

**Технология Ленгмюра как способ получения
металл-аффинных сорбентов на твердых подложках
для анализа долгоживущих продуктов метаболизма
галогенсодержащих ксенобиотиков алкилирующего действия**

Кельцева О.А.

Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова ФМБА

Институт аналитического приборостроения РАН

Санкт-Петербург, Россия

keltcieva@gmail.com

Необходимость усовершенствования
специфичных методов экстракции



Металл-аффинная хроматография (МАХ)
в тандеме с МАЛДИ масс-спектрометрией



Разработка сорбентов для МАХ на
основе стеаратов металлов



Модификация мишени МАЛДИ сорбентами на
основе стеаратов редкоземельных металлов для
экстракции аддуктов

Ксенобиотики способны вступать в
реакции алкилирования со многими
органическими и биоорганическими
веществами



Аддукты белков с хлорсодержащими
токсичными соединениями



Цели и задачи

Цель: Провести модификацию поверхности мишени для МАЛДИ-масс-спектрометрии сорбентами на основе стеаратов следующих металлов: меди, никеля, железа, кобальта, алюминия, галлия, лантана и иттербия для специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов белков.

Задачи:

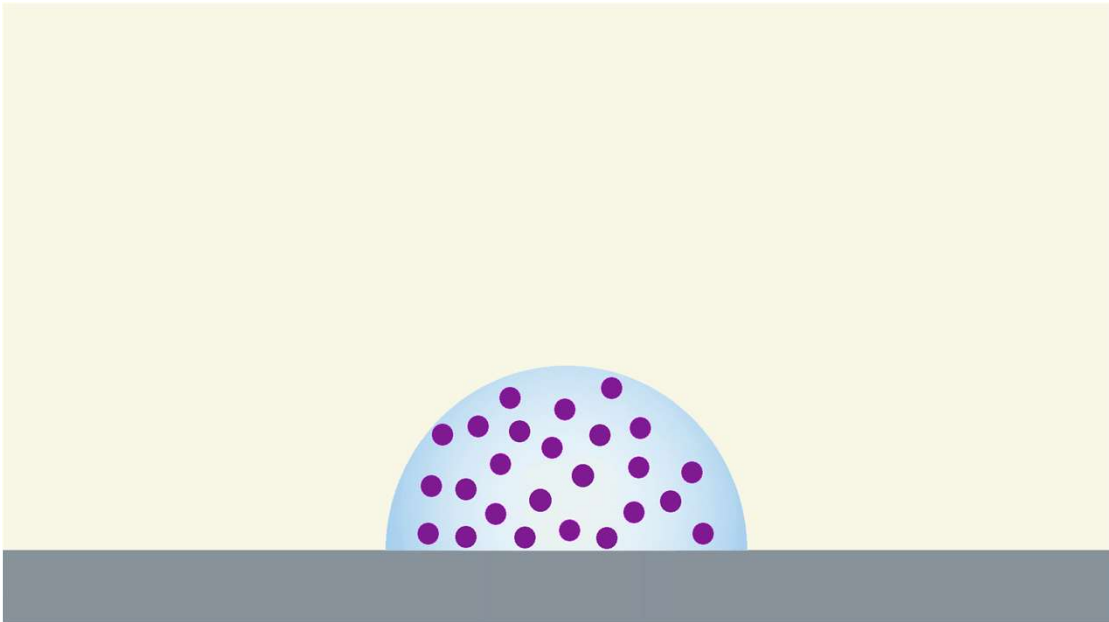
Модифицировать МАЛДИ мишень металл-аффинными сорбентами на основе стеаратов металлов.

Исследовать полученные сорбенты с использованием различных физико-химических методов.

Провести металл-аффинную экстракцию пептидов из образца гидролизата глобина человека, модифицированного 2,4-дихлор-N-хлорацетанилидом (C1-2).

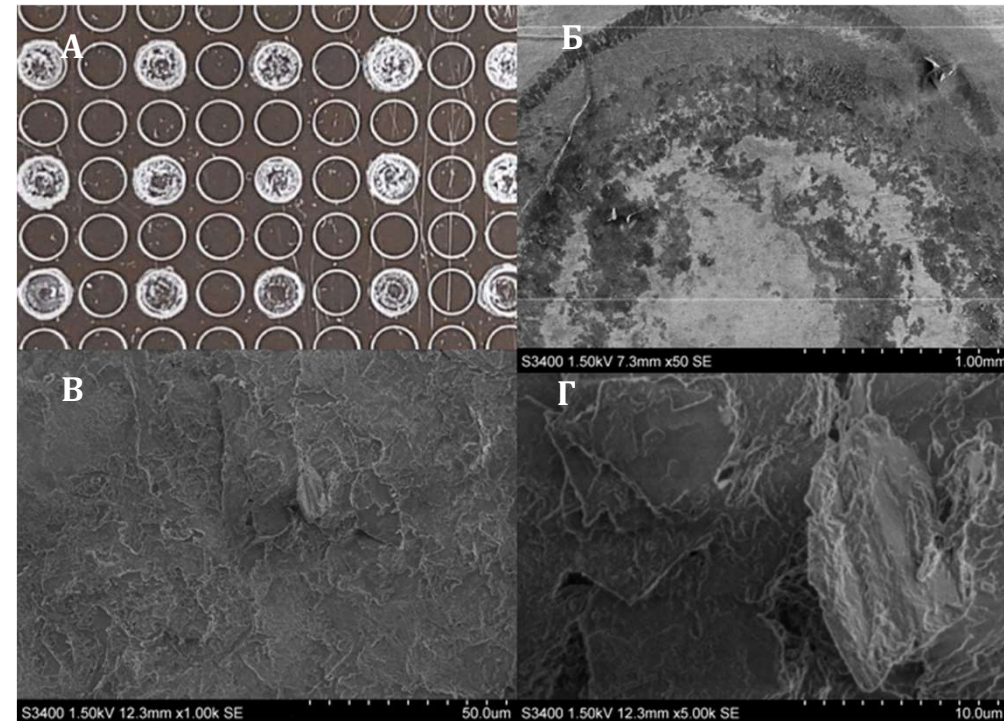
Формирование металл-аффинного сорбента

Получение монослоев на поверхности водной капли



- Нет потерь сорбента, минимальные потери образца на сорбенте
- Малый объем водной фазы, соли металла и образца

Исследование структуры пятен



А - фото нанесенных на мишень FEu, Б - увеличение в 50 раз,
В - увеличение в 1000 раз, Г - увеличение в 5000 раз

Получение сорбента и проведение металл-аффинной экстракции

Нанесение водного раствора соли металла

Нанесение на водную каплю раствора стеариновой кислоты в гексане (3 раза), удаление капли

Повторение предыдущего пункта, высушивание сорбента

Удаление несвязавшейся фракции

Нанесение на сорбент водной капли ТФУ, добавление гидролизата, сорбция 20 мин

Промывка для удаления излишков соли

Промывка пятен раствором ТФУ 3 раза, удаление, высушивание сорбента

Нанесение на монослой 30% раствора ацетонитрила и матрицы

МАЛДИ масс-спектрометрический анализ

Идентифицированные пептиды

Таблица: Триптические пептиды глобина, содержащие цистеины

N	C _x	m/z пептида	m/z модифицированного пептида	m/z экспериментальное	Последовательность	Предел обнаружения *	Субъединица
1	104	4201,31	4402,41	4402,53	LLSHCCl- 3LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSK	1 %	Hemoglobin subunit alpha
2	104	3767,03	3968,13	—	VDPVNFKLLSHCCl- 3LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDK		Hemoglobin subunit alpha
3	104	2967,61	3168,71	—	LLSHCCl- 3LLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDK		Hemoglobin subunit alpha
4	112	3079,65	3280,75	3280,66	LLGNVLCcl- 3VLAHHFGKEFTPPVQAAYQK	1 %	Hemoglobin subunit beta
5	93	3072,54	3273,64	—	VLGAFSDGLAHLNLTGTFATLSELHCcl-3DK		Hemoglobin subunit beta
6	112	2827,52	3028,62	—	LHVDPENFRLLGNVLCcl- 3VLAHHFGK		Hemoglobin subunit beta
7	93	2529,21	2730,31	2730,21	GTFATLSELHCcl-3DKLHVDPENFR	0,5 %	Hemoglobin subunit beta
8	112	1719,97	1921,1	1920,99	LLGNVLCcl-3VLAHHFGK	0,5 %	Hemoglobin subunit beta
9	93	1421,67	1622,77	1622,65	GTFATLSELHCcl-3DK	10 %	Hemoglobin subunit beta

* В следующих условиях: проведение экстракции на 6 монослоях, объем исследуемого образца 1 мкл

Результаты:

1. На мишени МАЛДИ сформированы сорбенты на основе стеаратов металлов, было показано, что метод наслаивания на каплю позволяет получить слоистые структуры с доступной поверхностью, содержащие ионы соответствующего металла.
2. Методом масс-спектрометрии было установлено, что основным структурным звеном является St_2Me .
3. Показано, что полученные структуры могут быть использованы в качестве металл-аффинных сорбентов для экстракции хлорсодержащих пептидов из сложнокомпонентных смесей.
4. Предложенный подход на сорбентах, содержащих лантаноиды, позволяет экстрагировать хлорсодержащие аддукты глобина при степени модификации белка 0,5%.

Предложенный способ модификации мишени является достаточно простым в исполнении, не требует большого количества времени и специального оборудования. Такой способ пробоподготовки также отличается своей экономичностью, так как для выполнения работ требуется минимальное количество как сорбента, так и образца.