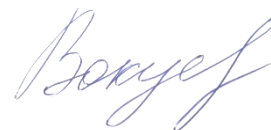


**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



ВОКУЕВ МИХАИЛ ФЁДОРОВИЧ

**ОБНАРУЖЕНИЕ РЯДА АЛКИЛФОСФОНАТОВ И ИХ
ПРОИЗВОДНЫХ В БИООБРАЗЦАХ РАСТИТЕЛЬНОГО И
ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДАМИ ХРОМАТО-
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Специальность – 1.4.2 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель: **Родин Игорь Александрович**
доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Григорьев Андрей Михайлович**
доктор химических наук
ФГБУ «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 14 отдел научно-исследовательский 1 управления научно-исследовательского испытательного,
старший научный сотрудник

Темердашев Азамат Зауалевич
доктор химических наук
ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Университет»,
старший научный сотрудник

Борисов Роман Сергеевич
кандидат химических наук
ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева Российской академии наук,
ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится « 22 » ноября 2023 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.5 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, аудитория 446.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.5/2625>

Автореферат разослан « » октября 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ананьева И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Хранение, применение, производство и транспортировка отравляющих веществ (ОВ) запрещены Конвенцией о запрещении химического оружия. Тем не менее, в последние десятилетия наблюдаются неоднократные случаи применения фосфорорганических ОВ нервно-паралитического действия (НПОВ) против мирного населения, в основном, в результате террористических атак или региональных конфликтов, вызванных политической нестабильностью в некоторых странах. Особую сложность представляет проведение расследований таких происшествий, прежде всего сбор доказательной базы. Важными уликами в таких расследованиях являются образцы с места происшествия, которые исследуются с использованием современных физико-химических методов анализа. Однако, далеко не всегда представляется возможность для незамедлительного отбора проб, что усложняет расследование инцидентов применения химического оружия (ХО) (или усложняет процедуру установления факта применения ОВ). Учитывая высокую опасность и токсичность отравляющих веществ, а также высокую скорость их деградации, актуальной задачей является разработка современных подходов для выявления фактов применения запрещенных соединений, характеризующихся высокой ретроспективностью и чувствительностью. Быстрая трансформация исходных ОВ затрудняет их прямое обнаружение и поэтому для подтверждения фактов воздействия используются устойчивые и специфичные продукты превращения – маркеры.

Для обнаружения маркеров применения ОВ в настоящее время предпочтение отдается методам масс-спектрометрии (МС) в сочетании с газовой хроматографией (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Для расследования инцидентов с вероятным использованием ОВ лучше всего подходят универсальные многокомпонентные методики для обнаружения широкого круга маркеров применения. Однако низкая молекулярная масса продуктов деструкции НПОВ и их высокая полярность осложняют их прямое совместное определение как методом ГХ, так и методом ВЭЖХ. Более того, учитывая сложность состава биологических образцов, таких как кровь и моча, необходимым является использование дополнительных процедур экстракции или дериватизации для улучшения аналитических характеристик разрабатываемых методик.

В данной работе предложено несколько новых ВЭЖХ-МС подходов для обнаружения и определения в объектах растительного и животного происхождения

низкомолекулярных продуктов деструкции НПОВ из класса фосфорорганических кислот: метилфосфоновой кислоты (МФК), этилфосфоновой кислоты (ЭФК), изопропилфосфоновой кислоты (иПФК), *n*-пропилфосфоновой кислоты (нПФК), этиловый эфир МФК или этилметилфосфоновая кислота (ЭМФК), изопропиловый эфир МФК или изопропилметилфосфоновая кислота (иПМФК), изобутиловый эфир МФК или изобутилметилфосфоновая кислота (иБМФК), пинаколиловый эфир МФК или пинаколилметилфосфоновая кислота (ПинМФК), циклогексильный эфир МФК или циклогексилметилфосфоновая кислота (цГМФК)). Также предложен универсальный реагент для дериватизации – *n*-метоксифенацилбромид (ПМФБ), подходящий для совместного определения маркеров НПОВ как методом ВЭЖХ, так и ГХ. При использовании ненаправленного метаболомного профилирования образцов мочи крыс, подвергнутых подкожному отравлению заринном, предложены новые потенциальные биомаркеры, наличие которых свидетельствует об остром токсикологическом отравлении.

Цель работы

Разработка новых способов одновременного обнаружения и определения маркеров применения НПОВ в биообразцах, включая образцы животного и растительного происхождения, методом ВЭЖХ-МС/МС, а также ГХ-МС/МС с предварительной дериватизацией.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Предложить дериватирующий реагент, образующий производные с фосфоновыми кислотами, которые возможно детектировать двумя независимыми методами – ГХ- и ВЭЖХ-МС/МС, а также изучить закономерности ионизации и фрагментации производных.

2. Изучить влияние различных факторов на выход реакции дериватизации алкилфосфоновых (АФК) и алкилметилфосфоновых кислот (АМФК) *n*-метоксифенацил бромидом и выбрать оптимальные условия проведения дериватизации при использовании полнофакторного экспериментального дизайна.

3. Разработать ВЭЖХ-МС/МС способ совместного обнаружения и определения АФК и АМФК в биологических жидкостях при использовании хроматографической колонки с многофункциональным сорбентом с гидрофильным покрытием.

4. Разработать ВЭЖХ-МС/МС способ совместного обнаружения и определения МФК и АМФК в биологических жидкостях, растениях и почве, при использовании

хроматографической колонки с многофункциональным сорбентом с гидрофобным покрытием.

5. Изучить возможность использования ненаправленного метаболомного профилирования для поиска новых потенциальных биомаркеров отравления фосфорорганическими ОВ.

Научная новизна

Продемонстрирована возможность применения *n*-метоксифенацил бромида в качестве дериватирующего реагента по отношению к широкому кругу алкилфосфонатов (ЭМФК, иПМФК, иБМФК, ПинМФК) для одновременного масс-спектрометрического определения продуктов дериватизации с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и ГХ.

Разработан подход для совместного определения АФК и АМФК в моче с помощью анионообменника на основе полистирол-дивинилбензола (ПСДВБ) с ковалентно-связанными четвертичными аммониевыми группами методом ВЭЖХ-МС/МС. Изучен механизм удерживания АФК и АМФК на данном сорбенте, выявлено проявление обращенно-фазового механизма удерживания для наиболее неполярных АМФК.

Разработан способ одновременного определения МФК и АМФК в моче, растениях и почве методом ВЭЖХ-МС/МС с применением хроматографической колонки SIELC SB смешанного типа удерживания (обращенно-фазовый и анионообменный).

Проведено ненаправленное метаболомное профилирование мочи крыс, подвергнутых подкожному отравлению заринном. В результате предложены 5 новых потенциальных биомаркеров биологической реакции на отравление.

Практическая значимость

Разработаны и валидированы методики ВЭЖХ-МС/МС определения АФК и АМФК в биообразцах, включая образцы животного и растительного происхождения, включающие предварительное выделение и очистку методом ТФЭ, на разном масс-спектрометрическом оборудовании при использовании различных хроматографических колонок. Разработанные методики могут найти применение в лабораториях, аккредитованных ОЗХО.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование *n*-метоксифенацил бромида в качестве дериватизирующего реагента в присутствии триэтиламина позволяет проводить одновременное определение АФК методами ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС.

2. Оптимизация условий реакции дериватизации АФК и АМФК с ПМФБ позволила достичь высокой чувствительности одновременного обнаружения АФК и АМФК методом ВЭЖХ-МС/МС (0,2 и 0,1 нг/мл, соответственно).

3. При использовании многофункциональных сорбентов для ВЭЖХ удерживание АФК и АМФК происходит в смешанном режиме благодаря гидрофобным и анионообменным взаимодействиям, что позволяет добиться при разработке ВЭЖХ-МС/МС способа совместного определения высокой прецизионности и чувствительности анализа (на уровне единиц нг/мл).

4. Применение ненаправленного метаболомного профилирования образцов мочи крыс, отравленных зарин, позволило обнаружить новые потенциальные эндогенные биомаркеры.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов подтверждается применением современного хроматографического и масс-спектрометрического оборудования, осуществлением обработки полученных результатов методами математической статистики, допустимой воспроизводимостью и правильностью экспериментальных данных.

Соответствие паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.2 – Аналитическая химия по областям исследований:

- методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.);

- анализ объектов окружающей среды;

- теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на следующих конференциях:

2019 год: 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Шиофок, Венгрия, 11 – 13 сентября 2019; III Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием, Краснодар, Россия, 29

сентября - 5 октября 2019; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», Москва, Россия, 8 - 12 апреля 2019.

2020 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», Москва, Россия, 10 - 27 ноября 2020.

2021 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», Москва, Россия, 12 – 23 апреля 2021; VI Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием, Краснодар, Россия, 26 сентября – 2 октября 2021.

2022 год: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022», Москва, Россия, 11 – 22 апреля 2022; IV Съезд аналитиков России, Москва, Россия, 25 сентября – 1 октября 2022.

Публикации

По материалам работы опубликовано 13 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ, представлено 8 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе литературных данных по теме работы, постановке цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов, а также в подготовке к публикации результатов проведенных исследований. Представленные результаты исследования получены лично автором или под его руководством. Обработку данных для метаболомного исследования проводил к.х.н. Плющенко И.В.

Структура и объем работы

Работа имеет следующую структуру: список использованных сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение (представлены в четырех главах), заключение, выводы, список использованной литературы. Текст работы содержит 142 страницы, включая 38 рисунков и 21 таблицу. В списке литературы 210 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении описана актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и поставленные задачи, раскрыта научная новизна работы, показана ее научно-практическая значимость, обозначены степень достоверности, степень апробации работы, публикации по теме исследования, структура и объем.

Обзор литературы

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором обобщены основные методы пробоподготовки и хроматографического определения маркеров фосфорорганических ОВ в объектах окружающей среды и биологических жидкостях. В первом разделе обзора литературы приведены общие сведения об алкилфосфонатах и основные способы пробоподготовки образцов для анализа. Во втором разделе описаны подходы к определению маркеров НПОВ при использовании газовой хроматографии – масс-спектрометрии. В третьем разделе рассмотрены основные варианты жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией для определения маркеров применения НПОВ. В четвертом разделе рассмотрены немногочисленные работы, в которых используется ненаправленный анализ для поиска новых ранее неизученных соединений – потенциальных маркеров применения ОВ. На основании обзора литературы сделаны выводы, которые подтверждают актуальность выбранной темы исследования и способов решения поставленных задач.

Экспериментальная часть

Во второй главе перечислены реагенты и оборудование, использованные в работе, описаны техника и методики экспериментов.

В качестве аналитов использовали стандарты фосфорорганических кислот с чистотой > 98% (Sigma Aldrich, США): МФК, ЭФК, нПФК, иПФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК и ПинМФК. В качестве внутренних стандартов использовали дейтерированные аналоги: d3-МФК, d3-ЭМФК, d3-иПМФК, d3-иБМФК, d3-цГМФК и d3-ПинМФК, с чистотой > 95% (структура и чистота подтверждена методом спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{31}P).

Для задач обнаружения и определения фосфорорганических кислот с предварительной дериватизацией ПМФБ использовали газовый хроматограф «HP 7890A» (Agilent Technologies, США) в сочетании с времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения Q-TOF 7200 (Agilent Technologies, США), оборудованный источником электронной ионизации, а также ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из гибридного тандемного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Qtrap 3200 (ABSciex, Канада) с линейной ионной ловушкой, оснащенного источником электрораспылительной ионизации; и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для анализа при совместном присутствии АФК и АМФК в моче, растениях и почве использовали жидкостные тандемные квадрупольные масс-спектрометры с электрораспылительной ионизацией двух разных фирм-производителей: Qtrap 3200 (ABSciex, Канада) и LCMS-8050 (Shimadzu, Япония).

Для метаболомных исследований использовали приборы Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония) с заявленным разрешением >10000 и аналитическую станцию, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific, США), совмещенную с масс-спектрометром Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, США) с разрешением не менее 30000.

Для хроматографического разделения использовали следующие колонки: Acclaim RSLC C18 120 Å (150 × 2,1 мм) с размером зерна сорбента 3 мкм (Dionex, США); Shimpack GISS C18 (100 × 2,1 мм) с размером зерна сорбента 1.8 мкм (Shimadzu, Япония); Primesep SB (SIELC Technologies, США) с многофункциональным сорбентом с гидрофобным покрытием и привитыми основными четвертичными аммониевыми группами со следующими параметрами: размер пор – 100 Å, длина 150 мм, внутренний диаметр – 2,1 мм, размер частиц – 3 мкм; колонка, заполненная сорбентом ВТМА на основе гидрофобной матрицы сополимеров стирола и дивинилбензола с разветвленным гидрофильным функциональным слоем, содержащим четвертичные аммониевые фрагменты, который синтезирован в лаборатории хроматографии химического факультета МГУ (степень сшивания: 50%, размер частиц: 5,5 мкм, площадь поверхности: 670 м²/г, средний размер пор: 100 Å, размеры 100 мм × 4 мм); газохроматографическая кварцевая капиллярная колонка DB-5MS (Agilent Technologies, США) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм с неподвижной жидкой фазой толщиной 0,25 мкм.

Результаты и их обсуждение

Результаты и их обсуждение представлены в главах 3–6 диссертации.

Третья глава посвящена совместному определению АФК и АМФК методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией. В качестве дериватирующих реагентов, потенциально подходящих для дериватизации АФК и АМФК с возможностью обнаружения продуктов дериватизации сразу двумя методами (ГХ-МС и ВЭЖХ-МС) были предложены 7 соединений схожего строения (Рис.1), с которыми реакция дериватизации АФК и АМФК имеет одинаковый механизм: реакция между АФК и АМФК с выбранными дериватирующими реагентами протекает по S_N2 механизму – атом галогена в молекуле реагента нуклеофильно замещается атомом кислорода гидрокси-группы кислот. В случае АФК продуктов реакции может быть два, поскольку молекулы АФК содержат две гидрокси-группы. В случае же АМФК, когда атом водорода одной ОН-группы АФК замещен на алкильную группу, продукт реакции может быть только один.

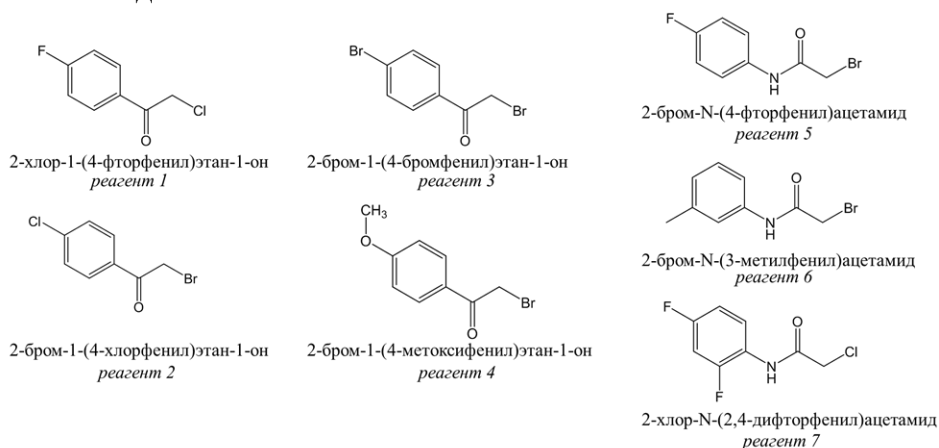


Рис.1. Структуры дериватирующих реагентов

В процессе выбора наилучшего дериватирующего реагента, позволяющего достичь большей чувствительности обнаружения АФК и АМФК в виде продуктов дериватизации, проводили предварительный эксперимент на примере МФК и иБМФК. Готовили растворы в ацетонитриле смеси двух кислот с концентрацией 1 мкг/мл и проводили дериватизацию всеми выбранными реагентами в одинаковых условиях. Далее анализировали полученные растворы методом ОФ-ВЭЖХ-МС и сравнивали интенсивности пиков образовавшихся продуктов дериватизации на хроматограммах, полученных в режиме сканирования. Наибольшая чувствительность продуктов дериватизации наблюдалась для реагента 4 (2-бром-1-(4-метоксифенил)этан-1-он или *n*-метоксифенацилбромид (ПМФБ)), поэтому для дальнейшего исследования возможностей хромато-масс-спектрометрического обнаружения продуктов дериватизации АФК и АМФК выбрали именно его.

Для улучшения аналитических характеристик подбирали наиболее оптимальные условия проведения реакции, изучали закономерности ионизации и фрагментации производных АФК и АМФК с ПМФБ при использовании тандемной масс-спектрометрии в режимах ГХ и ВЭЖХ.

Для разработки способа ВЭЖХ-МС/МС определения АФК и АМФК в виде производных с ПМФБ на первом этапе изучали закономерности ионизации и фрагментации продуктов реакции. В режиме регистрации положительно заряженных молекул для всех производных АМФК характерно присутствие в масс-спектре сигналов протонированных молекул (рис. 2в), которые частично подвергались фрагментации с образованием протонированной молекулы производного МФК с m/z 245. В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов было обнаружено, что депротонированные молекулы продуктов дериватизации АМФК нестабильны (рис. 2г), так как в масс-спектрах наблюдались только сигналы, соответствующие депротонированным молекулам исходных кислот.

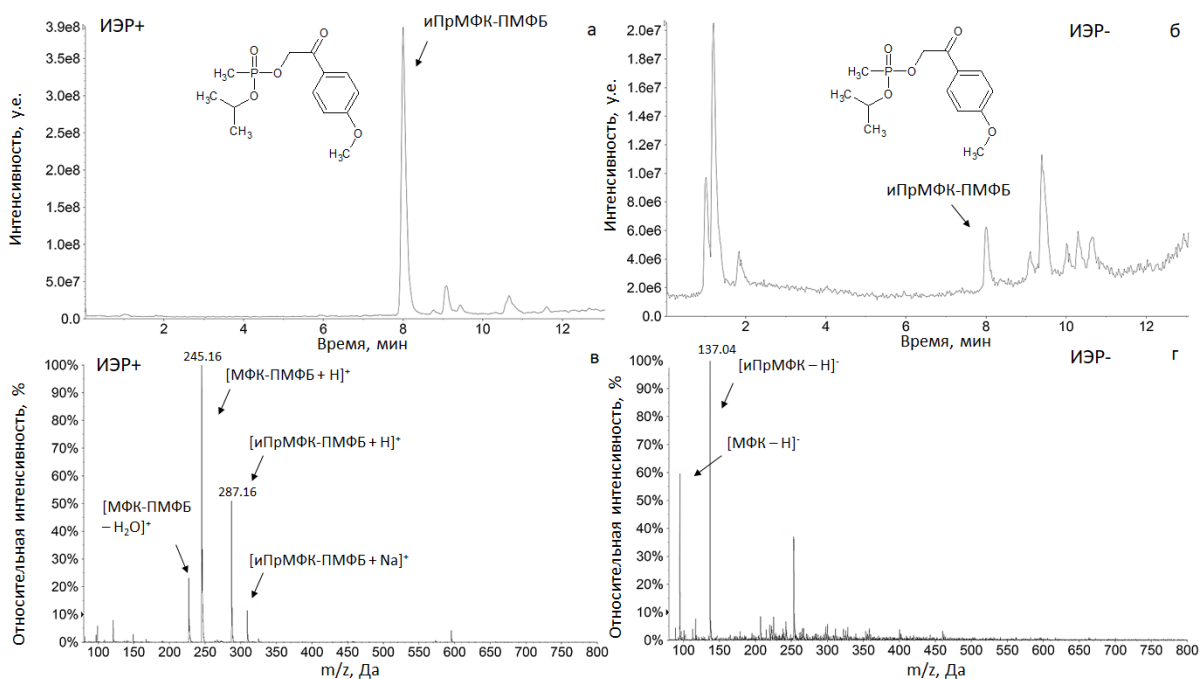


Рис.2. Хроматограммы деривата иПрМФК в режиме регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов. Масс-спектры деривата иПрМФК в режиме регистрации положительно (в) и отрицательно заряженных ионов (г).

Аналогичная закономерность при образовании ионов в источнике ИЭР была замечена и для АФК (рис. 3). Протонированные молекулы производных АФК по двум ОН-группам были зарегистрированы в режиме регистрации положительных ионов (рис. 3д) и также были нестабильны в режиме регистрации отрицательно заряженных молекул (рис. 3е). Однако в случае производных АФК по одной ОН-группе в обеих полярностях в масс-спектрах были зарегистрированы сигналы, отвечающие молекулярным ионам: в режиме регистрации отрицательных ионов – депротонированная молекула АФК-ПМФБ (рис. 3г), в режиме положительно заряженных ионов – протонированная (рис. 3в). Такое поведение может объясняться наличием в структуре производных одной непрореагировавшей гидроксильной группы, которая в условиях ИЭР может существовать как в депротонированной, так и в протонированной форме. Таким образом, для совместного ВЭЖХ-МС определения АФК и АМФК с предварительной дериватизацией наиболее выгодным является режим регистрации положительно заряженных молекул, так как все продукты дериватизации могут быть зарегистрированы одновременно в виде ионов $[M+H]^+$.

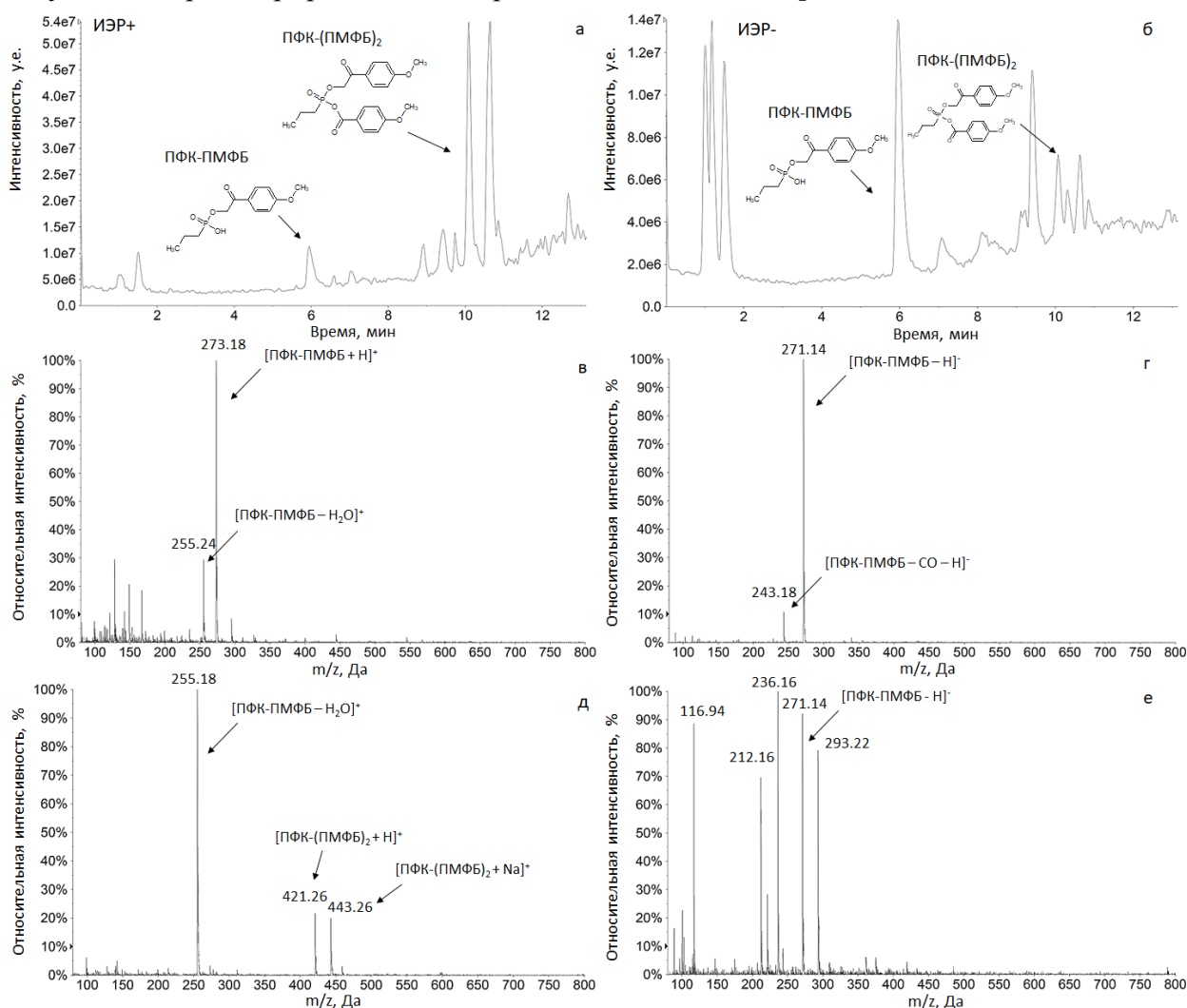


Рис.3. Хроматограммы производных ПФК с ПМФБ в режиме регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов (ионизация электрораспылением). Масс-спектры производных ПФК по одной ОН-группе (в) и двум ОН-группам (д) в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Масс-спектры производных ПФК по одной ОН-группе (г) и двум ОН-группам (е) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.

Далее для повышения чувствительности МС-детектирования выбирали наиболее интенсивные ионы-продукты для каждого аналита, и оптимизировали значения потенциала декластеризации (ПД) и энергии соударения (ЭС). Таким образом, полученные параметры (Табл. 1) использовали для ВЭЖХ-МС/МС определения АФК и АМФК в виде производных с ПМФБ.

Таблица 1. Оптимизированные условия МС-детектирования продуктов реакции дериватизации

Аналит	m/z (1), Да	m/z (2), Да	ПД, В	ЭС, В	t _R , мин	Тип реакции
ЭМФК-ПМФБ	273	121	40	30	7,4	определение
		149		17		подтверждение
иПМФК-ПМФБ	287	121	45	35	8,0	определение
		149		20		подтверждение
ПинМФК-ПМФБ	329	245	35	15	10,1	определение
		149		22		подтверждение
иБМФК-ПМФБ	301	121	40	35	9,0	определение
		149		23		подтверждение
МФК-ПМФБ	245	121	40	20	4,5	определение
		149		35		подтверждение
МФК-(ПМФБ) ₂	393	227	40	20	8,8	определение
		121		60		подтверждение
ЭФК-ПМФБ	259	121	40	27	5,1	определение
		149		15		подтверждение
ЭФК-(ПМФБ) ₂	407	241	30	10	9,5	определение
		121		50		подтверждение
(н-, и-)ПФК-ПМФБ	273	121	40	30	5,9	определение
		149		17		подтверждение
(н-, и-)ПФК-(ПМФБ) ₂	421	255	40	10	10,0	определение
		121		50		подтверждение

Также изучены закономерности фрагментации производных АФК и АМФК при использовании ГХ-МС/МС при электронной ионизации (ЭИ), а также выбраны оптимальные МРМ-переходы. При изучении масс-спектров электронной ионизации было выявлено, что производные АФК с ПМФБ нельзя анализировать методом ГХ-МС. Это может быть связано с высокой полярностью и низкой летучестью продуктов дериватизации по одной ОН-группе, и слишком высокой молекулярной массой продуктов дериватизации по двум ОН-группам. Для производных АМФК с ПМФБ удалось получить масс-спектры, важной особенностью которых является наличие молекулярных ионов производных (рис. 4), что ранее не удавалось наблюдать для дериватов АМФК с традиционными дериватирующими реагентами. Молекулярные ионы могут быть использованы для количественного анализа в режиме тандемной масс-спектрометрии, а также для идентификации выбранных аналитов. При фрагментации пиков молекулярных ионов в МС² спектрах производных АМФК наиболее интенсивным является сигнал с m/z 135, который является фрагментом молекулы ПМФБ и также присутствует в МС¹ спектрах производных АМФК, поэтому именно он был выбран в качестве иона-продукта для селективных переходов: ЭМФК-ПМФБ m/z 272 → 135.0441, иПМФК-ПМФБ m/z 286 → 135.0441, иБМФК-ПМФБ m/z 300 → 135.0441, ПинМФК-ПМФБ m/z 328 → 135.0441. Для выбранных переходов подбирали наиболее оптимальные значения ЭС. Регистрировали показания детектора для

выбранных переходов в зависимости от ЭС и выбирали значение ЭС, при котором наблюдалась максимальная интенсивность.

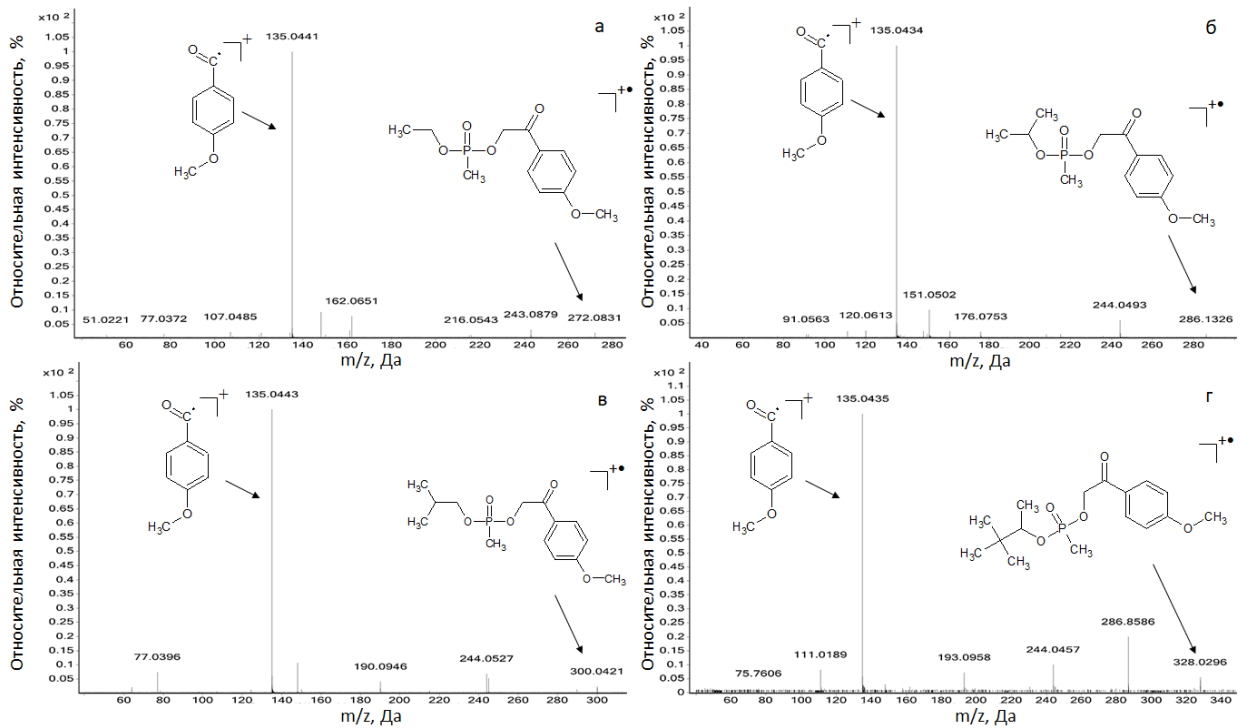
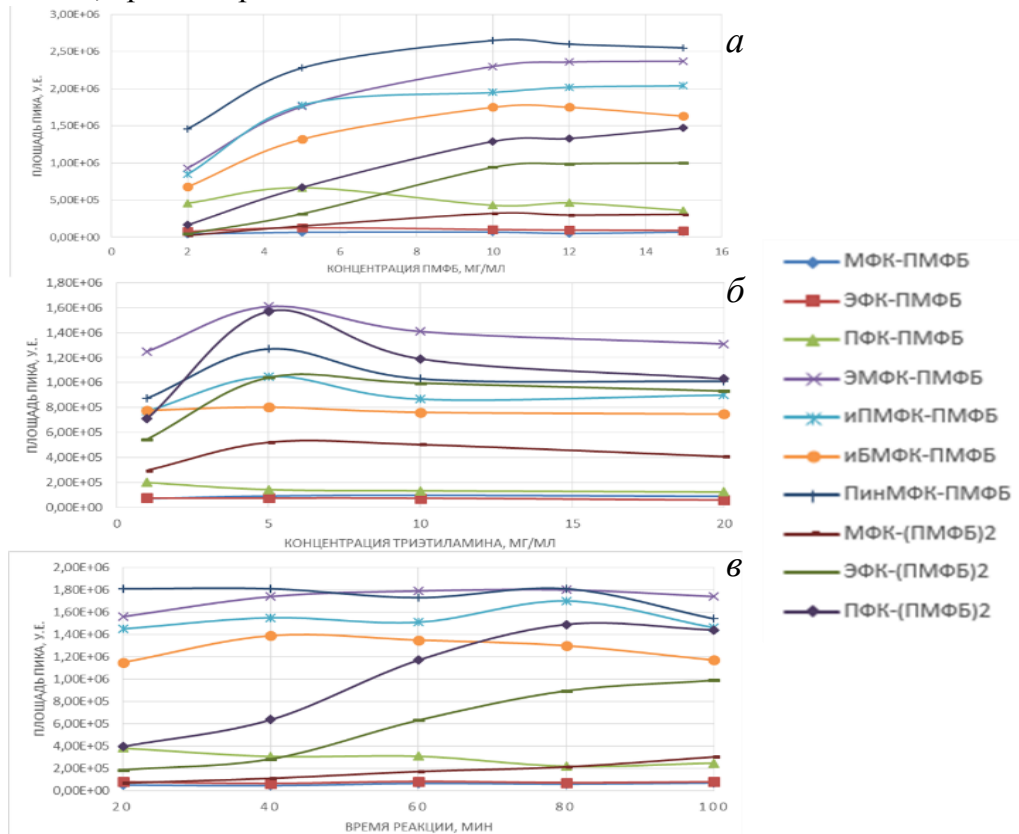


Рис. 4. Масс-спектры электронной ионизации ЭМФК-ПМФБ (а), иПрМФК-ПМФБ (б), иБуМФК-ПМФБ (в) и ПинМФК-ПМФБ (г)

Для детальной оптимизации условий реакции дериватизации АФК и АМФК с ПМФБ использовали полнофакторный экспериментальный дизайн 3^3 наряду с предварительной однофакторной оптимизацией параметров (рис. 5): концентрации ПМФБ и триэтиламина, времени реакции.

Рис. 5. Зависимости площадей пиков производных АФК и АМФК с ПМФБ от значений концентрации ПМФБ (а), концентрации триэтиламина (б), времени реакции (в)



Используя статистический показатель, позволяющий оценить суммарный выход реакции, и полнофакторный экспериментальный дизайн, были выбраны следующие оптимальные условия проведения реакции дериватизации АФК и АМФК с ПМФБ: время термостатирования – 120 минут, концентрация ПМФБ – 5 мг/мл, концентрация триэтиламина – 10 мг/мл.

При применении дериватизации для ГХ и ВЭЖХ определения маркеров в моче использовали твердофазную экстракцию (ТФЭ) для извлечения аналитов и уменьшения матричного влияния. Сравнивали два полярных сорбента на основе силикагеля. После ТФЭ проводили дериватизацию и анализ. Проводили оценку чувствительности разработанного способа определения АФК и АМФК в моче. Значения ПО и НОК для ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС приведены в табл. 2. Воспроизводимость и правильность оценивали методом «введено-найдено» на трех уровнях концентраций.

Таблица 2. ПО и НОК, достигнутые методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией ПМФБ

Метод	Вещество в форме производного	ПО, нг/мл	НОК, нг/мл
ГХ	ЭМФК-ПМФБ	70	200
	иПМФК-ПМФБ	70	200
	иБМФК-ПМФБ	50	150
	ПинМФК-ПМФБ	50	150
ВЭЖХ	МФК-(ПМФБ) ₂	0,4	1,0
	ЭФК-(ПМФБ) ₂	0,4	1,0
	ПФК-(ПМФБ) ₂	0,2	0,5
	ЭМФК-ПМФБ	0,1	0,3
	иПМФК-ПМФБ	0,1	0,3
	иБМФК-ПМФБ	0,1	0,3
	ПинМФК-ПМФБ	0,1	0,3

Четвертая глава посвящена совместному определению АФК и АМФК методом ВЭЖХ-МС/МС при использовании анионообменника на основе ПСДВБ с гидрофильным функциональным слоем, содержащим четвертичные аммониевые группы. В качестве внутренних стандартов использованы изотопно-меченные дейтерием аналоги аналитов. В данной главе использовали два жидкостных масс-спектрометра разных производителей (Sciex 3200 и Shimadzu-8050).

Изучены закономерности электрораспылительной ионизации АФК и АМФК, а также столкновительной фрагментации (Рис. 6). Выбраны наиболее интенсивные МРМ-переходы для каждого аналита и дейтерированного аналога, а также оптимальные значения ПД и ЭС.

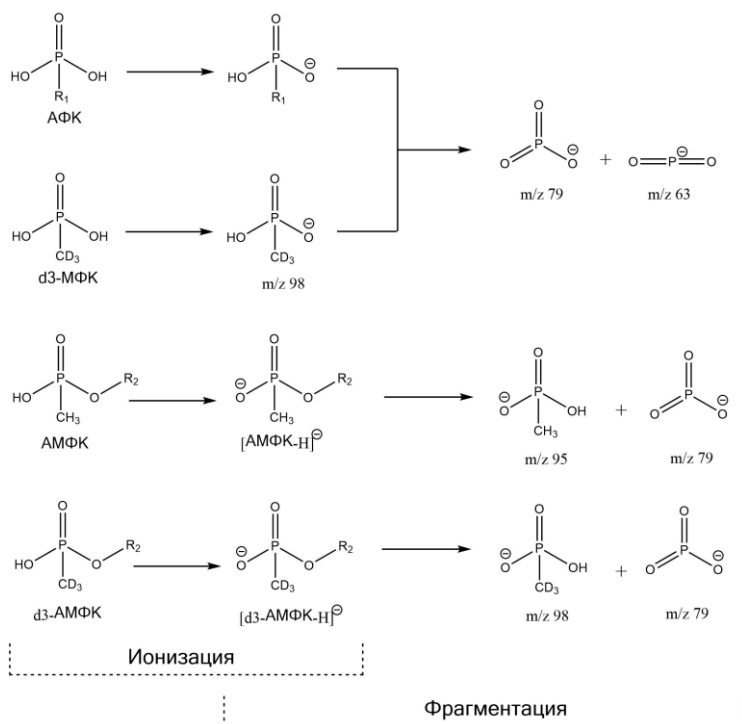


Рис. 6. Схема ионизации и фрагментации АФК и АМФК и дейтерированных аналогов (R1 – метил, этил, и-пропил, н-пропил, R2 – этил, и-пропил, и-бутил, пинаколил, ц-гексил).

Изучено влияние модификаторов подвижной фазы (ацетата аммония и ацетонитрила) на удерживание аналитов. Для изучения вклада гидрофобных и ионообменных взаимодействий при удерживании различных по полярности кислот строили зависимости логарифма факторов удерживания от логарифма концентрации ацетата аммония (рис. 7а). Из рис. 7 видно, что

угловые коэффициенты по модулю уменьшаются в ряду АФК-АМФК, что может указывать на то, что для АМФК в удерживание больший вклад вносят неполярные взаимодействия. Рис. 7а,б подтверждают значительно большую зависимость факторов удерживания АМФК от содержания ацетонитрила в ПФ, в то время как коэффициенты удерживания АФК изменяются в небольшом диапазоне с увеличением концентрации ацетонитрила. Исходя из этого был сделан вывод о смешанном режиме удерживания аналитов: АФК в основном удерживаются ионообменными взаимодействиями, а АМФК – неполярными. Также выбраны оптимальные условия хроматографического разделения.

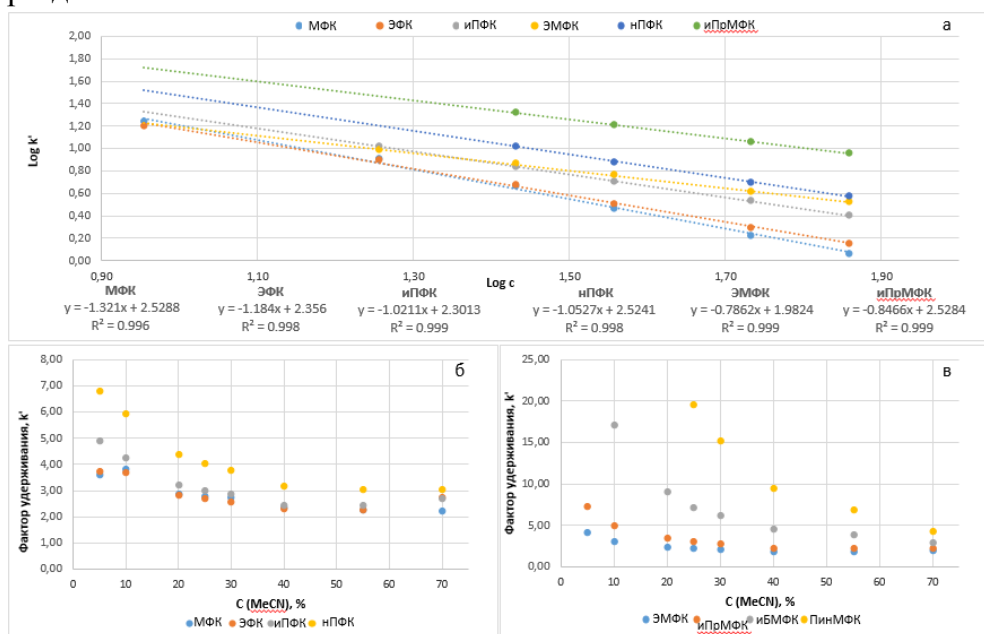


Рис. 7. Зависимость логарифма факторов удерживания АФК и некоторых АМФК от логарифма концентрации $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ в ПФ (а). Зависимости факторов удерживания АФК (б) и АМФК (в) от объемной доли ацетонитрила в ПФ (концентрация ацетата аммония равнялась 27 мМ)

Для извлечения АФК и АМФК из мочи использовали анионообменный сорбент для ТФЭ CHROMABOND SB. В результате подбора условий для количественного

извлечения аналитов из водосодержащих объектов с помощью ТФЭ картриджа SB была выбрана следующая процедура экстракции: кондиционирование – 3 мл ацетонитрила и 3 мл воды, загрузка – 1,2 мл разбавленной в два раза мочи, промывка – 1 мл воды и 2 мл 0,0025% аммиака в смеси вода-ацетонитрил 30:70% (об), элюирование – 1 мл 2,5 % водно-ацетонитрильного (50-50% об.) раствора аммиака.

Достигнутые пределы обнаружения АФК и АМФК в моче составили от 0,3 до 5 нг/мл. Разработанный способ определения АФК и АМФК в моче был валидирован и апробирован на образцах мочи людей, в которые вносили неизвестные количества некоторых маркеров. В результате в образцах обнаружены иПМФК и цГМФК (Рис. 8) на уровнях концентраций 30 и 6 нг/мл, соответственно.

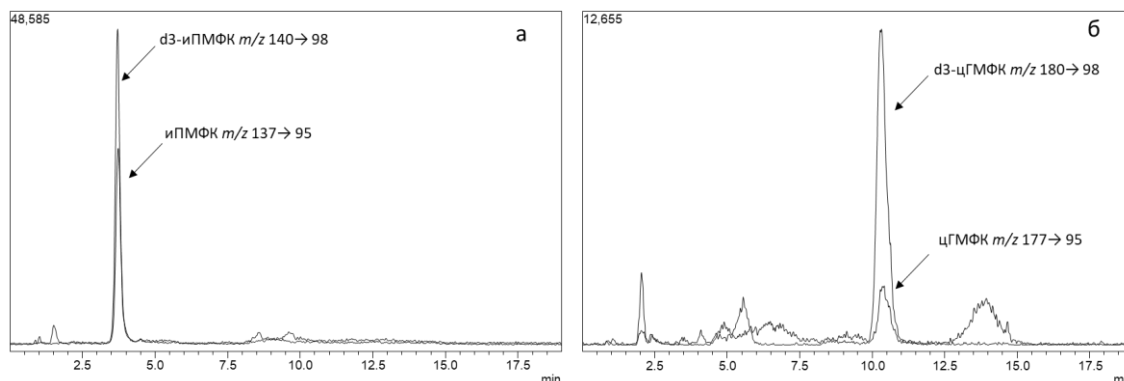


Рис. 8. МРМ-хроматограммы образцов 1 (а) и 2 (б), полученные при использовании Shimadzu-8050.

Пятая глава диссертации посвящена разработке способа совместного ВЭЖХ-МС/МС определения МФК и АМФК в моче крыс, почве и растении *Hedera Helix*, при использовании хроматографической колонки смешанного типа удерживания Primesep SB.

В первом разделе выбирали условия для хроматографического разделения аналитов. В качестве подвижных фаз использовали аммонийно-формиатные буферы в водно-ацетонитрильной смеси. В результате для градиентного элюирования выбраны следующие составы фаз: А — 20мМ раствор формиата аммония в смеси ацетонитрил-вода (30 : 70 % об.) при pH 3,4, Б – 40мМ раствор формиата аммония в смеси ацетонитрил-вода (70 : 30 % об.) при pH 4,4. На рис. 9 представлена МС-хроматограмма смеси фосфоновых кислот при подобранных условиях.

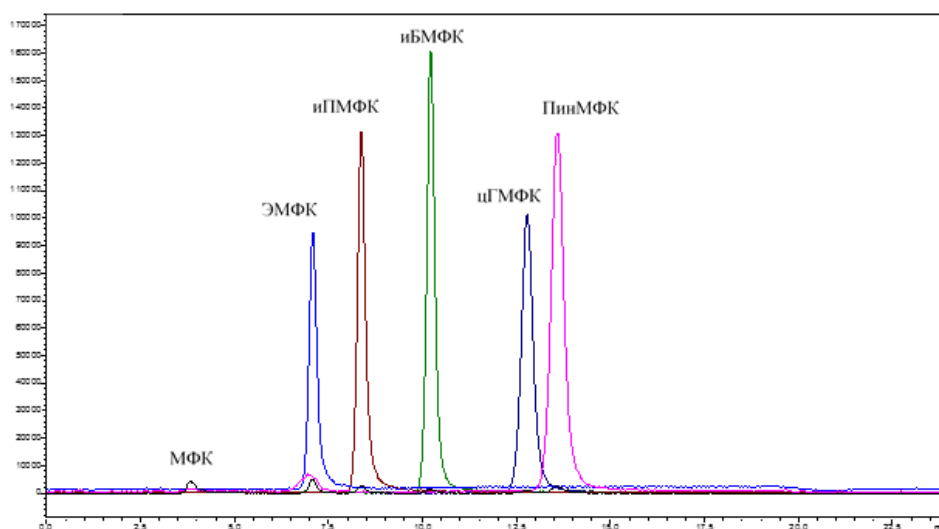


Рис. 9. Масс-хроматограмма МФК и АМФК, полученная при выбранных условиях для колонки SIELC Primesep SB (Shimadzu LCMS-8050).

Во втором разделе разработанный способ использовали для анализа мочи крыс, отравленных заринном подкожно. После отравления мочу отбирали в течение 4 недель, через 27 дней проводили повторное отравление и отбор мочи. Полярный ТФЭ сорбент на основе силикагеля применяли для извлечения маркеров зарина – МФК и иПМФК. Определены основные аналитические характеристики подхода, такие как ПО, НОК, правильность, воспроизводимость, степень извлечения и матричный эффект. МФК в моче не была обнаружена, что может быть связано с достаточно высоким ПО (50 нг/мл). Концентрация иПМФК в моче (табл. 3) была достаточна для обнаружения разработанным способом в образцах, отобранных только в течение 1-5 дней после отравления, а также после повторного отравления.

Таблица 3. Измеренная концентрация иПМФК (нг/мл) в моче крыс после отравления заринном (n = 3, p = 95%)

		Номер крысы				
		1	2	3	4	5
Дней после отравления	1	1060 ± 40	2200 ± 100	1050 ± 60	1710 ± 170	1720 ± 130
	4	99 ± 6	88 ± 10	43 ± 4	67 ± 9	102 ± 20
	5	< ПО	5,8 ± 1,4	< ПО	< ПО	< ПО
	6-26	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО	< ПО
	27 (повторное отравление)	850 ± 70	940 ± 80	549 ± 32	1080 ± 120	538 ± 21

В третьем разделе выбранные условия хромато-масс-спектрометрического детектирования использованы для анализа растения *Nedera Helix*, произрастающего в отравленной биомаркерами почве, и почвы. Для извлечения МФК и АМФК из объектов применяли жидкостную экстракцию водно-ацетонитрильной смесью при ультразвуковом воздействии. В случае растения, предварительно проводили гомогенизацию материала перетиранием в ступке при замораживании жидким азотом. Степени извлечения для всех аналитов находились в пределах от 84 до 101%, что подтверждает практически полное извлечение анализируемых маркеров из растений и почвы. При оценке матричного эффекта выявлено, что матричные компоненты растений оказывают существенное негативное влияние на определение МФК и АМФК, в то время как матричные компоненты почвы слабо влияют на определение. Для компенсации матричного эффекта применяли дейтерированные внутренние стандарты. Предложенный подход был также валидирован. В результате анализа растений, прорастающих в загрязненной почве в течение 1, 2 и 4 недель, а также самой загрязненной почвы, во всех образцах были обнаружены исследуемые маркеры (рис. 10). Содержание всех анализируемых маркеров в растении спустя 4 недели после загрязнения почвы было выше, чем в растении, собранном спустя 1 неделю, что свидетельствует о накоплении МФК и АМФК в организме растения, которое растет в загрязненной почве. Таким образом, растения могут использоваться в качестве дополнительных объектов исследования для подтверждения фактов применения ОВ.

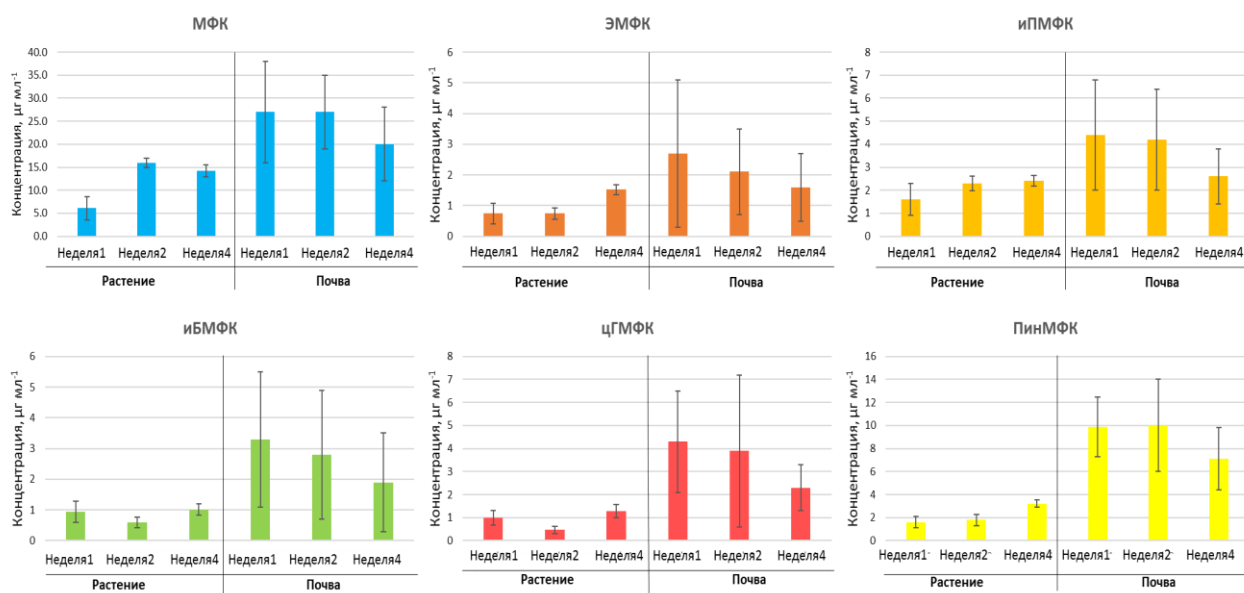


Рис. 10. Концентрации маркеров в экстрактах из образцов растения и почвы через 1, 2 и 4 недели после заражения ($n = 3$, $p = 95\%$)

В шестой главе диссертации описано применение ненаправленного профилирования для поиска новых соединений, по наличию или изменению содержания в моче которых можно судить о факте интоксикации заринном. В качестве образцов для анализа использовали мочу крыс. Биоматериал пяти особей крыс отбирали в течение 4 недель после подкожного введения зарина.

В первом разделе описана процедура выбора оптимальных подходов для обработки сырых данных. Сравнивали три метода коррекции сигнала: QC-LOESS, QC-RF и QC-XGB. Метод QC-XGB был выбран среди других алгоритмов как наилучший. Применение GAMM-моделирования с fold-change анализом позволило снизить размерность для улучшения выбора признаков и анализа "доза-эффект". Последовательная процедура статистического анализа позволила выбрать относительно небольшое количество потенциальных биомаркеров из большого количества признаков для дальнейшей клинической валидации и отобрать наиболее значимые признаки. Так, среди многих признаков было выбрано всего 6 метаболитов, изменение концентрации которых в моче меняется значительно в течение времени наблюдения (Рис. 11).

Во втором разделе проводили идентификацию выбранных соединений при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения на базе времяпролетного масс-спектрометра и масс-спектрометра с орбитальной ловушкой. Получали точные массы протонированных и депротонированных молекул 6 выбранных соединений, а также изучали их фрагментацию. При использовании баз данных HMDB, KEGG, RefMet, CFM-ID и MetFrag выбирали биомаркеры по совпадению точной массы иона-предшественника и ионов-продуктов в спектрах фрагментации. Таким образом, были предложены 5 соединений-маркеров, которые в дополнение к общеизвестным биомаркерам зарина могут быть полезны для выявления отравления спустя более пяти дней после воздействия.

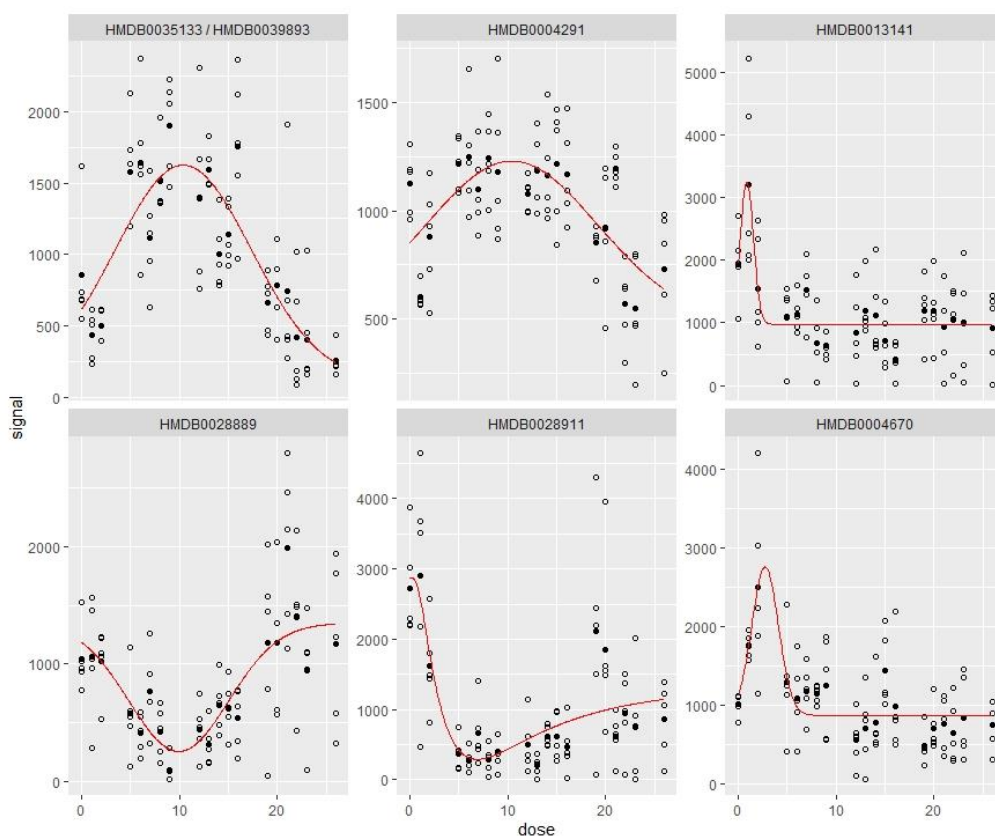


Рис. 11. Профили "доза-эффект" для выбранных метаболитов. Каждый рисунок представляет интенсивность ("сигнал", ось y) в зависимости от дня после воздействия заринном ("доза", ось x) с аппроксимирующей кривой красного цвета.

Таблица 4. Подробная информация о потенциальных биомаркерах воздействия зарина

Измеренное m/z Orbitrap (IT-TOF)	Прекурсор-ион	RT, мин	Название	Биологическая роль	Брутто-формула	Измеренная масса, Да	Точная масса, Да	Ошибка, ppm	LogP
166,0498 (166,0499)	[M+H] ⁺	2,14	5-пиридоксолактон (HMDB0004291)	Метаболит витамина B6, метаболизм ксенобиотиков	C ₈ H ₇ NO ₃	165,0425	165,0426	-0,60	0,42
269,1674 (269,1650)	[M+H] ⁺	2,50	-	-	-	268,1601	-	-	-
245,1862 (245,1795)	[M+H] ⁺	2,65	Изолейцил-лейцин (HMDB0028911)	Продукт неполного катаболизма белков	C ₁₂ H ₂₄ N ₂ O ₃	244,1789	244,1786	1,23	-0,96
151,0614 (151,0614)	[M+H] ⁺	2,96	1-метилгидроксантин (HMDB0013141)	Метаболиты человека и крысы	C ₆ H ₆ N ₄ O	150,0541	150,0541	0	-0,69
203,1298 (203,1301)	[M-H] ⁻	13,8	3,7-диметил-3-октен-1,2,6,7-тетрол (HMDB0035133)	Транспорт липидов Метаболизм липидов Метаболизм жирных кислот	C ₁₀ H ₂₀ O ₄	204,1371	204,1362	4,41	-0,37
			4-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-1-метилциклогексан-1,2-диол (HMDB0039893)						-0,48
295,2280 (295,2289)	[M-H] ⁻	27,2	α-диморфеколевая кислота (HMDB0004670)	Транспорт липидов Метаболизм липидов	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296,2352	296,2351	0,34	5,88

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований поставленная цель работы достигнута. Основные результаты, полученные в работе, представлены ниже.

В диссертационной работе представлен ряд разработок автора для совместного определения широкого круга маркеров применения НПОВ (МФК, ЭФК, и-/н-ПФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК), основанный на использовании дериватизации, процедур твердофазной экстракции для выделения аналитов из биообразцов различной природы, а также хроматографических колонок различного типа.

Предложен универсальный дериватирующий реагент – п-метоксифенацил бромид – для дериватизации продуктов гидролиза НПОВ, позволяющий проводить совместное масс-спектрометрическое определение АМФК в режимах ВЭЖХ при электрораспылительной ионизации и ГХ при электронной ионизации. Выявлено, что присутствие воды негативно влияет на выход реакции, поэтому для проведения дериватизации использовали ацетонитрил в качестве реакционной среды. Он хорошо совместим с ГХ-МС методом, поскольку является летучим растворителем и его можно вводить в испаритель без дополнительных сложностей. Также продемонстрировано, что дериватизация в присутствии триэтиламина позволяет добиться улучшения выхода реакции. Были изучены основные факторы, влияющие на выход реакции, далее применяли полнофакторный экспериментальный дизайн 3³ для выбора наиболее оптимальных условий реакции. Для извлечения АФК и АМФК из мочи использовали нормально-фазовый силикагельный ТФЭ сорбент, подбирали условия извлечения и оценивали степени извлечения аналитов. Разработанный подход был апробирован на моче с добавками аналитов, с помощью метода «введено-найдено» продемонстрирована высокая точность и воспроизводимость. Полученные пределы обнаружения для ВЭЖХ-МС/МС метода составили 0,1-0,4 нг/мл, что доказывает высокую чувствительность подхода и предоставляет возможность его применения для обнаружения фактов отравления ХО и нарушения Конвенции ОЗХО.

Для совместного определения АФК и АМФК использовали хроматографическую колонку, набитую анионообменником на основе ПСДВБ с гидрофильным функциональным слоем, содержащим четвертичные аммониевые группы. Изучили закономерности удерживания аналитов в зависимости от состава подвижных фаз. Применен анионообменный сорбент для ТФЭ, позволяющий извлекать все 9 аналитов. Предложена процедура извлечения аналитов ацетонитрильно-водным раствором аммиака. Данный способ ВЭЖХ-МС/МС был валидирован для определения 9 маркеров НПОВ в моче с применением дейтерированных внутренних стандартов на двух разных

масс-спектрометрах (Sciex 3200 и Shimadzu LCMS-8050). Достигнутые ПО составили 0,3-20 нг/мл.

Разработана и валидирована ВЭЖХ-МС/МС методика для совместного определения широкого круга маркеров НПОВ с использованием колонки SIELC SB, содержащая многофункциональный сорбент с гидрофобным покрытием. Способ апробирован на моче 5 особей крыс, которым вводили подкожно 25% летальной дозы зарина. С помощью разработанного способа в моче был обнаружен и определен только один маркер зарина – иПМФК, содержание которого снизилось до уровня ниже ПО за 4-5 дней в зависимости от особи. Также способ применяли для определения маркеров НПОВ в почве и растительном материале. Выявлено, что растение имеет способность к биоаккумуляции изучаемых аналитов и сохранению в организме в течение, как минимум, 4 недель.

Впервые проведено метаболомное исследование на образцах мочи крыс после отравления заринном для поиска новых потенциальных биомаркеров отравления. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения и статистических алгоритмов выявлены 5 потенциальных биомаркеров, изменение содержания в моче которых может быть связано с отравлением заринном.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрировано, что реагент п-метоксифенацил бромид, позволяет проводить одновременное определение АМФК в виде продуктов дериватизации методами ГХ-МС/МС, и ВЭЖХ-МС/МС. Изучены закономерности ионизации в условиях ЭИ и ИЭР, а также столкновительной фрагментации продуктов дериватизации. Оптимизированы параметры МС/МС детектирования характеристичных МРМ-переходов.
2. Предложено использование органического основания триэтиламина для повышения выхода реакции дериватизации. Изучено влияние воды, концентрации реагента и основания, а также времени на выход продуктов реакции. Выбраны оптимальные условия проведения реакции дериватизации при использовании полнофакторного экспериментального дизайна, в которых обеспечивается наибольший суммарный выход продуктов дериватизации. Выбранные в работе параметры для проведения дериватизации использованы для определения АФК и АМФК в моче с предварительным извлечением с помощью ТФЭ. Достигнутые ПО составили 0,1-0,4 нг/мл для ОФ-ВЭЖХ-МС/МС, 50-70 нг/мл для ГХ-МС/МС.
3. Изучены закономерности ИЭР и столкновительной фрагментации МФК, ЭФК, и-н-ПФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, ПинМФК и цГМФК. Выбраны оптимальные значения параметров МС/МС-детектирования (ПД, ЭС). Предложен анионообменный сорбент для ТФЭ для извлечения АФК и АМФК из мочи. Подобраны условия извлечения, а также оценены степени извлечения аналитов. Предложено использование многофункционального сорбента на основе ПСДВБ с гидрофильным покрытием для совместного определения АФК и АМФК методом ВЭЖХ-МС/МС. Подобраны оптимальные соотношения воды и ацетонитрила в подвижной фазе, а также выбраны концентрации формиата аммония для достижения приемлемых факторов удерживания при совместном определении. Разработан ВЭЖХ-МС/МС подход для совместного определения АФК и АМФК в моче с предварительной ТФЭ на анионообменном картридже с использованием дейтерированных аналогов. Подход был валидирован на двух тандемных ВЭЖХ масс-спектрометрах разных производителей. Достигнуты пределы обнаружения 0,3-20 нг/мл.
4. Предложена хроматографическая колонка, содержащая многофункциональный сорбент с гидрофобным покрытием. Подобраны условия хроматографического разделения с использованием аммонийно-формиатного буфера в водно-ацетонитрильном растворе. Разработан ВЭЖХ-МС/МС способ одновременного определения МФК и АМФК в биологических образцах с предварительной ТФЭ

и использовании дейтерированных внутренних стандартов. Метод был апробирован на моче крыс, подвергнутых подкожному отравлению заринном, почве и растениях. Пределы обнаружения для МФК и иПМФК в моче на приборе Shimadzu LCMS-8050 составили 50 и 2 нг/мл. В случае почвы и растений ПО для МФК и АМФК составили 80–300 и 8–80 нг/мл, соответственно, на приборе AV Sciex 3200. Продемонстрировано, что концентрация иПМФК в моче крыс после отравления заринном снижается за пять дней в ~1000 раз, а МФК и АМФК могут сохраняться в организме растения в течение, как минимум, 4 недель.

5. Показана возможность использования ненаправленного метаболомного профилирования для поиска новых потенциальных биомаркеров отравления на примере мочи крыс, отравленных заринном. Предложены 5 новых потенциальных биомаркеров, которые могут свидетельствовать об отравлении заринном.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2 – Аналитическая химия:

1. **Vokuev M. F.**, Baygildiev T. M., Braun A.V., Frolova A.V., Rybalchenko I.V., Rodin I.A. Monitoring of hydrolysis products of organophosphorus nerve agents in plant material and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 2022. V. 1685. P. 463604. IF (Web of Science) – 4,601. 70%.

2. **Vokuev M. F.**, Baygildiev T. M., Plyushchenko I. V., Ikhlaynen Y. A., Ogorodnikov R. L., Solontsov I. K., Braun A.V., Savelieva E.I., Rybalchenko I.V., Rodin I.A. Untargeted and targeted analysis of sarin poisoning biomarkers in rat urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2021. V. 413. P. 6973-6985. IF (Web of Science) – 4,478. 30%.

3. Baygildiev T.M., **Vokuev M.F.**, Ogorodnikov R.L., Braun A.V., Rybalchenko I. V., Rodin I.A. Simultaneous determination of organophosphorus nerve agent markers in urine by IC-MS/MS using anion-exchange solid-phase extraction // Journal of Chromatography B. 2019. V. 1132. P. 121815. IF (Web of Science) – 3,004. 50%.

4. Oreshkin D. V., Baygildiev T. M., **Vokuev M. F.**, Braun A. V., Godovikov I. A., Rybalchenko I. V., Rodin I. A. Determination of p-methoxyphenacyl bromide derivatives of alkylmethylphosphonic acids in urine using gas chromatography with high-resolution mass spectrometric detection // Journal of Analytical Chemistry. 2021. V. 76. P. 1530-1537. IF (Web of Science) – 1,237. 30%.

5. Baygildiev T. M., **Vokuev M. F.**, Oreshkin D. V., Braun A. V., Godovikov I. A., Rybalchenko I. V., Rodin I. A. p-Methoxyphenacyl Bromide as a Versatile Reagent for the Determination of Alkylphosphonic and Alkylmethylphosphonic Acids by High-Performance Liquid and Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection // Journal of Analytical Chemistry. 2020. V. 75. P. 1708-1718. IF (Web of Science) – 1,069. 50%.

Иные публикации:

6. **Vokuev M.F.**, Baygildiev T.M., Braun A.V., Rodin I.A., Rybalchenko I.V. Simultaneous determination of polar destruction products of nerve agents by hplc–ms/ms with preliminary derivatization // Book of Abstracts 12th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. Budapest, Hungary. 2019. P. 107.

7. **Вокуев М.Ф.**, Байгильдиев Т.М., Браун А.В., Рыбальченко И.В., Родин И.А. Совместное определение полярных продуктов деструкции нервно-паралитических отравляющих веществ методом ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией п-метоксифенацилбромидом // Материалы конференции III Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием. Краснодар, Россия. 2019. С. 47.

8. **Вокуев М.Ф.**, Байгильдиев Т.М. Применение дериватизации в сочетании с жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрией для определения полярных

продуктов деструкции нервно-паралитических отравляющих веществ // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2019. Москва, Россия. 2019.

9. Вокуев М.Ф., Байгильдиев Т.М. Изучение процесса накопления метаболитов сероорганических и фосфорорганических отравляющих веществ в кресс-салате (*Lepidium sativum*), используемого в качестве модельного растительного образца // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2020. Москва, Россия. 2020.

10. Вокуев М. Ф., Байгильдиев Т. М. Определение продуктов трансформации боевых отравляющих веществ в крысиной моче. // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2021. Москва, Россия. 2021.

11. Вокуев М.Ф., Байгильдиев Т.М., Браун А.В., Рыбальченко И.В., Родин И.А. Определение остаточного количества продуктов биотрансформации зарина в моче отравленных крыс для дальнейшего изучения закономерностей изменения метаболомного профиля // Материалы VI Всероссийского симпозиума Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии с международным участием. Краснодар, Россия. 2021. С. 200.

12. Вокуев М.Ф., Байгильдиев Т.М. Изучение аккумуляции продуктов трансформации фосфорорганических отравляющих веществ из почвы растением *hedera helix* // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2022. Москва, Россия. 2022. С. 25

13. Вокуев М.Ф., Байгильдиев Т.М., Браун А.В., Рыбальченко И.В., Родин И.А. Определение биомаркеров отравляющих веществ в растениях, выращенных в зараженной среде // Тезисы докладов, представленных на IV Съезде аналитиков России. Москва, Россия. 2022. С.179.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.х.н. Родину И.А. за поддержку и помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы, д.х.н., доц., проф. РАН Проскурнину М.А. за постоянное внимание к работе, к.х.н. Байгильдиеву Т.М. и к.х.н. Плющенко И.В. за постоянную помощь в научно-исследовательской деятельности и в обсуждении результатов, Огородникову Р.Л. за помощь в работе, к.х.н. Брауну А.В., д.х.н., проф. Рыбальченко И.В. и д.х.н. Савельевой Е.И. за помощь в планировании экспериментов, а также за предоставление образцов для исследования.

Автор выражает благодарность РНФ и РФФИ за финансовую поддержку выполненных исследований в рамках грантов «Исследование процессов трансформации высокотоксичных веществ в биологических средах и в окружающей среде с целью выявления характерных метаболитов и маркеров для их идентификации» (грант №19-13-00057, Номер ЦИТИС АААА-А19-119050690022-1), «Изучение закономерностей аккумуляции продуктов трансформации отравляющих веществ в растительной биомассе и разработка хромато-масс-спектрометрического методического обеспечения для определения их в объектах окружающей среды» (грант №21-33-70002, Номер ЦИТИС 121041500199-9) и «Разработка методического обеспечения для идентификации и определения в сложных матрицах следовых количеств маркеров и метаболитов отравляющих веществ и биотоксинов методами хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения» (грант №18-33-20068, Номер ЦИТИС АААА-А18-118101590020-8).