

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК: 577.3:621.384.8

ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА ВТОРИЧНО-ИОННОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ
В ЛИПИДНЫХ СЛОЯХ И ЛИПОСОМАХО.А. Боряк¹, М.В. Косевич¹, В.В. Чаговец¹, В.С. Шелковский¹, В.В. Орлов¹,
В.А. Карачевцев¹, Г.П. Горбенко², Е.А. Доманов², В.В. Товстяк²¹Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАНУ, пр. Ленина, 47, Харьков, 61103,²Харьковский национальный университет им.В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077

e-mail: boryak@ilt.kharkov.ua, mvkosevich@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 20 февраля 2005 г.

В рамках проблемы иммобилизации молекулярных компонентов биосенсоров предлагается масс-спектрометрический метод контроля иммобилизации красителей в липидных слоях и липосомах. Обосновывается критерий успешности включения красителей в липидный монослой на поверхности жидкой матрицы, состоящий в одновременном присутствии во вторично-ионных масс-спектрах системы пиков, соответствующих липидам и красителям. Предлагается методика идентификации липидов по их низкомолекулярным характеристическим фрагментам, которую можно внедрять на доступных аналитических приборах с ограниченным массовым диапазоном.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липиды, красители, иммобилизация, вторично-ионная масс-спектрометрия

Одним из важных этапов при конструировании биосенсоров является разработка методов иммобилизации молекулярных компонентов сенсоров [1]. Иммобилизация, обеспечивающая сохранение функциональной активности и доступности компонентов, обычно осуществляется в тонких пленках носителей или в липосомах [2]. Пленки формируют из высокомолекулярных полимеров, или путем самосборки слоев низкомолекулярных веществ, липидов, поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Важным моментом таких разработок является наличие методов контроля эффективности иммобилизации рабочих компонентов биосенсоров. Одним из эффективных методов анализа поверхности является вторично-ионная масс-спектрометрия (ВИМС) [3, 4]. Классическая ВИМС позволяет исследовать монослой органических веществ на твердых поверхностях. Жидкостный вариант ВИМС (жВИМС) и методика с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА) позволяют изучать пленки, образующиеся на поверхности жидкости (называемой в данном случае жидкой матрицей). Удары таких частиц вызывают распыление вещества преимущественно из поверхностного слоя (глубиной до 10 нм [3]) в ионизированном состоянии; ионы, регистрируемые в масс-спектрах, несут информацию о молекулярном составе поверхностного слоя.

Установлено, что такие компоненты некоторых типов биосенсоров, как красители и ферменты могут быть иммобилизованы в липидных слоях и липосомах. Липиды и ПАВ, используемые при конструировании липосом, способны образовывать монослой на поверхности воды и глицерина. Биологически активные вещества, обладающие так называемыми мембранотропными свойствами, могут встраиваться в такие слои. При иммобилизации в липосомах биологически-активные вещества могут включаться в оболочку, либо быть инкапсулированными внутри липосомы.

Ранее нами была разработана методика жВИМС исследований включения молекул мембранотропных фармакологических препаратов (антимикробных агентов на основе катионных ПАВ) в липидные слои [5, 6]. Было показано, что при эффективном включении ПАВ в слои в масс-спектрах такого супрамолекулярного образования регистрируются пики ПАВ наряду с пиками липидов. Поскольку распыление вещества в условиях жВИМС происходит только из верхнего слоя образца, занятого в случае ПАВ тонкой органической пленкой, которая в некоторой степени экранирует находящийся под ней раствор [7-9], то растворенные вещества, находящиеся в объеме раствора, практически недоступны для распыления. В связи с этим можно считать, что отсутствие в масс-спектрах такой системы пиков, соответствующих некоторым компонентам раствора, свидетельствуют об отсутствии их включения в поверхностную липидную пленку.

Существенной методической проблемой приложения метода ВИМС к исследованию биомолекул является ограниченный диапазон масс (до 1000 Да), характерный для сравнительно простых и доступных приборов, использовавшихся ранее для анализа металлов и диэлектриков, причем не только в лабораторных, но и в производственных условиях. Здесь следует подчеркнуть, что новые масс-спектрометрические методы ионизации с электрораспылением из растворов и матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (МАЛДИ), специально разработанные для изучения высокомолекулярных биополимеров [10, 11], неприменимы для интересующих нас объектов - пленок на поверхности жидкости. Методом электроспрей исследуются истинные растворы, дробящиеся до микрокапель, а методом МАЛДИ – твердые кристаллические образцы. Большой массовый диапазон в установке ВИМС, позволяющий регистрировать не только молекулярные ионы липидов, но и их ассоциаты с мембранотропными веществами, достигается ценой существенного повышения стоимости прибора, что оправдано на этапе фундаментальных исследований. Для контроля компонентов биосенсоров в условиях промышленного производства желательны более доступные и дешевые приборы.

Преодолеть эти препятствия позволяет предложенная А. Беннингтоном [12] и П. Бертраном [13] методика контроля состава образца на основании анализа не самих молекулярных ионов, а их характеристических фрагментов. Для реализации метода необходим выбор таких специфических, воспроизводимых в различных условиях, фрагментов - маркеров. В работе [12] было показано, что диагностическим фрагментом фосфолипидов можно считать фрагмент с m/z 184 а.е.м., соответствующий фосфатной головке липида. В работе [13] обсуждается состав аминокислотных остатков в ВИМС спектрах, отражающий состав пептидов плазмы крови. Отметим, что массы молекул красителей, используемых в некоторых видах биосенсоров, в частности в биосенсорах на глюкозу и pH, не превышают 500 Да, т.е. доступны для анализа на приборах среднего класса.

Целью данной работы явилась разработка БА/ВИМС метода для исследования включения красителей в липидные слои и липосомы в соответствии с оговоренным выше подходом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Масс-спектрометрические измерения проводились на двух типах установок. Измерения в режиме БА выполняли на приборе МИ-1201Э (ПО "SELMI", Сумы, Украина). В качестве бомбардирующего газа использовали аргон с энергией первичного пучка 4,5 кэВ.

ВИМС эксперименты в режиме положительных и отрицательных ионов проводили на установке VG-ZAB-SEQ ("Micromass", Великобритания). Бомбардирующим агентом служили ионы цезия с энергией 30 кэВ.

В экспериментах по иммобилизации красителей использовали фосфолипиды дидецилглицерилфосфатидилхолин (ДДФХ) (рис. 1,а) и яичный фосфатидилхолин (ФХ). Яичный ФХ представляет собой смесь фосфолипидов, различающихся структурой жирнокислотных остатков [14], основным компонентом которой является пальмитоил-олеоил фосфатидилхолин (рис. 1,б). В составе липидов водило катионное поверхностно-активное вещество (ПАВ) цетавлон - цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), рис. 1,в. Структуры ряда красителей – производных имидазофеназина - показаны на рис. 2.

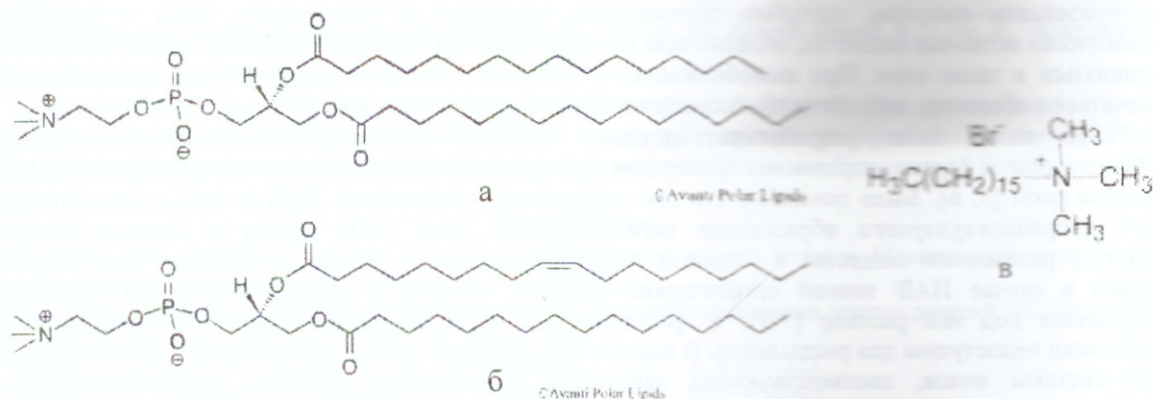


Рис. 1. Структурные формулы фосфолипидов (а) ДДФХ (м. в. 733,56 а.е.м.), (б) пальмитоил-олеоил ФХ (м. в. 759,58 а.е.м.) [14] и (в) ПАВ ЦТАБ (м. в. 364 а.е.м., масса катиона 284 а.е.м.).

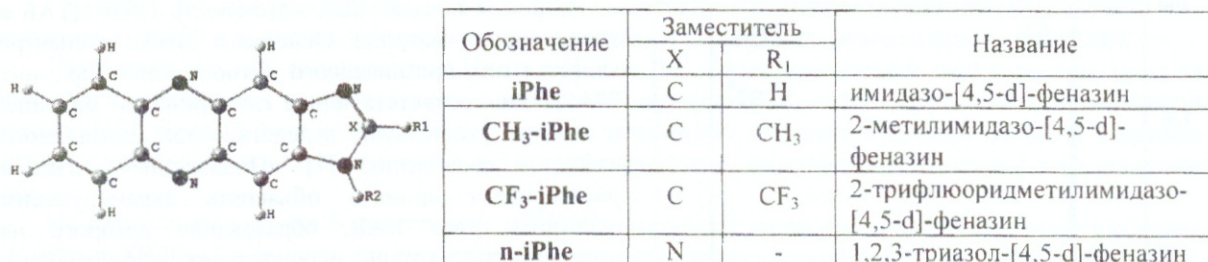


Рис. 2. Структуры ряда красителей – производных имидазофеназина и триазолфеназина [16, 17].

Липосомы получали из ФХ и ЦТАБ в молярном соотношении 19:1, с использованием метода этанольной инъекции [15], общая концентрация компонентов в водном растворе составляла $5 \cdot 10^{-3}$ моль·л⁻¹.

Предполагается, что при смешении раствора липосом с глицериновой матрицей происходит раскрытие части липосом и выход их компонентов на поверхность жидкой матрицы. Соотношение мономеров на поверхности качественно соответствует составу липосом; вопрос о строгих количественных корреляциях на данном этапе не решен и требует дальнейших исследований.

В работе использовали ДПФХ и ЦТАБ производства фирмы "Sigma", яичный фосфатидилхолин производства "Биолек" (Харьков, Украина), глицерин производства "Reanal" (Венгрия).

Красители имидазофеназинового ряда были синтезированы [16] в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины (Киев, Украина).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были получены БА и ВИМС масс-спектры индивидуальных компонентов исследуемых систем: липидов (ДПФХ, ФХ), ПАВ ЦТАБ, красителей, а также липосом и смесей красителей с ДПФХ и раствором липосом.

Вид контрольного жВИМС масс-спектра положительных ионов ДПФХ, представленного на рис. 3, совпадает с таковым, известным из литературных данных [5, 6]. Группа пиков молекулярного иона, показанная на рис. 3,б, содержит протонированный молекулярный ион $M \cdot H^+$ (m/z 734,6), изотопные пики с соответствующим распределением интенсивностей, а также пик иона на 1 а.е. меньше молекулярного, типичный для соединений, содержащих длинные углеводородные радикалы. В области средних масс регистрируются пики с m/z 496 и 480, соответствующие фрагментации ДПФХ по эфирному участку, сопряженному с остатком пальмитиновой кислоты. В области малых масс присутствует отмеченный во введении характеристический фрагмент с m/z 184, соответствующий полярной головке фосфолипида. Этот пик будет использоваться нами далее в качестве маркера наличия в поверхностном слое фосфолипида.

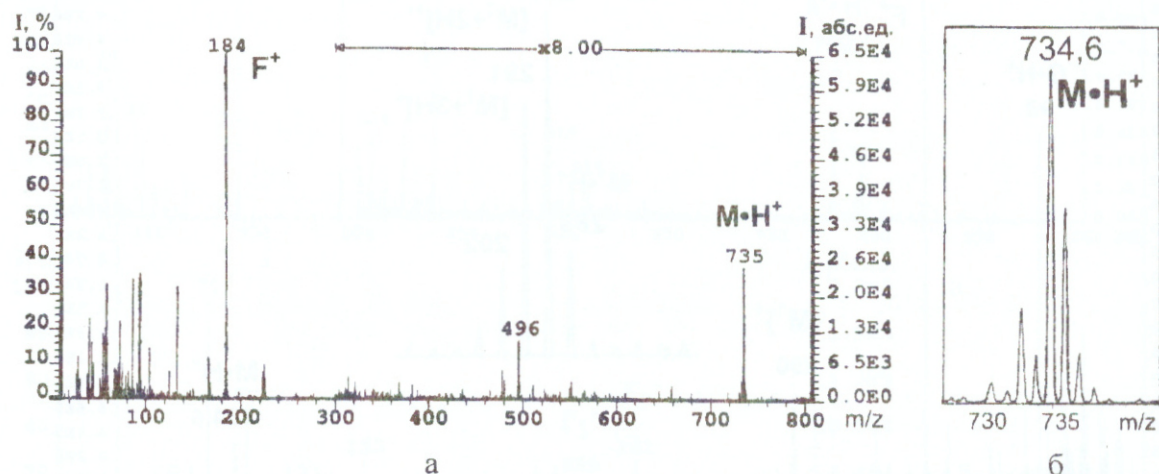
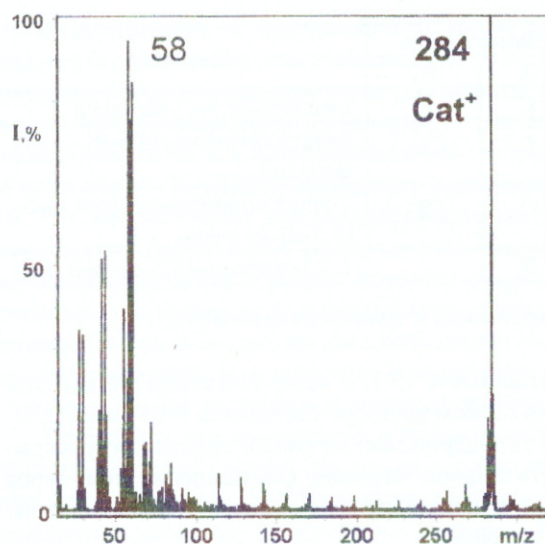


Рис. 3. ВИМС масс-спектр положительных ионов ДПФХ (М) в глицериновой матрице: а) большой массовый диапазон; F^+ - характеристический фрагмент, соответствующий полярной головке ДПФХ; б) увеличенный участок спектра, содержащий группу пиков молекулярного иона ДПФХ. (В оригинальных ВИМС масс-спектрах сохранена маркировка оси I, абс. ед., создаваемая программным обеспечением прибора VG-ZB-SEQ).



На рис. 4 показан ББА масс-спектр ПАВ ЦТАБ в глицериновой матрице. Основным пиком в спектре является пик органического катиона соли Cat^+ , m/z 284. Пики, соответствующие глицериновой матрице, в спектре отсутствуют вследствие так называемого «эффекта подавления» [7]. «Подавление» сигналов растворителя принято объяснять экранирующим действием слоя ПАВ, образование которого на поверхности матрицы препятствует эффективному распылению жидкости бомбардирующими частицами [7-9]. В связи с этим полное отсутствие сигналов жидкой матрицы в масс-спектрах можно считать косвенным критерием формирования заполненного монослоя ПАВ на поверхности матрицы.

Рис. 4. ББА масс-спектр положительных ионов ЦТАБ в глицериновой матрице: Cat^+ – органический катион соли.

ВИМС масс-спектры многих традиционных красителей были ранее хорошо изучены другими исследователями в работах [18-21]. Нами недавно начато исследование серии новых перспективных красителей - производных имидазофеназина. Детальное описание спектров индивидуальных красителей приведено в работе [17]. Красители, предназначенные для использования в качестве медиаторных красителей в биосенсорах, должны обладать определенными окислительно-восстановительными свойствами. Реакции восстановления красителей можно наблюдать в условиях вторично-ионной масс-спектрометрии [17-23]. Об осуществлении таких реакций свидетельствует появление в масс-спектрах характеристических пиков $[\text{M} + n\text{H}]^+$, ($n = 2, 3$) [19-23]. На основании результатов этих исследований один из представителей производных имидазофеназина, $\text{CF}_3\text{-iPhe}$, был выбран как один из наиболее перспективных по своим физико-химическим параметрам для использования в биосенсорах [17, 24].

Далее нами были исследованы растворы смесей ряда красителей с ДПФХ. На рис. 5 представлен жВИМС масс-спектр положительных ионов системы, содержащей $\text{CF}_3\text{-iPhe}$ (M^+). Спектр содержит пики фосфолипидов - молекулярный ион $\text{M}^+\cdot\text{H}^+$, m/z 734,6 и интенсивный диагностический фрагмент F^+ с m/z 184. Наряду с этими пиками в спектре присутствует группа пиков $[\text{M}^+ + n\text{H}]^+$, соответствующих красителю. Достаточно высокая интенсивность этих пиков, сравнимая с таковой молекулярного иона ДПФХ, свидетельствует об эффективном включении красителя в структуру поверхностного липидного слоя.

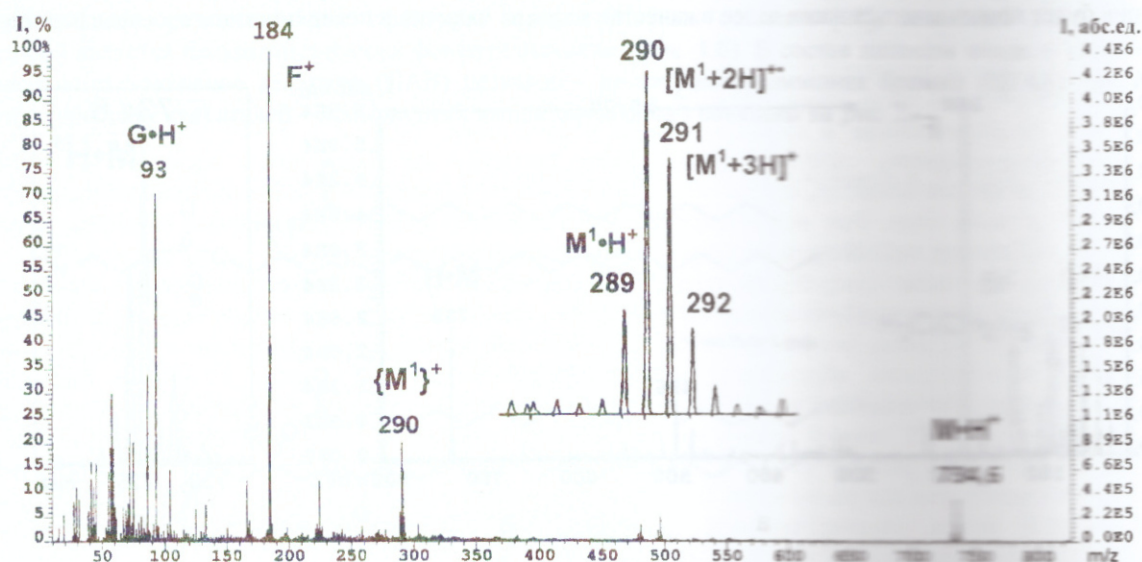


Рис. 5. ВИМС масс-спектр положительных ионов смеси ДПФХ (M) с красителем $\text{CF}_3\text{-iPhe}$ (M^+) в глицериновой (G) матрице. На вставке показан увеличенный фрагмент спектра, содержащий группу пиков $[\text{M}^+ + n\text{H}]^+$, соответствующих молекулярному иону красителя.

Возможности метода вторично-ионной масс-спектрометрии ...

Очевидно, что для констатации наличия обоих компонентов в системе достаточно небольшого диапазона масс до 300 а.е., который содержит пики красителя и характеристического фрагмента ДПФХ.

Примечательно, что распределение пиков в группе $[M^1 + nH]^+$ красителя в липидном слое (рис. 5) практически совпадает с распределением, характерным для спектров чистого красителя в глицериновой матрице [17]. Данный факт является косвенным свидетельством сохранения функциональной, в данном случае окислительно-восстановительной, активности красителя, иммобилизованного в фосфолипидном слое.

На следующем рисунке 6 представлен жВИМС масс-спектр отрицательных ионов того же образца CF_3-iPhe в ДПФХ. Из данного спектра следует, что группу пиков красителя $[M^1 - H]^-$, $[M^1]^-$, $[M^1 + H]^-$, можно наблюдать и в режиме отрицательных ионов. Наибольший по массе пик $[M-14]^-$, m/z 720, соответствует, по всей видимости, деалкилированию ДПФХ. В области малых масс характеристическими фрагментами ДПФХ являются остаток пальмитиновой кислоты F_1^- , m/z 255, а также фрагменты с m/z 79, 97.

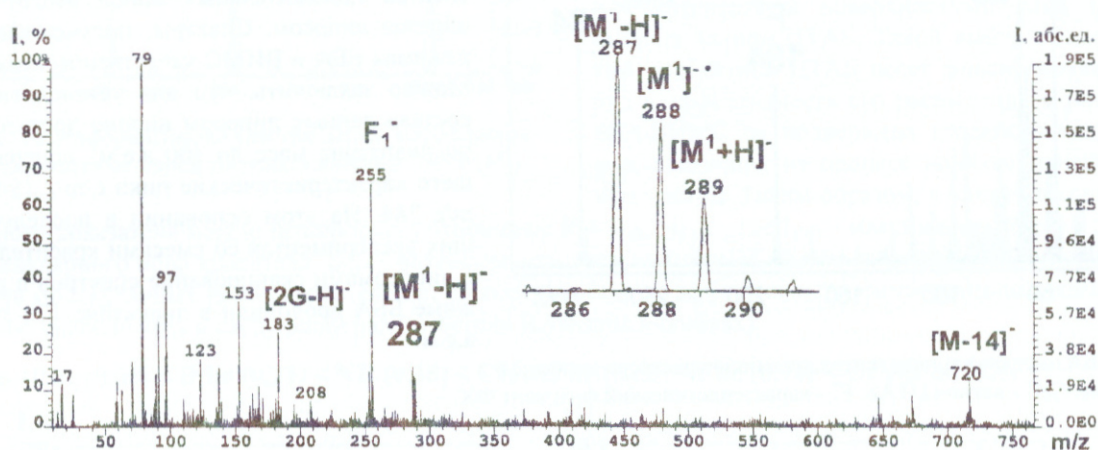


Рис. 6. ВИМС масс-спектр отрицательных ионов смеси ДПФХ (M) с красителем CF_3-iPhe (M^1) в глицериновой (G) матрице. На вставке показан увеличенный фрагмент спектра, содержащий группу пиков молекулярного иона красителя. F_1^- - фрагмент ДПФХ, соответствующий остатку пальмитиновой кислоты.

Затем были изучены масс-спектры липосом, построенных из ФХ и ЦТАБ. На рис. 7 приведены ВИМС масс-спектры положительных и отрицательных ионов липосом в глицериновой матрице.

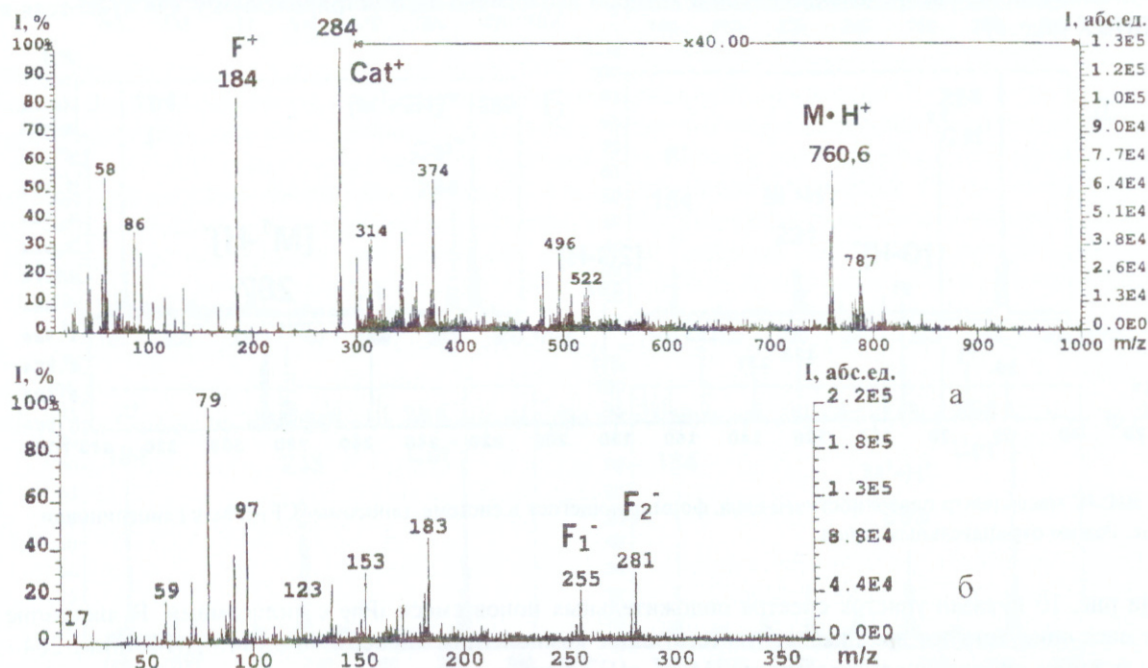


Рис. 7. ВИМС масс-спектры раствора липосом в глицерине: а) режим положительных ионов: M - ФХ, Cat^+ - катион ЦТАБ; б) режим отрицательных ионов; F_1^- - остаток пальмитиновой кислоты; F_2^- - остаток олеиновой кислоты.

В масс-спектре положительных ионов (рис. 7,а) в области больших масс присутствует группа пиков, сопровождающих пик протонированной молекулы ФХ, m/z 760,6 (с распределением, сходным с приведенным на рис. 3, б для ДПФХ). В области малых масс присутствуют два интенсивных пика, первый из которых, расположенный на m/z 184, является маркером фосфолипида, а пик с m/z 284 соответствует катиону ЦТАБ. Таким образом, монослой, формирующийся на поверхности матрицы, содержит оба компонента липосом.

В масс-спектре отрицательных ионов (рис. 7,б) в области больших масс пики находятся на уровне шума, а в области малых масс присутствуют два характеристических фрагмента, соответствующих остаткам пальмитиновой, F_1^- , m/z 255, и олеиновой, F_2^- , m/z 281, жирных кислот, входящих в состав ФХ, а также ряд более мелких фрагментов.

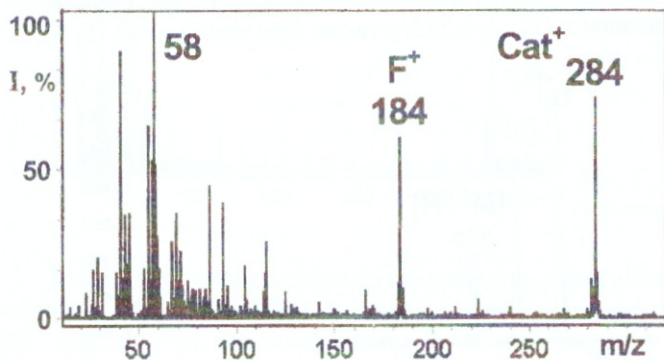


Рис. 8. БАА масс-спектр положительных ионов раствора липосом в глицерине. Cat^+ - катион ЦТАБ. F^+ - характеристический фрагмент ФХ.

На рис. 8 показан участок БАА масс-спектра положительных ионов этого же образца липосом. Спектры, полученные в режимах БАА и ВИМС качественно схожи. Можно заключить, что для установления состава данных липосом вполне достаточно диапазона масс до 300 а.е.м., содержащего характеристические пики с m/z 184 и m/z 284. На этом основании в последующих экспериментах со смесями красителей с липосомами сканирование спектров в режиме БАА проводили в диапазоне 170-300 а.е.м.

Следующим шагом стало изучение смесей серии красителей-производных имидзофеназина с липосомами. На данном этапе сделано допущение, что эффективность включения красителей в оболочку липосом в объеме раствора коррелирует с эффективностью их включения в монослой, образующийся на поверхности жидкого раствора.

На рис. 9 представлен ВИМС масс-спектр отрицательных ионов смеси липосом с красителем CF_3-iPhe в глицериновой матрице. О наличии в системе ФХ свидетельствуют его диагностические фрагменты F_1^- , m/z 255 и F_2^- , m/z 281. Включение в поверхностный слой CF_3-iPhe подтверждается группой пиков молекулярного иона, распределение пиков в которой аналогично зарегистрированному для красителя в слое ДПФХ (рис. 6).

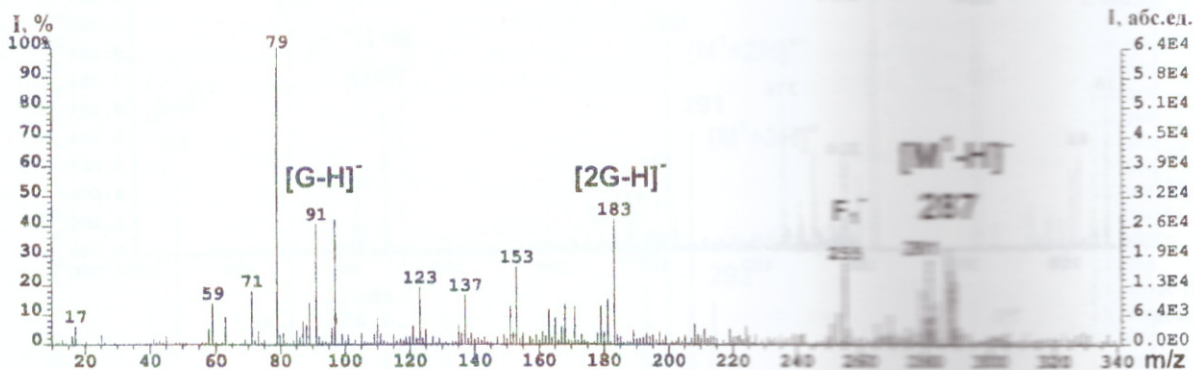


Рис. 9. ВИМС масс-спектр поверхностного слоя, формирующегося в системе липосом- CF_3-iPhe в глицериновой матрице. Режим отрицательных ионов.

На рис. 10 показан участок спектра положительных ионов смеси $iPhe$ с липосомами. В диапазоне малых масс присутствуют два пика, соответствующие компонентам липосом: m/z 184 - ДПФХ, m/z 284 - ЦТАБ, а также группа пиков красителя, $[M^1 + nH]^+$, наиболее интенсивным в которой является пик $[M^1 + 2H]^+$, m/z 222. Опять таки, основные, необходимые для установления состава системы, пики содержатся в диапазоне малых масс до 300 а.е.

Возможности метода вторично-ионной масс-спектрометрии ...

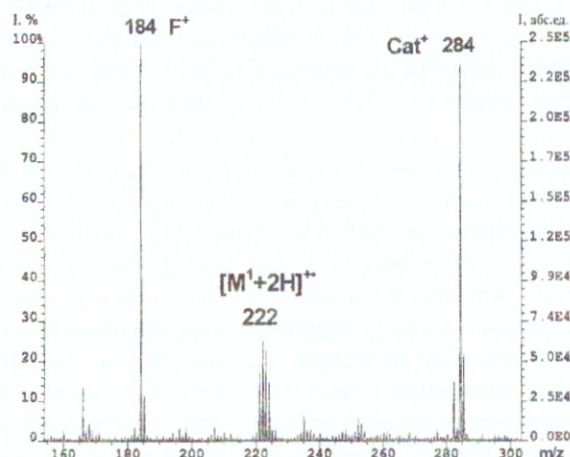


Рис. 10. Информативный участок ВИМС масс-спектра положительных ионов системы липосомы – iPhe (M^1).

венного показателя можно использовать отношение $R = I_{[M]} / I_{Cat+}$, где $I_{[M]}$ – максимальный пик в пакете молекулярного иона красителя, I_{Cat+} – интенсивность пика катиона ЦТАБ. По увеличению интенсивности пиков молекулярных ионов красителей и, по всей видимости, эффективности иммобилизации, красители можно расположить в следующий ряд (величина R указана в скобках):

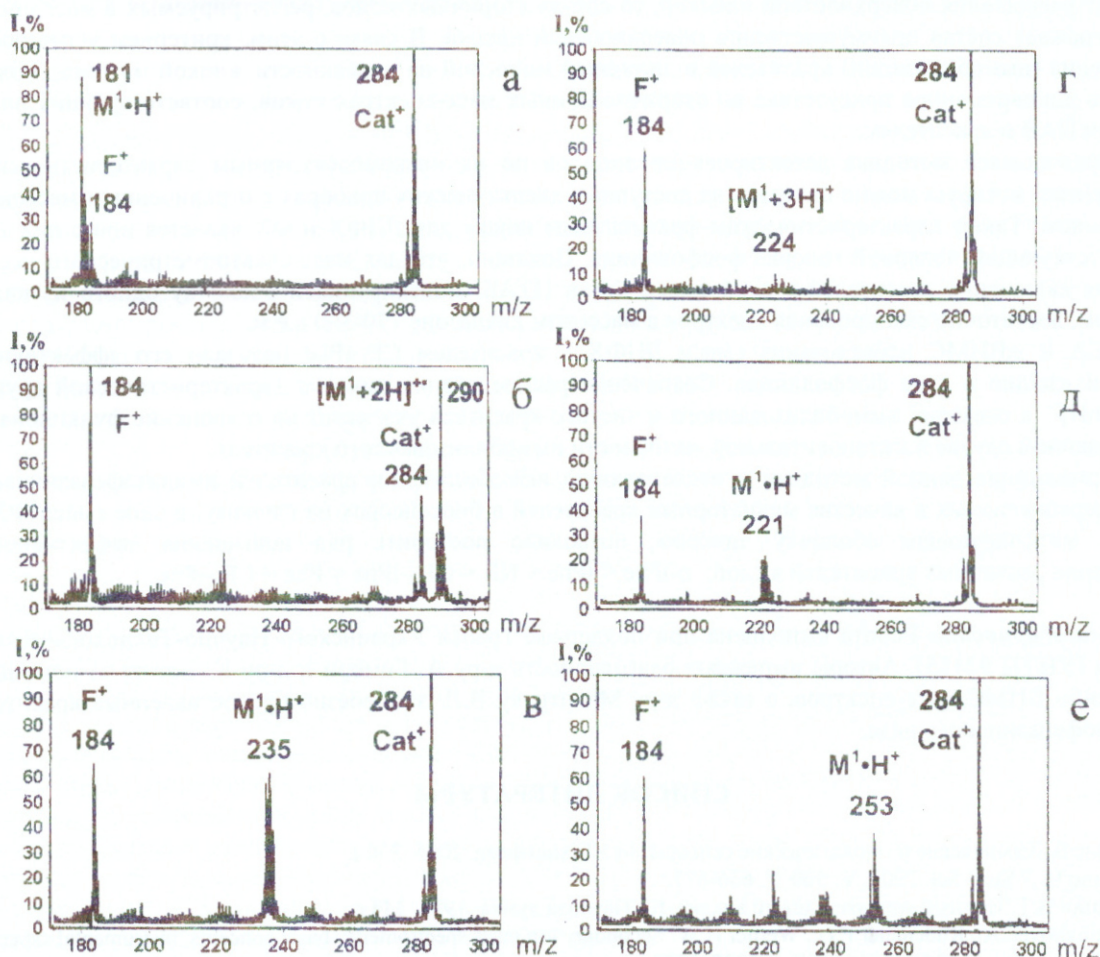


Рис. 11. ББА масс-спектры поверхностного слоя, формирующегося на поверхности глицериновой матрицы в системе липосомы – красители: а) феназин; б) $\text{CF}_3\text{-iPhe}$; в) $\text{CH}_3\text{-iPhe}$; г) $n\text{-iPhe}$; д) iPhe е) нейтральный красный.

На рис. 11 представлена серия ББА масс-спектров положительных ионов смеси липосом с красителями - производными имидзофеназина и, для сравнения, с феназином и нейтральным красным (NR). Анализ спектров показывает, что все они содержат пики, соответствующие красителям, однако относительные интенсивности этих пиков различаются для разных красителей.

Такая картина указывает на возможность включения всех красителей в поверхностный слой, однако, с различной эффективностью. Для количественной оценки эффективности включения красителя в поверхностный слой можно выбрать катион ЦТАБ. Такой выбор обусловлен тем, что катион ЦТАБ несет фиксированный заряд и эффективность его распыления в условиях ББА/ВИМС не подвержена воздействию факторов, влияющих на процесс ионизации нейтральных частиц. Таким образом, в качестве количественного

Примечательно, что CF_3 -iPhe производное, отмеченное выше как наиболее перспективное, и по параметру включения в липидные слои оказывается наиболее эффективным. Высокую эффективность включения показывает также феназин, а самую низкую – *n*-iPhe. Эффективности включения CH_3 -iPhe и взятого для сравнения стандартного красителя нейтрального красного сравнимы и занимают среднее положение по отношению к другим красителям.

Для определения механизмов и структурных параметров включения красителей в поверхностный слой необходимо проведение расчетов методами квантовой химии и молекулярной динамики. Однако, некоторые предположения можно сделать на основе опыта предыдущих работ по включению биологически активных веществ в липидные слои [5, 6] и липосомы [25]. Возможны два варианта встраивания красителей в слои, моделирующие оболочку липосом. Во-первых, плоскостная структура молекул красителей позволяет им встраиваться (интеркалировать) между гидрофобными хвостами ФХ и ЦТАБ. Во-вторых, возможна адсорбция красителей в области полярных головок ФХ и ЦТАБ. Примечательно, что в данном случае наблюдается хорошая корреляция между распределением зарядов в молекулах красителей [17] и эффективностью их включения в поверхностный слой: наличие зоны повышенной плотности отрицательного заряда на CF_3 группе CF_3 -iPhe обеспечивает наиболее эффективное взаимодействие этого производного с положительно заряженной (за счет катионов ЦТАБ) оболочкой липосом.

ВЫВОДЫ

Рассмотрена методология контроля иммобилизации красителей в липидных слоях и липосомах с использованием возможностей метода вторично-эмиссионной масс-спектрометрии в его модификациях БА и жВИМС. Возможность использования данного метода основывается на свойстве липидов и ПАВ формировать самособирающийся монослой на поверхности жидкой матрицы, доступной для воздействия первичного ионного пучка. Поскольку более глубокие слои раствора в значительной степени экранируются от распыления поверхностной пленкой, то состав вторичных ионов, регистрируемых в масс-спектрах, отражает состав преимущественно поверхностной пленки. В связи с этим, критерием успешности включения (иммобилизации) красителей в липидный монослой на поверхности жидкой матрицы можно считать одновременное присутствие во вторично-ионных масс-спектрах пиков, соответствующих липидам или ПАВ и красителям.

Предлагается методика детектирования липидов по их низкомолекулярным характеристическим фрагментам, которую можно внедрять на доступных аналитических приборах с ограниченным массовым диапазоном. Таким характеристическим фрагментным ионом для ДПФХ и ФХ является ион с m/z 184, соответствующий полярной головке фосфолипида. Показано, что для масс-спектрометрического исследования включения красителей в слой смеси ФХ и ЦТАБ, моделирующей оболочку одного из видов липосом, достаточно сканирования спектров в массовом диапазоне 170-300 а.е.м.

БА и жВИМС исследование смеси ДПФХ с красителем CF_3 -iPhe показало его эффективную иммобилизацию в слое фосфолипида. Совпадение распределения пиков в характеристической группе $[M^+ + nH]^+$ в спектрах иммобилизованного и чистого красителя указывает на сохранение функциональной, в данном случае восстановительной, активности иммобилизованного красителя.

Приложения данной методики к исследованию иммобилизации красителей имидазофеназинового ряда, перспективных в качестве медиаторных красителей в биосенсорах на глюкозу, в слое смеси ФХ и ЦТАБ, моделирующем оболочку липосом, позволило построить ряд повышения эффективности включения различных красителей в слой: n -iPhe < iPhe < NR < CH_3 -iPhe < Phe < CF_3 -iPhe.

Благодарности: Работа выполнена при поддержке гранта Украинского Научно-Технологического Центра (УНТЦ #2155). Авторы выражают благодарность д-ру А. Гомори и д-ру К. Векею за помощь в получении ВИМС масс-спектров, а также д-ру Макитруку В.Л. за любезно предоставленные красители имидазофеназинового ряда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. М.: Техносфера. 2005. 336 с.
2. Kasemo B. // Surf. Sci. 2002. V. 500. P. 656-677.
3. Черепин В.Т. Ионный микрозондовый анализ. К.: Наукова думка. 1992. 344 с.
4. Benninghoven A., Rudenauer F.G., Werner H.W. Secondary ion mass spectrometry: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends. New York: Wiley. 1987. 1226 p.
5. Пашинская В.А., Косевич М.В., Гомори А., Векей К., Корзовская О.В., Лисецкий Л.Н., Благий Ю.П. // Вісник Харківського університету. Біофізичний вісник. 1999. N 450. Вип. 2. С. 59-62.

Возможности метода вторично-ионной масс-спектрометрии ...

6. Pashynskaya V.A., Kosevich M.V., Gomory A., Vashchenko O.V., Lisetski L.N. // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2002. V. 16. N 18. P. 1706-1713.
7. Ligon W.V., Dorn S.B. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1986. V. 78. P. 99-113.
8. Ligon W.V., Dorn S.B. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1984. V. 57. P. 75-90.
9. Benninghoven A. // *Int. J. Mass Spectrom Ion Phys.* 1983. V. 53. P. 85-99.
10. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2003. 493 с.
11. Kaltashov I.A., Eyles S.J. *Mass Spectrometry in Biophysics: Conformation and Dynamics of Biomolecules*. New York: Wiley. 2005. 458 p.
12. Bourdos N., Kollmer F., Kamische R., Benninghoven A., Galla H.-J., Sieber M. // *SIMS XII. Proc. 12th Int. Conf. on Secondary Ion Mass Spectrom.*, Brussels, Belgium, 5-10 Sept. 1999. Amsterdam: Elsevier. 2000. P. 923-926.
13. Henry M., Bertrand P. // *Abstr. 4th Europ. Workshop on Secondary Ion Mass Spectrom.*, 26-29 Sept. 2004. Munster, Germany. P. 26.
14. AVANTI Polar Lipids Inc. Catalog (<http://www.avantilipids.com/Catalog.asp>), Product Number: 840051. <http://www.avantilipids.com/ProductData.asp?n=840051>.
15. Gorbenko G.P., Domanov Y.A. // *J. Biol. Phys. Chem.* 2005. V. 5. P. 13-19.
16. Макитрук В.Л., Шаламай А.С., Кондратюк И.В. // *Биополимеры и клетка*. 1997. N 13. С. 453-459.
17. Kosevich M.V., Boryak O.A., Orlov V.V., Shelkovsky V.S., Chagovets V.V., Stepanian S.G., Karachevtsev V.A., Adamowisz L. // *J. Mass Spectrom.* 2006. V. 41. N 1. P. 113-123.
18. Bentz B.L., Gale P.J. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V. 78. P. 115-130.
19. Gale P.J., Bentz B.L., Chait B.T., Field F.H., Cotter R.J. // *Analytical Chemistry*. 1986. V. 58. P. 1070-1076.
20. Kyranos J.N., Vouros P. // *Biomed. Envir. Mass Spectrom.* 1990. V. 19. P. 628-634.
21. Ohashi Y., Itoh Y. // *Current Organic Chemistry*. 2003. V. 7. P. 1605-1611.
22. Pelzer G., De Pauw E., Dao V.D., Marient J. // *J. Phys. Chem.* 1984. V. 88. P. 5065-5068.
23. Cerny R.L., Gross M.L. // *Analytical Chemistry*. 1985. V. 57. P. 1160-1163.
24. Ryazanova O.A., Zozulya V.N., Voloshin I.M., Karachevtsev V.A., Makitruk V.L., Stepanian S.G. // *Spectrochimica Acta. Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004. V. 60. P. 2005-2011.
25. Liu P., Finashin A.V., Domanov Ye. A., Gorbenko G.P. // *Visnyk Kharkivs'koho Natsional'noho Universytetu im.V.N.Karazina. Biophysical Bulletin*. 2005 (in press)