

В **главе 2.1** приведены результаты исследований процесса ионизации и транспорта ионов с поверхности пробоотборников различной формы и выполненных из различных материалов. Для изучения электрораспылительной ионизации с поверхности объёмных пробоотборников в

работе были получены вольт-амперные характеристики, с помощью установки, моделирующей практические условия электрораспыления у входного интерфейса масс-спектрометра изображения (Рисунок 1).

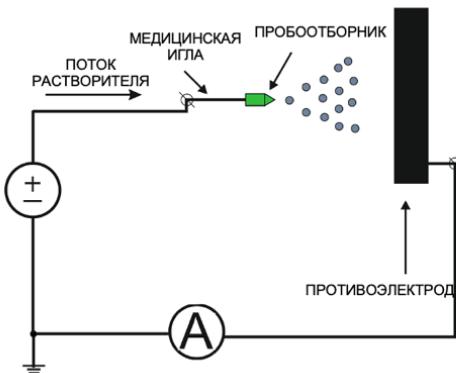


Рисунок 1. Экспериментальная установка для исследования вольт-амперных характеристик.

Для изучения транспорта анализов с последующей электрораспылительной ионизацией в работе были использованы зонды, выполненные из различных материалов: зонд из ксантогената целлюлозы; зонд из целлюлозы, зонд из спрессованного полиэтилентерефталата, причём зонды из полиэтилентерефталата использованы различной формы: сферической и конической. Структуры используемых пробоотборников подтверждены с помощью твердотельной спектроскопии ЯМР 13С, дифференциальной сканирующей калориметрии и ИК-спектроскопии. Спектры твердотельного ЯМР получены на спектрометре Bruker Avance III 600, ротор 4 мм и при вращениях 8 кГц и 12 кГц, а полученные данные обработаны с помощью программного обеспечения TopSpin Bruker. Термограммы получены с помощью дифференциального сканирующего микрокалориметра ДСК-500. Измерения проводились в динамическом режиме линейного нагревания с заданной скоростью 10 оС/мин. ИК-спектры поглощения получены с помощью ИК-Фурье спектрометр Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, США в режиме НПВО, (ATR) с алмазным кристаллом в диапазон: 400-4000 см⁻¹. Разрешение 4 см⁻¹, накопление 64 скана. Рamanовские спектры получены с помощью микроскопа Renishaw InVia Qontor. Измерение проводили при возбуждении 785 нм лазерной излучение с линейной поляризацией, дифракционная решётка 2400 штр/мм, диапазон съёмки 100-4000 см⁻¹, мощность 0.05 м/Вт. Предварительно проведена калибровка по положению моды монокристаллического кремния 520 см⁻¹. Измерение проведено в расширенном режиме, при котором диапазон измерения делится на три равные части, измерения в которых проходят последовательно, а затем результат объединяется встроенным программным обеспечением WiRe. Мощность излучения и время экспозиции подбирались исходя из соотношения сигнал шум, а также

минимизации гармонических осцилляции, сопутствующих нагреванию образца в ходе измерения, в спектре.

С помощью данных твердотельной спектроскопии ^{13}C ЯМР подтверждена структура объёмных пробоотборников из полиэтилентерефталата. ^{13}C ЯМР δ , м. д.: 64,80 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}$); 130,80 (C4 Ar); 134,13 (C2 Ar); 169,21 (C=O) (Рисунок 2).

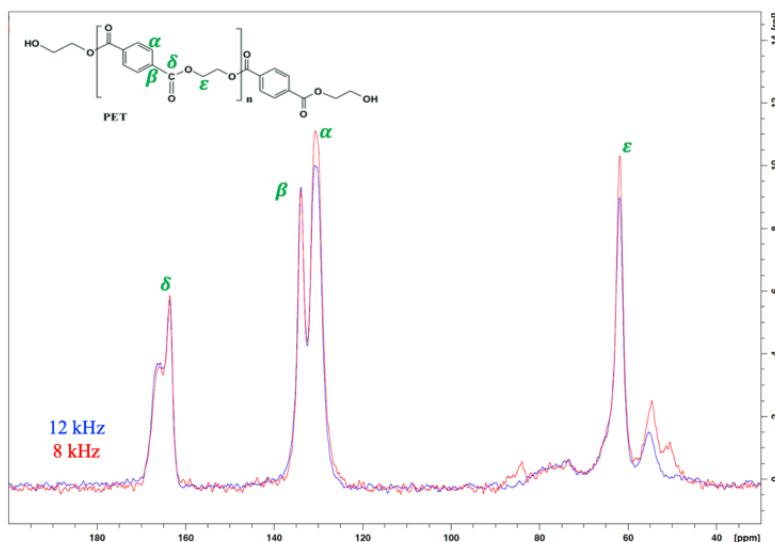


Рисунок 2. Спектры ЯМР сферических пробоотборников из полиэтилентерефталата.

На Рисунке 3 приведены ИК-спектры всех материалов, из которых изготовлены объёмные пробоотборники различной формы. Для сферического пробоотборника из целлюлозы (Рисунок 3 В) показаны все характерные полосы функциональных групп полимера: полосы от 3500 до 3100 cm^{-1} колебания гидроксильных групп ν_{OH} и от 3000 до 2850 cm^{-1} (валентные колебания C–H), слабые полосы в области 1430–1150 cm^{-1} (изгиб C–O–H при 1430 cm^{-1} , деформация C–H при 1370 cm^{-1}), перекрывающиеся полосы от 1160 до 950 cm^{-1} (асимм. колебание C–O–C при 1105 cm^{-1} , сим. колебания C–O при 1060 cm^{-1} и растяжение C–O при 1035 cm^{-1}). Для сферического пробоотборника из полиэтилентерефталата после предварительной обработки (Рисунок 3 С) и до предварительной обработки (Рисунок 33 Е) пробоотборников приведены ИК-спектры с характерными полосами функциональных групп полимера: колебания гидроксильных групп ν_{OH} 3426 cm^{-1} , 2965 cm^{-1} и 2906 cm^{-1} симм. растяжения C–H, 1575 cm^{-1} и 1505 cm^{-1} колебания ароматического скелета при растяжении C=C, 1409 cm^{-1} и 1338 cm^{-1} растяжение группы C–O, деформация группы O–H, 1240 cm^{-1} и 1118 cm^{-1} терефталатная группа ($\text{OOCC}_6\text{H}_4\text{-COO}$), 1091 cm^{-1} метиленовая группа. Структура материалов пробоотборников в ходе предобработки не меняется. Для сферического пробоотборника из ксантогената целлюлозы

(Рисунок 3 В) показана характеристическая полоса, соответствующая частоте валентных колебаний C=S 1160 см⁻¹.

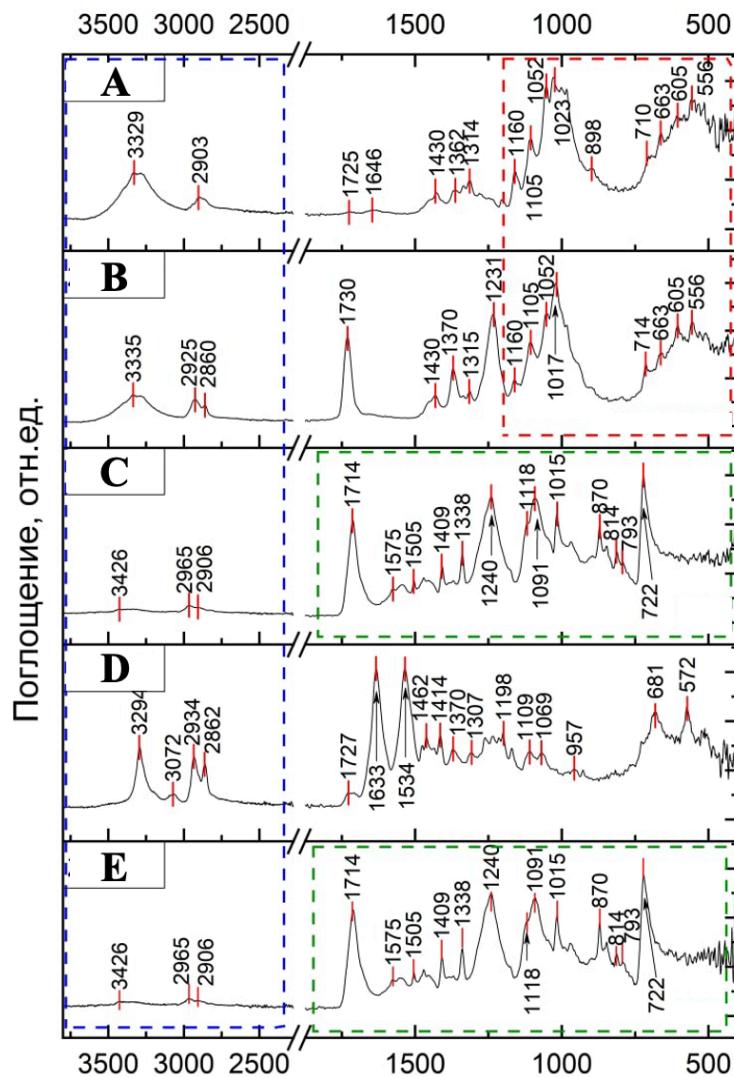


Рисунок 3. ИК-спектры поглощения материалов, из которых изготовлены (A) сферический пробоотборник из ксантогената целлюлозы, (B) сферический пробоотборник из целлюлозы, (D) конический пробоотборник; (C) и (E) сферический пробоотборник из полиэтилентерефталата после процедур предварительной подготовки пробоотборника и до процедур предварительной подготовки пробоотборника соответственно.

После подтверждения структуры объёмных пробоотборников конической и сферической формы было оценено влияние геометрии ионного источника на процесс электрораспылительной ионизации (Рисунок 4, Рисунок 5).

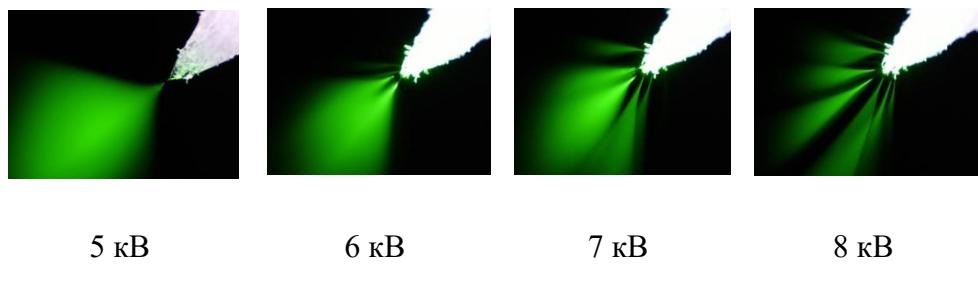


Рисунок 4. Формирование множественных конусов Тейлора на пробоотборнике конической формы. Растворитель состава 9:1 CH₃OH:H₂O (об./об.) с добавлением 0,1 % (об.) HCOOH. Расстояние до противоэлектрода 10 мм.

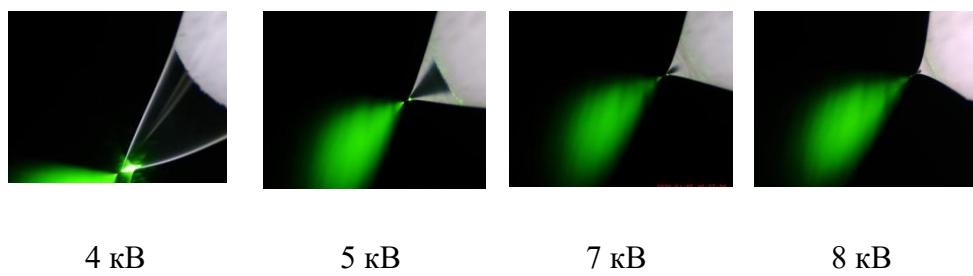


Рисунок 5. Формирование одинарного конуса Тейлора на пробоотборнике сферической формы. Растворитель состава 9:1 CH₃OH:H₂O (об./об.) с добавлением 0,1 % (об.) HCOOH. Расстояние до противоэлектрода 10 мм.

Сравнение показывает, что пробоотборники конической формы характеризуются менее предсказуемым протеканием процесса электрораспыления, в том числе к формированию множественных конусов Тейлора (Рисунок 4) при гораздо более низких напряжениях распыления по сравнению с аналогичными экспериментами с пробоотборниками сферической формы (Рисунок 5), вследствие того, что первые имеют более высокую локальную напряжённость электрического поля на кончике в отсутствие потока растворителя, как и бумажные пробоотборники, используемые в методе Paper Spray. После смачивания растворителем пробоотборника конической формы на конце уже образуется значительная локальная напряжённость, так что спрей формируется непосредственно при обтекании волокон острия, вместо формирования капли вне поверхности пробоотборника. Кроме того, формирование капли на конце заострённого пробоотборника энергетически менее выгодно, чем на сферической поверхности, поскольку энергия тратится на преодоление поверхностного натяжения. В то время как на сферическом пробоотборнике конус Тейлора обычно формируется из довольно большой (много больше размеров острия) капли жидкости при подаче на него высокого напряжения и растворителя. При низких напряжениях происходит смачивание поверхности пробоотборника и образование капель. С увеличением напряжения капля растворителя начинает вытягиваться в градиенте электрического и гравитационного поля,

формируется аэрозоль из заряженных капель с высокой плотностью поверхностного заряда. При достижении порогового напряжения конус Тейлора вытягивается, формируется струя конической формы, с которой срываются постепенно испаряющиеся заряженные. Формирование конуса Тейлора происходит в локальных минимумах потенциальной энергии проводящей жидкости в электрическом и гравитационном поле при наличии её потока. При дальнейшем увеличении напряжения возможно возникновение коронного разряда.

Варьирование типа растворителя для ионных источников различной геометрии показывает, что для большинства растворителей процесс электрораспыления с поверхности сферического пробоотборника начинается при напряжении около 5 кВ, в частности, для 1:1 CH₃OH:H₂O (об./об.) с добавлением 10 мМ HCOONH₄ при напряжении \approx 4,8 кВ (Рисунок 5). По мере увеличения напряжения ток постепенно увеличивается и при достижении порогового напряжения стабилизируется с изменением до 20 нА. Далее наблюдается плато в диапазоне напряжений от 5 кВ и 8 кВ, где ток электрораспыления практически не зависит от приложенного напряжения, что является общеизвестной характеристикой «конусно-струйного» режима электрораспыления.

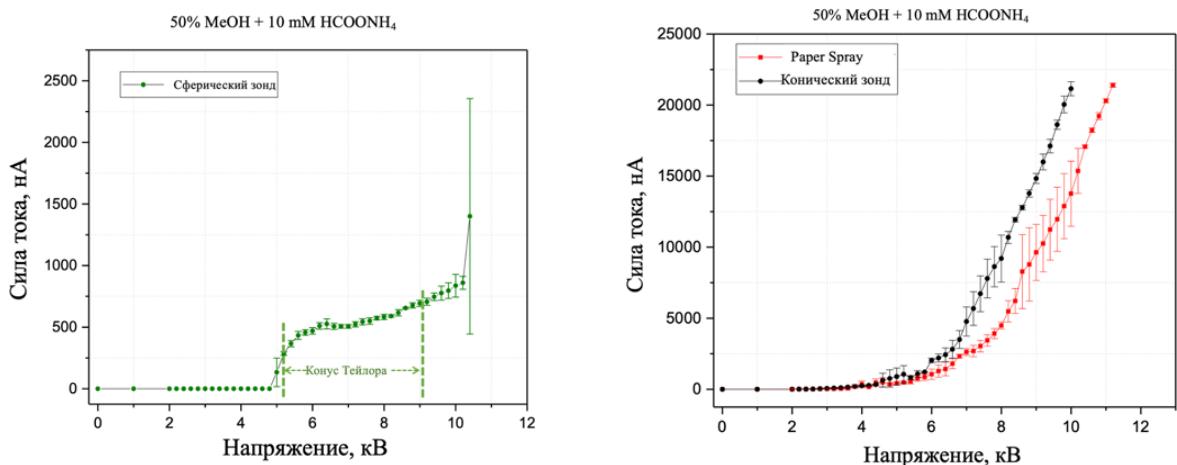


Рисунок 6. Вольт-амперные характеристики (ВАХ) для различных ионных источников: Paper Spray и зондов сферической и конической формы на расстоянии до противоэлектрода 1 см для растворителей состава: (А) и (Б) 1:1 CH₃OH:H₂O (об./об.) с добавлением 10 мМ HCOONH₄.

Плато продолжается, в среднем, до достижения напряжения 8 кВ, а при напряжении выше 8 кВ ток быстро растёт, что может указывать на начало коронного разряда. Для пробоотборников конической формы, бумажных пробоотборников и стандартных ESI-эмиттеров характерен быстрый рост тока распыления, чего не наблюдается в случае использования пробоотборников сферической формы, равномерное обтекание которых

растворителем “сглаживает” неоднородности поверхности, уменьшая локальную напряженность электрического поля, что делает их значительно менее чувствительными ко многим факторам, в числе которых небольшие изменения проводимости растворителей и прилагаемых напряжений. При подаче растворителя состава 1:1 i-PrOH:MeOH (об./об.) на пробоотборник сферической формы и бумажный пробоотборник были получены ВАХ, характеризующиеся плато с «конусно-струйным» режимом электрораспыления в области напряжений от 4 до 7 кВ для и его отсутствием для сферических и бумажных пробоотборников соответственно (Рисунок 7).

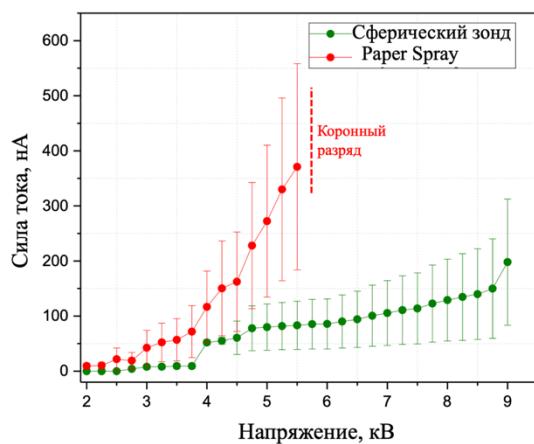


Рисунок 7. Вольт-амперные характеристики (ВАХ) для различных ионных источников: Paper Spray и сферического зонда из спрессованного полиакрилонитрила на расстоянии до противоэлектрода 1 см для растворителя состава 1:1 CH₃OH:i-PrOH.

Таким образом, пробоотборник сферической формы имеет более широкий диапазон рабочих напряжений, характеризующиеся стабильным «конусно-струйным» режимом электрораспыления, чем объёмный пробоотборник конической формы или бумажный пробоотборник, используемый в Paper Spray, а также стандартный ESI-эмиттер, что обеспечивает более стабильные процессы ионизации. Стоит отметить, что стабильность процесса электрораспыления при высоких напряжениях (> 7 кВ) потенциально может обеспечивать стабильность ионизации анализаторов с высоким поверхностным натяжением, которые труднее ионизировать. Анализы с такими физическими свойствами практически невозможно обнаружить с помощью метода Paper Spray, где приложенные высокие напряжения (> 6 кВ) обычно приводят к сильному коронному разряду и, как следствие, к тлению бумаги. В результате, при использовании объёмных пробоотборников условия получения воспроизводимых спектров становятся менее строгими, что упрощает реализацию и использование метода прямой ионизации.

Глава 2.2 посвящена разработке метода идентификации биологических молекул, основанного на прямой ионизации с поверхности сферического пробоотборника в присутствии различных биологических матриц, а также приведены закономерности экстракции, которые определяют аналитические характеристики разрабатываемого метода.

Эксперименты проводились с использованием гибридного масс-спектрометра LTQ XL Orbitrap ETD (ThermoFisher, Сан-Хосе, Калифорния) в режиме полного сканирования с m/z 50–1000 и в режиме фрагментации MS². MS¹ спектры были получены с использованием масс-анализатора Orbitrap с разрешением 30000 FWHM при m/z =400. Спектры MS² были получены с использованием масс-анализатора — ионной ловушки LTQ — при «нормальной» скорости сканирования индуцированный столкновениями диссоциации (Collision induced dissociation, CID), ширина окна изоляции 2,0 Да. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме положительных ионов при напряжении распыления 5,0 кВ и в режиме отрицательных ионов при напряжении распыления 4,5 кВ. В обоих режимах температура нагревательного капилляра на входе в масс-спектрометр составляла 220 °C. В качестве пробоотборника и ионного источника использовали зонд из полиэтилентерефталата длиной 10,0 мм (Рисунок 8 С). Пробоотборник помещался в металлический держатель, присоединённый к системе трёхмерного позиционирования, позволяющей воспроизвести геометрические параметры источника с точностью 0,2 мм. Две камеры использовались для контроля положения пробоотборников. Расстояние между входным отверстием масс-спектрометра и наконечником пробоотборника (в ближайшей точке) составляло 7 мм и 13 мм для измерений в режиме положительных и отрицательных ионов соответственно (Рисунок 8 А). Количественные измерения проводились трижды путём добавления к 4 мкл раствора аналита 4 мкл внутреннего стандарта. Для экстракции добавляли 30 мкл рабочего раствора с составом 9:1 (об./об.) MeOH:H₂O с 0,1% (об.) муравьиной кислоты и 90 мкл рабочего раствора с составом MeOH:i-PrOH 1:1 (об./об.) в положительном и отрицательном режиме соответственно. Для осуществления ионизации электрораспылением рабочие растворы наносили при помощи автоматической пипетки на пробоотборник с предварительно нанесёнными и высушенными аналитами, подавая через латунный держатель высокое. В результате молекулы анализаторов, высушенные на поверхности объёмного пробоотборника экстрагируются подаваемым растворителем, и на конце объёмного пробоотборника, расположенного напротив входа в вакуумную систему масс-спектрометра, образуется поток заряженных капель, которые десольватируются со сферической поверхности пробоотборника с последующим образованием ионов анализируемых веществ.

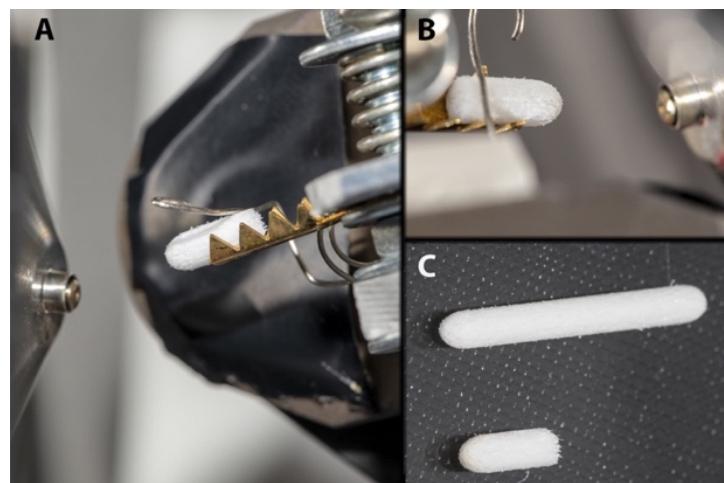


Рисунок 8. Схематическое изображение ионного ESI источника с объёмным полиэтилентерефталата пробоотборником. А, В: пробоотборник длиной 10,0 мм помещали в латунный держатель и закрепляли зажимом из нержавеющей стали.

Пробоотборника длиной 10,0 мм (С, внизу).

В результате последовательного введения целевых анализитов известного содержания и внутренних стандартов одинаковой концентрации построены калибровочные кривые, связывающие зависимость площади под кривой полного ионного тока характеристических переходов и номинальные концентрации. Калибровочные кривые для всех анализаторов в различных матрицах (чистом растворителе и биологических матрицах) аппроксимировали с использованием взвешенной линейной регрессии наименьших квадратов с весовым коэффициентом $1/x^2$.

Коэффициент детерминации (R^2) использован для грубой оценки линейности калибровки. *Предел обнаружения (Limit of detection, LOD)* и *предел количественного определения (Limit of Quantitation, LOQ)* определён как концентрации, при которых сигнал составляет $3 \cdot \frac{S}{N}$ и $10 \cdot \frac{S}{N}$ соответственно. Для всех анализаторов *точность (Accuracy)*, *прецизионность (Precision)*, *матричный эффект (Matrix effect, ME, %)*, *степень экстракции (Recovery, %)*, и *полнота элюирования (Carryover effect, %)* определены при двух различных концентрациях (500 и 1250 нг/мл). Прецизионность была выражена с помощью относительного стандартного отклонения (коэффициент вариации, Coefficient of variation, CV%) при каждой концентрации ($n_{\text{повтор.}}=3$). Точность рассчитана для каждой концентрации как \pm систематическая ошибка (Bias%), полученная в результате сравнения между концентрацией, интерполированной из регрессии, и ожидаемой. Матричные эффекты оценивалась как отношение средней ($n_{\text{повтор.}}=3$) нормализованной площади под кривыми для характеристических переходов анализируемых образцов в различных биологических матрицах и средней нормализованный площади под

кривыми характеристических переходов в метаноле для растворов анализируемых веществ той же концентрации. Степень экстракции рассчитана путём сравнения среднего нормализованного сигнала двух наборов из трёх повторений для каждой концентрации. Полнота элюирования оценивалась по трём «холостым» образцам, каждый из которых анализировался после образца в наивысшей концентрации.

MS¹ спектры и PRM-переходы получены для аналитов в различных матрицах, включая биологические в режиме регистрации положительных ионов (Рисунок 10). Несмотря на сложность наблюданной картины, разрешающей способности масс-спектрометра высокого разрешения (на уровне от 15000 до 60 000 FWHM) и точности измерения массы даже на уровне 1 ppm достаточно для того, чтобы достоверно детектировать представленное вещество по точной массе.

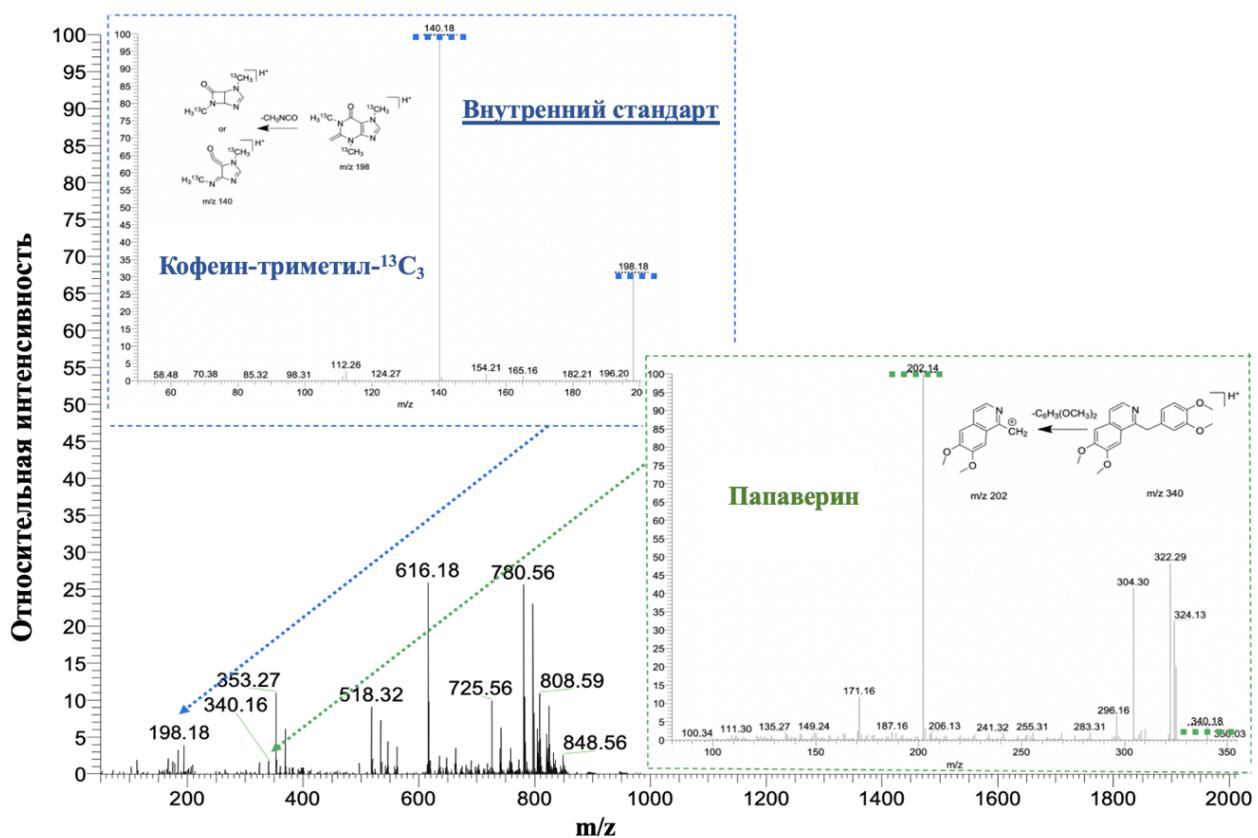


Рисунок 9. MS¹ масс-спектры (папаверин с концентрацией 2500 нг/мл и кофеин-триметил-¹³C₃ с концентрацией 100 мкг/мл – внутренний стандарт) в биологической матрице (цельная кровь) в режиме регистрации положительных ионов; PRM-переходы: папаверин m/z 340 → m/z 202 (фрагмент-квантификатор), m/z 198 → m/z 140 (фрагмент-квантификатор).

Для построения калибровочных кривых были посчитаны площади под кривой полных ионных токов характеристических PRM-переходов (Рисунок 10 А, В).

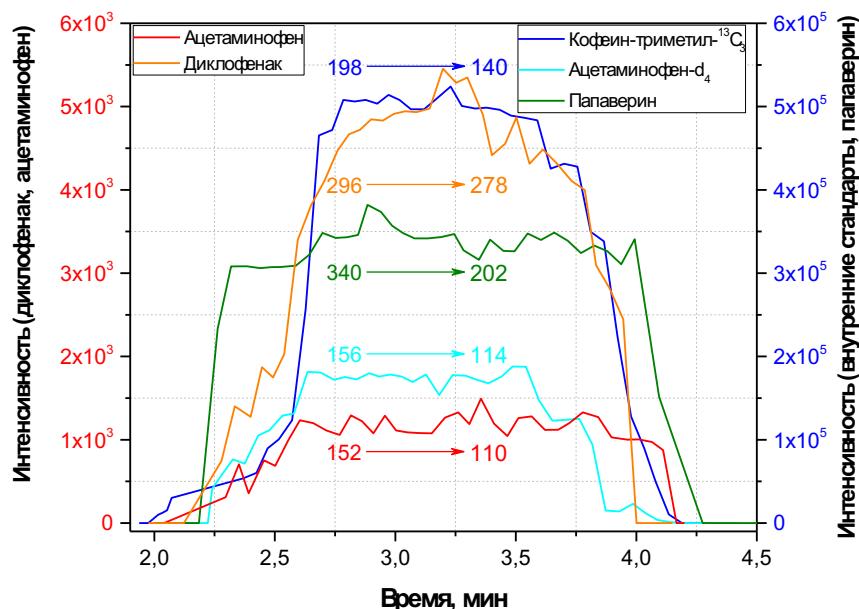
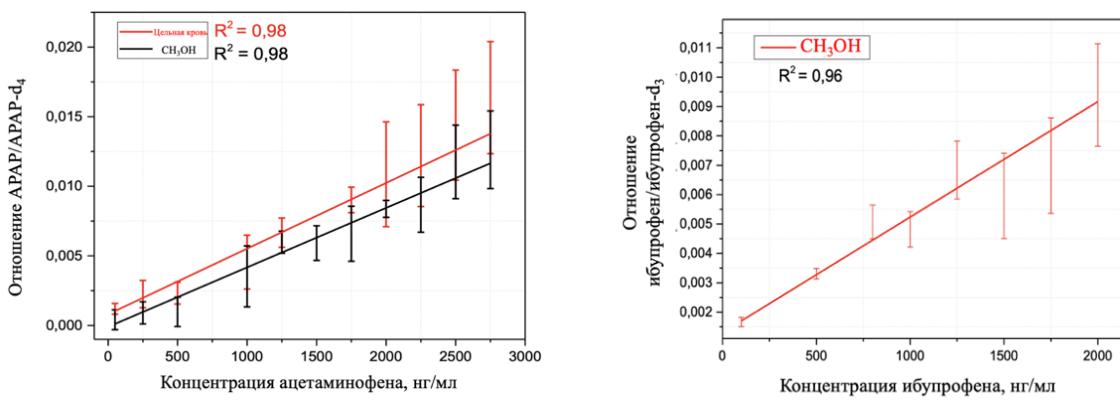


Рисунок 10. Масс-хроматограммы экстрагированных ионов, полученные для ацетаминофена (2500 нг/мл), диклофенака (2500 нг/мл), папаверина (2500 нг/мл) и внутренних стандартов (кофеин-триметил- $^{13}\text{C}_3$ и ацетаминофен- d_4 с концентрацией 100 мкг /мл) в режиме регистрации положительных ионов.

Для всех анализов с использованием объёмного пробоотборника были получены калибровочные линейные соответствия с значением коэффициента детерминации R^2 , диапазоне от 0,96 до 0,99 (Рисунок 11 А для режима регистрации положительных ионов, Рисунок 11 В для режима регистрации отрицательных ионов), что сопоставимо с аналогичными методами прямой масс-спектрометрии, в частности Swab Touch spray, с нанесением внутреннего стандарта непосредственно на пробоотборник перед началом масс-спектрометрического анализа. Пределы обнаружения (LOD) составили 10 нг/мл и 10 пг/мл для ацетаминофена и папаверина в режиме регистрации положительных ионов (матрица — CH_3OH); 2 мкг/мл и 250 пг/мл для ацетаминофена и папаверина соответственно в режиме регистрации положительных ионов (матрица — высушенная кровь); 5 мкг/мл и 5 пг/мл для диклофенака и ибупрофена растворителе соответственно в режиме регистрации отрицательных ионов (матрица — CH_3OH).



A

B

Рисунок 11. Калибровочные кривые для (А) ацетаминофена в различных матрицах в режиме регистрации положительных ионов (р-значение < 0,05); (В) ибупрофена в режиме регистрации отрицательных ионов (р-значение < 0,05).

Пределы количественного определения (LOQ) составили 7 мкг/мл и 850 пг/мл для ацетаминофена и папаверина в режиме регистрации положительных ионов. Эти результаты хорошо согласуются с диапазоном терапевтических концентраций, что свидетельствует о пригодности метода для терапевтического мониторинга препаратов в биологических матрицах. Кроме того, результаты сопоставимы с традиционными физико-химическими методами анализа, например, ЖХ-МС-МС.

Таблица 1. Аналитические характеристики метода.

Аналит	LOD	LOQ	R ²	Прецизионность (CV, %)		Точность, (Bias, %)		Матричные эффекты, %		Полнота экстракции, %	
				500 нг/мл	1250 нг/мл	500 нг/мл	1250 нг/мл	500 нг/мл	1250 нг/мл	500 нг/мл	1250 нг/мл
Папаверин	2 μг/мл	7 μг/мл	0,97	12,61	5,69	+23,12	+28,91	112,48	94,22	72,45	92,63
APAP	250 рг/мл	833 рг/мл	0,98	37,11	3,92	-11,81	+11,56	9,43	10,39	98,72	98,94

Стабильность отношений интегральных интенсивностей PRM-переходов ацетаминофена к внутреннему стандарту (Рисунок 13) собранных образцов капиллярной крови объёмом 4 мкл здоровых добровольцев после употребления 500 мг ацетаминофена, высушенных на поверхности объёмных пробоотборников и хранившихся при комнатной температуре оценивали через 1, 2, 5 и 7 дней после отбора, путём вычисления отношения

средней нормированной площади анализируемых образцов и средней нормированной площади набора образцов, приготовленных непосредственно перед измерением.

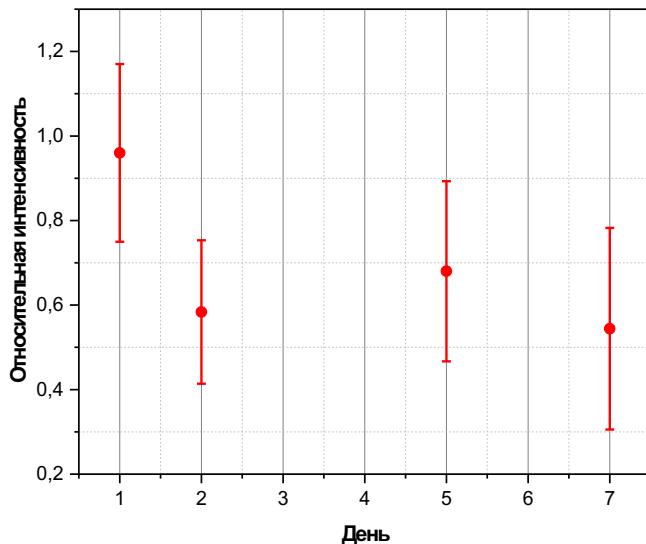


Рисунок 12. Изучение стабильности сигнала ацетаминофена, зарегистрированного в образцах высущенной на объёмном пробоотборнике крови, через 1, 2, 5 и 7 дней.

Погрешность в рассчитанных отношениях интегральных интенсивностей PRM-переходов ацетаминофена к внутреннему стандарту, N-(4-гидроксифенил-2,3,5,6-d₄)-ацетамиду, наблюдалась в пределах повторов; в частности, относительные стандартные отклонения для первых суток составили менее 15 % и оставались менее 30 % (от исходной концентрации) для последующих суток, что сопоставимо с PS-MS, поэтому возможно утверждать, что образцы, высущенные на поверхности объёмного пробоотборника не требуют специальных условий для хранения или транспортировки, благодаря чему предлагаемый метод является пригодным для сбора образцов в «полевых» условиях.

Помимо идентификации по данным о точной массе и масс-спектрам фрагментов MSⁿ, возможно подтверждать наличие лекарственных препаратов и токсинов в биологическом образце по их метаболическому паттерну, а именно: по одновременному присутствию в масс-спектре пиков, соответствующих как исследуемому веществу, так и одному (или нескольким) его метаболитам, например, при использовании масс-спектрометра низкого разрешения, в которых не удается осуществить фрагментацию исследуемых ионов. В таком случае данные о точной массе и изотопное распределение исходного соединения и его метаболитов могут служить первичными дескрипторами, которые могут быть использованы для идентификации, чему посвящена **глава 2.3** диссертационной работы. В главе 2.3 приведены результаты исследования разработанного метода для анализа экзогенных веществ на примере

лекарственных препаратов и их метаболитов с помощью метаболической трансформации в крови. Проведена экстракция из модельного раствора с поверхности объёмного пробоотборника с известной концентрацией никотина ((S)-3-(1-метил-2-пирролидинил)пиридин) 10 нг/мл с использованием, высушенного на поверхности пробоотборника в матрице чистого растворителя, CH_3OH , в течение 5 минут перед проведением масс-спектрометрического анализа, с использованием рабочего раствора состава $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (об./об.) с 0,1% (об.) муравьиной кислоты. В качестве модельных объектов использованы образцы крови объёмом 4 мкл здоровых добровольцев, в половине которых содержались исследуемые биомолекулы никотина. Образцы высушивали на поверхности объёмных пробоотборников в течение 30 минут перед проведением анализа. Отбор капиллярной крови добровольцев проводили с помощью скарификатора. Для экстракции целевых анализов добавляли 30 мкл рабочего раствора с составом 9:1 (об./об.) $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ с 0,1% (об.) муравьиной кислоты.

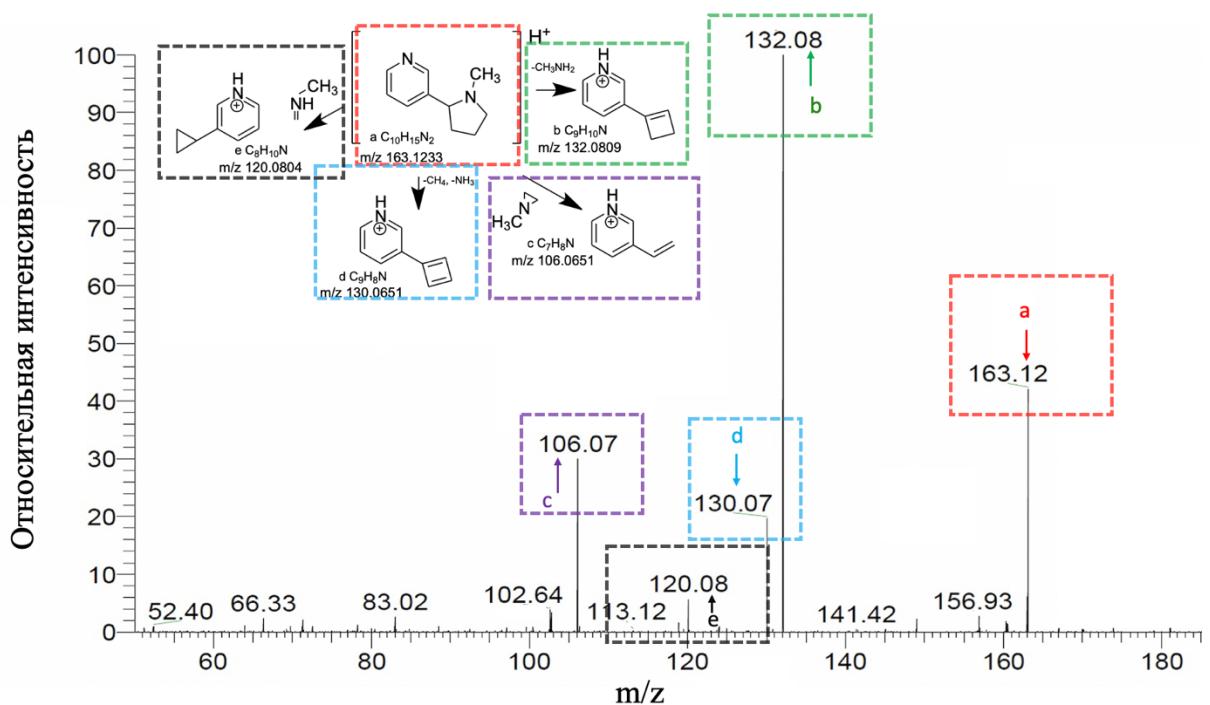


Рисунок 13. Сканирование ионов-фрагментов (Product ion Scan) никотина (родительский ион а) с образованием нескольких фрагментов (б-е) из модельного раствора с поверхности объёмного пробоотборника с концентрацией никотина 10 нг/мл с использованием растворителя состава $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (об./об.) с 0,1% (об.) муравьиной кислоты.

На масс-спектре, полученном из образца высушенной крови добровольцев, в крови которых содержались молекулы никотина, ионов-фрагментов никотина ($m/z=163,23$) можно достоверно идентифицировать только низкоинтенсивные ионы с значением m/z 132,08 и 106,07 и низким отношения S/N , которые являются фрагментами протонированного иона никотина, поэтому в данном случае идентификация по метаболическому паттерну представляется более

надёжным методом (Рисунок 15). На примере биотрансформации никотина с m/z 163.12 в котинин с m/z 177.10 возможна более надёжная дифференциация образов высушеннной крови, содержащей никотин (Рисунок 16).

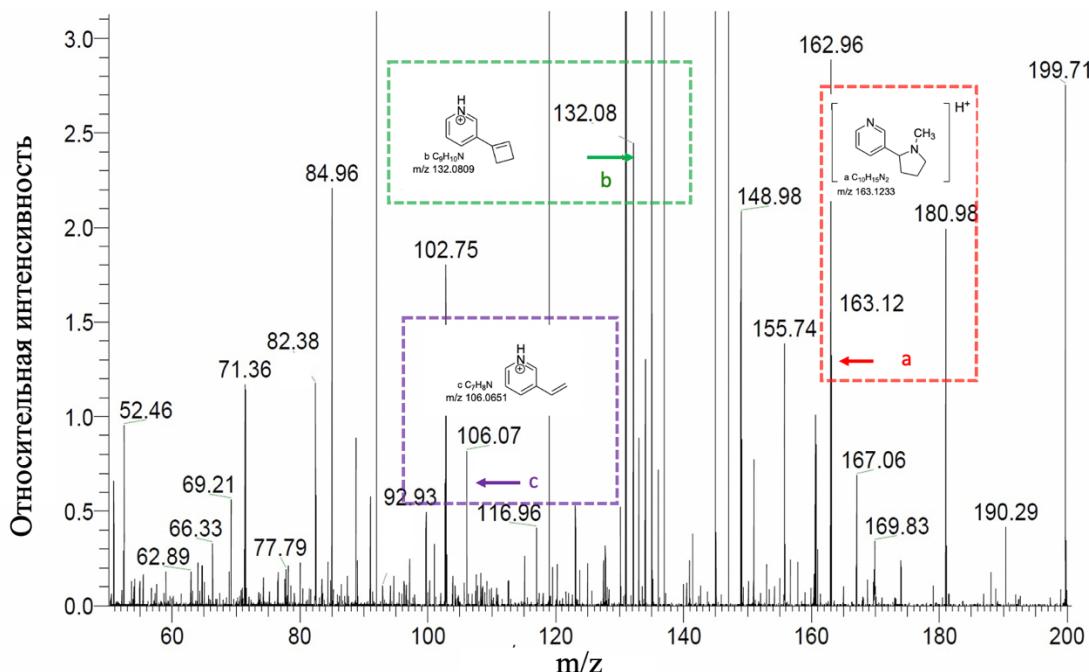


Рисунок 14. Сканирование ионов-фрагментов (Product ion Scan) никотина (родительский ион а) с образованием нескольких фрагментов (б и с) из образца высушенной крови с поверхности объёмного пробоотборника с использованием растворителя состава $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (об./об.) с 0,1% (об.) муравьиной кислоты.

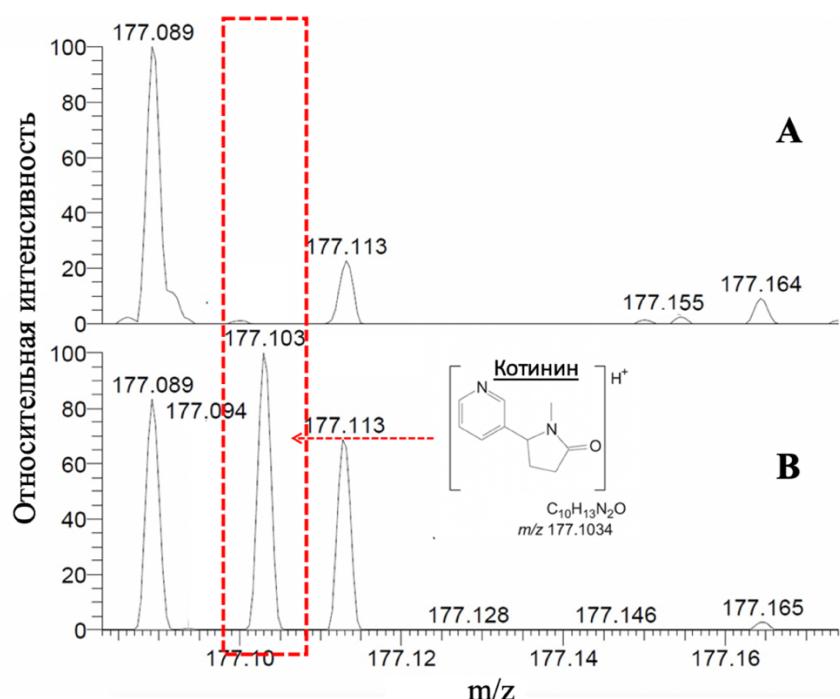


Рисунок 15. Мониторинг ионов котинина из образцов высушенной капиллярной крови, (А) которые не содержат никотин и (В) содержат никотин.

ВЫВОДЫ

- Впервые с помощью вольт-амперных характеристик показано, что формирование множественных конусов Тейлора на поверхности заострённых объёмных пробоотборников приводит к менее предсказуемому и воспроизведимому режиму ионизации, а также к возникновению коронного разряда при гораздо более низких напряжениях по сравнению с эмиттерами сферической формы. Продемонстрировано, что данное явление характерно для заострённых эмиттеров вследствие более высокого значения локальной напряженности электрического поля на их кончике.
- Впервые было определено влияние физико-химических параметров и исследованы возможности метода для анализа образцов в различных биологических матрицах с использованием сферических пробоотборников, являющихся одновременного электроспрейными эмиттерами. Продемонстрирована возможность проведения количественного анализа с отбором проб *in vivo*, характеризующаяся высокой специфичностью, селективностью и чувствительностью идентификации как в режиме регистрации положительных ионов, так и в режиме регистрации отрицательных ионов.
- Разработан метод прямой ионизации без предварительной пробоподготовки, дериватизации и хроматографического разделения биологических образцов с использованием объёмных пробоотборников сферической формы, выполняющих одновременно функцию электроспрейного эмиттера и пробоотборника, с возможностью идентификации анализаторов по данным о точной массе и при помощи tandemной масс-спектрометрии или масс-спектрам метаболитов при анализе малых объёмов вещества.
- Продемонстрирована применимость разработанного метода прямой ионизации образца для решения практических задач, в частности, для подтверждения наличия лекарственных препаратов и их метаболитов в биологических образцах.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях:

1. [Индексируется базой Scopus, WoS] Shamraeva M.A., Pekov S.I., Bormotov D.S., Levin R.E., Larina I.M., Nikolaev E.N., Popov I.A. The lightweight spherical samplers for simplified collection, storage, and ambient ionization of drugs from saliva and blood // Acta Astronautica. – 2022. – Vol. 195. – P. 556-560.
2. [Индексируется базой Scopus, WoS] Shamraeva M.A., Bormotov D.S., Shamarina E.V., Bocharov K.V., Peregudova O.V., Pekov S.V., Nikolaev E.N., Popov, I.A. Spherical Sampler Probes Enhance the Robustness of Ambient Ionization Mass Spectrometry for Rapid Drugs Screening // Molecules. – 2022. – Vol. 27(3). – P. 945.
3. [Индексируется базой Scopus, WoS] Levin R.E., Shamraeva M.A., Larina I.M., Bormotov D.S., Pekov S.I., Shivalin A.S., Silkin S.V., Eliferov V.A., Bocharov K.V., Nikolaev E.N., Popov I.A. The development of a method for direct mass spectrometric analysis of biological samples using porous samplers. // Aerospace and Environmental Medicine. – 2021. – Vol. 55(1). – P. 99-103.

Тезисы на конференциях:

1. The method for direct mass spectrometric analysis of biological samples using porous samplers. Popov I.A., Pekov S.I., **Shamraeva M.A.**, Bormotov D.S., Levin R.E., Larina I.M., Nikolaev E.N. 23RD IAA HUMANS IN SPACE, 05-08 April 2021
2. **Шамраева М. А.**, Новый атмосферный источник ионов для быстрого профилирования биологических объектов на основе ионизации электрораспылением, : 63-я Всероссийская научная конференция МФТИ, 2020
3. **Шамраева М.А.**, Новый метод прямого пробоотбора с электроспрейной ионизацией для быстрого исследования биологических объектов, XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2020", 2020

ШАМРАЕВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

МЕТОД ПРЯМОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, ОСНОВАННЫЙ НА ГЕНЕРАЦИИ ИОНОВ
ПРИ ПЕРЕХОДЕ ИЗ ЖИДКОЙ ФАЗЫ В ГАЗООБРАЗНУЮ С ПОВЕРХНОСТИ
ПОРИСТОГО СФЕРИЧЕСКОГО ПРОБООТБОРНИКА

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”

141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9.