

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
Химический факультет

*На правах рукописи*



**Родин Игорь Александрович**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ТРАНСФОРМАЦИИ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ  
МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

02.00.02 – Аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
доктора химических наук

Москва – 2016



## Общая характеристика работы

### Актуальность темы

Обнаружение продуктов трансформации отравляющих веществ (ОВ) в биологических и природных объектах позволяет устанавливать факты применения ОВ, наблюдать за утечкой ОВ при их хранении, а также решать много важных смежных проблем. Разработка соответствующих методов осложнена необходимостью обнаружения малых количеств аналитов ( $10^{-9}$  г/мл и ниже) и сложным составом объектов. Задачи по анализу таких объектов обычно исходят из смежных областей науки, например медицины, фармакологии и токсикологии, поэтому требования к чувствительности, селективности и информативности анализа устанавливаются исходя из физиологической активности изучаемого соединения и типа объекта анализа. Для обнаружения продуктов трансформации необходима разработка способов высокочувствительного определения этих соединений.

Для решения указанной проблемы перспективно использование современного гибридного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС). Метод характеризуется высокой селективностью и чувствительностью, а также позволяет получать большой объем масс-спектрометрических данных в ходе одного анализа, что обеспечивает высокую достоверность анализа. По сравнению с газовой хромато-масс-спектрометрией (ГХ-МС), при использовании ВЭЖХ-МС отсутствуют ограничения по летучести и термической стабильности определяемых соединений, существенно расширяется диапазон исследуемых соединений. Благодаря широкому набору сорбентов для ВЭЖХ-МС и большой вариабельности в выборе состава подвижных фаз, достигается уникальная возможность управления селективностью разделения соединений различных классов. Использование различных вариантов ионизации, а также широкие возможности проведения масс-спектрометрического детектирования позволяют достигать низких пределов обнаружения, обеспечивать высокую селективность (в ряде случаев специфичность) детектирования, что обеспечивает возможность решения наиболее сложных задач.

Значительным ограничением при использовании ВЭЖХ-МС для определения физиологически активных веществ, в том числе продуктов трансформации ОВ, является малое число разработанных методик (метод недавно используют для решения таких задач, в отличие от ГХ-МС), отсутствие общих принципов разработки таких методик, а также проблема привязки разработанных методик к конкретным приборам. Так, сложный механизм ионизации, протекающей при атмосферном давлении, делает получаемую масс-спектральную информацию сильно зависимой от конструкции прибора.

Представляется важным создание принципиальных подходов к разработке методик определения указанных соединений, основанных на закономерностях удерживания и ионизации в ВЭЖХ-МС, обусловленных физико-химическими свойствами этих аналитов. Такие подходы должны включать получение сведений об общих масс-спектрометрических характеристиках аналитов, например закономерности формирования масс-спектров, мало зависящие от конструкции источника ионизации, особенностей поведения ионов

соединений в условиях тандемного масс-спектрометрического эксперимента, а также общие закономерности хроматографического поведения при разделении в условиях ВЭЖХ.

Список токсических веществ и их прекурсоров, для которых должны быть созданы и апробированы надежные способы обнаружения, указаны в Приложениях 1-3 Конвенции о запрещении разработки, производства, хранения и использования химического оружия КЗХО. Эти Приложения включают тысячи химических соединений, в частности, большую часть из них составляют органические вещества с различными физико-химическими свойствами: кислоты, основания, соединения с группами, содержащими гетероатомы фосфора, серы, мышьяка, фтора и/или хлора. В настоящей работе в качестве аналитов выбраны несколько классов элементарноорганических соединений, являющихся основными продуктами трансформации нервно-паралитических ОВ (диалкилтаурины и О-алкилметилфосфоновые кислоты, алкилфосфоновые кислоты), иприта (продукты разложения под действием фермента  $\beta$ -лиазы, тиодигликолевая кислота) и люизита (2-хлорвиниларсоновая и 2-хлорвиниларсонистая кислоты), обладающих свойствами полярных соединений и относящихся к нелетучим веществам. Указанные вещества являются специфичными маркерами основных классов отравляющих веществ, т.е. не встречаются в окружающей среде и способны сохраняться в объектах анализа в течение длительного времени, а также по своему происхождению являются продуктами превращений отравляющих веществ.

Для решения указанной задачи ранее использовались преимущественно методы ГХ-МС и ГХ-МС/МС, существенным ограничением которых была невозможность прямого определения высокополярных продуктов превращения ОВ. Особые трудности возникают при использовании данных методов в анализе сложных биологических и природных образцов. Методы ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС позволяют решить указанную проблему, тем самым проводить более экспрессное и чувствительное определение указанных веществ в сложных матрицах.

### **Цель работы**

Развитие методических основ высокочувствительного определения органических и элементарноорганических соединений высокой полярности, являющихся продуктами трансформации ОВ, в биологических материалах и в объектах окружающей среды с использованием метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии с различными способами ионизации в вариантах одномерной и тандемной масс-спектрометрии.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Поиск условий хроматографического разделения в различных вариантах (обращенно-фазовом и гидрофильном) ВЭЖХ анализа и характера ионизации и фрагментации в условиях масс-спектрометрического анализа с электрораспылительной ионизацией и химической ионизацией при атмосферном давлении продуктов трансформации ОВ: диалкилтауринов и О-алкилметилфосфоновых кислот, алкилфосфоновых кислот, а также S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида (продукты разложения нервно-паралитических ОВ), метаболитов иприта, которые образуются в живых организмах под действием фермента  $\beta$ -лиазы, продуктов окислительного гидролиза иприта в живых организмах и в окружающей

среде – тиодигликолевой кислоты, двух основных продуктов разложения люизита (хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот) в объектах окружающей среды и биопробах.

2. Разработка подходов к проведению пробоподготовки и выбор условий пробоподготовки, обеспечивающих эффективную очистку от примесей, мешающих определению малых количеств аналитов, в биологических жидкостях (моче, крови) и в объектах окружающей среды (сточных водах, почве, талом снеге и др).

3. Создание и апробация способов хромато-масс-спектрометрического определения продуктов трансформации ОВ методами прямого ВЭЖХ-МС анализа в биологических жидкостях и объектах окружающей среды, искусственно загрязненных продуктами трансформации ОВ, позволяющих надежно выявлять факт применения ОВ.

4. Изучение процессов выведения продуктов трансформации ОВ из живого организма после получения лабораторными крысами несмертельных доз ОВ для оценки ретроспективности разработанных подходов.

5. Разработка и апробация рутинных способов высокочувствительного скрининга продуктов трансформации ОВ в природных водах методом капиллярного зонного электрофореза.

6. Расширение возможностей метода ВЭЖХ-МС(МС) для обнаружения следов соединений, являющихся продуктами трансформации ОВ с использованием упрощенных процедур пробоподготовки с последующим созданием стандартизованных подходов для определения соединений различных классов в ходе единственного цикла анализа.

### **Научная новизна**

Изучены особенности масс-спектров первого и второго порядка электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении ряда О-алкилметилфосфоновых кислот, алкилфосфоновых кислот, диалкилтауринов, ряда продуктов трансформации V-газов, тиодигликолевой кислоты, ряда продуктов ферментативного превращения иприта ( $\beta$ -лиазные аддукты), хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот.

Установлены особенности удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии О-алкилметилфосфоновых кислот, алкилфосфоновых кислот, диалкилтауринов, ряда продуктов трансформации V-газов, тиодигликолевой кислоты, ряда продуктов ферментативного превращения иприта ( $\beta$ -лиазные аддукты), хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот.

Изучена реакция взаимодействия алкилфосфоновых кислот с п-бромфенацилбромидом. Изучены масс-спектры первого и второго порядка электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении.

Предложена схема высокочувствительного определения метилфосфоновой кислоты в варианте гидрофильной ВЭЖХ-МС/МС в виде производного с п-бромфенацилбромидом.

Изучено разделение хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот в условиях капиллярного зонного электрофореза. Предложен способ скрининга этих веществ в объектах окружающей среды методом капиллярного электрофореза. Изучено разделение диалкилтауринов в условиях капиллярного зонного электрофореза. Предложены схемы

скрининга диалкилтауринов в объектах окружающей среды методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ-МС/МС.

Проведена сравнительная оценка различных способов пробоподготовки образцов мочи и плазмы крови, основанных на использовании сорбционного концентрирования, а также способа ввода пробы после разбавления (техника «dilute and shoot»). Показана возможность существенного упрощения пробоподготовки.

Предложены хромато-масс-спектрометрические подходы для изучения выведения метаболитов зарина, зомана, VX и люизита из живых организмов на примере лабораторных животных (образцы крови и мочи).

### **Практическая значимость**

Предложен ряд подходов, направленных на развитие метода ВЭЖХ-МС(/МС). Особое внимание уделено повышению чувствительности и экспрессности анализа. Также предложен путь унификации условий определения продуктов трансформации ОВ, основанный на использовании упрощенной пробоподготовки, простых хроматографических систем с подвижными фазами фиксированного состава и использовании распространенных типов хроматографических колонок. Предложены способы быстрой пробоподготовки образцов биологических материалов (кровь, моча), объектов окружающей среды (почвы и воды), обеспечивающие воспроизводимость и правильность анализа.

Предложены способы высокочувствительного определения:

- метилфосфоновой кислоты методом гидрофильной ВЭЖХ-МС/МС в природных водах и экстрактах пыле-грунтовых смесей с пределом обнаружения 200 пг/мл,

- 2-(N,N-диалкиламино)-этансульфоновых кислот в природных водах методом ВЭЖХ-МС с пределом обнаружения 25 нг/мл,

- тиодигликолевой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС в биологических образцах и природных водах с пределами обнаружения 50 и 10 нг/мл, соответственно,

- пинаколилметилфосфоновой кислоты, изобутилметилфосфоновой кислоты, изопропилметилфосфоновой кислоты и этилметилфосфоновой кислоты в биологических жидкостях в варианте обращенно-фазовой (ультра)ВЭЖХ-МС(-МС) с пределами обнаружения 0,1, 0,4, 0,5 и 0,8 нг/мл, соответственно,

- хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот в образцах крысиной мочи – методом ВЭЖХ-МС-МС без использования дериватизации с пределами обнаружения 3 и 0.5 нг в 1 мл мочи, соответственно,

- 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана, а также 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с пределами обнаружения 0,05 – 5 нг/мл,

- S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида в природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС, с пределами обнаружения 0,3 – 50 нг/мл,

Предложены скрининговые способы обнаружения продуктов трансформации ОВ в природных водах методом капиллярного электрофореза:

- хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот с пределами обнаружения 0,3 – 0,5 мкг/мл, соответственно,

- 2-(N,N-диалкиламино)этансульфоновых кислот с пределами обнаружения 3 – 5 мкг/мл.

Установлен вид распределения концентраций продуктов трансформации ОВ во времени по результатам анализа биологических жидкостей лабораторных крыс после интоксикации нервно-паралитическими ОВ, ипритом и люизитом. Показана высокая ретроспективность разработанных подходов.

Разработанные способы успешно прошли апробацию во время проведения официальных и тренировочных сравнительных тестов в 2010 – 2015 гг.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Результаты изучения ионизации продуктов трансформации боевых отравляющих веществ (серо-, мышьяк-, фосфорсодержащих и т.д.) и их производных в условиях электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении.
2. Результаты изучения фрагментации, инициированной соударением, продуктов трансформации боевых отравляющих веществ (серо-, мышьяк-, фосфорсодержащих и т.д.).
3. Условия пробоподготовки при определении продуктов трансформации ОВ в объектах сложного состава (моче, крови, объектах окружающей среды).
4. Способы определения:
  - О-алкилметилфосфоновых кислот методом ВЭЖХ-МС в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции,
  - продуктов ферментативной трансформации иприта в биологических жидкостях с использованием твердофазной экстракции,
  - О-алкилметилфосфоновых кислот и продуктов ферментативной трансформации иприта в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием ввода пробы после разбавления (техника «dilute and shoot»),
  - алкилтауринов в природных водах методом ВЭЖХ-МС,
  - метилфосфоновой кислоты и алкилметилфосфоновых кислот в природных водах и грунто-пылевой смеси методом гидрофильной ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией с п-бромфенацилбромодом,
  - тиодигликолевой кислоты в биологических жидкостях и природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием ввода пробы после разбавления (техника «dilute and shoot»),
  - 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана, а также 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием ввода пробы после разбавления (техника «dilute and shoot») и твердофазной экстракции,
  - S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида в природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС.

## 5. Схемы скрининга:

- продуктов хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот методом капиллярного электрофореза в природных водах
- алкилтауринов методом капиллярного электрофореза в природных водах.

### Апробация работы и публикации

Результаты исследований докладывались на следующих научных конференциях:

International Congress on Analytical Sciences (Москва, Россия, 2006), International conference «Euroanalysis» (Антверпен, Бельгия, 2007), European Conference on Analytical Chemistry «Euroanalysis» (Инсбрук, Austria, 2009), Всероссийская конференция «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2010), 36<sup>th</sup> International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, (Рим, Италия, 2010), IUPAC International Congress on Analytical Sciences (Киото, Япония, 2011), 36<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Chromatography and Related Techniques (Будапешт, Венгрия, 2011), IV Международный молодежный медицинский конгресс (Санкт-Петербург, Россия, 2011), “8<sup>th</sup> annual LC/MS/MS workshop on environmental application and food safety” (Барселона, Испания, 2012), «Ломоносовские чтения» секция «Химия» (Москва, Россия, 2013), The Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVIII (Тромсе, Норвегия, 2013), 1<sup>th</sup> International Conference on Urine Omics (Капарика-Алмада, Португалия, 2013) IV Всероссийский симпозиум с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, Россия, 2014). Седьмой съезд ВМСО, VI Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2015), 10<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (Шиофок, Венгрия, 2015), X Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2016» (Углич, Россия, 2016).

### Вклад автора

Вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включённые в диссертацию, состоит в общей постановке задач, непосредственном участии в экспериментальных исследованиях, обсуждении и оформлении полученных результатов и обобщении результатов исследований.

### Публикации результатов

Материалы диссертации опубликованы в 17 статьях и в более чем в 20 тезисах докладов.

### Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5-ти глав с обсуждением полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 277 страницах текста, содержит 83 таблицы и 137 рисунков.

### **Основное содержание работы**

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором описаны пути трансформации ОБ, рассмотрены и систематизированы работы, посвященные исследованиям обнаружения и определения основных классов ОБ (нервно-паралитических ОБ, сернистых и азотистых ипритов, мышьяк-содержащих ОБ) и продуктов их разложения в объектах окружающей среды и биологических жидкостях живых организмов методами ВЭЖХ и ГХ.

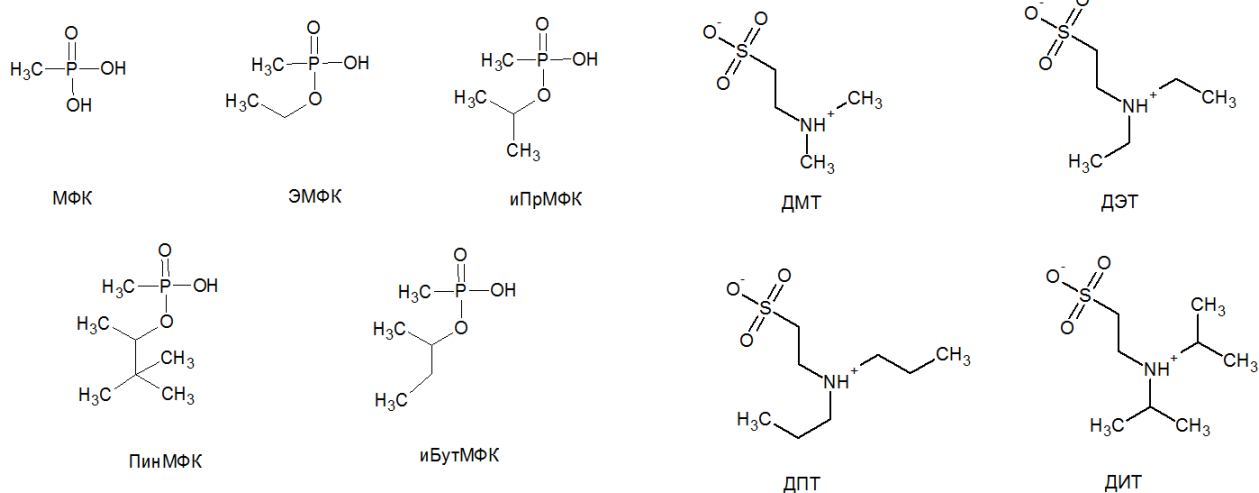
Во **второй главе** диссертации перечислены реагенты и аппаратура, которые применялись в ходе исследования. В работе использовали следующее хроматографическое оборудование:



жидкостный хроматограф с масс-спектрометрическим детектором LCMS-2010A (Shimadzu, Япония), система капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия), жидкостной хроматограф Agilent 1100 (США) с МС-МС детектором Varian 1200 (США), жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (Dionex, США) с гибридным тандемным масс-спектрометрическим детектором Q TRAP 3200 (AB SCIEX, Канада), масс-спектрометр типа «ионная ловушка» Amazon SL (Bruker, Германия).

В работе использовали следующие хроматографические колонки: Kromasil 100 C18 (1.0×250 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (HiChrom, Великобритания), Sinergi-HydroRP (150\*2,1 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Phenomenex, США), Synergi Polar (250x2 мм), диаметр зерна сорбента 4 мкм (Phenomenex, США), Acclaim C18 (250 × 2 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США), Sinergi Polar (150x2 мм), диаметра зерна сорбента 4 мкм (Phenomenex, США), Zorbax Stable Bond C-18E (150x2 мм), диаметра зерна сорбента 5 мкм (Agilent, США), Zorbax SB-C18 (150 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента – 1.8 мкм (Agilent, США) кварцевые капилляры для КЗЭ с поливиниловым покрытием внутренним диаметром 50 и 75 мкм.

**Третья глава** посвящена разработке способов определения О-алкилметилфосфонатов - продуктов гидролиза зарина, зомана, VX и RVX в объектах окружающей среды и биологических объектах, а также диалкилтауринов (Рис. 1) - продуктов окислительной трансформации V-газов – нервно-паралитических ОВ методом ВЭЖХ-МС и КЗЭ-УФ.



**Рис. 1. Структурные формулы О-алкилметилфосфонатов и диалкилтауринов. МФК – метилфосфоная кислота, ЭМФК – этил метилфосфоная кислота, иПрМФК – изопропил метилфосфоная кислота, ПинМФК- пинаколил метилфосфоная кислота, иБутМФК – изобутилметилфосфоная кислота, ДМТ – 2-(N, N –диметиламино)-этансульфоная кислота, ДЭТ - 2-(N, N –диэтиламино)-этансульфоная кислота, ДПТ - 2-(N, N –дипропиламино)-этансульфоная кислота, ДИТ - 2-(N, N –диизопропиламино)-этансульфоная кислота.**

**Определение диалкилтауринов методом КЭ.** Разрабатывали простую скрининговую методику определения диалкилтауринов методов капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием. Для достижения необходимых параметров разделения (эффективности и селективности), необходимо варьировать состав ведущего электролита, рабочее напряжение, также влияющее на скорость перемещения анионов, и диаметр капилляра.

Для соотнесения пиков компонентов анализируемой смеси, анализировали растворы индивидуальных компонентов. На рис. 2 представлено наложение электрофореграмм индивидуальных компонентов и электрофореграмма модельной смеси. На всех электрофореграммах присутствует пик со временем миграции 4,8 мин, который выходит перед пиком ДИТ и не зависит от концентрации анализируемых компонентов. Появление этого пика имеет систематическую природу. Поэтому одной из задач при выборе условий разделения была задача устранения мешающего влияния этого пика. Выбранные условия позволяют проводить селективное разделение диалкилтауринов в смеси.

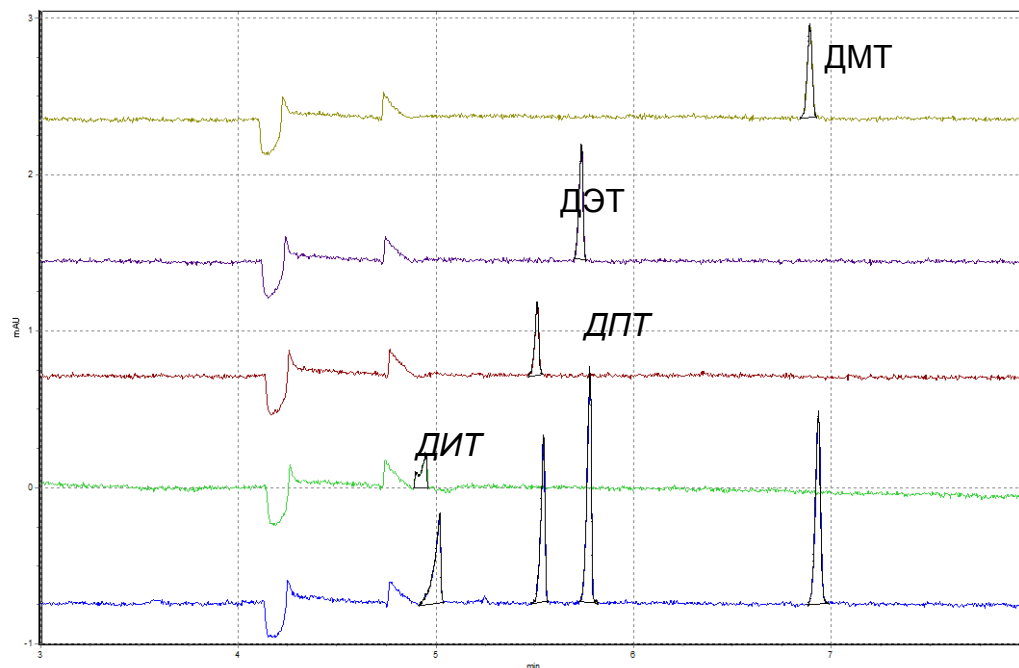
Для выбора оптимальных условий прямого детектирования и построения спектров поглощения анализируемых компонентов был зарегистрирован ряд электрофореграмм четырехкомпонентной смеси диалкилтауринов в диапазоне длин волн от 190 до 235 нм с шагом 5 нм. При уменьшении длины волны наряду с интенсивностью аналитического сигнала возрастает шум базовой линии, что обусловлено поглощением воды и растворенного в ней кислорода. С уменьшением длины волны детектирования, увеличение шума превалирует над ростом оптической плотности, поэтому при детектировании в области 190 - 195 нм соотношение сигнал/шум не достигает максимального значения. Однако в районе 200 нм поглощение ведущего электролита существенно снижено, коэффициенты оптической экстинкции алкилтауринов еще достаточно высоки. Таким образом, оптимальные результаты достигаются при использовании длины волны 200 нм, что совпадает с литературными данными при определении таурина.

Использовали гидродинамический ввод пробы. Ввод пробы осуществляли под давлением 25 мбар в течение 5 с ( $125 \text{ мбар} \times \text{с}$ ), исходя из наилучшего получаемого соотношения сигнала и эффективности разделения. Показано, что при отсутствии сильного влияния компонентов матрицы, увеличение объема вводимой пробы может быть использовано для дополнительного повышения чувствительности определения (вплоть до  $500 \text{ мбар} \times \text{с}$  с сопутствующим уменьшением эффективности разделения в 2-3 раза).

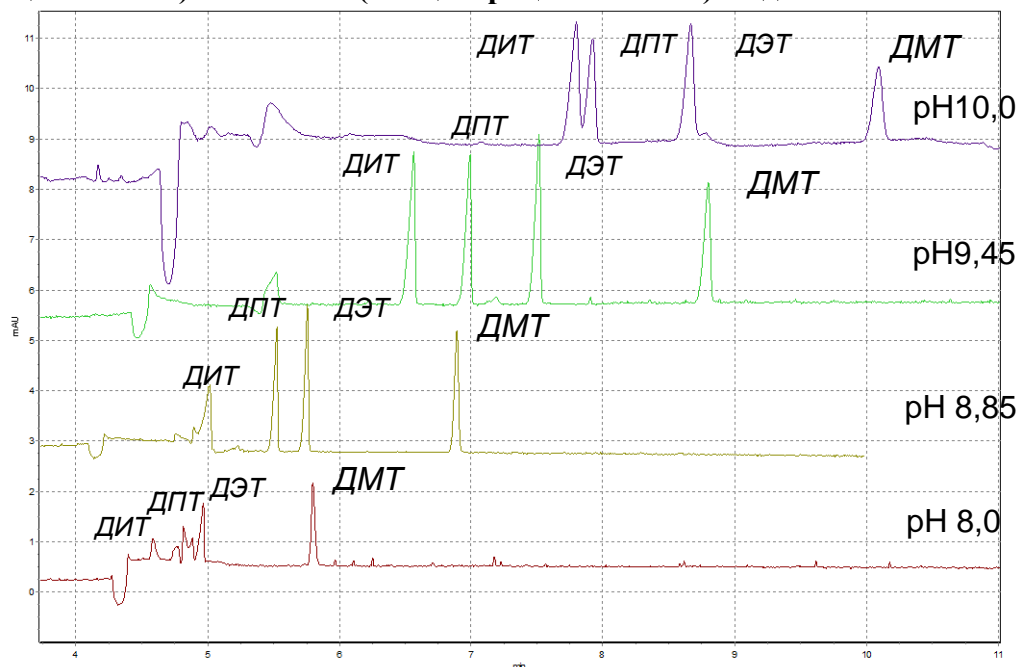
Показано, что уменьшение напряжения практически не влияет на селективность разделения, “растягивая” электрофореграмму по оси времени. Стоит отметить также возрастающее искажение пика ДИТ при уменьшении напряжения. Показано, что концентрация боратного буфера (рН 8,85) практически не влияет на разрешение пиков, однако с увеличением концентрации, по сравнению с исходной 20 мМ, происходит изменение порядка выхода мешающего системного пика и пика ДИТ, при концентрации 30 мМ они накладываются друг на друга, а при концентрации 40 мМ выходят в обратном порядке. Кроме того, при увеличении концентрации ведущего электролита сильно возрастает значение электрического тока, текущего через капилляр.

Таким образом, уменьшение напряжения (увеличение напряжения невозможно согласно рабочим характеристикам прибора) и увеличение концентрации ведущего электролита не оказывают желаемого влияния на картину разделения. Исследуемые вещества являются слабыми органическими кислотами, поэтому на электрофоретическую подвижность компонентов большое влияние должен оказывать рН раствора ведущего электролита, так как при его различных значениях может меняться доля эффективно ионизированной (депротонированной) формы

вещества. Для изучения зависимости исходный 20 мМ боратный буфер (рН 8,85) довели до рН 8 соляной кислотой и до рН 9,45 и 10,0 1 М раствором NaOH (рис. 3). Как видно из представленных электрофореграмм рН, ведущего электролита существенно влияет на разделение исследуемых алкилтауринов, изменяя время миграции и разрешение пиков, что согласуется с амфотерной природой исследуемых соединений.



**Рис. 2. Наложение электрофореграмм растворов индивидуальных диалкилтауринов (концентрация 50 мг/л) и их смеси (концентрация 100 мг/л) в одном масштабе.**



**Рис. 3. Наложение электрофореграмм, полученных при различных значениях рН 20 мМ боратного буфера, в одном масштабе.**

Увеличение рН ведущего электролита позволило удалить мешающее влияние пика системной природы перед пиком ДИТ, а характеристики пика ДИТ существенно улучшились, что можно объяснить более полной ионизацией в растворе. Наилучшая картина разделения получена при рН 9,45, такой рабочий буферный раствор использовали в дальнейшей работе.

Изучено разделение смеси диалкилтауринов на капилляре с внутренним диаметром 50 мкм. Показано, что диаметр капилляра в данном случае не влияет на картину разделения. Время уменьшается менее чем на минуту, а чувствительность детектирования падает почти в 2 раза. Капилляры диаметром более 75 мкм в работе не использовали в силу их малой распространённости в практике метода.

**Таблица 1. Метрологические характеристики разработанного подхода**

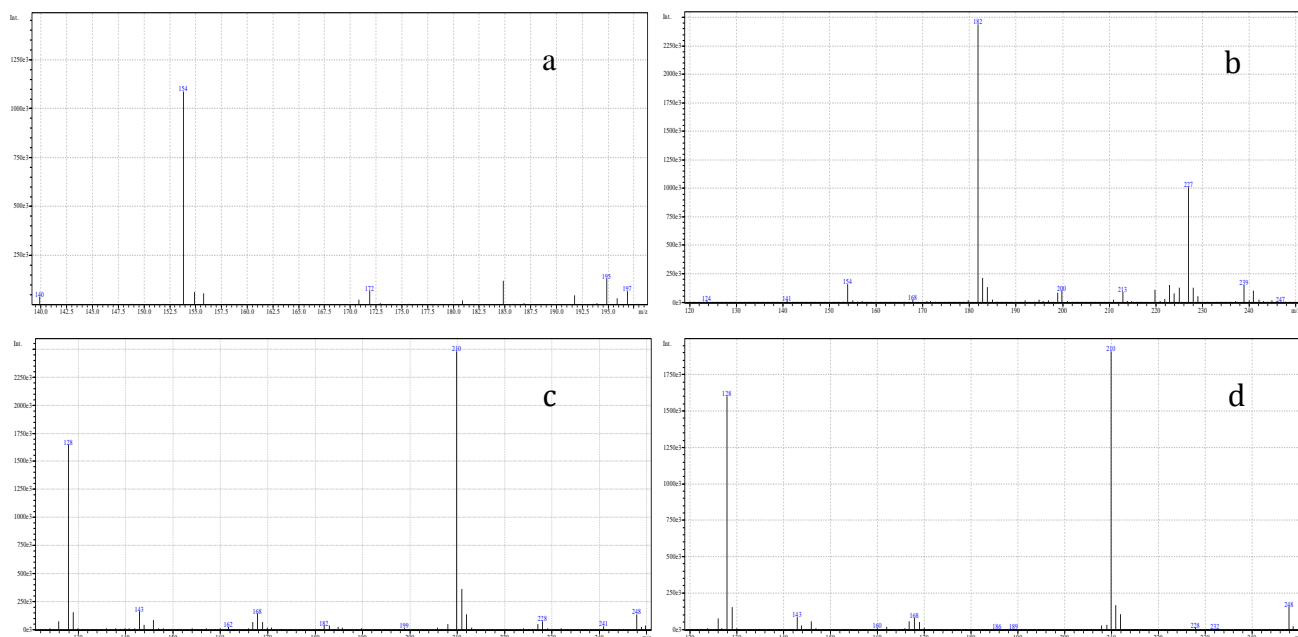
Вещество	Уравнение градуировочного графика	$r^2$	Предел обнаружения, мг/л	Диапазон определяемых концентраций, мкг/г	$S_r$ , %
ДМТ	$S_i = 0,281 \times C_i$	0,99	5	10-250	6
ДЭТ	$S_i = 0,346 \times C_i$	0,99	3	5-250	5
ДПТ	$S_i = 0,306 \times C_i$	0,99	3	5-250	4
ДИТ	$S_i = 0,324 \times C_i$	0,99	3	5-250	5

В выбранных условиях получены электрофореграммы и построены градуировочные зависимости для стандартных смесей, содержащих четыре исследуемых диалкилтаурина, в диапазоне концентраций 5–250 мкг/мл. Рассчитаны пределы обнаружения и метрологические характеристики разработанного подхода (табл. 1).

**Определение диалкилтауринов методом ВЭЖХ-МС.** Диметилтаурин (ДМТ), 2-(диэтиламино)-этансульфоновую кислоту (диэтилтаурин, ДЭТ), 2-(дипропиламино)-этансульфоновую кислоту (дипропилтаурин, ДПТ) и 2-(диизопропиламино)-этансульфоновую кислоту (диизопропилтаурин, ДИТ) это продукты окислительной трансформации ОВ класса V-газов, которые представляют собой нелетучие органические вещества проявляющие свойства слабых органических кислот (по сульфогруппе) и слабых оснований (за счет протонирования атома азота) в варианте ВЭЖХ-МС для создания арбитражного подхода к определению исследуемых соединений на низком уровне содержаний (нг/мл). Диалкилтаурины проявляют свойства органических оснований средней силы, легко протонируются в слабокислой среде, образуя положительно заряженные ионы, а также могут образовывать отрицательно заряженные ионы за счет депротонирования сульфогрупп.

Для выбора оптимальных условий детектирования масс-спектрометра сравнивали интенсивности откликов детектора при исследовании стандартных растворов диалкилтауринов (концентрация компонентов 1 мкг/мл). Для сравнения отношений сигнал/шум, достигаемых при использовании разных вариантов ионизации и полярности, использовали типичные параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем. Для выбора характеристичных ионов в режиме регистрации выделенных ионов для детектирования диалкилтауринов изучали масс-спектры, получаемые в условиях ХИАД (+) (рис. 4) и выбирали пики ионов, имеющие наибольшую интенсивность. В спектрах всех диалкилтауринов наиболее интенсивны сигналы протонированных молекул, для ДМТ и ДЭТ фрагментация незначительна (на спектре присутствуют молекулярные ионы с  $m/z$  154 и 182), а в случае ДПТ и ДИТ в масс-спектрах присутствуют ионы-продукты, образующиеся при отщеплении сульфогруппы ( $m/z$  128).

Масс-спектры ДПТ и ДИТ, являющихся изомерами, очень похожи. В таблице 2 представлены выбранные характеристичные ионы для каждого вещества.



**Рис. 4. Масс-спектры химической ионизации при атмосферном давлении (положительные ионы) ДМТ (а), ДЭТ (b), ДПТ (с), ДИТ (d).**

Для всех исследуемых соединений максимальное соотношение сигнал/шум достигается при использовании кислых подвижных фаз, а величина аналитического сигнала достигает наибольшего значения при рН 5,4 и мало меняется при дальнейшем снижении рН, что, по-видимому, связано с ростом и достижением постоянной величины мольной доли протонированных ионов в кислой среде. Проводили разработку условий хроматографического разделения диалкилтауринов. Благодаря наличию гидрофобных алкильных радикалов в структуре, диалкилтаурины удерживаются в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ, при этом достигается высокая селективность разделения. Для разделения полярных органических веществ с умеренной гидрофобностью используются колонки с технологией эндкепинга, например Zorbax Stable Bond C-18E, которую использовали в настоящей работе. Ранее показано, что для оптимального выхода по ионизации необходимо использование слабокислых подвижных фаз. Однако чтобы диалкилтаурины удерживались на обращенно-фазовых колонках, необходимо использовать такое значение рН подвижной фазы, при котором аналиты существуют преимущественно в незаряженной форме. Данное условие обеспечивается при рН 5,4, в этих условиях достигается приемлемая эффективность ионизации диалкилтауринов.

**Таблица 2. Характеристичные ионы для обнаружения диалкилтауринов в варианте ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием**

Соединение	Характеристичный ион, m/z
ДМТ	154
ДЭТ	182
ДПТ	210
ДИТ	210

При использовании подвижной фазы с рН 5,4 достигаются необходимые значения хроматографических параметров (коэффициенты емкости находятся в диапазоне 2-7), удерживание реализуется преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий, наблюдается

хорошая селективность разделения. Таким образом, использование аммонийно-ацетатного буферного раствора с рН 5,4, хорошо совместимого с масс-спектрометром, позволяет успешно реализовывать хроматографическое разделение диалкилтауринов.

В таблице 3 представлены хроматографические параметры разделения диалкилтауринов в выбранных условиях. Использование предложенной программы градиентного элюирования обеспечивает разделение смеси с необходимой эффективностью и разрешением за приемлемое время.

**Таблица 3. Параметры хроматографического разделения для обнаружения ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ**

Соединение	Время удерживания, мин	Разрешение, $R_{n, n+1}$	Эффективность, ТТ/м
ДМТ	1,5	1,4	35000
ДЭТ	1,8	2	40000
ДПТ	2,5	2,5	50000
ДИТ	3,6	-	50000

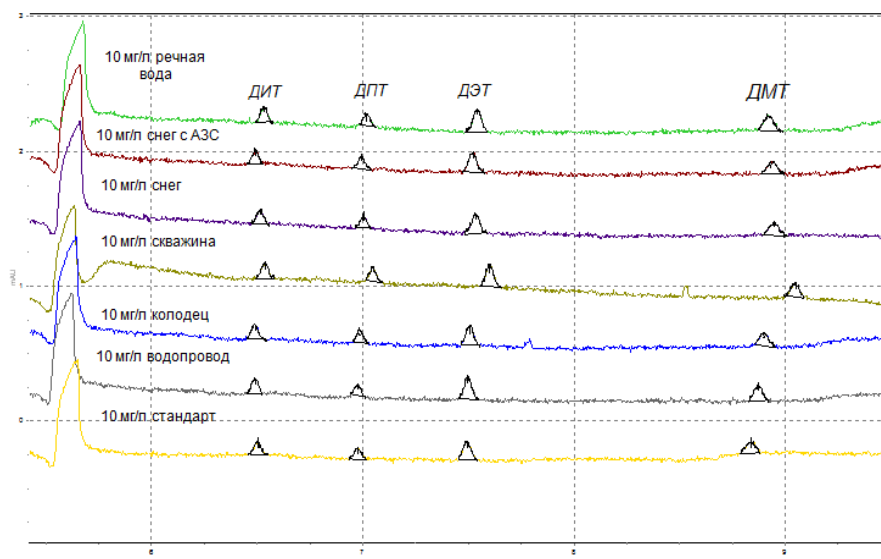
В выбранных условиях определения ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ получены градуировочные зависимости для изучаемых диалкилтауринов в диапазоне концентраций 0,05– 10 мкг/мл, оценены пределы обнаружения и метрологические характеристики предложенного подхода (табл. 4). Предложенный подход характеризуется приемлемой чувствительностью, высокими метрологическими характеристиками. Данный метод опробован при анализе реальных проб природных вод с добавками диалкилтауринов (проверка правильности методом введено – найдено). В качестве объектов для исследования использовали образцы воды, существенно отличающиеся по происхождению и химическому составу – концентрации металлов, анионов, органических веществ и другим показателям. Полученные хроматограммы свидетельствуют о незначительном мешающем влиянии матрицы.

**Таблица 4. Метрологические характеристики разработанного подхода для определения диалкилтауринов методом ВЭЖХ-МС**

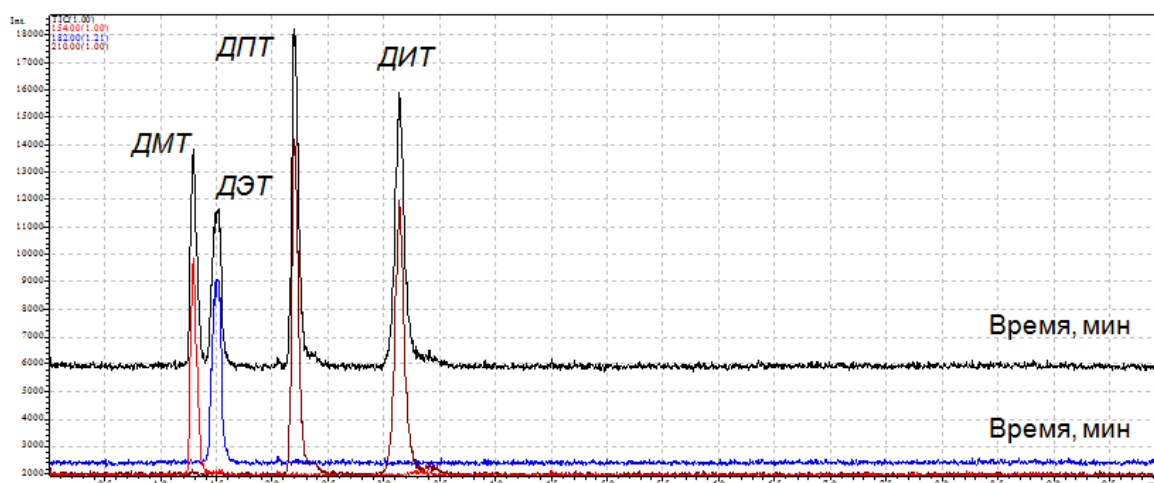
Соединение	Уравнение градуировочного графика	$R^2$	Предел обнаружения, мг/л	Диапазон определяемых содержаний, мкг/г	$S_r$ , %
ДМТ	$S = 4,1 \times 10^5 \times C$	0,99	0,015	0,05– 10	11
ДЭТ	$S = 5,1 \times 10^5 \times C$	0,99	0,015	0,05– 10	12
ДПТ	$S = 5,4 \times 10^5 \times C$	0,99	0,025	0,05– 10	14
ДИТ	$S = 3,9 \times 10^5 \times C$	0,99	0,025	0,05– 10	12

**Апробация способов определения диалкилтауринов.** Для апробации разработанного способа определения продуктов окисления V-газов методом ВЭЖХ-МС и КЗЭ–УФ были приготовлены модельные пробы с различным содержанием целевых веществ в природных водах разного химического состава. Обнаружение считалось достоверным при условии превышения отношения сигнал-шум значения 3:1 для характеристичных пиков соединений, отклонении времени удерживания от стандартного не более 10% при использования режима детектирования по выделенным характеристичным ионам. Результаты апробации в полной мере подтверждают

возможность применения разработанного хромато-масс-спектрометрического способа определения продуктов окисления V-газов диалкилтауринов и позволяют проводить надежное обнаружение данных веществ в сточных водах (рис. 5 и 6).



**Рис. 5.** Наложение электрофореграмм, полученных при использовании различных реальных образцов вод в качестве матрицы, в одном масштабе. Ввод пробы 125 мбар×с, буфер боратный 20 мМ (рН 9,45), капилляр ID = 75 мкм,  $L_{эфф}/L_{общ} = 50,5/60$  см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 200 нм, температура 20°C.



**Рис. 6.** Хроматограмма образца речной воды с добавкой смеси 0.1 мкг/мл диалкилтауринов, в условиях хромато-масс-спектрометрического определения. Колонка Zorbax Stable Bond C-18 E.

**Определение алкилметилдфосфоновых кислот.** Чтобы исключить ошибки при проведении анализов, ОЗХО регулярно ужесточает требования, предъявляемые к способам обнаружения маркеров ФОВ, в связи с чем в данной работе проведена разработка высокочувствительного селективного способа определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК с использованием метода ультра-ВЭЖХ-МС-МС (использование сорбентов с диаметром зерна 2-3 мкм и повышенного давления в системе), что позволяет повысить экспрессность анализа и добиться высоких значений эффективности разделения, а с использованием варианта тандемного масс-

спектрометрического детектирования появляется возможность определения следовых количеств веществ на низких уровнях. Известно, что наиболее высокая чувствительность масс-спектрометрического детектирования органических кислот достигается при работе в режиме регистрации отрицательных ионов. О-алкилметилфосфонаты - маркеры фосфорсодержащих ОБ (зарина, зомана и RVX) относятся к группе органических кислот средней силы, поэтому условия детектирования изучали в этой полярности ионов. Оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования проводили в режиме прямого ввода, непосредственно вводя растворы содержащие О-алкилметилфосфонаты (в подвижной фазе) в источник ионизации прибора.

Для масс-спектров исследуемых соединений характерны интенсивные пики депротонированных молекул, соответствующие потере подвижного протона фосфоновой группы. Кроме того, в масс-спектре полученных соединений присутствуют малоинтенсивные пики, соответствующие фрагментному иону, возникающему при разрыве связи Alk-O представляющего собой анион метилфосфоновой кислоты. Таким образом, для достижения максимального соотношения сигнал-шум при определении иБутМФК, иПрМФк и ПинМФК в качестве характеристичных ионов для селективного масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации выделенных ионов выбраны:

для иПрМФК - 95, 137;

для иБутМФК - 95, 151;

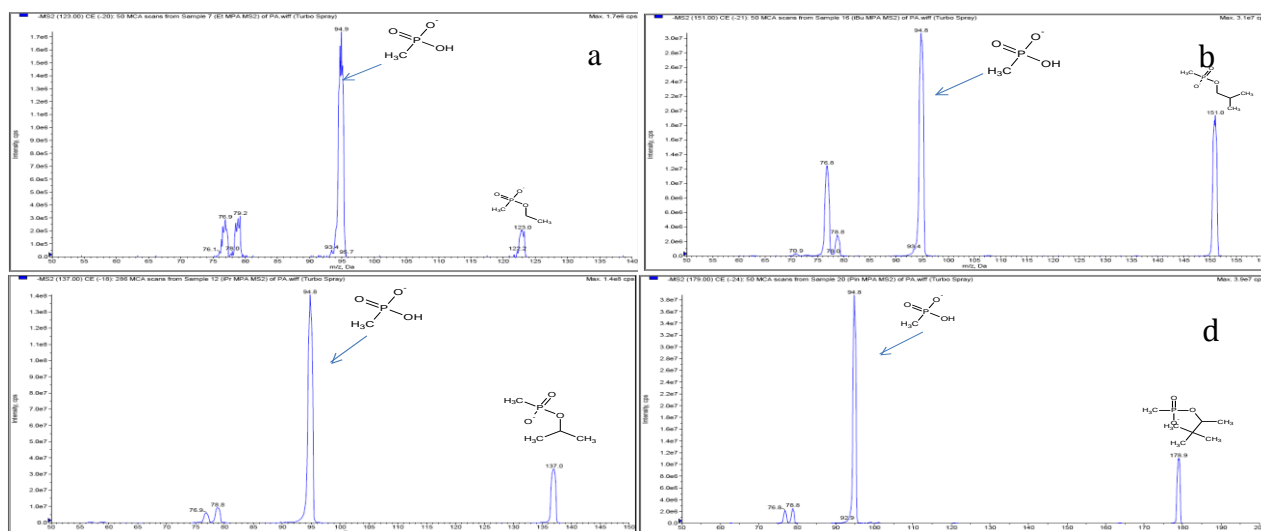
для ПинМФК - 95, 179;

На стадии проведения оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования проводили изучение влияния параметров, отвечающих за настройки масс-спектрометра, а именно: потенциал декластеризации, входной потенциал на нулевом квадруполье масс-анализатора, энергия фрагментация и др.) и выбор оптимальных пар ионных переходов для масс-спектрометрического детектирования иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.

Работу проводили в режиме прямого ввода с использованием шприцевого насоса (вводили ацетонитрил-водные растворы иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК с содержанием 1 мкг/мл). В масс-спектрах иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК присутствуют депротонированные молекулы иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК с характеристичными  $m/z$  137, 179, 123 и 151, соответственно (режим регистрации отрицательных ионов). После выбора оптимальных настроек первого квадруполья, позволяющего получать максимальную интенсивность сигнала депротонированных молекул исследуемых соединений, проводили изучение влияния энергии фрагментации в ячейке соударения масс-спектрометра на формирование спектра ионов-продуктов, образующихся в результате диссоциации вызванной соударением из депротонированных молекул иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК и интенсивность пиков образующихся ионов-продуктов. На рисунке 6 представлены МС/МС спектры иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, полученные в режиме регистрации отрицательных ионов в варианте электрораспылительной ионизации, при этом использовали оптимальные параметры работы масс-анализатора. Наиболее интенсивными ионными переходами оказались  $m/z$  137  $\rightarrow$  95,  $m/z$  137  $\rightarrow$  79, для определения иПрМФК,  $m/z$  179  $\rightarrow$  95,  $m/z$  179  $\rightarrow$  79, для определения ПинМФК,  $m/z$  123  $\rightarrow$  95,  $m/z$  123  $\rightarrow$  79, для определения ЭМФК и

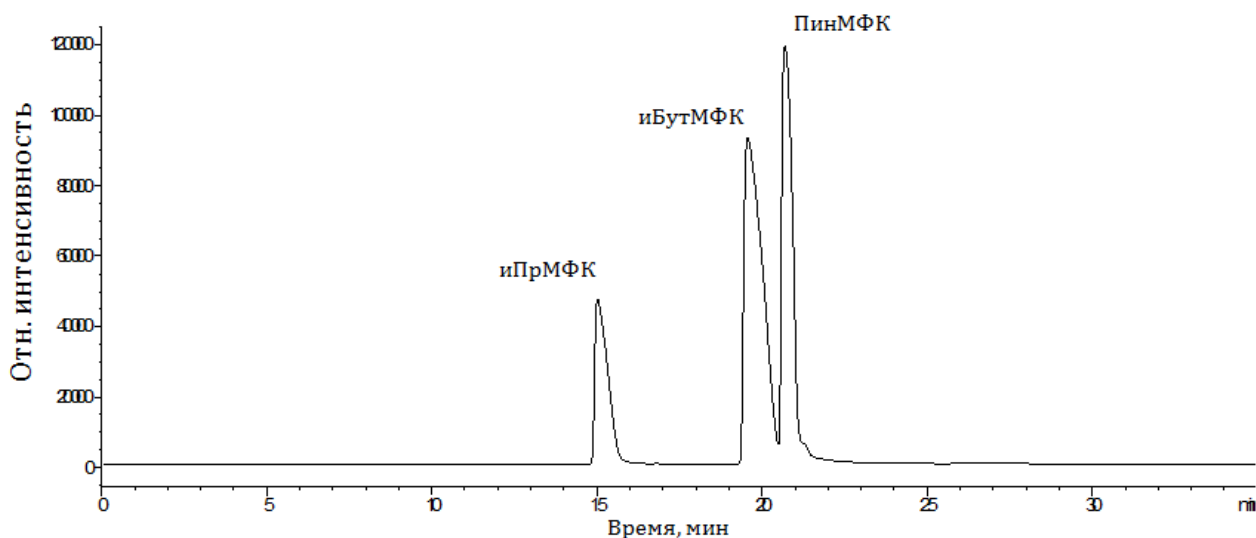


$m/z$  151  $\rightarrow$  95,  $m/z$  151  $\rightarrow$  79, для определения иБутМФК. Таким образом фрагментация депротонированных молекул иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК идет с образование иона метилфосфоновой кислоты с  $m/z$  95 и иона-продукта с  $m/z$  79 (рис. 7).



**Рис. 7.** Спектры МС/МС электрораспылительной ионизации (отрицательные ионы) депротонированных молекул ЭМФК (а), иБутМФК (б), иПрМФК (с) и ПинМФК (д).

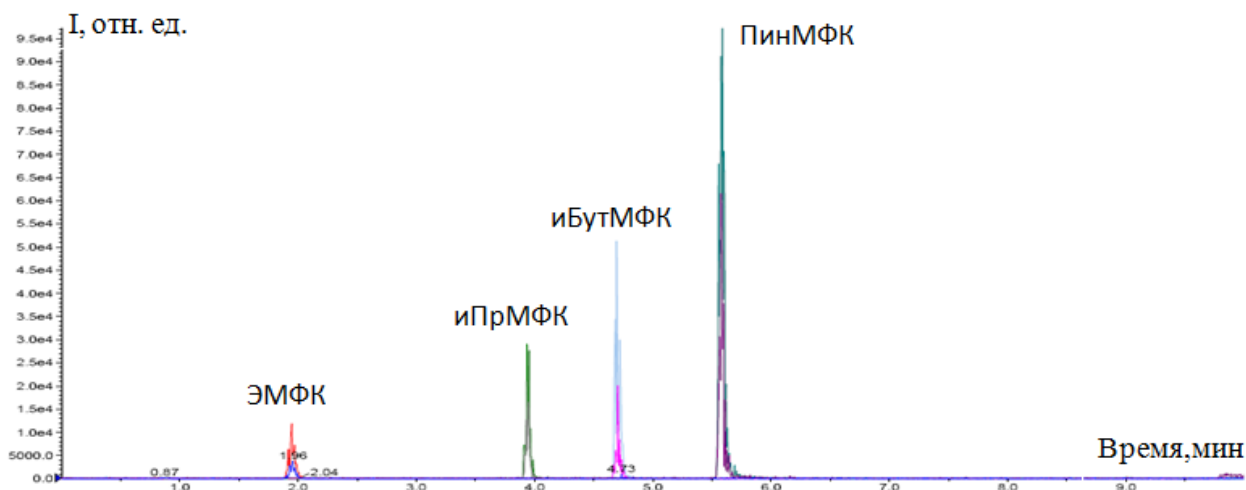
Разработка условий хроматографического разделения О-алкилметилфосфонатов в варианте ВЭЖХ-МС. Для достижения оптимальных условий хроматографического разделения сравнивали эффективность хроматографического разделения (число теоретических тарелок на колонку для каждого О-алкилметилфосфонатов) на сорбенте для разделения полярных органических веществ Synergi Hydro-RP (содержит полярные остатки на матрице сорбента) при использовании различных программ градиентного элюирования, разных температур термостатирования колонки и при использовании в качестве компонентов подвижной фазы растворов с варьируемыми значениями рН. Критерием выбора оптимальной хроматографической программы являлось достижение максимальной эффективности разделения. На рисунке 8 представлена хроматограмма водного раствора смеси иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК, полученная в выбранных условиях разделения в варианте ВЭЖХ-МС.



**Рис. 8.** Хроматограмма водного раствора смеси иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК (200 нг/мл). Колонка: Synergi Hydro-RP 150 × 2.1 мм, 5 мкм.

**Разработка условий хроматографического разделения О-алкилметилфосфонатов в варианте ультра-ВЭЖХ-МС-МС.** В качестве неподвижной фазы при одновременном разделении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК использовали колонку с обращенно-фазовым сорбентом Acclaim RSLC. иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК являются органическими кислотами средней силы, поэтому для снижения размывания хроматографических пиков и подавления диссоциации в качестве подвижных фаз использовали 0.5 % водный раствор муравьиной кислоты и 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (каналы А и В в хроматографе). Для определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК использовали программу градиентного элюирования, в условиях которой коэффициенты емкости иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК составили 3.9, 5.6, 2.0 и 4.7, соответственно, что приемлемо для способа хроматографического анализа. В таблице 5 представлены хроматографические параметры при разделении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.

На рисунке 9 представлена хроматограмма водного раствора смеси иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, полученная в выбранных условиях хромато-масс-спектрометрического определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.



**Рис. 9. Хроматограмма водного раствора иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК (20 нг/мл). Колонка: Acclaim RP 150 × 2.1 мм, 2 мкм.**

**Таблица 5. Хроматографические параметры при определении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК**

Параметр	ЭМФК	иПрМФК	ПинМФК	иБутМФК
Время удерживания, мин	2.0	3.9	5.6	4.7
Разрешение пиков, $R_{n,n+1}$	11.8	5.3	-	5.1

**Разработка схем пробоподготовки.** Разрабатывали способ пробоподготовки для образцов крови для определения О-алкилметилфосфонатов в варианте ВЭЖХ-МС. В настоящее время наиболее эффективной техникой проведения пробоподготовки при анализе сложных объектов биологического происхождения считается твердофазная экстракция (ТФЭ). Данный метод характеризуется высокой селективностью и высокими степенями извлечения. Для достижения

необходимой чувствительности определения необходимо разработать процедуру ТФЭ, которая характеризуется эффективным удалением мешающих компонентов пробы и высокими степенями извлечения определяемых соединений.

Для разработки процедуры ТФЭ использовали плазму крови человека, полученную от добровольцев разного пола и возраста. В каждый образец плазмы вносили добавку смеси иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК в количествах, необходимых для создания концентраций изучаемых веществ на уровне 200 нг/мл плазмы. В таблице 6 представлены сравнительные результаты по значениям степеней извлечения определяемых соединений, достигаемые при использовании различных схем пробоподготовки. Использование картриджа Strata SDB-L позволяет достигать наиболее приемлемых значений степеней извлечения (выше 50 %), что подтверждает выбор схемы пробоподготовки с использованием данного типа картриджей как оптимального для проведения ТФЭ на стадии пробоподготовки плазмы к хромато-масс-спектрометрическому анализу.

С использованием предложенных схем масс-спектрометрического детектирования, хроматографического разделения и пробоподготовки определены значения пределов обнаружения иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК в плазме человека, которые составили 4 нг, 1 нг и 0.6 нг в 1 мл, соответственно. В ходе исследования иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК методом ультраВЭЖХ-МС-МС проводили оптимизацию процедуры пробоподготовки образцов мочи. Для этого образец мочи подщелачивали раствором аммиака до pH 8-9, чтобы перевести иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в анионы, которые плохо удерживаются на выбранных сорбентах картриджей, далее пробу пропускали через картридж.

На этапе изучения процедуры пробоподготовки исследовали влияние типа сорбента картриджа на пропускание иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. Для этого в работе проводили очистку образцов мочи на двух типах картриджей: Strata Screen C (смешанный сорбент с лигандами C8 и катионно-обменными группами) и Strata SDB-L (сорбент сополимера стирола и дивинилбензола). Критерием выбора оптимального картриджа является минимальное удерживание иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК на сорбенте картриджа, при максимальном удерживании компонентов матрицы пробы.

**Таблица 6. Извлечение О-алкилметилфосфонатов из плазмы крови человека с использованием картриджей для ТФЭ различного типа. Схема пробоподготовки представлена в тексте (n=3, P=0.95)**

Соединение	Степень извлечения, %			
	Strata C 18E	Strata SDB-L	Strata SAX	Strata Screen A
<b>иПрМФК</b>	<5	59±7	27±5	15±4
<b>иБутМФК</b>	32±7	120±20	32±5	30±5
<b>ПинМФК</b>	140±30	91±9	43±6	52±7

Расчет величины пропускания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК проводили относительно содержания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в водном растворе до пропускания его через картриджи. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании картриджа Strata SDB-L, для которого величина пропускания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК составила более 85%. Для картриджа Strata Screen C пропускание иПрМФК,

ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК не превышает 80 % и характеризуются худшими величинами воспроизводимости.

В таблице 7 представлены метрологические характеристики разработанного подхода для определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в образцах человеческой мочи, искусственно загрязненных иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.

**Апробация.** Для апробации разработанного способа определения О-алкилметилфосфонатов кислоты методом ВЭЖХ-МС изучали образцы плазмы крови крыс, получавших внутривенно различные ФОВ в количестве соответствующем половине смертельной дозы, вызывающей гибель половины лабораторных животных ( $LD_{50}$ ) для крысы, которые отбирали у выживших крыс через различные промежутки времени после интоксикации. Апробация разработанного подхода проводилась на пробах *in vivo*, проанализированных методом ВЭЖХ-МС, результаты анализа по каждой из проб приведены в таблице 8.

Показано, что присутствие соответствующего маркера ФОВ может быть достоверно обнаружено в реальных пробах биоматериалов. Определение маркеров ФОВ удалось провести во всех пробах, кроме пробы 48 часовой плазмы крысы получавшей RVX. По полученным экспериментальным данным построены кривые выведения продуктов трансформации ФОВ для крыс (рис. 10). Аппроксимация полученных данных степенной функцией характеризуется высокими значениями коэффициентов корреляции. Таким образом, предложенный подход характеризуется высокой чувствительностью и позволяет проводить определение О-алкилметилфосфонатов как маркеров ФОВ в плазме вплоть до двух суток после отравления несмертельными ( $1/2 LD_{50}$ ) дозами нервно-паралитических отравляющих веществ, заринном зоманом и российским VX (RVX). Данный способ может быть успешно использован для установления, типа ОВ воздействию которого подвергся, пострадавший.

**Таблица 7. Метрологические характеристики разработанного подхода для определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в модельных образцах человеческой мочи**

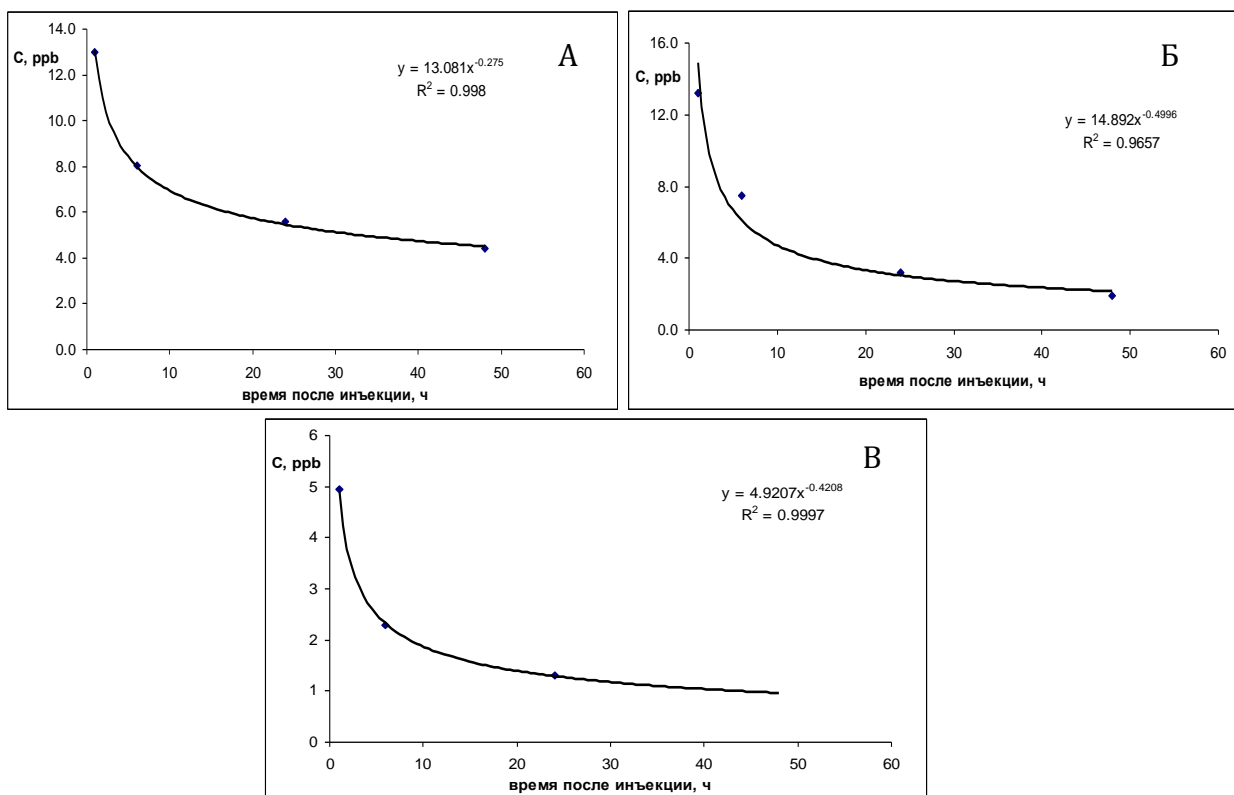
Параметр	ЭМФК	иПрМФК	ПинМФК	иБутМФК
$R^2$ , коэффициент корреляции	0.999	0.999	0.999	0.999
Предел обнаружения $C_{min}$ , нг/мл	0.8	0.5	0.1	0.4
Диапазон линейности градуировочного графика, нг/мл	2-2000	1-1000	1-1000	1-1000

**Таблица 8. Результаты ВЭЖХ-МС анализа для определения продуктов трансформации зарина, зомана и RVX (n=3, p=0.95)**

Номер пробы	Тип ФОВ	Время, прошедшее между инъекцией ОВ и отбором пробы	Маркер ФОВ	Концентрация маркера в пробе, нг/мл
А-1	Зарин	1 час	иПрМФК	13±2
А-2	Зоман	1 час	ПинМФК	13±4
А-3	RVX	1 час	иБутМФК	5±1
А-4	Зарин	6 часов	иПрМФК	8±1

А-5	Зоман	6 часов	ПинМФК	7.5±0.8
А-6	RVX	6 часов	иБутМФК	2.3±0.5
А-7	Зарин	24 часа	иПрМФК	5.6±0.5
А-8	Зоман	24 часа	ПинМФК	3.2±0.3
А-9	RVX	24 часа	иБутМФК	1.3±0.1
А-10	Зарин	48 часов	иПрМФК	4.4±0.7
А-11	Зоман	48 часов	ПинМФК	1.9±0.2
А-12	RVX	48 часов	иБутМФК	~ 1.0*

\*Примечание: содержание маркера находится на уровне предела обнаружения, поэтому вычисление площади пика затруднительно

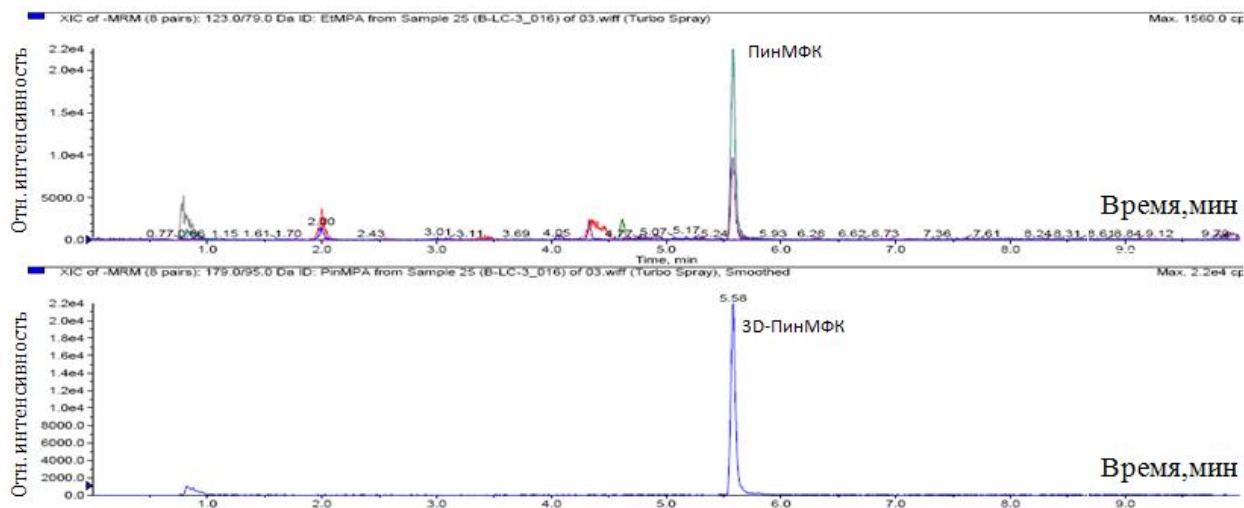


**Рис. 10.** Токсикокинетические кривые продуктов трансформации ФОВ для крыс (А – иПрМФК, Б – иБутМФК, В – ПинМФК). Вертикальная ось содержания маркеров имеет размерность нг/мл.

Для проведения экспериментальной оценки применимости разработанного хромато-масс-спектрометрического подхода определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК и двух метаболитов иприта МСМТЭСЭ и СБМСЭ методом ультра-ВЭЖХ-МС-МС в образцах биоматериалов анализировали модельные образцы человеческой мочи, полученной от добровольцев, куда вносили в разных содержаниях иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК, иБутМФК, МСМТЭСЭ и СБМСЭ. Апробация разработанного подхода проходила в рамках неофициального межлабораторного испытания ОЗХО и заключалась в обнаружении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК, иБутМФК, МСМТЭСЭ и СБМСЭ в зашифрованных пробах человеческой мочи.

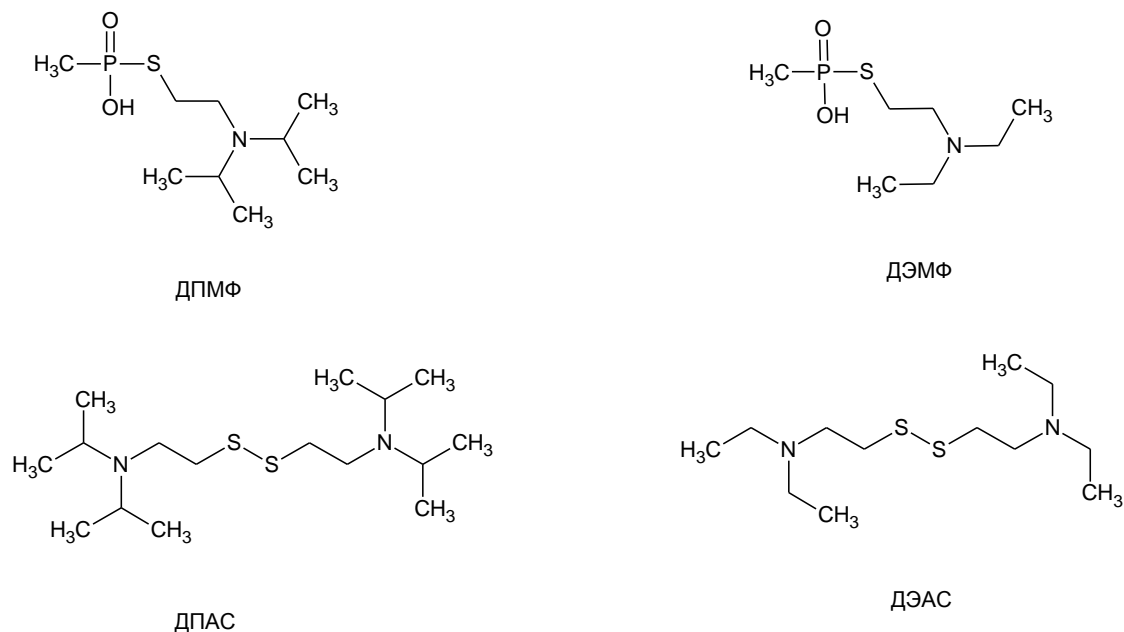
Образцы готовили к анализу и исследовали согласно разработанной процедуре пробоподготовки. Для повышения достоверности проводимых исследований также анализировали холостые (бланковые) образцы – пробы человеческой мочи, не содержащие

иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК, иБутМФК, МСМТЭСЭ и СБМСЭ. На рисунке 11 представлена хроматограмма человеческой мочи, в которой удалось обнаружить ПинМФК. В ходе испытаний удалось обнаружить в четырех зашифрованных пробах иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и СБМСЭ. Полученные данные полностью подтверждены независимым ГХ-МС-МС анализом с применением реакции дериватизации с гептафторбутирилимидазолом, который проводился в сторонней аккредитованной лаборатории.



**Рис. 11. Хроматограмма образца человеческой мочи, с добавкой ПинМФК. Колонка: Acclaim C18 250 × 2 мм, 2.2 мкм; Режим мониторинга выбранных реакций.**

**Определение продуктов трансформации V-газов.** С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием разработан подход к определению четырех маркеров применения нервно-паралитических отравляющих веществ S-(2-диэтиламиноэтил)-метилфосфонотиоата (ДЭМФ), S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфонотиоата (ДПМФ), бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида (ДЭАС) и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида (ДПАС) (Рис. 12) в водных объектах окружающей среды. Эти вещества образуются в водных средах при трансформации нервно-паралитических боевых отравляющих веществ класса V-газов (в частности – производные с изопропильными и этильными заместителями при атоме азота являются продуктами разложения отравляющих веществ VX и VR, соответственно).



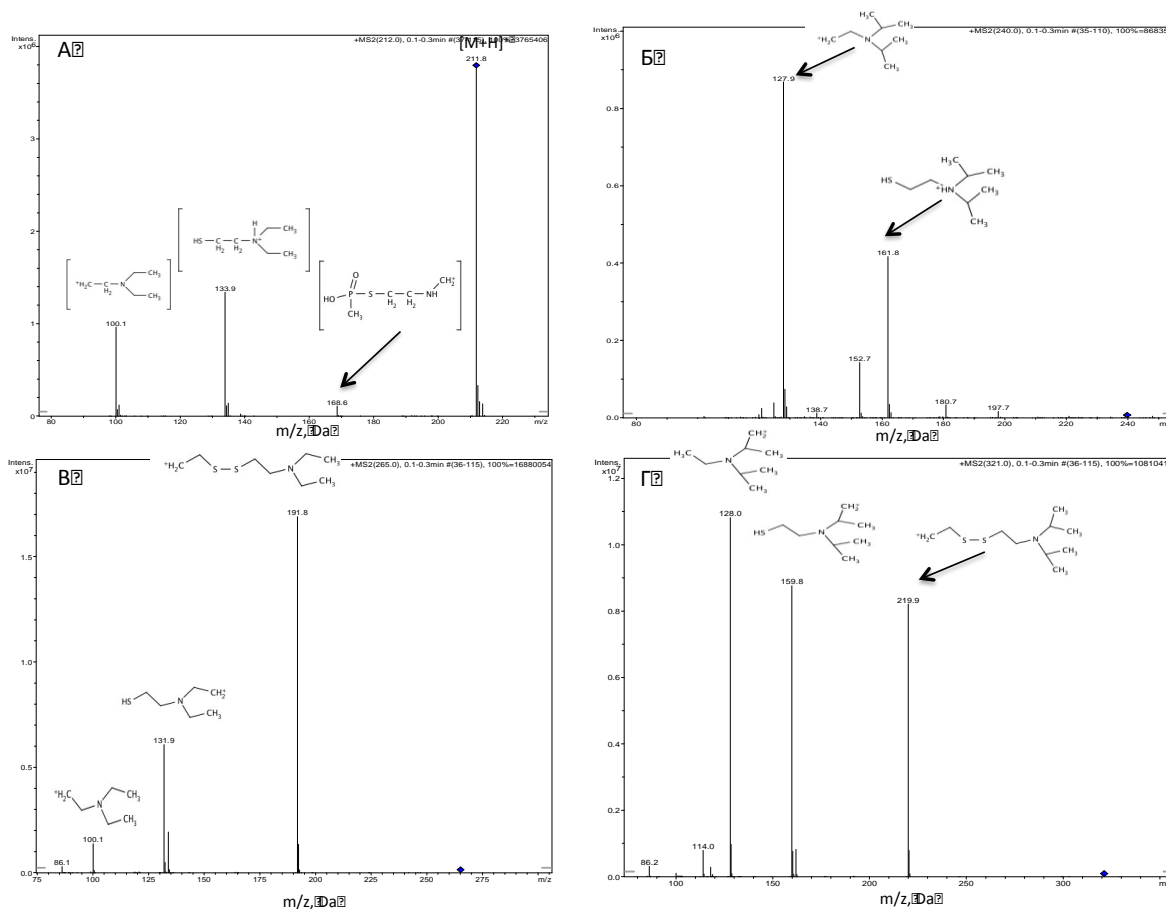
**Рис. 12. Структурная формула четырех маркеров применения нервно-паралитических отравляющих веществ.**

В ходе исследования использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительных ионов, поскольку ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в своем составе имеют амино- группы, которые отвечают за образование протонированных молекул в ходе ионизации, и поэтому нет необходимости использовать химическую ионизацию при атмосферном давлении, которая, как правило, используется для трудноионизируемых, слабополярных соединений. На первом этапе работы исследовали влияние напряжения источника ионизации на величины сигналов протонированных молекул ДЭМФ ( $m/z$  212), ДПМФ ( $m/z$  240), ДЭАС ( $m/z$  265) и ДПАС ( $m/z$  321). Для этого использовали типичные параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем и прописанные в файле автоматической настройки системы - автотюнинга. Напряжение источника ионизации варьировали в диапазоне 2500 В – 5500 В. В случае ДЭМФ и ДПМФ при увеличении напряжения источника ионизации с 4500 В до 5500 В происходит увеличение интенсивности сигнала на 40-50 %, при этом величина шума увеличивается не более чем на 10 %, поэтому в дальнейшем использовали напряжение источника ионизации 5500 В при определении ДЭМФ и ДПМФ, однако для ДЭАС и ДПАС величина шума увеличивается на 50 %, поэтому использовали напряжение источника ионизации 4500 В при детектировании ДЭАС и ДПАС.

Проводили выбор оптимальных пар ионных переходов при определении исследуемых соединений. Поскольку в масс-спектрах ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС присутствуют интенсивные сигналы протонированных молекул, исследовали их фрагментацию. На рис. 13 представлены масс-спектры диссоциации активированной соударением протонированных молекул ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС, а также приведены возможные структурные формулы образующихся фрагментов. После выбора характерных пар фрагментных ионов для каждого из исследуемых продуктов трансформации ФОВ исследовали влияние энергии и амплитуды фрагментаций на величину аналитического сигнала этих ионов. В таблице 9 приведены условия

масс-спектрометрического детектирования ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС, при которых удается достичь максимальной интенсивности сигналов выбранных ионных реакций.

**Выбор условий хроматографического разделения.** При работе в режиме выбранных ионных реакций, для большинства соединений, не возникает необходимости полного хроматографического разделения компонентов смеси, поскольку набор выбранных ионных реакций для каждого соединения специфичен и влияние сигнала от посторонних компонентов на аналитический сигнал аналита в этом случае ничтожно мала. При подборе подвижной фазы для ВЭЖХ-МС необходимо учитывать, что для подвижной фазы можно применять только летучие компоненты. В качестве неподвижной фазы при определении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в пробах использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом Zorbax SB-C18, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4.6 мм, размером зерна сорбента 1.8 мкм, фирмы «Agilent».



**Рис. 13. Масс-спектры диссоциации активированной соударением протонированных молекул ДЭМФ, ДПМФ, ДЭАС и ДПАС с  $m/z=212$  (А),  $m/z=240$  (Б),  $m/z=265$  (В) и  $m/z=321$  (Г), соответственно. Режим регистрации положительно заряженных ионов.**

ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС обладают кислотными свойствами, поэтому в ходе их хроматографического разделения использовали подвижную фазу, состоящую из ацетонитрила и раствора 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде, для увеличения доли незаряженных частиц ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС и, как следствие, к уменьшению размывания пиков определяемых соединений при прохождении через колонку. Поскольку в данном случае нами использован режим регистрации положительно заряженных ионов, присутствие муравьиной кислоты в подвижной фазе способствует увеличению доли положительно заряженных ионов в камере ионизации за счет протонирования амино- групп ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС. В



выбранных условиях градиентного элюирования коэффициенты емкости (k) ДЭМФ, ДПМФ, ДЭАС и ДПАС составили 3.9, 6.6, 3.6 и 6.6, соответственно, и являются приемлемыми для метода хроматографического анализа. В таблице 10 представлены хроматографические параметры при разделении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС.

Метрологические характеристики разработанного способа ВЭЖХ-МС/МС детектирования ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в выбранных оптимальных условиях разделения представлены в таблице 11. На рисунке 14 представлены типичные хроматограммы, полученные в выбранных условиях разделения ДПМФ и ДПАС. На хроматограммах представлены величины аналитического сигнала, по каждому из соответствующих выбранных ионных переходов (верхняя хроматограмма – для выбранного ионного перехода для количественного анализа, нижняя хроматограмма - для подтверждения). В качестве критерия установления присутствия ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в пробах использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных переходов, соответствующих определяемому компоненту.

**Таблица 9. Оптимальные параметры детектирования ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в выбранных условиях масс-спектрометрического детектирования**

Соединение	Напряжение источника ионизации, В	Выбранная для обнаружения ионная реакция	Выбранная для определения ионная реакция	Энергия фрагментации (при обнаружении), В	Энергия фрагментации (при определении), В
ДЭМФ	5500	$m/z$ 212 $\rightarrow$ $m/z$ 134	$m/z$ 212 $\rightarrow$ $m/z$ 100	90	75
ДПМФ	5500	$m/z$ 240 $\rightarrow$ $m/z$ 128	$m/z$ 240 $\rightarrow$ $m/z$ 162	85	85
ДЭАС	4500	$m/z$ 265 $\rightarrow$ $m/z$ 192	$m/z$ 265 $\rightarrow$ $m/z$ 132	85	100
ДПАС	4500	$m/z$ 321 $\rightarrow$ $m/z$ 128	$m/z$ 265 $\rightarrow$ $m/z$ 160	85	80

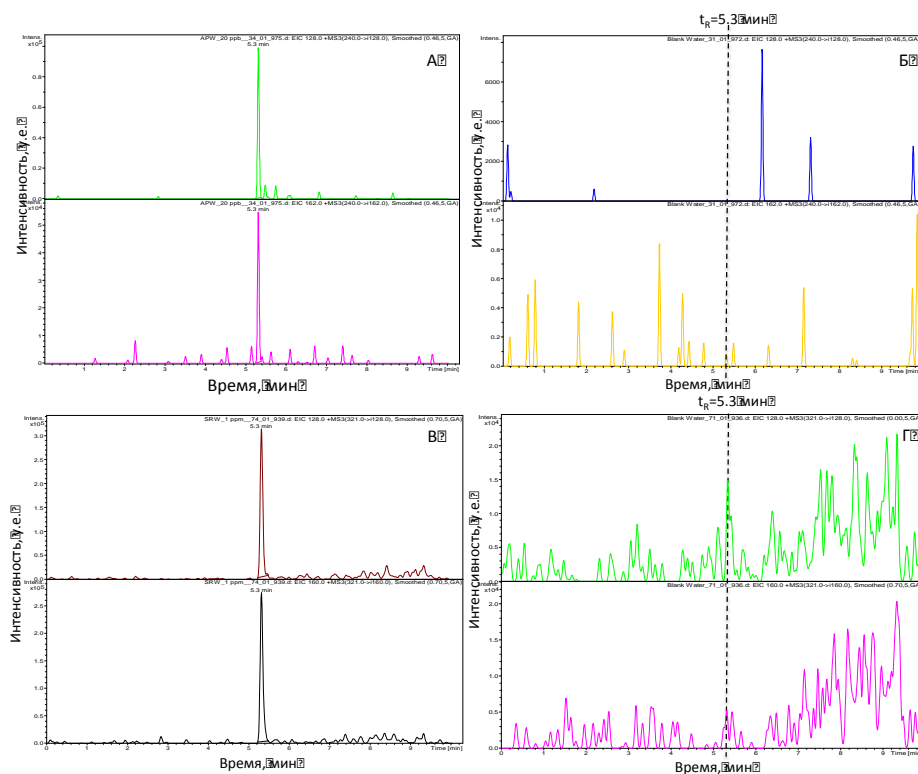
**Таблица 10. Хроматографические параметры при разделении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС. При расчетах использовали величину мертвого времени равную 0.7 мин.**

Параметры Соединение	Время удерживания, мин	Коэффициент емкости	Эффективность, ТТ/м
ДЭМФ	3.4	3.9	5000
ДПМФ	5.3	6.6	40000
ДЭАС	3.2	3.6	2000
ДПАС	5.3	6.6	45000

**Таблица 11. Метрологические характеристики разработанного подхода определения ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС**

Вещество	Уравнение градуировочного графика	$r^2$	Предел обнаружения, мкг/мл	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	$S_r$ , %
ДЭМФ	$S_i = 2.8 \times 10^7 \times C_i$	0,99	0.0003	0.02-5	6
ДПМФ	$S_i = 3.7 \times 10^6 \times C_i$	0,99	0.003	0.02-5	5
ДЭАС	$S_i = 3.2 \times 10^7 \times C_i$	0,99	0.3	0.5-10	10
ДПАС	$S_i = 1.3 \times 10^6 \times C_i$	0,99	0.05	0.1-2	7

Разработанный способ определения исследуемых продуктов деструкции V-газов ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС методом ВЭЖХ-МС/МС опробован при анализе растворов смесей этих соединений в реальных пробах воды. Проверку правильности подхода проводили методом «введено-найдено» (табл. 12). В качестве объектов для исследования использовали образцы воды различного состава: водопроводную воду, колодезную воду, воду из скважины и речную воду. Определению ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС во всех исследуемых типах водных проб не мешало присутствие неорганических анионов, металлов, повышенные значения жесткости, мутности и цветности, а также значительное валовое содержание органических веществ.

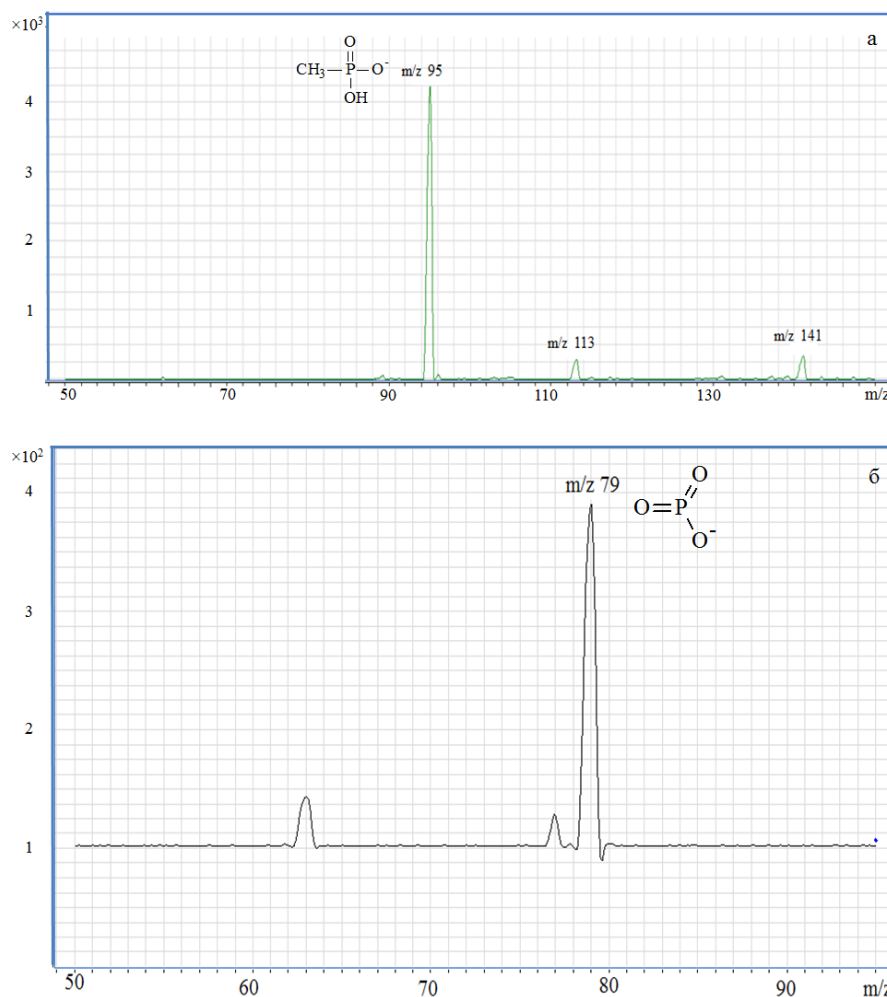


**Рис. 14. Хроматограммы стандартных водных растворов не содержащих ДПМФ и ДЭАС (Б и Г, соответственно), содержащих 20 нг/мл и 1000 нг/мл ДПМФ (А) и ДЭАС (В), соответственно. Режим мониторинга выбранных реакций.**

**Таблица 12. Проверка правильности разработанного подхода определения ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС методом «введено-найдено»**

Проба воды	Введено в смеси, мкг/мл	Найдено, мг/л			
		ДЭМФ	ДПМФ	ДЭАС	ДПАС
Водопровод	1	1,01±0,04	0,99±0,07	1,03±0,08	1,01±0,09
Колодец	1	1,04±0,06	0,98±0,04	0,96±0,07	0,96±0,07
Скважина	1	0,99±0,06	1,02±0,06	1,0±0,1	0,95±0,09
Речная вода	1	1,03±0,05	1,04±0,07	0,95±0,09	1,01±0,09

**Определение МФК.** Был разработан способ определения метилфосфоновой кислоты (МФК) в водных объектах, позволяющего быстро контролировать наличие МФК на уровне десятков нг/мл. Получены спектры электрораспылительной ионизации ионов-предшественников и фрагментных ионов МФК. После обработки этих спектров выбирали характеристические ионы, по которым проводили масс-спектрометрическое детектирование. На Рис. 15 представлен масс-спектр, полученный в режиме сканирования, и спектр фрагментных ионов, полученных из депротонированной молекулы МФК.



**Рис. 15. а) Масс-спектр (ионизация электрораспылением) стандартного образца МФК б) ионов-продуктов депротонированной молекулы МФК [М-Н]<sup>-</sup> с m/z 95.**

В масс-спектре МФК присутствует интенсивный сигнал с m/z 95, соответствующий депротонированной молекуле МФК, а также два сигнала с m/z 113 и 141, соответствующих

аддуктам депротонированной молекулы МФК с молекулой воды и муравьиной кислоты. В спектре ионов-продуктов преобладает сигнал с  $m/z$  79, которому соответствует молекула, образующаяся в ячейке соударений при потере метильной группы. Исходя из информации, полученной из масс-спектров, для определения был выбран ионный переход с  $m/z$  95→79, а для качественного подтверждения переход  $m/z$  95→63.

Для выбора подходящего состава подвижной фазы в качестве первого компонента использовали водные растворы 0.5% муравьиной кислоты, 5 мМ ацетата аммония и их смеси с уксусной кислотой и гидроксидом аммония. В качестве второго компонента подвижной фазы использовали ацетонитрил. Получали зависимость интенсивности сигнала депротонированной молекулы от pH подвижной фазы. Наибольшая интенсивность сигнала иона депротонированной молекулы МФК достигается при значении pH 2,4. Данному значению pH соответствует pH 0,5% раствора муравьиной кислоты в воде. Таким образом, наиболее подходящей подвижной фазой являлся раствор, состоящий из 0,5% муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила в соотношении 95:5 по объему.

На следующей стадии работы проводили оптимизацию масс-спектрометрических параметров, таких как потенциал на входе в масс-анализатор и энергия соударений. Из полученных зависимостей было выяснено, что наиболее подходящие значения, при которых наблюдается максимальная интенсивность сигнала ионов с  $m/z$  95, 79 и 63, для потенциала на входе в масс-анализатор – 50 В, а для энергии соударений – 20 В для  $m/z$  79 и 25 В для  $m/z$  63. Изменение скорости потока газа-распылителя от 8 до 10 л/мин и температуры газа-распылителя от 200 до 350 °С привело к десятикратному увеличению сигнала, соответствующего ионным переходам 95→79 и 95→63.

Метрологические характеристики прямого экспрессного определения МФК представлены в таблице 13.

**Таблица 13.** Характеристики прямого ВЭЖХ-МС-МС определения МФК в природной воде

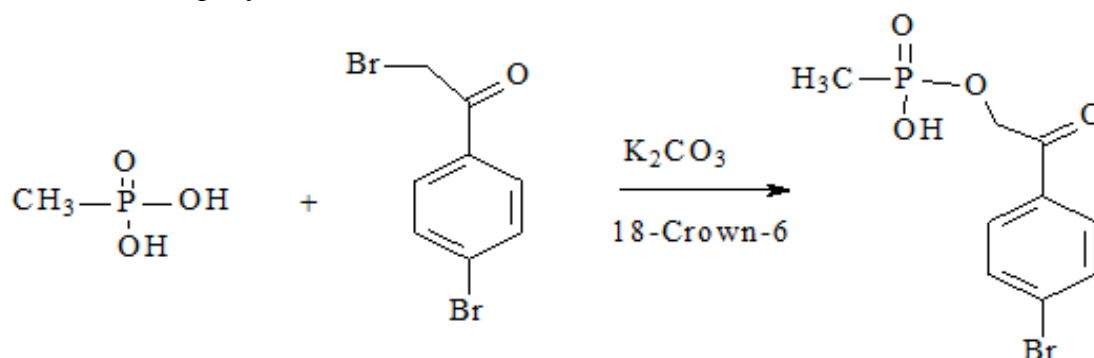
Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	R <sup>2</sup>	Наименьшая определяемая концентрация нг/мл	Предел обнаружения нг/мл
МФК	30-1000	$y=570 \times x$	0.99	30	10

Правильность разработанного подхода определяли методом «введено-найдено» (Табл. 14).

**Таблица 14.** Проверка правильности, разработанного подхода методом «введено-найдено» (n=3, p=0,95)

Проба воды	Введено в смеси, нг/мл	Найдено, нг/мл
Природная вода	100	98 ± 5
Вода из скважины	100	96±7
Водопроводная вода	100	105±9

Разрабатывали высокочувствительный способ определения МФК в виде производного с п-бромфенацил бромидом (ПБФБ), реагентом, переводящим МФК в менее полярное соединение с более высокой молекулярной массой. Реакцию дериватизации проводили согласно схеме, представленной на рисунке 16.



**Рис. 16.** Реакция дериватизации МФК п-бромфенацил бромидом.

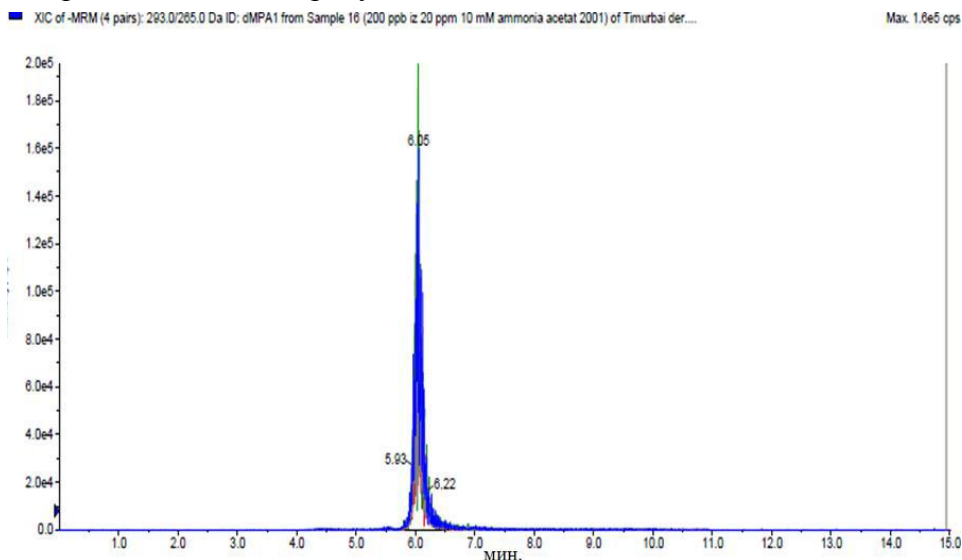
Добавки 18-краун-6 и  $K_2CO_3$  увеличивают скорость реакции и выход целевого продукта. Реакцию проводили при температуре 80 °С в течение 30 минут. Используя систему прямого ввода в масс-спектрометр, получали масс-спектры электрораспылительной ионизации образующихся производных в варианте регистрации отрицательных ионов и выбирали характеристичные ионы для детектирования.

Для определения МФК в виде производного применяли гидрофильную хроматографию с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Хроматографическое разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм). Наилучшая форма хроматографического пика и чувствительность определения была достигнута при использовании в качестве подвижной фазы 10 мМ ацетата аммония и ацетонитрила. Разделение проводили в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин. Время удерживания производного МФК при данной скорости потока составило  $6 \pm 0.5$  мин (Рис. 17). Масс-спектрометрическое детектирование проводили по выбранным ионным переходам. В масс-спектре (рис. 18) производного присутствуют наиболее интенсивные сигналы ионов с соотношением  $m/z$  293 и 291 один к одному, соответствующие депротонированным молекулам производного МФК.

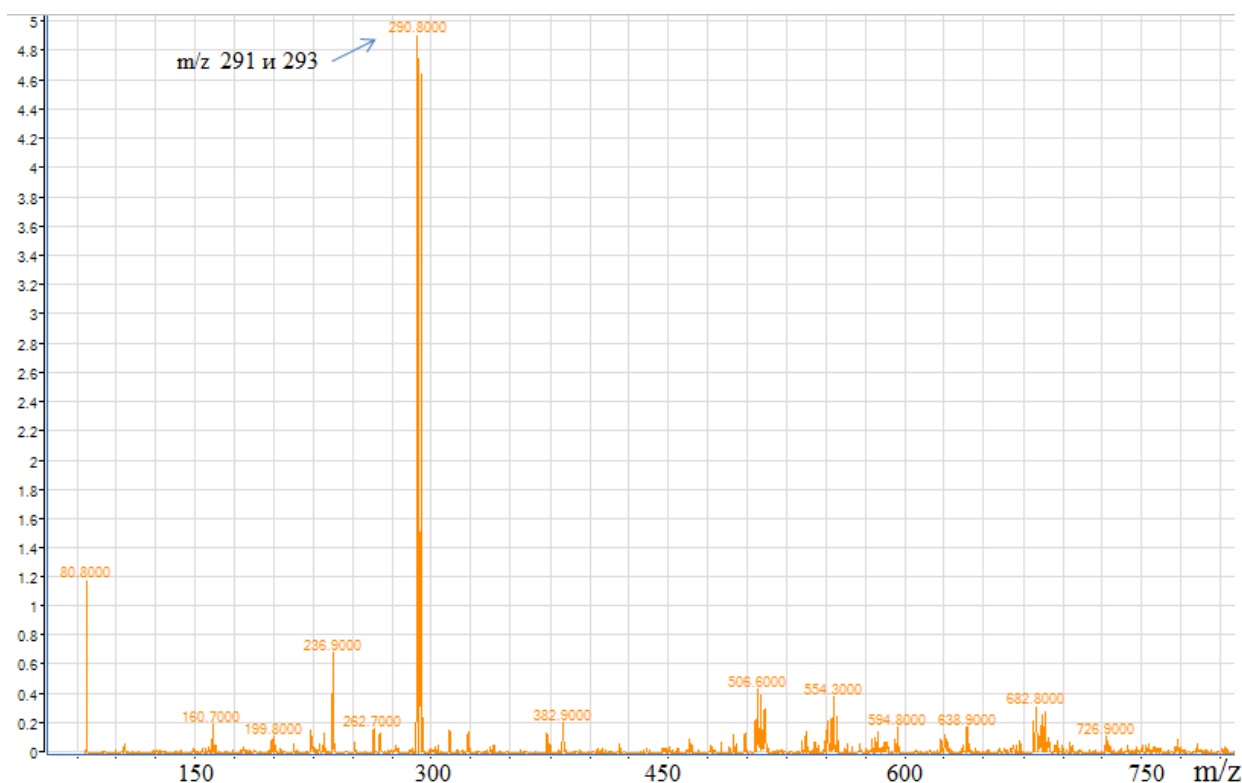
Применение дериватирующего реагента привело к снижению предела определения МФК в виде производного, по сравнению с определением МФК без дериватизации в 5-10 раз. Ограничением при определении МФК в виде производного является невозможность проведения реакции дериватизации в водной среде. Для анализа образцов природных вод необходимы упаривание водной матрицы и смена растворителя на ацетонитрил. Упаривание проводили при помощи отгонки при пониженном давлении на ротационном испарителе.

**Выбор условий пробоподготовки.** Были оптимизированы условия упаривания на ротационном испарителе. В круглодонную колбу на 10 мл порциями по 2 мл добавляли 10 мл водных стандартных растворов МФК с концентрацией 20 нг/мл. Упаривание вели при давлении 15 мбар. Температуру упаривания контролировали на уровне 35 °С для минимизации возможных потерь МФК, упаривание проводили до объема, не превышающего 100 мкл. Доводили ацетонитрилом до объема 1 мл (ожидаемый коэффициент концентрирования 10) и колбу

помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. Реакцию дериватизации проводили согласно схеме, представленной на рисунке 16.



**Рис. 17. Хроматограмма 200 нг/мл производного МФК по выбранным ионным переходам. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм).**



**Рис. 18. Масс-спектр хроматографического пика, полученный в режиме сканирования.**

В процессе упаривания данным способом в каплеуловителе конденсировались капли жидкости и давление в системе не снижалось до установленного значения 15 мбар, а держалось на уровне 40 мбар. В результате этого происходили большие потери МФК (97%) и был получен коэффициент концентрирования равный 0.3. Во избежание накопления капель жидкости в каплеуловителе был применен подход, включающий в себя обогрев каплеуловителя до и во время упаривания. Применение данного подхода привело к снижению давления в системе до установленного значения 15 мбар и в каплеуловителе не наблюдалось накопление капель жидкости. В результате был существенно увеличен коэффициент концентрирования, который составил 9. Потери МФК

данным методом упаривания и концентрирования всего 10%. Наиболее оптимальным для упаривания был выбран объем равный 10 мл. При увеличении объема образца увеличивается время, требуемое для упаривания. При уменьшении объема образца, с учетом коэффициента концентрирования, снижается предел обнаружения. При объеме образца равному 10 мл удается достичь снижения пределов обнаружения при приемлемом времени упаривания.

**Апробация.** Для оценки предложенного способа определения готовили растворы МФК различной концентрации в 70 мкл воды и 930 мкл ацетонитрила. Растворы МФК подвергали реакции дериватизации с п-бромфенацил бромидом и строили градуировочный график. Характеристики ВЭЖХ-МС/МС определения МФК в виде производного, представлены в Табл. 15.

Получали данные по воспроизводимости реакции дериватизации на двух уровнях концентраций МФК - 3 нг/мл и 60 нг/мл. Воспроизводимость на уровне 3 и 60 нг/мл составила 5.8 и 5.7 %. Также было выяснено, что продукт дериватизации остается стабильным в течение 2 дней. Правильность способа исследовали при помощи метода «введено-найденно». Результаты определения матричного эффекта представлены в Табл. 16.

**Таблица 15.** Характеристики определения МФК в виде производного (n=3, p=0.95)

Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	R2	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл
МФК	3-60	$S_i = 5752 \times c_i$	0.99	3	0.9

**Таблица 16.** Определение правильности методики (n=3, p=0.95)

Пробы воды	Введено в смеси, нг/мл	Найдено, нг/мл	Введено в смеси, нг/мл	Найдено, нг/мл
Природные воды А	0.4	$0.39 \pm 0.03$	6	$6 \pm 0.2$
Природные воды Б	0.4	$0.4 \pm 0.02$	6	$5.9 \pm 0.1$
Природные воды В	0.4	$0.4 \pm 0.03$	6	$6 \pm 0.1$

Как видно из Табл. 19 введенные и найденные концентрации совпадают, что свидетельствует о том, что матрица не оказывает мешающего влияния на ионизацию, выход реакции дериватизации и коэффициент концентрирования. С учетом коэффициента концентрирования предел обнаружения данной методики определения МФК в природных водах в виде производного с применением гидрофильной хроматографии составил 100 пг/мл. Разработанная методика характеризуется хорошей воспроизводимостью реакции дериватизации, высоким коэффициентом концентрирования или низким процентом потерь МФК, высокой чувствительностью и приемлемым временем удерживания деривата. Достигнут предел обнаружения МФК не встречающийся ранее в литературе

Предложен способ определения МФК и О-алкилметилфосфонатов в грунтово-пылевой смеси - более сложной по составу матрице, чем природные воды, поэтому важными задачами являлись подбор:

- 1) Подбор подходящих условий пробоподготовки, обеспечивающий наиболее полное извлечение анализируемых соединений
- 2) Подбор хроматографических условий разделения с мешающими компонентами матрицы

**Одновременное определение МФК и О-алкилметилфосфонатов.** При попытках проведения дериватизации О-алкилметилфосфонатов было обнаружено, что при условиях дериватизации, описанных выше, О-алкилметилфосфонаты, в отличие от МФК, не подвергаются дериватизации. Это объясняется их более высокими значениями константы кислотности ( $pK_a$  3.3 против 2.12) и недостаточным высоким рН среды. Отсутствие реакции дериватизации О-алкилметилфосфонатов, в отличие от МФК, позволило разработать высокочувствительный способ совместного определения МФК и О-алкилметилфосфонатов.

*Подбор масс-спектрометрических параметров детектирования* О-аллилметилфосфонатов. Для О-аллилметилфосфонатов получали масс-спектры электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. Получали фрагментные ионы, образующиеся в ячейке соударений. Для определения нами выбраны следующие ионные переходы для каждого из О-алкилметилфосфоната, представленного в Табл. 17.

**Таблица 17.** Ионные переходы для О-алкилметилфосфонатов:  $m/z$  депротонированной молекулы  $\rightarrow m/z$  иона-продукта

Параметр	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Основная выбранная реакция	293 $\rightarrow$ 265	123 $\rightarrow$ 95	137 $\rightarrow$ 95	151 $\rightarrow$ 95	179 $\rightarrow$ 95
Дополнительная выбранная реакция	291 $\rightarrow$ 263 293 $\rightarrow$ 215 291 $\rightarrow$ 213	123 $\rightarrow$ 79	137 $\rightarrow$ 79	151 $\rightarrow$ 79	179 $\rightarrow$ 79

*Подбор хроматографических условий.* Разделение МФК и О-алкилметилфосфонатов проводили на колонке Luna HILIC при скорости потока 1.5 мл/мин. В качестве подвижной фазы выступала смесь растворителей, состоящая из А – 10 мМ ацетата аммония в воде и Б – ацетонитрила. Применяя данную программу, получали значения хроматографических параметров удерживания, представленных в Табл. 18. На Рис. 19 показана хроматограмма по выбранным ионным переходам раствора МФК в выбранных хроматографических условиях.

**Таблица 18.** Значения времени удерживания и коэффициента емкости для алкилметилфосфоновых кислот

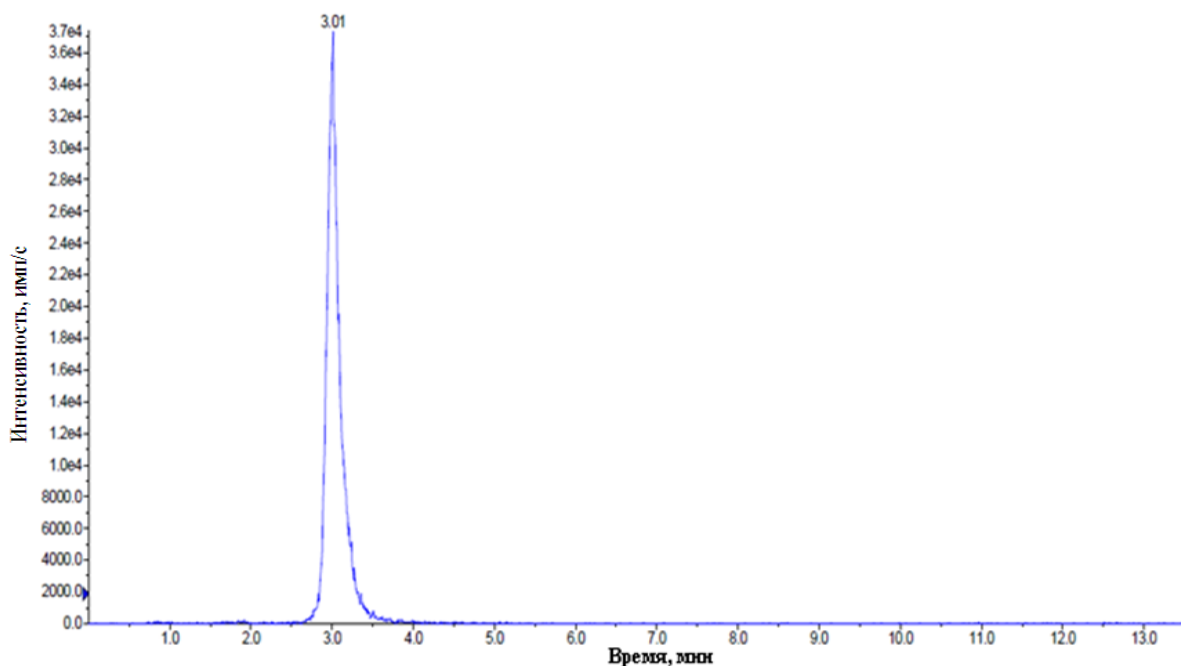
Параметр	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Время удерживания $t_R$ , мин	3,1 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1	4,74 $\pm$ 0,01	4,1 $\pm$ 0,1	3,78 $\pm$ 0,05
Коэффициент емкости, $k'$	2.5	5	4.5	3.7	3.4

*Выбор способа пробоподготовки.* Трудностью определения МФК в виде производного является невозможность проведения реакции дериватизации в водной среде. Для анализа образцов грунто-пылевой смеси необходимы ее диспергирование, экстрагирование водой в УЗ-



ванне в течение 20 минут, центрифугирование надосадочного слоя в течение 2 минут, фильтрование, упаривание водной матрицы до 50 мкл и растворение в ацетонитриле. Упаривание проводили методом отгонки при пониженном давлении на ротационном испарителе.

Оценивали степень извлечения МФК и О-алкилметилфосфонатов при экстрагировании водой, коэффициент концентрирования, матричный эффект, строили градуировочную зависимость в диапазоне концентраций для водных стандартных растворов МФК и О-аллилметилфосфонатов 0,005-100 нг/мл, оценивали такие метрологические характеристики как предел обнаружения (ПО), прецизионность в течении одного дня и в разные дни.



**Рис. 19.** Хроматограмма 50 нг/мл производного МФК по выбранному ионному переходу 293 →265. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза – 10 mM ацетат аммония – ацетонитрил. Скорость потока – 1,5 мл/мин.

*Коэффициент концентрирования.* Получали точное значение коэффициента концентрирования на двух уровнях концентраций – 3 и 50 нг/мл. Количественные характеристики определения коэффициента концентрирования представлены в Табл. 19. *Степень извлечения при экстракции водой.* Степень извлечения при экстракции водой оценивали, проводя эксперименты на уровне концентрации – 50 нг/мл в трех повторениях. Количественные характеристики определения представлены в Табл. 20. *Матричный эффект.* Исследовали влияние матричного эффекта. Результаты определения матричного эффекта представлены в Табл. 21.

**Таблица 19. Значения коэффициента концентрирования МФК и АМФК на двух уровнях концентрации МФК и АМФК (n=3, P=0,95)**

Кислота	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Коэффициент концентрирования	9.0 ± 0.3	9.2 ± 0.2	10.1 ± 0.1	9.4 ± 0.2	9.4 ± 0.6

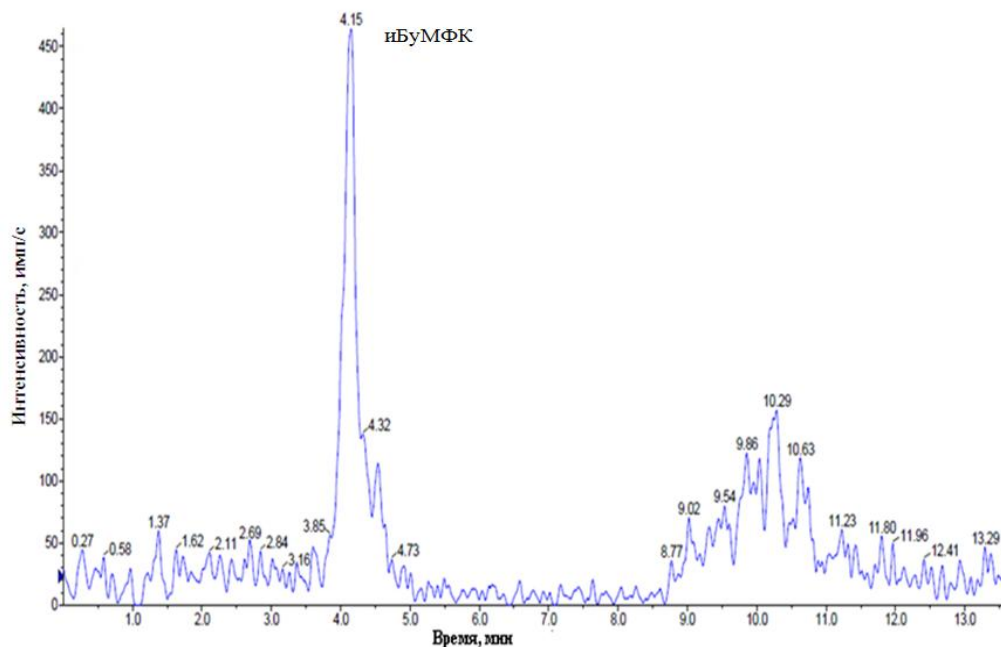
**Таблица 20. Значения степени извлечения при экстракции водой МФК и АМФК из грунто-пылевой смеси на уровне концентрации 50 нг/мл (n=3, P=0,95)**

Кислота	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
R, %	90 ± 5	94 ± 4	97 ± 2	98 ± 2	93 ± 4

**Таблица 21. Значения матричного эффекта для АМФК в грунте (n=3, P=0,95)**

Кислота	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
ME, %	40 ± 4	88 ± 6	94 ± 4	99 ± 2	98 ± 3

*Градуировочная зависимость.* Для построения градуировочной зависимости готовили растворы МФК и АМФК в ацетонитриле с концентрацией 1 мкг/мл. Из него методом последовательных разбавлений смесью ацетонитрил-вода (95:5) готовили растворы МФК и АМФК с концентрациями в диапазоне от 0.005-100 нг/мл. На Рис. 20 представлена хроматограмма иБуМФК. В качестве предела обнаружения выбирали концентрацию, для которой соотношение сигнал/шум (или сигнал холостой пробы) составляло не менее 3:1.



**Рис. 20. Хроматограмма 0,025 нг/мл иБуМФК. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза – 10 мМ ацетат аммония – ацетонитрил.**

*Прецизионность в течении одного дня.* Для оценки прецизионности в условиях одного дня проводили пять параллельных анализов грунто-пылевой смеси с добавкой МФК и АМФК до концентрации 50 нг/мл ниже максимальной концентрации в области линейности по градуировочному графику в максимально близких условиях (в один день). В качестве

количественной характеристики прецизионности оценивали величину относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ). Относительное стандартное отклонение не превышало 6%.

*Прецизионность в разные дни.* Для оценки прецизионности между днями проводили три последовательных анализа стандартных раствора МФК и АФМК до концентрации 50 мкг/мл в разные дни. В качестве количественной характеристики прецизионности оценивали величину относительного стандартного отклонения ( $s_r$ ) найденной концентрации образцов. Относительное стандартное отклонение не превышало 15 %.

Разработанный подход использовался для анализа реальных объектов, содержащих продукты деструкции химического оружия. Реальные образцы представляют собой пробы грунто-пылевой смеси с места бывшего завода по производству химического оружия в Волгоградской области. Точные результаты представлены в Табл. 29.

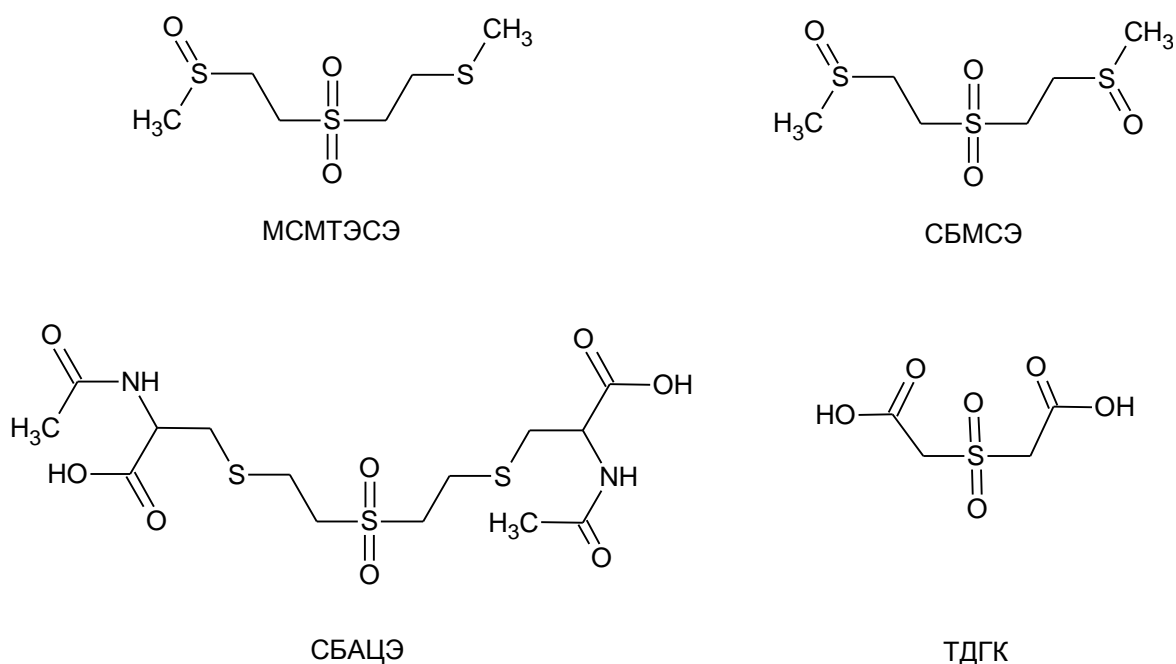
**Таблица 22. Содержание МФК и АМФК в реальных образцах грунто-пылевой смеси (P=0,95, n=3)**

Образцы	Вещество	С, мкг/г
1	МФК	0,09 ±0,01
	ПрМФК	0,32 ±0,05
2	МФК	На уровне ПО
	иПрМФК	0,15 ±0,02
	ПинМФК	0,18 ± 0,03
3	МФК	На уровне ПО
	иПрМФК	8,72 ± 0,13
	иБуМФК	0,011 ± 0,002
	ПинМФК	2,78 ±0,06
4	МФК	На уровне ПО
	иПрМФК	0,43 ± 0,07
	ПинМФК	1,62 ± 0,15

В результате работы предложен способ пробоподготовки для реальных образцов почв, характеризующийся высокой степенью извлечения. Было показано, что использование *пара*-бромфенацил бромида в качестве дериватирующего агента приводит к высокой чувствительности масс-спектрометрического определения МФК в виде производного. Данный метод определения характеризуется высоким коэффициентом концентрирования, превосходной чувствительностью. Предложенная методика апробирована на грунто-пылевой смеси и применена к анализу реальных объектов.

**Четвертая глава** посвящена разработке способа определения важных в аналитическом плане метаболитов иприта, образующихся под действием фермента  $\beta$ -лиазы - 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] (СБАЦЭ), 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана (МСМТЭСЭ) методами ультра-ВЭЖХ-МС-МС в режиме электрораспылительной ионизации (Рис. 21).

В ходе оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования изучали влияние напряжения в ячейке соударений на спектр МС/МС и интенсивность сигналов ионов, образующихся при фрагментации протонированных и депротонированных молекул СБАЦЭ, СБМСЭ и МСМТЭСЭ. В случае СБАЦЭ максимальной интенсивности пиков образующихся фрагментных ионов удается достичь в варианте регистрации отрицательных ионов, при этом наиболее интенсивными оказались сигналы фрагментных ионов со значениями  $m/z$  127 и 163. В дальнейшем указанные ионы использовали в качестве характеристичных при детектировании СБАЦЭ в варианте регистрации выбранных реакций ( $m/z$  443  $\rightarrow$   $m/z$  127 и  $m/z$  443  $\rightarrow$   $m/z$  163). В ходе исследования фрагментации СБМСЭ и МСМТЭСЭ наиболее интенсивными ионными переходами оказались  $m/z$  247  $\rightarrow$  183,  $m/z$  247  $\rightarrow$  119, для определения СБМСЭ,  $m/z$  231  $\rightarrow$  75,  $m/z$  231  $\rightarrow$  167, для определения МСМТЭСЭ.



**Рис. 21. Структурные формулы метаболитов иприта.**

В качестве колонки для хроматографического определения СБАЦЭ в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ была выбрана колонка с сорбентом Synergi Polar RP. Данная неподвижная фаза характеризуется высокой эффективностью для сильнополярных веществ и оптимальна для различных азотсодержащих органических соединений (позволяет устранить размывание и асимметрию пиков азотсодержащих соединений, характерное для ОФ ВЭЖХ), а колонка диаметром 2 мм и мелкодисперсный сорбент позволят повысить эффективность разделения.

Для установления подходящих условий варьировали значения pH и программу градиентного элюирования по ацетонитрилу таким образом, чтобы добиться максимальной эффективности, чувствительности и необходимого коэффициента емкости (1-5). Сильно выраженное влияние pH на удерживание и чувствительность детектирования связано с тем, что в структуре СБАЦЭ присутствуют несколько функциональных групп кислотной и основной природы, поэтому даже при небольшом изменении кислотности происходит перепротонирование различных функциональных групп и переход вещества из одной протонированной формы в другую, сильно отличающиеся друг от друга по масс-спектральным и хроматографическим свойствам.

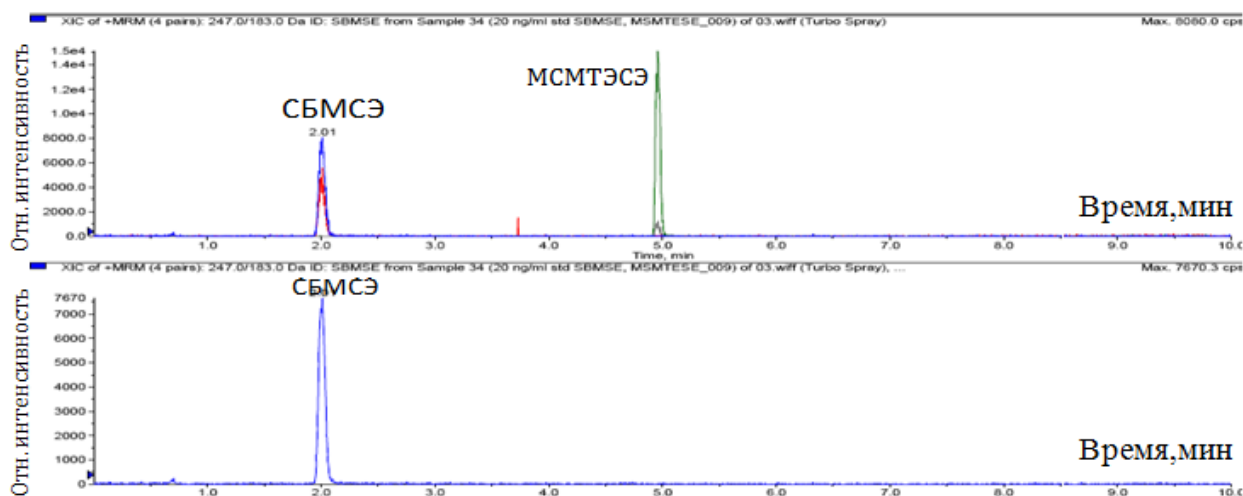
Оптимальным следует признать значение pH подвижной фазы 5,4, при котором достигается максимальная эффективность пика СБАЦЭ, что, по-видимому, связано с тем, что СБАЦЭ существует в виде гидрофобного цвиттер-иона, хорошо удерживающегося на колонке и дающего интенсивный сигнал в виде отрицательного иона.

С использованием водных растворов СБАЦЭ провели оценку метрологических характеристик разработанного способа. Нестабильность времен удерживания определяемого компонента не превышает 0,3 минуты. Предел обнаружения составил 0,5 нг/мл.

В ходе разработки способа разделения МСМТЭСЭ и СБМСЭ методом (ультра)ВЭЖХ в качестве неподвижной фазы использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом Acclaim RSLC. Для того чтобы увеличить долю заряженных частиц МСМТЭСЭ и СБМСЭ в растворе и как следствие, повысить интенсивность ионизации в ходе анализа, в качестве подвижных фаз использовали 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде (канал А) и 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (канал В), что способствует образованию протонированных молекул МСМТЭСЭ и СБМСЭ и повышает интенсивность сигнала положительных ионов определяемых компонентов. При хроматографическом разделении МСМТЭСЭ и СБМСЭ использовали программу градиентного элюирования, в условиях которой коэффициенты емкости (k) МСМТЭСЭ и СБМСЭ составили 7.3 и 2.4, соответственно, что является приемлемым для метода хроматомасс-спектрометрического анализа. В таблице 23 приведены хроматографические параметры для способа определения МСМТЭСЭ и СБМСЭ. На рисунке 22 представлена хроматограмма водного раствора, содержащего МСМТЭСЭ и СБМСЭ, полученная при использовании оптимальных условий хромато-масс-спектрометрического определения МСМТЭСЭ и СБМСЭ.

**Таблица 23. Хроматографические параметры для способа определения МСМТЭСЭ и СБМСЭ. При расчетах использовали величину мертвого времени равную 0.60 мин**

Соединение	Время удерживания, мин	Разрешение пиков, $R_{n,n+1}$	Селективность
МСМТЭСЭ	4.96	-	3.1
СБМСЭ	2.01	16.1	3.1



**Рис. 22. Хроматограмма водного раствора 20 нг/мл СБМСЭ и 20 нг/мл МСМТЭСЭ. Колонка: Acclaim C18 250 × 2 мм, 2.2 мкм.**

Проводили изучение способа пробоподготовки, позволяющего проводить надежное определение СБАЦЭ, МСМТЭСЭ и СБМСЭ в образцах биологических жидкостей (мочи). Для обнаружение СБАЦЭ опробовали несколько схем твердофазной экстракции, в том числе, твердофазную экстракцию на удерживание и на пропускание с использованием картриджей Strata SDB-L (полимерный сорбент на основе сополимера стирол-дивинилбензола высокой плотности), Strata C 18E (обращено-фазовый силикагель с пришитыми группами C18 и полярным эндкепингом) и Strata SCREEN-C (смешанный обращено-фазовый и катионнообменный сорбент). Установлено, что высокая полярность СБАЦЭ и его существование в заряженной форме в широком диапазоне pH ограничивают достижение высоких степеней извлечения определяемого вещества, таким образом, твердофазная экстракция на удерживание не может быть использована для проведения пробоподготовки. Удерживание СБАЦЭ при использовании картриджа Strata C 18E практически не наблюдается, при этом на картридже удерживаются мешающие компоненты, входящие в состав матрицы пробы (моче), а определяемое вещество беспрепятственно проходит через патрон. Пропускание образца мочи через картридж приводило к его полному обесцвечиванию, что косвенно свидетельствует об эффективности подобной очистки пробы. На этапе оптимизации процедуры пробоподготовки исследовали влияние типа сорбента на пропускание МСМТЭСЭ и СБМСЭ. Образец мочи подкисляли раствором уксусной кислоты до pH 2.5, чтобы перевести МСМТЭСЭ и СБМСЭ в заряженное состояние, в котором они плохо удерживаются на сорбенте, затем проводили очистку образцов мочи на двух типах картриджей: Strata Screen C (смешанный сорбент с группами C8 и пришитыми катионно-обменными сульфогруппами) и Strata SDB-L (сорбент на основе сополимера стирола и дивинилбензола). Критерием выбора подходящего картриджа является максимальное пропускание МСМТЭСЭ и СБМСЭ через сорбент. Наилучшие результаты получаются при использовании картриджа Strata SDB-L, для которого величин пропускания МСМТЭСЭ и СБМСЭ составляет более 85%, в случае картриджа Strata Screen C значения пропускания данных соединений не превышают 80 % и характеризуются худшей воспроизводимостью извлечения.

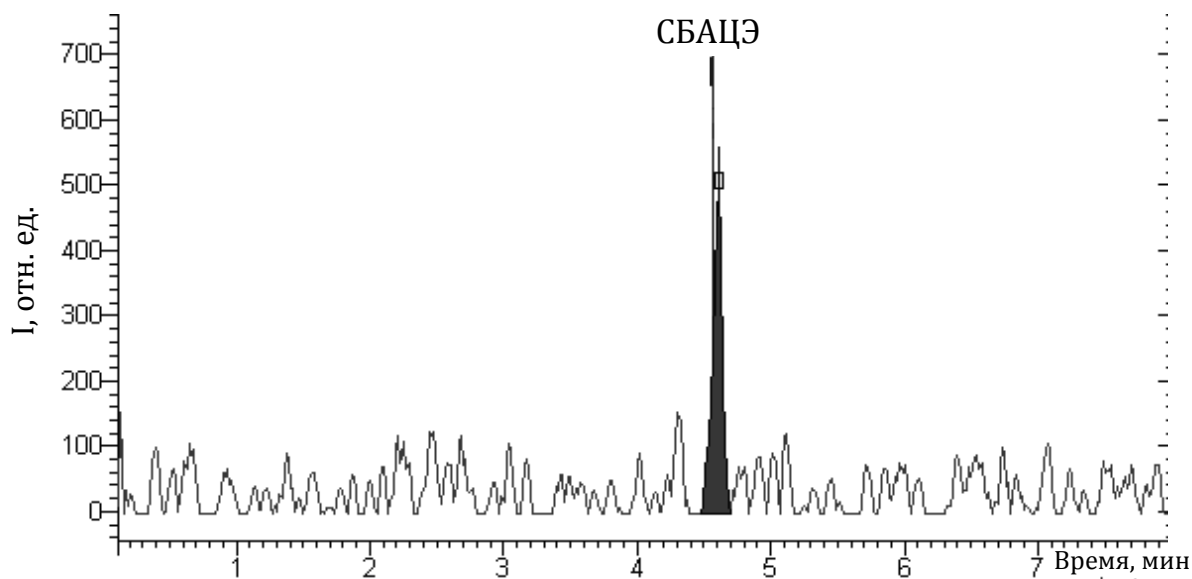
В выбранных условиях ультра-ВЭЖХ-МС-МС определения трех метаболитов иприта в образцах мочи оценены метрологические характеристики разработанных подходов, которые представлены в таблице 24.

**Таблица 24. Метрологические характеристики способов определения продуктов трансформации иприта МСМТЭСЭ и СБМСЭ в образцах мочи**

Параметр	СБАЦЭ	СБМСЭ	МСМТЭСЭ
$R^2$ , коэффициент корреляции	0.999	0.999	0.999
Предел обнаружения $C_{min}$ , нг/мл	0.5	2	1
Диапазон линейности градуировочной зависимости, нг/мл	2-2000	5-5000	2-2000

Для проведения экспериментальной оценки применимости разработанного хромато-масс-спектрометрического способа определения метаболита СБАЦЭ исследовали образцы биопроб лабораторных крыс, получавших несмертельную дозу иприта. Использование предложенного

подхода позволило добиться большой ретроспективности анализа – достоверное обнаружение метаболита иприта осуществляется в образцах мочи, полученной на 22 день после проведения интоксикации (рис. 23).

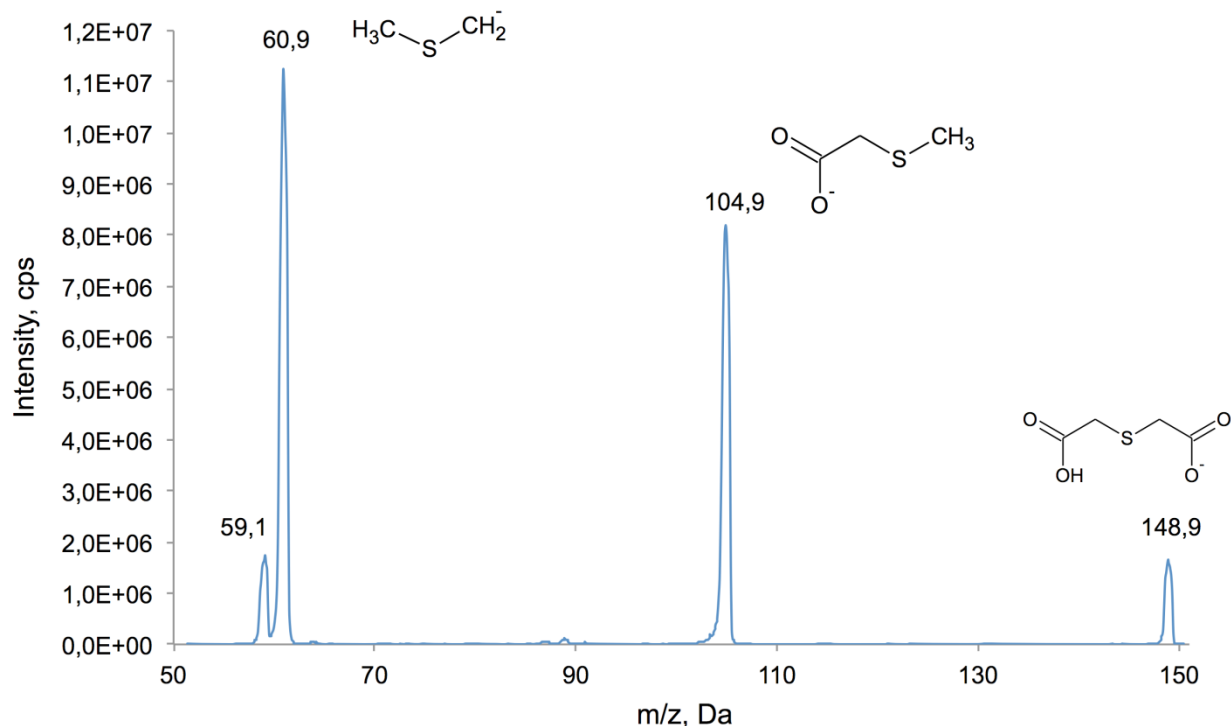


**Рис. 23.** Хроматограмма образца крысиной мочи, полученная при определении СБАЦЭ через 15 дней с момента интоксикации несмертельной дозой иприта. Колонка: Synergi Polar RP 250x2 мм, 4 мкм; Подвижная фаза А – 20 мМ аммонийно-ацетатного буфера в воде с рН 5.4, подвижная фаза В – ацетонитрил; скорость потока 0.3 мл/мин; градиентное элюирование (0.00 – 2 мин – 2 % В, 2- 5 мин – 2%-20% В, 5-6 мин- 20 % - 90 % В, 6-8 мин- 90 % В, 8-10 мин- 2 % В). Режим регистрации выбранных ионных реакций СБАЦЭ.

**Определение тиодигликолевой кислоты.** Была разработана методика экспрессного определения тиодигликолевой кислоты (ТДГК) в природных водах и моче методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанный ВЭЖХ-МС/МС подход для определения тиодигликолевой кислоты (ТДГК) демонстрирует хорошую чувствительность, селективность и устойчивость. ТДГК легко ионизировалась в условиях электрораспылительной ионизации, а сигналы ионов-продуктов, образующиеся в ячейке соударений - интенсивные (Рис. 24).

В ячейке соударений депротонированная молекула ТДГК фрагментируется с потерей одной ( $m/z$  105) и двух ( $m/z$  61) карбоксильных групп (Рис. 24). Эти ионы были использованы для определения ТДГК. Первый переход ( $m/z$  149 → 105) использовали для определения и второй ( $m/z$  149 → 61) для подтверждения. Выбранные ионные переходы ТДГК имели наибольшую интенсивность при значении потенциала декластеризации -18 В и значении энергии соударений - 11 В для перехода  $m/z$  149 → 105 и -16 В для перехода  $m/z$  149 → 61.

ТДГК является очень полярной молекулой за счет двух карбоксильных групп в структуре. ТДГК частично существует в диссоциированном виде в окружающей среде и биологических жидкостях. При использовании 20 мМ ацетата аммония и ацетонитрила в качестве подвижной фазы удерживания ТДГК не наблюдалось и ТДГК элюировалась с мертвым временем колонки. Использование 0.1% муравьиной кислоты позволило решить проблему удерживания ТДГК. Диссоциированная молекула ТДГК протонируется муравьиной кислотой и становится менее заряженной. Применение муравьиной кислоты привело к увеличению времени удерживания ТДГК, значение коэффициента емкости – 2.1.

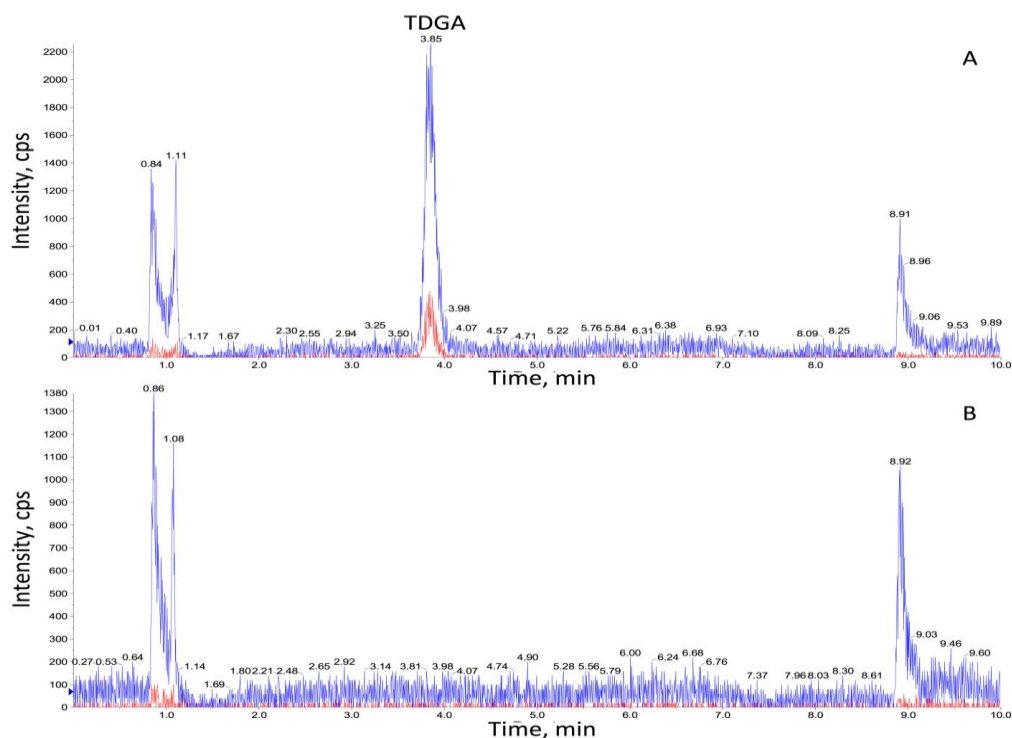


**Рис. 24. Масс-спектр диссоциации активированной соударением депротонированной молекулы ТДГК.**

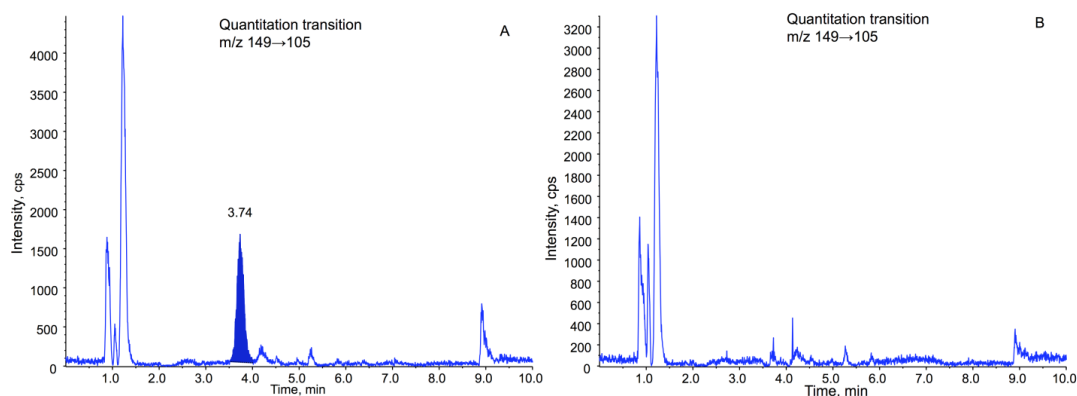
Значение относительного стандартного отклонения для времени удерживания, полученное при анализе трех последовательных вводов раствора ТДГК с концентрацией  $50 \text{ нг мл}^{-1}$ , в моче - 0,7 %. В дополнении к селективному детектированию диагностических ионов-продуктов, разделение при помощи ЖХ позволило выполнить надежное обнаружение ТДГК в неизвестных образцах, таких как моча человека и природные воды.

*Селективность.* Мешающих пиков эндогенных соединений в моче и природных водах со временем удерживания ТДГК не наблюдалось. Хроматограммы холостых образцов мочи, природных вод и образцов мочи и природных вод с добавками ТДГК представлены на Рис. 25, 26. *Линейность.* Градуировочные зависимости ТДГК в моче человека и природной воде были проанализированы в течение 3-недельного периода. Градуировочные зависимости для ТДГК были построены в диапазоне концентраций  $150\text{-}5000 \text{ нг мл}^{-1}$  для определения ТДГК в моче и в диапазоне концентраций  $20\text{-}2000 \text{ нг мл}^{-1}$  для определения ТДГК в природной воде. На каждом уровне концентрации было получено по две точки (коэффициенты корреляции больше, чем 0,998 для образцов мочи и природных вод с добавками ТДГК). Каждая градуировочная зависимость показала отличную линейность с коэффициентами корреляции, как правило = 0,99. Градуировочная зависимость охватывала почти два порядка. Стандартные отклонения показывают отличную воспроизводимость измерений концентрации на каждом уровне.





**Рис. 25.** Хроматограмма образца природных вод с добавкой 20 нг/мл ТДГК (А) и образца природных вод без ТДГК (Б).



**Рис. 26.** Хроматограммы образца мочи с добавкой 150 нг мл<sup>-1</sup> ТДГК (А) и образца мочи без ТДГК (Б).

В моче ПО составил 50 нг мл<sup>-1</sup>, в воде – 10 нг мл<sup>-1</sup>. *Точность и воспроизводимость.* Образцы контроля качества (КК) анализировали в 20 повторных измерениях. Результаты анализа образцов КК были приемлемыми для всех трех уровней концентраций. Данные по воспроизводимости внутри- и между днями для ТДГК в воде и в моче представлены в Табл. 25 и 26.

С учетом матричного эффекта все концентрации были между 94% и 96% от номинальных значений. Этот факт означает то, что существенного эффекта матрицы не наблюдалось и что матричные компоненты не повлияли на ионизацию ТДГК. Результаты были воспроизводимыми и воспроизводимость внутри и между-днями были менее 3%. Значения точности были в диапазоне 94.5-103.0%. Точность и воспроизводимость при изучении образцов мочи и природной воды с добавками ТДГК продемонстрировали применимость разработанного подхода к различным образцам мочи и природной воды.

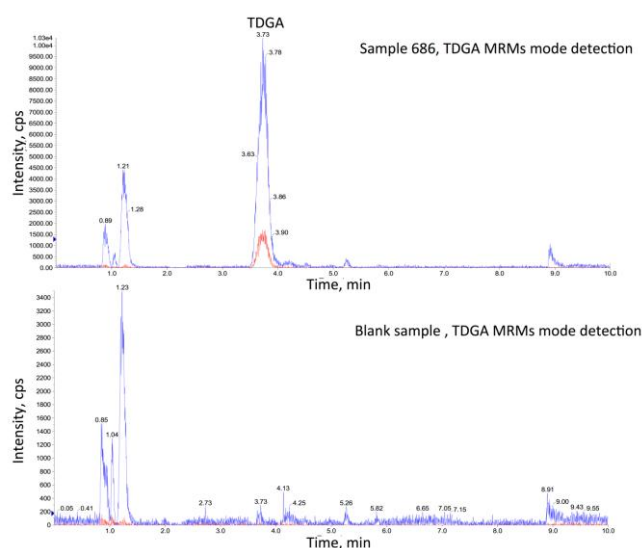
**Таблица 25. Воспроизводимость и точность метода для образца КК с концентрацией 40 нг мл<sup>-1</sup> в воде**

Параметр	ТДГК, внутри дня (n=5)	ТДГК, между днями (n=20)
Найденная концентрация (нг мл <sup>-1</sup> ) (среднее ± СО)	40±3	38±4
Точность (%)	105	97.5
Воспроизводимость (%)	7.5	10.5
Матричный эффект среднее ± СО (%)	96±5	102±4

**Таблица 26. Воспроизводимость и точность метода для образца КК с концентрацией 380 нг мл<sup>-1</sup> в моче**

Параметр	ТДГК, внутри дня (n=5)	ТДГК, между днями (n=20)
Найденная концентрация (нг мл <sup>-1</sup> ) (среднее ± СО)	382±6	378±9
Точность (%)	95.5	94.6
Воспроизводимость (%)	1.5	2.4
Матричный эффект среднее ± СО (%)	96±6	102±3

Несколько аналитических подходов было разработано для количественного определения ТДГК в биологических образцах и природных водах; однако по нашим сведениям, среди них не было подхода включающего в себя измерения ТДГК в моче и природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная ВЭЖХ-МС/МС методика определения ТДГК была использована в 30-м официальном профессиональном тестировании ОЗХО в лаборатории № 8 (Россия) для анализа образцов природных вод, на наличие ТДГК. Результаты показали присутствие ТДГК в воде (Рис. 27).



**Рис. 27. Хроматограмма реального образца природных вод, анализируемого в рамках 30 профессионального тестирования лабораторий ОЗХО.**

Пять образцов мочи здоровых добровольцев показали наличие измеряемых количеств ТДГК. В настоящем исследовании концентрацию ТДГК в моче добровольцев определяли с помощью разработанного метода ВЭЖХ-МС/МС. Средняя концентрация ТДГК в моче  $0.25 \pm 0.02$  мг л<sup>-1</sup>. Уровни ТДГК в моче были очень похожи для всех добровольцев, и по нашему мнению, данные результаты ранее не были представлены в литературе.

**Пятая глава** диссертации посвящена разработке способа определения двух основных продуктов гидролитической трансформации люизита – 2-хлорвиниларсонистой кислоты (ХВАК) и 2-хлорвиниларсоновой кислоты (ХВАОК) методами КЭ-СФ и ВЭЖХ-МС-МС (Рис. 28).



**Рис. 28. Структурные формулы продуктов гидролитической трансформации люизита.**

*Выбор начальных условий.* При прямом спектрофотометрическом детектировании в условиях предлагаемого подхода при  $\lambda = 195$  нм исследуемые вещества представляют собой слабые органические кислоты, поэтому в щелочной среде существуют, практически полностью, в виде анионов (за счет депротонирования). За счет отличий в размерах существенно различаются электрофоретические подвижности, что приводит к их селективному разделению методом КЗЭ. Таким образом, для достижения необходимых параметров разделения (эффективности и селективности) необходимо варьировать состав ведущего электролита, напряжение и диаметр капилляра. В качестве начальных условий для разделения и детектирования компонентов анализируемой смеси были выбраны следующие условия определения слабых органических кислот: боратный буферный раствор с концентрацией 30 мМ (измеренный рН 8.8 – 8.9), длина волны - 200 нм, рабочее напряжение - 20 кВ (анодный режим), температура капилляра - 20°C, ввод пробы – гидродинамический 180 мбар×с (6 секунд при давлении 30 мбар). В качестве рабочего капилляра из соображений более высокой чувствительности был выбран немодифицированный капилляр с внутренним диаметром 75 мкм и эффективной длиной 50 см (общая длина 60 см). Электрофореграмма, полученная в указанных условиях представлена на рис. 29. Из представленного рисунка видно, что оба компонента анализируемой смеси полностью разделяются между собой. В табл. 27 представлены полученные характеристики разделения, позволяющие проводить селективное разделение ХВАК и ХВАОК в смеси.

Выбранные для разделения компонентов условия позволяют проводить успешное и селективное разделение пробы. Для дальнейшей оптимизации схемы определения проводили варьирование концентрации буферного раствора ведущего электролита и выбирали подходящие параметры детектирования, промывки капилляра и ввода пробы.

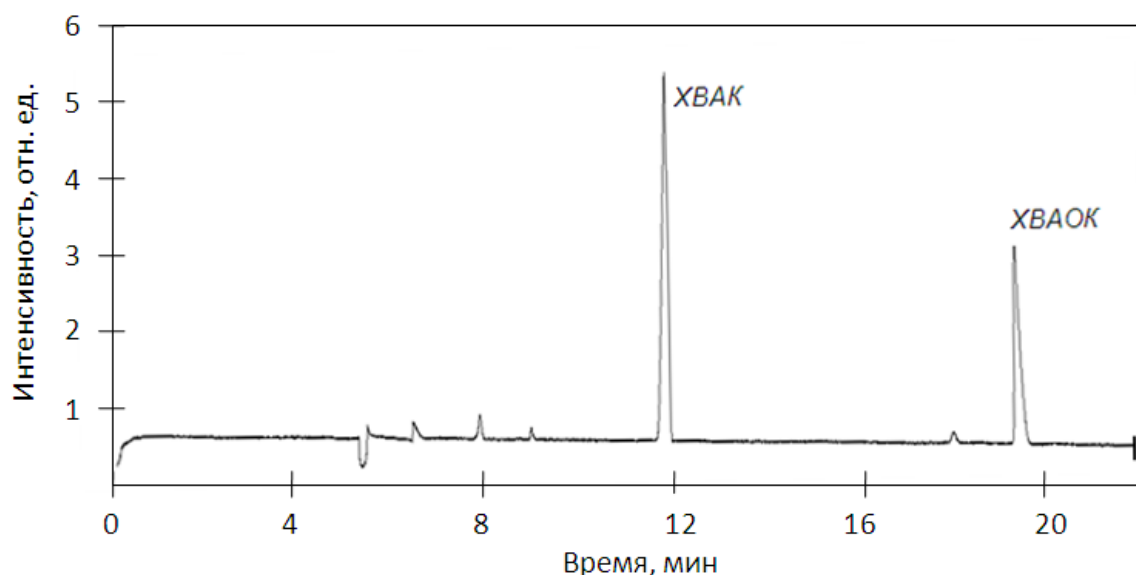


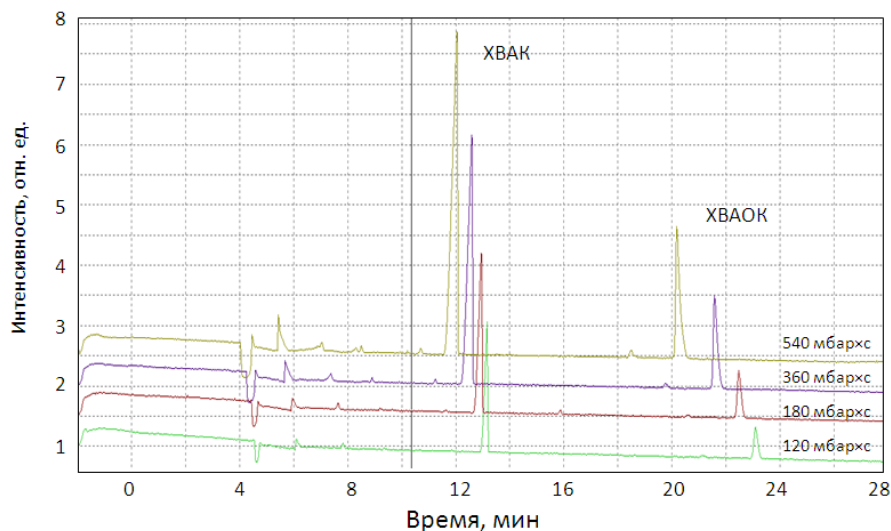
Рис. 29. Электрофореграмма смеси 2-хлорвиниларсоновой и 2-хлорвиниларсонистой кислот. Концентрация компонентов в смеси 25 мг/л.

Таблица 27. Характеристики разделения исследуемых соединений

Вещество (по порядку выхода пика)	Время миграции, мин	Эффективность, тыс. теоретических тарелок	Разрешение, $R_{n, n+1}$
ХВАК	11,92	133	20,2
ХВАОК	19,36	44	-

*Оптимизация способа промывки капилляра и объема вводимой пробы.* На стадии оптимизации программы промывки капилляра между анализами варьировали продолжительности воздействия на капилляр двумя промывочными растворами: деионизированной водой и рабочим электролитом. Наилучшие результаты были получены при последовательной промывке в течение 3 минут водой и 3 минут рабочим буферным раствором.

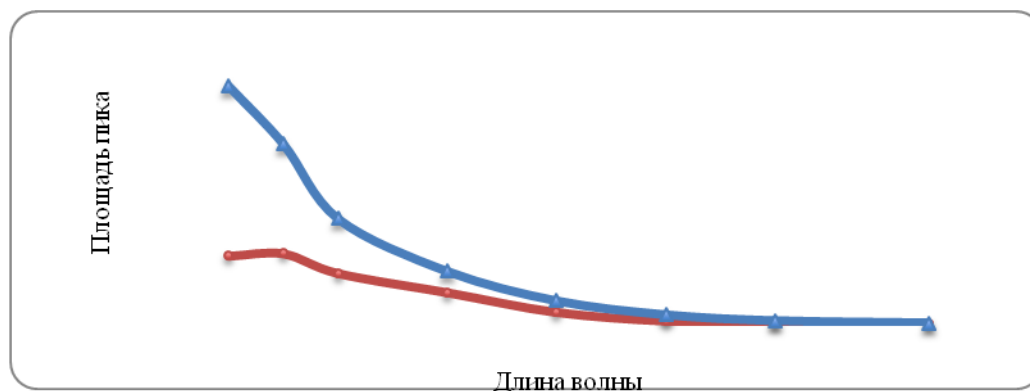
*Влияние объема вводимой пробы,* как функции давления ввода пробы и времени, на площадь пика и эффективность показано на рис. 30. Давление ввода пробы выбирали постоянным 30 мбар, время ввода варьировали в диапазоне от 4 до 18 с. *Выбор рабочего напряжения, концентрации раствора ведущего электролита.* Концентрация буферного раствора в ведущем электролите может оказывать существенное влияние на селективность разделения пробы. Изучали влияние концентрации буфера на картину разделения. Время анализа при использовании 20 мМ буфера наименьшее, однако, снижается воспроизводимость результатов. Поэтому для дальнейшей работы был выбран боратный буфер с рабочей концентрацией 30 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации рабочего буфера приводило лишь к увеличению времени анализа.



**Рис. 30.** Наложение электрофореграмм, полученных для разного объема вводимой пробы, в одном масштабе. Концентрация компонентов в смеси 10 мг/л. Боратный буфер 30 мМ (рН 8,85), внутренний диаметр капилляра = 75 мкм,  $L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$  см, напряжение - 20 кВ (анодный вариант), длина волны - 195 нм, температура - 20°C.

*Выбор длины волны для прямого детектирования.* Для выбора оптимальных условий прямого детектирования и построения спектров поглощения анализируемых компонентов был снят ряд электрофореграмм двухкомпонентной смеси кислот в диапазоне длин волн от 190 до 254 нм. Полученные спектры поглощения представлены на рис. 31.

Максимумы поглощения исследуемых веществ находятся в коротковолновой (дальней) области ультрафиолетового спектра за минимальной границей рабочего диапазона прибора (190 нм). Однако при уменьшении длины волны наряду с интенсивностью аналитического сигнала возрастает шум базовой линии, что обусловлено поглощением воды и растворенного в ней кислорода. С уменьшением длины волны детектирования увеличение шума превалирует над ростом оптической плотности, поэтому при детектировании в области 190 нм соотношение сигнал/шум не достигает максимального значения. Однако в районе 195-200 нм поглощение ведущего электролита существенно снижено, коэффициенты оптической экстинкции аналитов еще достаточно высоки. Таким образом, оптимальные результаты достигаются при использовании длины волны 195 нм (которая применялась в дальнейшей работе для прямого детектирования).



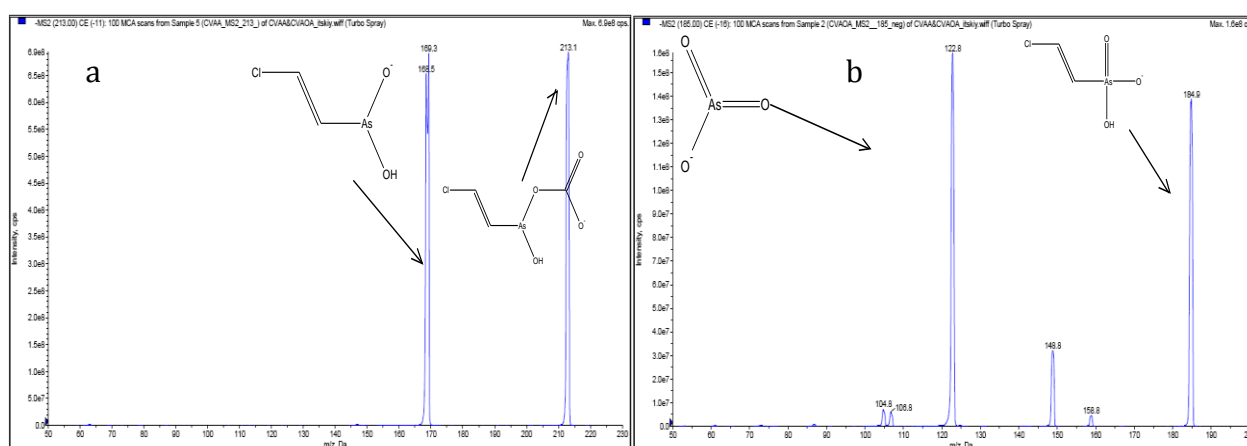
**Рис. 31.** Зависимость площади пиков ХВАК и ХВАОК от длины волны детектирования: ▲ - ХВАК; ● - ХВАОК.

*Построение градуировочных зависимостей.* В выбранных условиях были построены градуировочные зависимости для компонентов анализируемой смеси в диапазоне концентраций 1.0 – 40 мкг/мл для 2-хлорвиниларсонистой кислоты и 1.5-60 мкг/мл для 2-хлорвиниларсоновой кислоты, рассчитаны пределы обнаружения и метрологические характеристики анализа (табл. 28). Предложенный подход характеризуется необходимой чувствительностью, хорошими метрологическими характеристиками и экспрессностью определения.

**Таблица 28. Метрологические характеристики разработанного подхода**

Вещество	Уравнение градуировочного графика	$r^2$	Предел обнаружения, мг/л	Диапазон определяемых концентраций, мкг/г	$S_r$ , %
ХВАК	$S_i = 36.729 \times C_i$	0.98	0.3	1-40	6
ХВАОК	$S_i = 21.875 \times C_i$	0.99	0.5	1.5-60	5

Для выбора условий тандемного масс-спектрометрического детектирования ХВАК и ХВАОК проводили установление влияния параметров, отвечающих за чувствительность и селективность детектирования (потенциал декластеризации, входной потенциал на нулевом квадруполе масс-анализатора, энергия фрагментация и др.) и выбор оптимальных пар ионных переходов для масс-спектрометрического детектирования ХВАК и ХВАОК. В масс-спектре ХВАК присутствует интенсивный пик с  $m/z$  213, который предположительно представляет собой аддукт ХВАК с присутствующей в растворе муравьиной кислотой. В случае исследования ХВАОК в масс-спектре присутствует интенсивный пик депротонированной молекулы с  $m/z$  185. На рисунке 32 приведены масс-спектры ионов-продуктов ХВАК и ХВАОК, полученные при фрагментации ионов с  $m/z$  213 и  $m/z$  185 соответственно.



**Рис. 32. Спектр электрораспылительной ионизации (отрицательные ионы) ионов-продуктов депротонированных молекул ХВАК (а), и ХВАОК (б).**

Наиболее интенсивны ионные переходы  $213 \rightarrow 169$  в случае ХВАК и  $185 \rightarrow 123$  и  $185 \rightarrow 149$  в случае ХВАОК, которые в дальнейшем использовали для определения данных соединений в варианте ВЭЖХ-МС-МС. Образование этих фрагментов происходит с разрушением связей С-О

иона аддукта ХВАК и молекулярного иона ХВАОК. На следующем этапе работы исследовали разделение ХВАК и ХВАОК методом ВЭЖХ. Поскольку ХВАК и ХВАОК существенно отличаются по силе как кислоты (расчетные значения  $pK_{a,ХВАК}=4.5$ ,  $pK_{a,ХВАОК}=3.0$ , ACD/ChemSketch® ver. 10.0), для определения ХВАК и ХВАОК использовались различные программы градиентного элюирования, в условиях которых удастся добиться приемлемых значений хроматографических параметров разделения для целевых веществ. В таблице 29 представлены программы градиентного элюирования, которые использовали для определения ХВАК и ХВАОК, в данных условиях коэффициенты емкости ( $k$ ) для ХВАК и ХВАОК составляют 5.6 и 0.7, соответственно. Чтобы уменьшить размывание пиков ХВАК и ХВАОК в ходе анализа, в качестве подвижной фазы использовали 0.5 % водный раствор муравьиной кислоты, которая подавляет диссоциацию кислот и в растворе ХВАК и ХВАОК присутствуют преимущественно в виде незаряженных форм.

Проводили выбор процедуры пробоподготовки мочи для определения ХВАК и ХВАОК, для этого исследовали влияние типа сорбента картриджа на пропускание ХВАК и ХВАОК. Пробы мочи подщелачивали аммиаком до pH 9 для того, чтобы перевести ХВАК и ХВАОК в анионы, которые плохо удерживаются на сорбентах картриджей, и, далее, проводили очистку образцов мочи на двух типах картриджей: Strata Screen C (смешанный сорбент с группами C8 и катионно-обменными группами) и Strata X (сорбент с привитыми группами сульфобензойной кислоты, обладающий катионно-обменными свойствами). Критерием выбора оптимального картриджа является максимальное пропускание ХВАК и ХВАОК через сорбент. Наилучших результатов удастся достигнуть при использовании картриджа Strata Screen C, для которого пропускание ХВАОК составляет более 60% и ХВАК более 90%, соответственно. Использование картриджа Strata X приводит к значительным потерям ХВАК и ХВАОК на сорбенте картриджа, что неприемлемо при определении следовых количеств ХВАК и ХВАОК в образцах мочи.

**Таблица 29. Условия хроматографического разделения для определения ХВАК и ХВАОК в водных растворах и в модельных образцах человеческой мочи. Подвижная фаза А – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В – ацетонитрил**

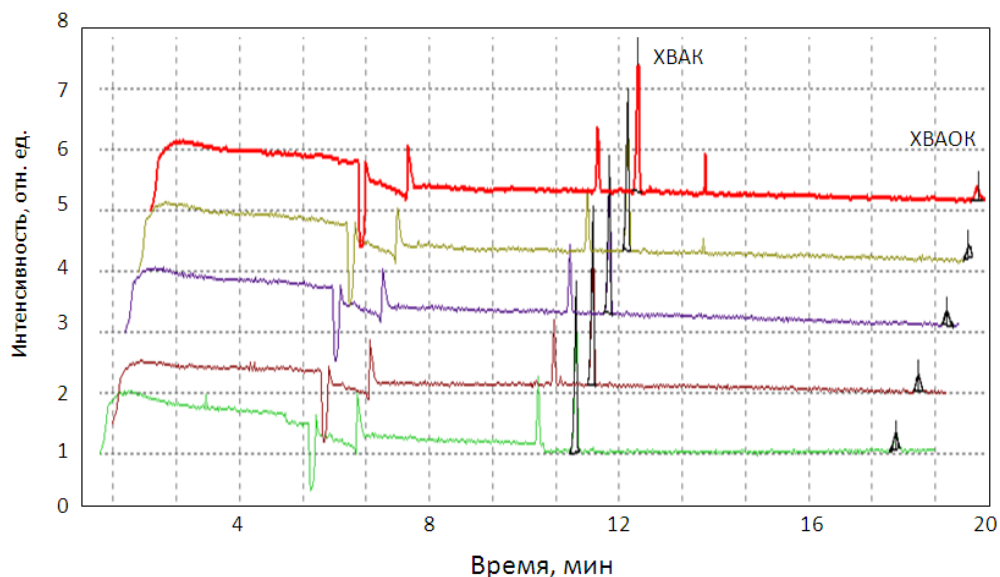
Температура термостата колонки	20 °С;
Скорость подачи элюента	0.30 мл/мин;
Программа градиентного элюирования при определении ХВАК	0.00 – 2.00 мин – 10 % В, 2.01- 9.00 мин – 10%-60% В, 9.01-10.50 мин- 60 % В, 10.51-10.80 мин- 60%-10% В, 10.81-11.80 мин – 10 % В
Программа градиентного элюирования при определении ХВАОК	0.00 – 2.00 мин – 5 % В, 1.51- 7.00 мин – 5%-70% В, 7.01-9.50 мин- 70 % В, 9.51-9.80 мин- 70%-5% В, 9.81- 11.80 мин – 5 % В

Для оценки метрологических характеристик способа определения ХВАК и ХВАОК проводили анализ образцов человеческой мочи, искусственно загрязненной ХВАК и ХВАОК. На основании полученных данных предел обнаружения в образцах человеческой мочи составил 0.3 нг/мл для ХВАК и 3 нг/мл для ХВАОК.

На этапе апробации подхода определения ХВАК и ХВАОК методом КЗЭ с прямым спектрофотометрическим детектированием было изучено мешающее влияние матрицы и

проведена проверка правильности разработанного подхода. Предложенный подход был опробован при анализе растворов смесей анализируемых веществ в реальных пробах воды (проверка правильности подхода методом «введено – найдено»).

Полученные электрофореграммы представлены на рис. 33. В качестве объектов для исследования выбирали образцы воды, существенно отличающиеся по ключевым параметрам, характеризующим химический состав – концентрациям металлов, анионов, органических веществ и другим показателям.



**Рис. 33. Наложение электрофореграмм, полученных при использовании различных реальных образцов вод в качестве матрицы, в одном масштабе. Ввод пробы – гидродинамический 180 мбар×с, буфер боратный 30 мМ (рН 9,45), внутренний диаметр капилляра = 75 мкм,  $L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$  см, напряжение - 20 кВ (анодный вариант), длина волны - 195 нм, температура - 20°C.**

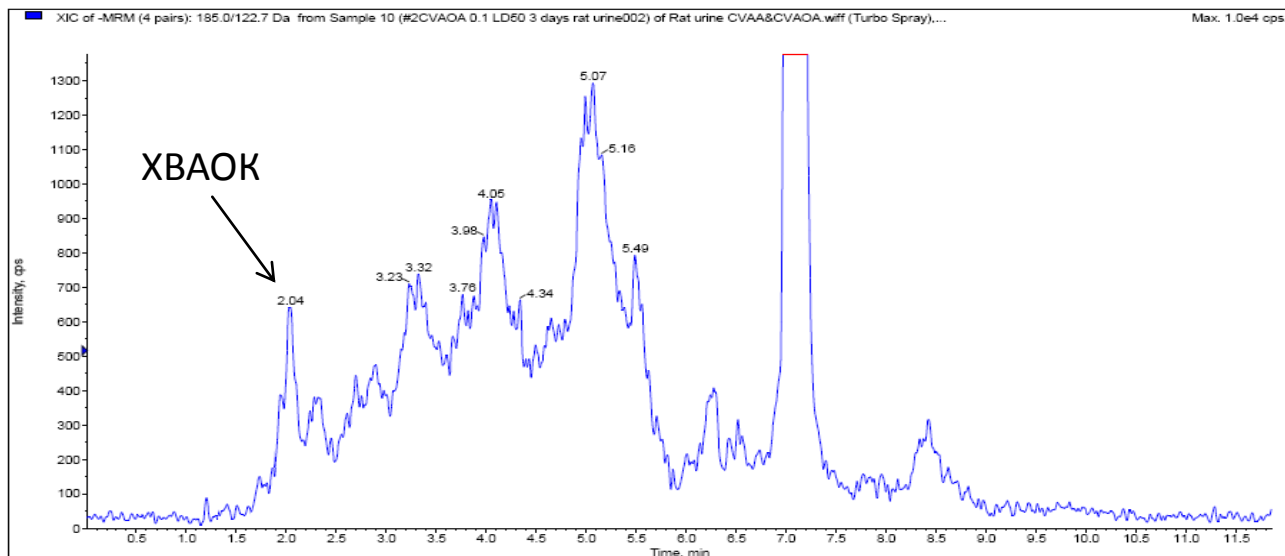
Как видно из представленных результатов мешающее влияние матрицы в четырех из пяти исследованных реальных образцах вод (кроме сточной воды, для которой матричный эффект был на уровне  $0.8 \pm 0.1$ ) практически не сказывается на определении анализируемых компонентов на уровне содержания 2 мг/л и выше. Таким образом, определению аналитов не мешает присутствие неорганических анионов, металлов, повышенные значения жесткости, мутности и цветности.

Таким образом, был разработан и апробирован на образцах природных вод новый способ определения ХВАК и ХВАОК методом капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием. Показано, что предложенный подход может быть успешно применен для скрининга ХВАК и ХВАОК в широком диапазоне концентраций в водах различных типов.

На следующем этапе провели апробацию подхода определения ХВАК и ХВАОК методом ВЭЖХ-МС-МС проводили анализ образцов крысиной мочи, отобранных в разные дни после получения дозы люизита *in vivo*. Крыс подвергали воздействию люизита в различных дозах: 0.25 LD<sub>50</sub> и 0.1 LD<sub>50</sub> (1,25 и 0,5 мг/кг соответственно). В результате исследования не удалось обнаружить ХВАК в пробах, однако на следующий день после заражения люизитом в образцах мочи крыс наблюдается интенсивный пик ХВАОК, который соответствует содержанию 20 мкг/мл. На основании полученных данных можно сделать предположение, что люизит в



организме крыс в течение первого дня с момента заражения превращается в ХВАОК через стадию образования ХВАК. Таким образом, данный способ позволяет проводить селективное и чувствительное определение ХВАК и ХВАОК (пределы обнаружения составили 0.5 нг и 3 нг в 1 мл мочи для ХВАК и ХВАОК, соответственно) в моче в течение 3 дней с момента интоксикации 0.25 LD<sub>50</sub> и 0.1 LD<sub>50</sub> люизитом (рис. 34).



**Рис. 34. Хроматограмма образца крысиной мочи на 3 день с момента получения дозы 0.1 LD<sub>50</sub> люизита.**

Таким образом, показана высокая эффективность разработанного способа анализа для подтверждения факта воздействия люизита на организм млекопитающих.

## **Выводы**

1. Получен комплекс данных об особенностях масс-спектров первого и второго порядка электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении ряда О-алкилметилфосфоновых кислот, алкилфосфоновых кислот, диалкилтауринов, продуктов превращения V-газов, тиодигликолевой кислоты, ряда продуктов ферментативного превращения иприта ( $\beta$ -лиазные аддукты), хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот и особенностях их удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии.
2. Предложены условия проведения пробоподготовки для хромато-масс-спектрометрического определения продуктов трансформации ОВ, отличающиеся простотой, экспрессностью и обеспечивающие необходимое извлечение и отделение мешающих компонентов матрицы пробы. Обоснована возможность существенного упрощения пробоподготовки образцов мочи и плазмы крови с использованием сорбционного концентрирования, а также способа ввода пробы после разбавления (техника «dilute and shoot»).
3. Предложены способы высокочувствительного определения: метилфосфоновой кислоты методом гидрофильной ВЭЖХ-МС/МС в природных водах и в экстрактах пыле-грунтовых смесей с пределом обнаружения 200 пг/мл; 2-(N,N-диалкиламино)-этансульфоновых кислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС с пределом обнаружения 25 нг/мл; тиодигликолевой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС в биологических образцах и природных водах с пределами обнаружения 50 и 10 нг/мл, соответственно; пинаколил метилфосфоновой кислоты, изобутилметилфосфоновой кислоты, изопропил метилфосфоновой кислоты и этилметилфосфоновой кислоты в биологических жидкостях в варианте обращенно-фазовой (ультра)-ВЭЖХ-МС(-МС), с пределами обнаружения 0,1, 0,4, 0,5 и 0,8 нг/мл; хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот – методом ВЭЖХ-МС-МС без использования дериватизации в образцах мочи с пределами обнаружения 3 и 0,5 нг в 1 мл мочи, соответственно; S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил)метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида в природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС с пределами обнаружения 0,3 – 50 нг/мл, 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана, а также 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с пределами обнаружения 0,05 – 5 нг/мл.
4. Разработанные способы апробированы на реальных объектах: показано, что данные подходы позволяют проводить надежное определение исследуемых продуктов трансформации ОВ в биологических жидкостях (моче и крови) лабораторных животных, которые подверглись воздействию нервно-паралитических ОВ, иприта и люизита. Подтверждена правильность их обнаружения в образцах человеческой мочи с использованием разработанных способов.
5. Изучены процессы выведения некоторых продуктов трансформации ОВ из организмов крыс и оценена ретроспективность предложенных подходов. Показано, что О-

изопропилметилфосфонат, О-пинаколил-метилфосфонат, О-изобутилметилфосфонат выводятся из организма лабораторных крыс в течение первых двух суток после интоксикации ФОВ. Метаболит иприта 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] удается надежно обнаруживать в образце крысиной мочи даже после 22 дней с момента интоксикации 5-ю мг/кг иприта. Установлено, что люизит в организме крыс в течение первого дня с момента заражения дозой 0,5 мг/кг превращается в хлорвиниларсоновую кислоту через стадию образования хлорвиниларсонистой кислоты.

6. Разработаны способы скрининга продуктов трансформации нервно-паралитических ОВ и люизита в природных водах методом капиллярного электрофореза с пределами обнаружения 0.3 – 5 мкг/мл.

### **Список статей по теме диссертации**

1. Родин И.А., Браун А.В., Ставрианиди А.Н., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. Обнаружение хлорвиниларсоновой кислоты - маркера применения люизита - методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8 №3. С. 217-224.
2. Rodin I., Braun A., Savelieva E., Rybalchenko I., Ananieva I., Shpigun O. Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteiny)ethane] in plasma and urine by liquid chromatography–negative electrospray-tandem mass spectrometry. // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. 2011. V. 34. №16. P.1676-1685.
3. Rodin I., Braun A., Stavrianidi A., Shpigun O., Rybalchenko I. Lewisite metabolites detection in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2011. V.879. №32. P. 3788-3796.
4. И. А. Родин, А. В. Браун, И. А. Ананьева, О. А. Шпигун, Е. И. Савельева, И. В. Рыбальченко, С. Л. Болотов, Г. М. Родченков Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8. № 1. С. 45-50.
5. Смирнов Р.С., Браун А.В., Ставрианиди А.Н., Родин И.А., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. Определение 2-(диалкиламино)-этансульфоновых кислот в водных объектах методом капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2012. Т.78. №4. С. 16-21.
6. Родин И.А., Браун А.В., Ставрианиди А.Н., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии. // Аналитика и контроль. 2012. Т.16. №3. С. 254-259.
7. Родин И. А., Шпигун О. А. Современные тенденции развития метода жидкостной хроматографии (обзор) // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. — 2012. — Т. 78, № 1. — С. 6–17.
8. Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А. Определение боевых отравляющих веществ и продуктов их превращения методами хромато-масс-спектрометрии (обзор). // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2013. Т. 79. №4. С. 5-13.
9. Rodin I., Stavrianidi A., Braun A., Smirnov R., Shpigun O., Rybalchenko I. New Techniques for Nerve Agent Oxidation Products Determination in Environmental Water by High-Performance

- Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS) and Capillary Electrophoresis (CE) with Direct Ultraviolet (UV) Detection. // Environmental Forensics. 2013. V.14. № 2. С. 87-96.
10. Rodin I., Braun A., Stavrianiidi A., Baygildiev T., Shpigun O., Rybalchenko I. "Dilute-and-Shoot" RSLC-MS/MS method for fast detection of nerve and vesicant chemical warfare agent metabolites in urine. // Journal of Analytical Toxicology. 2015. V.39. №1. P. 69-74.
  11. Родин И.А., Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Байгильдиев Т.М., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. Определение хлорвиниларсонистой и хлорвиниларсоновой кислот в водных объектах методом капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2015. Т. 81. №3. С. 11-16.
  12. Rodin I., Baygildiev T., Stavrianiidi A., Braun A., Rybalchenko I., Shpigun O. Hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry methylphosphonic acid determination in water samples after derivatization with p-bromophenacyl bromide. // Chromatographia. 2015. V. 78. № 7-8. P. 585-591.
  13. И. А. Родин, А. В. Браун, Т. М. Байгильдиев, И. А. Ананьева, О. А. Шпигун, И. В. Рыбальченко Определение продуктов гидролитической трансформации отравляющих веществ VX и VR в природных водах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии// Масс-спектрометрия 2015. Т. 8 №3. С. 217-224.
  14. Baygildiev T., Braun A., Stavrianiidi A., Rodin I., Shpigun O., Rybalchenko I., Ananieva I. "Dilute-and-Shoot" liquid chromatography tandem mass spectrometry method for fast detection of thiodiglycolic acid in urine. // European Journal of Mass Spectrometry. 2015. V. 21. № 5. P.733–738.
  15. Байгильдиев Т.М., Родин И.А., Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Ахмерова Д.И., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. Экспрессное определение низких содержаний метилфосфоновой кислотой методом ВЭЖХ-МС/МС. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2016. Т. 82. №2. С.5-8.
  16. Baygildiev T., Rodin I., Stavrianiidi A., Braun A., Lebedev A., Rybalchenko I., Shpigun O. Hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination in environmental samples after pre-column derivatization with p-bromophenacyl bromide. // Journal of Chromatography A. 2016. V. 1442, P. 19-25
  17. Rodin I., Braun A., Stavrianiidi A., Baygildiev T., Rybalchenko I., Shpigun O. A validated LC-MS/MS method for fast detection of thiodiglycolic acid in aqueous samples. // International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2016. V. 96. № 5, P. 436-444.

### **Благодарности**

*Выражаю искреннюю благодарность и признательность, чл.- корр. РАН, проф. О.А. Шпигуну, за постоянный интерес к работе, ценные советы и замечания при подготовке диссертации.*

*Благодарю своих бывших и нынешних аспирантов А.В. Брауна, А.Н. Ставрианиди, Т.М. Байгильдиева принимавших активное участие в выполнении отдельных этапов данной работы.*

*Выражаю свою благодарность за консультации, полезные советы и содействие в выполнении работы проф. И.В. Рыбальченко и д.х.н. Е.И. Савельевой.*