

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

**ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

*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

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

Научный руководитель:  
Д.х.н. Родин И.А.

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
Глава 1. ОБНАРУЖЕНИЕ МАРКЕРОВ ПРИМЕНЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ). .....	12
1.1. Пробоподготовка биологических образцов для анализа фосфорорганических ОВ. ....	19
1.2. Определение маркеров НПОВ методом ГХ-МС. ....	21
1.3. ВЭЖХ-МС методы определения маркеров применения ОВ. ....	26
1.4. Ненаправленный анализ .....	38
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	41
2.1. Реагенты .....	41
2.2. Оборудование.....	42
2.3. Процедура для совместного определения АФК и АМФК методами ГХ- МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией ПМФБ .....	44
2.4. Процедура проведения совместного определения АФК и АМФК при использовании анионообменной хроматографии с тандемным масс- спектрометрическим детектированием. ....	45
2.5. Токсикологический эксперимент по отравлению крыс заринном и отбор образцов мочи .....	47
2.6. Процедура проведения совместного ВЭЖХ-МС/МС определения МФК и АМФК в моче крыс при использовании колонки смешанного типа. ....	48
2.7. Процедура проведения совместного ВЭЖХ-МС/МС определения МФК и АМФК в растениях и почве при использовании колонки смешанного типа.....	49
2.8. Процедура проведения метаболомного профилирования.....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	53

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ ДЕРИВАТИЗАЦИИ АЛКИЛФОСФОНОВЫХ И АЛКИЛМЕТИЛФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ П-МЕТОКСИФЕНАЦИЛ БРОМИДОМ.....	53
3.1. Выбор дериватизирующего реагента .....	54
3.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования.....	56
3.2.1. ВЭЖХ-МС/МС.....	56
3.2.2. ГХ-МС/МС .....	64
3.3. Оптимизация условий проведения реакции дериватизации фосфоновых кислот п-метоксифенацил бромидом .....	66
3.4. Оценка чувствительности, правильности и воспроизводимости определения АФК и АМФК в моче с предварительной дериватизацией ПМФБ в условиях ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС. ....	71
Глава 4. СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФК И АМФК МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОРБЕНТА С ГИДРОФИЛЬНЫМ ПОКРЫТИЕМ.....	75
4.1. Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования в режиме МРМ.....	76
4.2. Оптимизация условий хроматографического разделения.....	80
4.3. Извлечение фосфоновых кислот из водных объектов и мочи .....	84
4.4. Оценка метрологических характеристик разработанного способа определения АФК и АМФК в моче .....	86
4.4.1. Степень извлечения.....	86
4.4.2. Предел обнаружения и наименьшая определяемая концентрация, линейный диапазон градуировочных кривых .....	87
4.4.3. Воспроизводимость и правильность .....	88
4.5. Аprobация разработанного способа определения на искусственно зараженных образцах мочи .....	88
Глава 5. СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МФК И АМФК В БИОПРОБАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ	

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОРБЕНТА С ГИДРОФОБНЫМ ПОКРЫТИЕМ .....	92
5.1. Выбор условий хромато-масс-спектрометрического детектирования	92
5.2. ВЭЖХ-МС/МС анализ мочи крыс .....	94
5.2.1. Пробоподготовка мочи для ВЭЖХ-МС/МС анализа.....	94
5.2.2. Валидация разработанного подхода по определению МФК и иПМФК в моче.....	95
5.2.3. Анализ образцов мочи крыс после воздействия заринном .....	98
5.3. Анализ почвы и растений <i>Hedera Helix</i> .....	100
5.3.1. Образцы для анализа .....	100
5.3.2. Подготовка растений и почвы для анализа.....	100
5.3.3. Валидация разработанного ВЭЖХ-МС/МС способа для определения МФК и АМФК в растении и почве. ....	101
Глава 6. НЕЦЕЛЕВОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ МОЧИ КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ ЗАРИНОМ .....	107
6.1. Обработка данных .....	107
6.2. Идентификация выбранных соединений и их биологическая роль ...	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	117
ВЫВОДЫ .....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМФК	алкилметилфосфоновая кислота/кислоты
АФК	алкилфосфоновая кислота/кислоты
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ	газовая хроматография
иБМФК	изобутилметилфосфоновая кислота
иПМФК	изопропилметилфосфоновая кислота
иПФК	изопропилфосфоновая кислота
ИХ	ионная хроматография
ИЭР	ионизация электрораспылением
МРМ	мониторинг множественных реакций
МС	масс-спектрометрия
МС/МС	тандемная масс-спектрометрия
МФК	метилфосфоновая кислота
МЭ	матричный эффект
НПОВ	нервно-паралитические отравляющие вещества
нПФК	н-пропилфосфоновая кислота
ОВ	отравляющие вещества
ОЗХО	Организация по запрещению химического оружия
ОСО	относительное стандартное отклонение
ОФ	обращенно-фазовая
ПГУС	пористый графитированный углеродный сорбент
ПД	потенциал декластеризации
ПинМФК	пинаколилметилфосфоновая кислота
ПМФБ	п-метоксифенацил бромид
ПСДВБ	полистирол-дивинилбензол
ТФЭ	твёрдофазная экстракция
ХО	химическое оружие
цГМФК	циклогексилметилфосфоновая кислота
ЭМФК	этилметилфосфоновая кислота
ЭС	энергия соударений
ЭФК	этилфосфоновая кислота
ЯМР	ядерно-магнитный резонанс

## ВВЕДЕНИЕ

### 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), н-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), циклогексиловый эфир МФК или циклогексилметилфосфоновая кислота (цГМФК)). Также предложен универсальный реагент для дериватизации – п-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) п-

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 п-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 дериватирующего реагента в присутствии триэтиламина позволяет проводить одновременное определение АМФК 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 заринном, 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.

## ГЛАВА 1. ОБНАРУЖЕНИЕ МАРКЕРОВ ПРИМЕНЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

Использование химического оружия (ХО) в ходе боевых действий XX века позволило мировому сообществу констатировать природу его воздействия как антигуманную. Отравление нелетальными дозами крайне высокотоксичных и опасных для организма соединений вызывает тяжелые последствия для здоровья и необходимость длительных медицинских вмешательств в дальнейшем для восстановления после интоксикации. После многолетних обсуждений 29 апреля 1997 г. вступила в силу Международная Конвенция о запрещении химического оружия [1], и была создана международная организация по запрещению химического оружия (ОЗХО). На конец 2022 года она насчитывала 193 стран-участниц. Согласно Конвенции, каждая присоединившаяся страна обязуется никогда и ни при каких обстоятельствах:

- не разрабатывать, не производить, не получать каким-либо образом, не накапливать, не сохранять ХО, а также не передавать его кому бы то ни было;

- не применять ХО;

- не участвовать ни в каких действиях, связанных с применением ХО или с действиями, запрещенными Конвенцией;

- каждая страна-участница обязуется уничтожить все запасы ХО, находящиеся под ее контролем и юрисдикцией, а также все объекты по производству ХО.

Признание мировым сообществом высокой ответственности за использование ХО вызвало повышение интереса ученых к разработкам методов аналитического контроля по выявлению фактов несанкционированного использования, транспортировки или хранения отравляющих веществ (ОВ), и как следствие, появление большого количества научных публикаций по данной тематике. Данные разработки приобретают особую актуальность в связи с многократными случаями нарушения Конвенции за последние годы, связанными с применением ОВ [2-5].

До середины 80-х годов XX века наибольший интерес исследователей вызывали экспрессные методы обнаружения и идентификации боевых ОВ [6-8] из-

за требований по защите и обеспечению безопасности как военнослужащих, так и мирного населения, в случаях использования ХО.

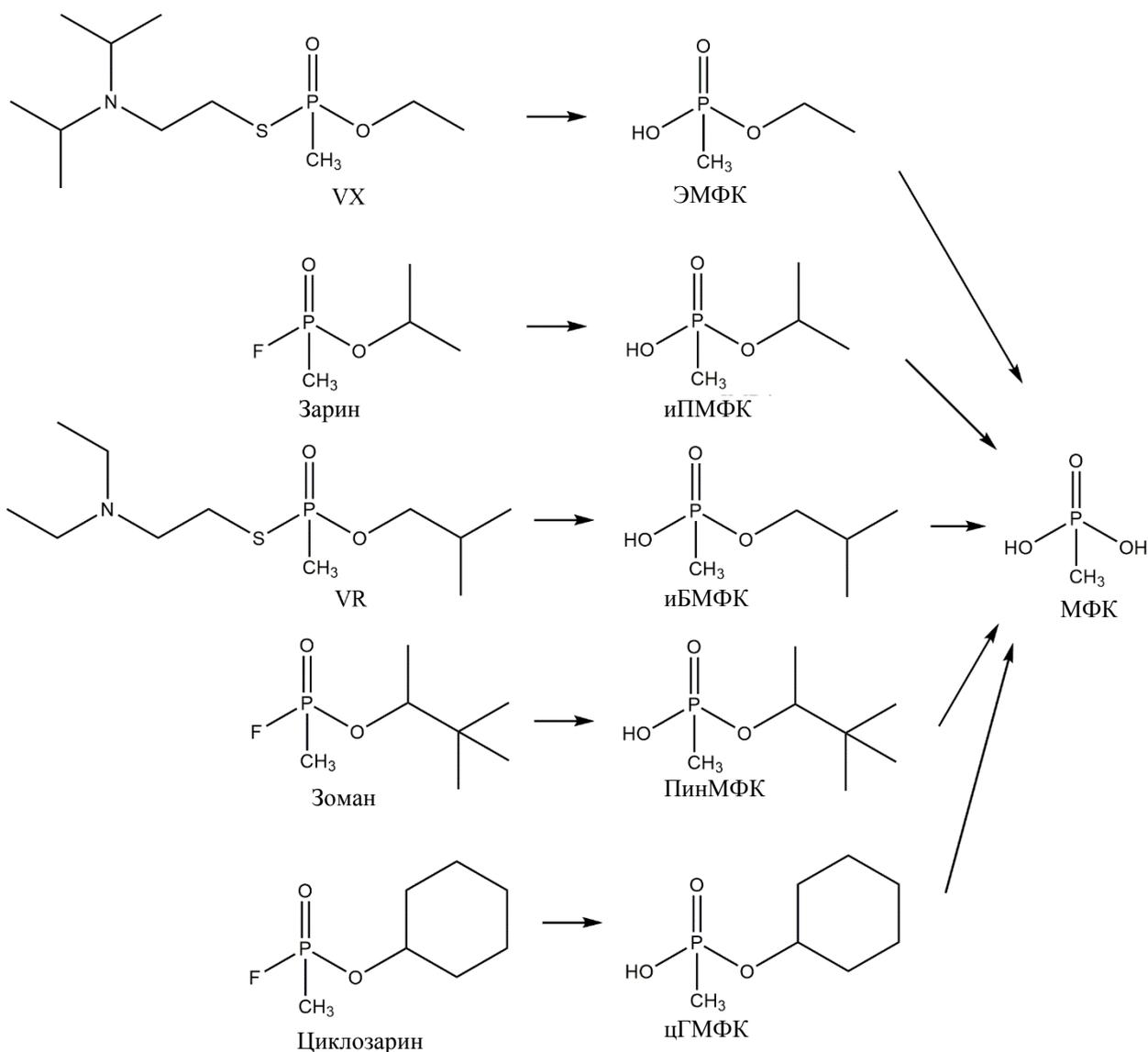
Поскольку главным предназначением ХО является быстрое выведение из строя людей с последующим прекращением действия в зоне применения, большинство соединений, составляющих основу ХО, являются крайне нестойкими органическими соединениями и подвергаются быстрому разложению (гидролизу) в условиях окружающей среды или при попадании в организм. В этой связи при создании способов аналитического контроля для соблюдения правил Конвенции возникла потребность в новых лабораторных подходах для обнаружения и определения долгоживущих характеристичных продуктов деградации ОВ – маркеров или биомаркеров, по наличию в объектах исследования которых можно однозначно судить о факте применения ХО, а также определить тип исходного ОВ. По результатам анализа можно делать выводы о степени заражения окружающей среды, а также об использованной дозе ОВ.

По характеру физиологического воздействия различают несколько типов ОВ: нервно-паралитическое, удушающее, кожно-нарывное, психохимическое, раздражающее [9]. Наибольшую опасность из-за высокой токсичности представляют нервно-паралитические отравляющие вещества (НПОВ). Это фосфорорганические соединения, основными представителями которых являются такие вещества как табун, зарин, циклозарин, зоман, VX и VR, которые многократно применялись в ходе террористических атак и военных действий [10-13]. Физические свойства основных представителей НПОВ представлены в табл. 1. При попадании в организм они необратимо связывают фермент ацетилхолинэстеразу (АХЭ), который отвечает за метаболизм ацетилхолина, отвечающего за передачу нервных импульсов между синапсами. При накоплении критического количества ацетилхолина передача нервных импульсов прекращается и наступает паралич с дальнейшим летальным исходом [14].

**Таблица 1. Физические свойства НПОВ [15]**

	Давление паров	Летучесть	Внешний вид	Запах	Растворимость	Устойчивость
Табун CAS#77-81-6	0,037 мм.рт.ст (20 °C)	576-610 мг/м <sup>3</sup> (25 °C)	Прозрачная или коричневая жидкость	Фруктовый	9,8 г / 100 г (25 °C)	T <sub>1/2</sub> = 24-36 ч
Зарин CAS#107-44-8	2,1 мм рт.ст (20 °C)	16400-22000 мг/м <sup>3</sup> (25 °C)	Прозрачная жидкость	Без запаха	Смешивается	2-24 ч (5-25 °C)
Циклозарин CAS#329-99-7	0,7 мм рт.ст (25 °C)	59 ppm	Прозрачная жидкость	Без запаха	3,7 г / 100 г (25 °C)	Неизвестно
Зоман CAS#96-64-0	0,4 мм рт.ст (20 °C)	3060-3900 мг/м <sup>3</sup> (25 °C)	Прозрачная жидкость	Фруктовый, камфорное масло	2,1 г / 100 г (20 °C)	Относительно устойчив
VX CAS#20820-80-8	0,0007 мм рт.ст (20 °C)	3-30 мг/м <sup>3</sup> (25 °C)	Густая прозрачная или бледно-желтая жидкость	Без запаха	Смешивается при <9,4 °C, слабо при 25 °C	2-6 дней
VR CAS#159939-87-4	0,0005 мм рт.ст (20 °C)	Неизвестно	Прозрачная жидкость	Без запаха	Неизвестно	Неизвестно

Фосфорорганические НПОВ относительно быстро гидролизуются до характеристичных алкиловых эфиров метилфосфоновой кислоты (АМФК), а они, в свою очередь с меньшей скоростью гидролиза – до стабильной метилфосфоновой кислоты (МФК) (рис. 1). Данные вещества являются экзогенными соединениями, то есть не образуются в организме в процессе жизнедеятельности, а также не содержатся в природных объектах, как следствие, их наличие в таких объектах свидетельствует о факте применения ОВ. Поэтому АМФК и МФК являются надежными маркерами воздействия НПОВ и по их содержанию в биологических материалах или в различных природных объектах можно сделать вывод не только о факте воздействия ОВ, но и определить тип ХО [16].



**Рис. 1. Схема гидролиза НПОВ с образованием алкиловых эфиров метилфосфоновой кислоты и последующим гидролизом до МФК.**

Алкилфосфоновые кислоты (АФК), такие как этилфосфоновая кислота (ЭФК), н-пропилфосфоновая кислота (нПФК) и изопропилфосфоновая кислота (иПФК) по своим свойствам схожи с МФК и могут образовываться при разложении НПОВ, схожих по действию с общеизвестными, но в отличие от них они никогда не производившиеся в промышленных масштабах. Такими нервными агентами, например, являются VE, VS или этилзарин (GE) [17].

При отравлении животных и людей НПОВ помимо низкомолекулярных АФК и АМФК в организме образуются высокомолекулярные метаболиты и аддукты ОВ с аминокислотами и пептидами, входящими в состав белков и ферментов, которые также являются биомаркерами применения ОВ. Так, в работах [18-26] показано, что

некоторые тирозиновые остатки в белках подвергаются фосфорилированию многими представителями НПОВ. Помимо тирозина единственный несвязанный дисульфидными связями цистеин(34) в человеческом альбумине также подвергается модификации под действием ОВ [27-31]. Данные пептидные аддукты после специфичного ферментативного расщепления белка на пептиды могут быть идентифицированы и определены.

Для расследования вероятных случаев нарушения Конвенции ОЗХО аккредитовывает и привлекает национальные лаборатории, располагающие всем необходимым оборудованием для анализа проб окружающей среды, а также биологических сред (биомедицинские пробы). Всего, по состоянию на конец 2022 года, ОЗХО аккредитовано 20 лабораторий для анализа биомедицинских проб (табл. 2) из 14 стран-участниц [32] и 25 лабораторий для анализа экологических проб (табл. 3) из 21 стран-участниц [33].

Поскольку на момент вступления в силу Конвенции ОЗХО в разных странах находились значительные запасы высокотоксичных фосфорорганических НПОВ, а также наиболее известные случаи террористических актов связаны именно с этими ОВ, превалирующее количество исследований за последнее время связано с определением маркеров именно НПОВ [34, 13].

Для более детального расследования случаев нарушения Конвенции, особенно тех, которые связаны с отравлением людей, наилучшим подходом является исследование всех возможных объектов, которые могут быть получены, на предмет присутствия широко круга маркеров и биомаркеров ОВ, как низкомолекулярных АФК и АМФК, так и белковых аддуктов. Однако, так как маркеров отравления с разными физико-химическими свойствами может быть большое количество (в подробной обзорной статье [35] авторы описывают 35 установленных продуктов деградации НПОВ (на примере VX)), такой подход является трудоемким и требует значительное количество времени и материальных ресурсов. Поэтому в данной работе мы акцентировали внимание исключительно на низкомолекулярных маркерах применения ОВ, а именно на совместном определении и идентификации АФК и АМФК.

**Таблица 2. Перечень национальных аккредитованных ОЗХО лабораторий для анализа биомедицинских проб**

	Название лаборатории	Государство-участник
1	Defence Science and Technology Group	Австралия
2	Laboratory of Toxicant Analysis, Academy of Military Medical Sciences	Китай
3	Laboratory of Analytical Chemistry, Research Institute of Chemical Defence	Китай
4	Finnish Institute for Verification of the Chemical Weapons Convention (VERIFIN)	Финляндия
5	DGA Maitrise NRBC, Département d'analyses chimiques	Франция
6	Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology	Германия
7	Biomedical Verification Division, Defence Research and Development Establishment	Индия
8	Defense Chemical Research Laboratory (DCRL)	Иран
9	TNO Defence, Security and Safety	Нидерланды
10	Chemical Analysis Laboratory, CBR Directorate, Agency for Defense Development	Республика Корея
11	CBRN Research Center, ROK CBRN Command	Республика Корея
12	Laboratory for the Chemical and Analytical Control of Military Research Centre	Российская Федерация
13	Laboratory of Chemical Analytical Control and Biotesting, Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology (RIHOPHE)	Российская Федерация
14	Verification Laboratory, Defence Medical and Environmental Research Institute, DSO National Laboratories	Сингапур
15	Swedish Defence Research Agency (FOI)	Швеция
16	Defence Science and Technology Laboratory, Chemical and Biological Systems, Porton Down	Великобритания
17	Centers for Disease Control and Prevention	США
18	Combat Capabilities Development Command (DEVCOM), Chemical Biological Center (CBC), Forensic Analytical Laboratory	США
19	Lawrence Livermore National Laboratory	США
20	U.S. Army Medical Research Institute of Chemical Defense	США

**Таблица 3. Перечень национальных аккредитованных ОЗХО лабораторий для анализа экологических проб**

	Название лаборатории	Государство-участник
1	Defence Science and Technology Group	Австралия
2	Belgium Defence Laboratories (DLD)	Бельгия
3	Laboratório de Análises Químicas, Centro Tecnológico do Exército (CTEx)	Бразилия
4	Laboratory of Analytical Chemistry, Research Institute of Chemical Defence	Китай
5	Laboratory of Toxicant Analysis, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences	Китай
6	Finnish Institute for Verification of the Chemical Weapons Convention (VERIFIN)	Финляндия
7	DGA Maîtrise NRBC, Analytical Chemistry Department	Франция
8	Bundeswehr Research Institute for Protective Technologies and NBC Protection	Германия
9	VERTOX Laboratory, Defence Research & Development Establishment	Индия
10	Defense Chemical Research Laboratory	Иран
11	TNO Defence, Safety and Security	Нидерланды
12	Laboratory for Analysis of Chemical Threat Agents, Norwegian Defence Research Establishment (FFI)	Норвегия
13	Analytical Laboratory, Defence Science Technology Organization	Пакистан
14	Chemical Analysis Laboratory, CB Department, Agency for Defence Development	Республика Корея
15	CBRN Defense Research Institute, ROK Defense Command	Республика Корея
16	Research and Innovation Center for CBRN Defense and Ecology, Chemical Analysis Laboratory	Румыния
17	Laboratory for the Chemical and Analytical Control of Military Research Centre	Российская Федерация
18	Central Chemical Weapons Destruction Analytical Laboratory of the Federal State Unitary Enterprise, "State Scientific Research Institute of Organic Chemistry and Technology"	Российская Федерация
19	Verification Laboratory, Defence Medical and Environmental Research Institute, DSO National Laboratories	Сингапур
20	LAVEMA (Laboratorio de Verificación de Armas Químicas), INTA Campus La Marañosa	Испания
21	Swedish Defence Research Agency, FOI	Швеция
22	Spiez Laboratory, Swiss NBC Defence Establishment	Швейцария
23	Defence Science and Technology Laboratory, Porton Down	Великобритания
24	DEVCOM Chemical Biological Center, Forensic Analytical Laboratory	США
25	Lawrence Livermore National Laboratory	США

### ***1.1. Пробоподготовка биологических образцов для анализа фосфорорганических ОВ.***

Важнейшим этапом для проведения анализа крови на присутствие маркеров ОВ является разделение плазмы и осаждающихся веществ, эритроцитов и белков. Далее, в зависимости от определяемых веществ, используют либо одну из фракций, либо готовят обе фракции по отдельности. Белковые фракции обычно используют для выявления белковых аддуктов ОВ [36].

Маркеры ОВ анализируют *in vivo* в цельной крови, отобранной у контактировавших с ХО людей, или у отравленных животных в исследовательских целях. Многие исследования проводят *in vitro* с использованием коммерчески доступных компонентов крови, например плазмы, белков или ферментов. Подготовка образцов при анализе цельной крови является более трудоемкой, чем в *in vitro* анализе, так как включает предварительную стадию разделения крови на плазму и вещества, которые могут осаждаться (эритроциты) [37]. В случае *in vitro* анализа, данной стадией можно пренебречь, а подготовка проб в целом проще [38], что связано с использованием коммерчески доступных компонентов.

Исследования проводятся не только для разработки все более чувствительных подходов обнаружения и идентификации ОВ, но и для выбора наиболее эффективных методов лечения после отравления ХО. В обоих случаях процедуры пробоподготовки могут быть одинаковые, например, как в работе [39] для анализа *in vitro* плазмы человека и *in vivo* анализа крови мартышек.

Эритроциты в своем составе содержат белки, такие как АХЭ, бутилхолинэстераза (БХЭ) и альбумин [26, 40-43]. Если необходимо проанализировать белковые фракции, их можно осадить с помощью центрифугирования или добавления 2-пропанола с последующим центрифугированием [40, 41]. Существуют также некоторые методы, подходящие для осаждения компонентов крови, такие как иммунопреципитация [44], иммуномагнитная сепарация [45-48] и иммуно-аффинная очистка [49]. В работе [45] использовали иммуномагнитный метод выделения аддуктов НПОВ с БХЭ из сыворотки крови человека. Аддукты с БХЭ связывали с анти-БХЭ моноклональными антителами и расщепляли пепсином, далее полученные

нонапептидные анализы отделяли от пепсина, нерасщепленных белков, крупных пептидов и магнитных частиц.

После образования аддуктов с компонентами крови фосфорорганические НПОВ могут быть реактивированы только в течение короткого времени [37, 50-52], так как спустя некоторое время аддукты начинают разлагаться с выделением продуктов метаболизма ОВ. Обычно аддукты с НПОВ реактивируют с помощью ионов фтора. Такой подход использовали для реактивации зарина и циклозарина в эритроцитах карликовых свиней [37], или для реактивации зомана с помощью фторида калия при анализе крови крыс [52]. Аддукты НПОВ, присутствующие в плазме, также могут быть реактивированы, после их извлечения из плазмы. Смесь после реактивации можно очистить с помощью ТФЭ на С18 картриджах при элюировании этилацетатом [37, 52, 53].

Множество вариаций сорбентов ТФЭ может быть использовано для извлечения маркеров НПОВ из плазмы. ТФЭ является основным способом для отделения маркеров от матричных компонентов при подготовке биологического материала. Обычно используют сорбенты С18 и С8 [39], а также эксклюзионные и ионнообменные [54] сорбенты для ТФЭ. Авторы работы [54] использовали катионообменный ТФЭ-сорбент на основе сополимера стирола и дивинилбензола после осаждения белков из плазмы крови крыс с помощью сульфата цинка и центрифугирования. Данный сорбент показал лучшие результаты по сравнению с С18 сорбентом.

Обнаружение продуктов ОВ в объектах окружающей среды (вода, почва, смывы с различных поверхностей) или в биологических жидкостях (кровь, слюна, моча) ставит перед исследователями комплексные задачи. Принято считать, что использование ВЭЖХ-МС, а также тандемной масс-спектрометрии, может гарантировать высокую специфичность, селективность и чувствительность анализа, однако на практике это не всегда так. Часто возникают проблемы с интерференцией и подавлением ионизации матричными компонентами, решению которых при разработке ВЭЖХ-МС методик уделяется большое внимание. Традиционно, для уменьшения ошибок, связанных с матричными эффектами, используют внутренние стандарты, представляющие собой аналоги аналитов, меченные стабильными изотопами (дейтерием или углеродом-13). Также нельзя недооценивать важность

очистки пробы в процессе пробоподготовки и правильно подобранные условия хроматографического разделения. Подавление ионизации можно уменьшить удалением неорганических солей и других матричных компонентов из матрицы, используя ТФЭ или жидкостно-жидкостную экстракцию (ЖЖЭ). ТФЭ широко используется и для анализа мочи, которая также является важным объектом исследования при анализе метаболитов ОВ. Мочу используют в основном для обнаружения и определения низкомолекулярных продуктов метаболизма НПОВ – АФК и АМФК [55-57]. Моча является менее сложной биологической жидкостью по сравнению с кровью, поэтому ее пробоподготовка зачастую проще по сравнению с пробоподготовкой крови, плазмы и сыворотки. Однако анализ мочи может быть особенно затруднен из-за наличия большого количества кислых соединений, которые могут совместно элюироваться с АФК и АМФК и приводить к ошибкам. Так, Мауинни и др. [58] описали интерференцию МС-сигнала ЭМФК с компонентами мочи. С помощью предварительной ТФЭ можно не только уменьшить матричное влияние, но и увеличить чувствительность, сконцентрировав аналиты.

### ***1.2. Определение маркеров НПОВ методом ГХ-МС.***

В 70-80х годах прошлого столетия появились первые публикации по ГХ-методам определения нативных ОВ и их продуктов деградации в различных средах, при предварительном внесении аналитов в образцы [59-63]. В 1990 году опубликован обзор хроматографических методов [64], применимых для анализа как маркеров применения ОВ, так и интактных ОВ, при использовании азотно-фосфорного, фотоионизационного, пламенно-фотометрического и атомно-эмиссионного детектирования. Более поздние публикации посвящены применению ИК-Фурье-спектрометрических [65-68], масс-спектрометрических [69-71] и других спектральных детекторов [72-74].

В результате расследования фактов применения зарина и иприта против курдского населения в 1988 г. на севере Ирака были опубликованы работы [75, 76], в которых авторы продемонстрировали возможность использования ГХ-МС и ГХ-МС/МС для определения следовых количеств иприта и зарина, а также продуктов их деградации в образцах почвы, одежды и останков жертв химической атаки с высокой

чувствительностью и ретроспективностью (спустя 4 года после применения ХО). В тот период исследователи предпочитали именно ГХ по сравнению с ВЭЖХ из-за лучшего аппаратного обеспечения и доступности на то время, а также универсальности из-за наличия масс-спектральных библиотек [77], полученных при электронной ионизации. Помимо этого, ГХ был удобным методом анализа легколетучих нативных ОВ [78]. Однако продукты трансформации фосфорорганических НПОВ (АФК и АМФК) – полярные малолетучие соединения, поэтому их ГХ анализ возможен при предварительном переводе в более подходящие производные с помощью реакции дериватизации. Несмотря на тот факт, что процедура проведения дериватизации является трудоемкой и времязатратной операцией, которая может вносить дополнительную ошибку в результаты анализа, ее использование является необходимым условием ГХ определения АФК и АМФК. В литературе описано множество вариантов ГХ определения полярных производных НПОВ в виде метильных [79-82] триметилсилильных [83-85], трет-бутилдиметилсилильных [86, 87], трифторацетильных [88], пентафторбензильных производных [89-91], а также некоторых других [92, 93]. В работах [94, 95] обобщены способы ГХ определения маркеров НПОВ и других видов ХО в виде дериватов.

Алкилфосфоновые кислоты (ЭФК, нПФК и иПФК) анализировали после их дериватизации с помощью N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил)трифторацетамида с 1% трет-бутилдиметилсилилхлоридом при использовании твердофазной микроэкстракции с сорбционным волокном, покрытым карбоксеном. Предел обнаружения предложенного подхода составил от 1 до 200 нг/мл. При анализе алкилметилфосфоновых кислот с использованием ГХ-МС проводили предварительную дериватизацию триметилсилилдиазометаном [96].

При анализе фосфоновых кислот (МФК, ЭМФК, иПМФК и ПинМФК) в почве методом ГХ-МС в виде трет-бутилдиметилсилильных производных [97] степени извлечения получают низкие из-за подавления реакции дериватизации матричными компонентами и адсорбции аналитов в почвах. Для увеличения выхода реакции авторы использовали ТФЭ на анионообменном сорбенте водного экстракта почвы. Для уменьшения степени адсорбции аналитов и увеличения степени извлечения из почв использовали щелочной раствор в качестве экстрагента. При

использовании воды в качестве экстрагента были получены низкие степени извлечения, однако при замене воды на щелочной раствор произошло резкое увеличение извлечения кислот из почвы, например, при использовании 0,1 М раствора гидроксида натрия степень извлечения превышала 68%. Мешающие матричные компоненты удаляли из щелочного экстракта почвы путем ТФЭ. Щелочной экстракт почвы нейтрализовали плавиковой кислотой и наносили на картридж. После промывания водой МФК и АМФК элюировались метанольным раствором аммиака количественно.

В исследовании [80] описан ГХ-МС метод определения зарина, зомана и их продуктов гидролиза в образцах воды, почвы, травы и песка. Авторы изучали время, спустя которое можно обнаружить маркеры. Аналиты из водных экстрактов почвы, травы и песка, а также из загрязненных водных объектов, сорбировали на ТФЭ сорбентах. Далее картриджи охлаждали и транспортировали в лабораторию для дальнейшей подготовки. В лаборатории аналиты элюировали хлороформом (в случае картриджа С18) или гидроксидом триметилфениламмония (в случае анионообменного сорбента), который также действовал как метилирующий реагент, и анализировали растворы. Продукты гидролиза зарина и зомана были обнаружены в образцах спустя даже 4 недели после заражения, тогда как нативные ОВ были обнаружены только спустя 2 недели. Данный метод не требует большого количества оборудования или реагентов и может быть легко применен неподготовленным персоналом в полевых условиях с дальнейшим анализом в лаборатории.

Определение нескольких НПОВ в воздухе осуществляли на приборе ГХ-МС с термодесорбером. Предварительно воздух с содержанием ОВ пропускали через ловушку с 3 типами сорбента (Tenax TA, Tenax GR и Carboxen 1016). В результате исследователи пришли к выводу, что пары основных представителей НПОВ, за исключением VX и VR, могут быть обнаружены с помощью сорбции на сорбенте Tenax TA с последующим десорбционным ГХ-МС анализом [98]. Вместо специальных адсорбционных трубок, в которые набивается сорбент Tenax TA, авторы [99] предложили использовать лайнеры для газового хроматографа. Это позволяет после сорбции ОВ в лайнере вводить его в прибор и проводить анализ, что делает данный вариант удобным для мобильных лабораторий. Исходя из анализа литературы по газохроматографическим методам определения НПОВ и продуктов их гидролиза, можно сделать вывод о необходимости проведения дериватизации АФК и АМФК для перевода в более удобные для ГХ-анализа формы, в то время как нативные ОВ можно анализировать напрямую.

**Таблица 4. ГХ-МС методы анализа НПОВ и их продуктов разложения**

Аналит	Образец	Пробоподготовка/ Метод	Условия определения	ПО	Источник
Зарин реактивированный из белков	Кровь, волосы, ткани.	ТФЭ, ГХ-МС	VF-5 MS (45 м x 0.32 мм, 0.4 мм)	-	[13]
НПОВ и продукты гидролиза	Плазма, моча	ТФЭ, ГХ-МС	VF-5 MS (30 м x 0.25 мм, 0.25 мм)	-	[56]
VX	Кровь	ГХ-МС	Rtx-5MS (30 м x 0.25 мм, 0.25 мм)	2 пг	[51]
Табун, зарин, VX	Человеческая плазма	ТФЭ, ГХ-ГХ-МСВР	1. CP Sil 8 CB (25 м x 0.25 мм, 0.25 мм) 2. CB 52 Wax (1 м x 0.1 мм, 0.2 мм)	70 пг/мл	[53]
Продукты гидролиза: АМФК	Смесь кислот	ГХ-МС Дериватизация триметилсилилдиазометаном	Rtx-200 (30 м x 0.25 мм x 25 мкм) Программирование температуры: 5 <sup>0</sup> С (4.3 мин), 12 <sup>0</sup> С/мин до 270 <sup>0</sup> С (5 мин) интервал сканирования m/z 50–440 Да	1-200 нг/мл	[96]
Зарин	Органические и водные растворы	ТФЭ, ГХ-МС	SolGel Wax (30 м x 250 мкм x 25 мкм) Программируемая температура: 35 <sup>0</sup> С (5 мин), 5 <sup>0</sup> С/мин до 100 <sup>0</sup> С (1 мин), 10 <sup>0</sup> С/мин до 200 <sup>0</sup> С (5 мин). МС-детектирование в режиме SCAN (35-350 Да) и SIM	-	[100]
Зарин	Образцы воды с добавками	ТФЭ, ГХ-МС	Программирование температуры: 50 <sup>0</sup> С (2 мин), 15 <sup>0</sup> С / мин до 280 <sup>0</sup> С (3 мин), режим SIM	5-50 нг/мл	[101]

Продолжение таблицы 4

Продукты гидролиза: ЭМФК, иПМФК, ПинМФК, МФК, нПФК	Водные образцы	Жидкостная микроэкстракция, ТФЭ, in-situ дериватизация ГХ-МС	HP-5MS (30 м x 0.25 мм x 0.25 мкм) Программирование температуры: 60°C (2 мин), 10°C/мин до 280°C (4 мин), режим сканирования в диапазоне m/z 40– 550 Да	0.01-0.54 нг/мл	[102]
Продукты гидролиза: иПМФК, ПинМФК, иПФК, ЭФК, МФК, нПФК	Образцы воды с добавками	Жидкостная микроэкстракция, дериватизация пропилбромидом ГХ-МС	BPX5 (30м x 0.32мм x 0.25 мкм) Программирование температуры: 50°C (2 мин), 10°C/мин до 200°C или с 25°C до 300°C (3 мин). МС в режиме SIM или в режиме сканирования (m/z 50–400)	0.1–0.75 мкг/мл	[103]
Продукты гидролиза: ЭМФК, МФК, иБМФК	Образцы речной воды с добавками	ТФЭ, дериватизация ГХ-МС	DB5-MS (30 м x 0.25 мм x 0.25 мкм) Программирование температуры: 40°C (1 мин), 10°C/мин до 280°C (5 мин). режим SCAN и SIM	10 нг/мл для SIM режима, 100 нг/мл для SCAN режима	[104]
Продукты гидролиза: МФК, ЭМФК, ПинМФК	Водные и органические образцы	Дериватизация ГХ-МС с термодесорбцией	RXI-5MS (30 м x 0.25 мм x 0.25 мкм) Программирование температуры: 40°C (2 мин), 10°C/min to 280°C (6 мин)	-	[105]

### ***1.3. ВЭЖХ-МС методы определения маркеров применения ОВ.***

В качестве преимущества использования разных вариантов ВЭЖХ по сравнению с ГХ можно назвать возможность определения маркеров ОВ без дополнительной стадии дериватизации, что сокращает время анализа и уменьшает погрешности подходов. Также дериватизация усложняет интерпретацию фрагментации в случае скрининга большого количества неизвестных маркеров. Несмотря на широкое применение метода ГХ–МС для надежного обнаружения и определения многих продуктов деструкции ОВ [106], он недостаточно универсален, обладает определенными ограничениями, например, по термостабильности и летучести аналитов [107]. Также можно отметить некоторые длительные процедуры подготовки образцов (экстракция, очистка, концентрирование, дериватизация), которые увеличивают погрешность и ошибку определения, от которых нельзя избавиться [108].

Несмотря на это, нельзя выделить метод ВЭЖХ-МС как лучший, поскольку он также обладает некоторыми недостатками, например, слишком широкая вариабельность параметров (состав и рН подвижной фазы, различные модификаторы, тип хроматографической колонки), которые следует оптимизировать перед анализом. Недостаточная универсальность приводит к слабому уровню стандартизации и к отсутствию унифицированных масс-спектральных баз данных и библиотек. Однако с помощью ВЭЖХ-МС, в особенности ВЭЖХ-МС/МС, можно решать некоторые задачи с более высокой эффективностью и чувствительностью по сравнению с ГХ-МС [109–110]. На сегодняшний день наибольшее внимание исследователей привлекает ультра-ВЭЖХ – вариант ВЭЖХ с давлением в системе более 500 бар – такая модификация требует ряд современных решений (насосов, капилляров, соединений различных компонентов, колонок) для достижения такого давления [111]. При сочетании данного метода с тандемной масс-спектрометрией или масс-спектрометрией высокого разрешения [112] можно добиться существенного улучшения в селективности определения, повышения эффективности разделения при уменьшении времени анализа. В целом, использование сразу обоих методов и ВЭЖХ, и ГХ, повышает достоверность обнаружения маркеров применения ОВ, а учитывая существующие критерии системы качества [77], согласно которым

определение любых маркеров ОВ должно быть подтверждено двумя независимыми методами, представляется отличным решением.

Первые работы по обнаружению маркеров ОВ при использовании ВЭЖХ с различными типами детекторов [113-116], такими как спектрофотометрический, по светорассеянию, пламенно-фотометрический появились в конце 80-х годов прошлого столетия. В то же время ученые уже использовали МС с ионизацией термораспылением [117]. Появление позднее мягких способов ионизации, в особенности ионизации электрораспылением (ИЭР), привело к появлению огромного количества работ в области ВЭЖХ-МС обнаружения и определения ОВ и их биомаркеров. Двумя наиболее популярными механизмами ионизации для ВЭЖХ-МС обнаружения и определения маркеров НПОВ на сегодняшний день являются ИЭР и химическая ионизация при атмосферном давлении (ХИАД). Оба варианта относятся к «мягким» методам ионизации, и каждый из них имеет свои преимущества. ИЭР наиболее предпочтительный источник ионов для подавляющего числа работ, связанных с ВЭЖХ-МС по сравнению с более старыми методами ионизации, например, термораспылением. В ИЭР подвижная фаза после прохождения хроматографической колонки проходит через электрораспылительный капилляр, к которому приложено высокое напряжение (несколько кВ). При постепенной десольватации капель, образующихся в источнике под действием потоков газа, поверхность капель заряжается и это приводит к выбросу диссоциированных ионов аналита под действием кулоновских сил. В ХИАД для получения аэрозоля элюат после колонки нагревается и обдувается сильным потоком азота. Далее аэрозоль подвергается коронному разряду с образованием заряженных молекул аналита. Таким образом, при ХИАД ионизация молекул происходит в газовой фазе, при ИЭР – в жидкой фазе. В качестве примера «жесткого» источника ионизации для определения АФК и АМФК можно привести индуктивно связанную плазму, однако ее использование зафиксировано лишь в одной работе [118].

Исследования на наличие ОВ и их маркеров в биологических образцах в основном проводят с помощью ВЭЖХ в различном исполнении, в том числе ионной хроматографией (ИХ) [119], обращенно-фазовой (ОФ) с градиентным элюированием, гидрофильной (HILIC) [120, 121].

Для подтверждения отравления НПОВ на практике обычно проводят ВЭЖХ-МС и ГХ-МС обнаружение метаболитов в биологических жидкостях (кровь и моча). При отравлении в биологических образцах образуются два основных типа маркеров – аддукты с белками и свободные низкомолекулярные метаболиты (АФК и АМФК) [122], причем первые обнаруживаются в крови, другие — обычно в моче. В большинстве работ, посвященных определению АФК и АМФК, для разделения используется обращенно-фазовый сорбент. Обычно используются С18 колонки или смешанные колонки С8–С18. В качестве подвижной фазы обычно применяют смеси воды с ацетонитрилом или метанолом. В качестве модификаторов подвижных фаз в МС-анализе обычно используют буферы на основе летучих солей (формиат и ацетат аммония) или кислоты (муравьиная, уксусная). В некоторых исследованиях для определения фосфоновых кислот использовали трифторуксусную кислоту, однако в работе [123] выявлено, что при использовании муравьиной кислоты чувствительность ОФ-ВЭЖХ-МС-ИЭР выше, чем в случае трифторуксусной кислоты. Также стоит отметить, что повышенные концентрации кислот подавляют сигнал, что негативно сказывается на чувствительности. Авторы [124] отметили, что использование муравьиной кислоты в некоторых случаях улучшает образование протонированных молекул ряда соединений при использовании ИЭР. АФК и АМФК слабо удерживаются в обращенно-фазовом режиме хроматографии, так как являются полярными соединениями с низкими значениями  $pK_a$ . При использовании режима регистрации положительных ионов, необходимы более высокие концентрации кислоты в ПФ для смещения равновесия диссоциации АФК и АМФК. В условиях ОФ-ВЭЖХ МФК обычно элюируется вблизи мертвого времени, что ухудшает количественные показатели ее определения ввиду значительного матричного подавления. Однако при использовании простых объектов, таких как смывы с поверхностей, можно добиться хороших результатов при определении МФК. Например, Уиллисон [125] разработал подход для обнаружения МФК, ЭМФК, иПМФК и ПинМФК на различных поверхностях (сталь, стекло, гипсокартон, дерево, ламинат) с помощью сбора салфеткой. Когда фосфоновые кислоты присутствуют по отдельности или в несложной смеси, их можно легко анализировать с помощью ОФ-ВЭЖХ-МС-ИЭР. Данный вариант использовали для обнаружения маркера зарина (иПМФК) в организмах отравленных людей [13]. В работе [126] описана

разработанная процедура с использованием ОФ-ВЭЖХ для простого и быстрого анализа мочи без предварительной пробоподготовки на предмет присутствия метаболитов зарина, зомана, VX и VR, в которой удалось добиться хорошего разделения ЭМФК, иПМФК, иБМФК и ПинМФК, которое было достигнуто с помощью градиента с подвижными фазами, состоящими из 0,5% муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила. Начальный участок градиента начинался с 98% водного раствора муравьиной кислоты и 2% ацетонитрила.

Для улучшения разделения полярных веществ при работе с ОФ сорбентами можно модифицировать неполярную поверхность с помощью ион-парного модификатора, обычно, солей тетраалкил аммония. Такой вариант хроматографии называется ион-парная. Ион-парные реагенты сорбируются на поверхности ОФ-сорбента, снижая гидрофобные свойства, при этом улучшая разделение полярных аналитов. В работе [117] авторы изучали разделение МФК и АМФК в режиме ион-парной хроматографии с колонкой на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами, которые в свою очередь модифицировали различными четвертично-аммониевыми солями. Ричардсон с соавторами в работе [118] для определения МФК, ЭМФК и иПМФК методом ВЭЖХ-МС с ионизацией индуктивно-связанной плазмой использовали колонку Alltima C8 (3,2 × 150 мм) с размером частиц 5 мкм и в качестве ион-парного реагента применяли бромид миристилтриметиламмония с подвижной фазой вода-метанол 98-2% (об.). Авторы [127] также исследовали разделение фосфоновых кислот в режиме ион-парной хроматографии с помощью модификации ОФ-сорбента гептафтормасляной кислотой. В основном, необходимость использования ион-парной системы объясняется попыткой улучшить удерживание наиболее полярного маркера НПОВ – МФК – для максимального отделения ее от матричных компонентов, что позволяет уменьшить возможные помехи и улучшить ионизацию.

Использование капилляров, заполненных неподвижной фазой, можно считать ранним этапом развития УВЭЖХ. В начале 2000-х годов исследователи применяли капиллярные ВЭЖХ колонки для определения АФК и АМФК в объектах окружающей среды [128-130]. Основной идеей использования таких колонок было повышение числа теоретических тарелок при хроматографировании полярных аналитов. Дальнейшая необходимость в повышении эффективности дало толчок в

развитии этой области, что привело к появлению УВЭЖХ. Это стало возможным благодаря появлению более мелких частиц сорбента и более производительных насосов для ВЭЖХ, которые могут создавать высокое давление, необходимое для УВЭЖХ. Стандартные насосные системы способны работать с максимальным давлением порядка сотен бар, в то время как насосы для УЭЖХ создают давление от 500 бар и выше (более 1000 бар).

В работе [125] сравнивали ВЭЖХ и УВЭЖХ с целью сокращения времени хроматографического анализа. В случае ВЭЖХ использовали колонку Atlantic C18 с параметрами  $2,1 \times 150$  мм и размером частиц 3 мкм при скорости потока подвижной фазы 0,3 мл/мин при градиентном элюировании. В случае УВЭЖХ применяли колонку Acquity VEN C18 ( $2,1 \times 50$  мм) с размером частиц 1,7 мкм при скорости потока 0,5 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор 0,2% (об.) муравьиной кислоты и ацетонитрил. В результате удалось добиться кратного (в 4 раза) уменьшения времени выхода МФК и АМФК, как следствие, времени анализа, затрачиваемого на один образец.

Еще одним способом хроматографического анализа АФК и АМФК является использование жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, или гидрофильной хроматографии (HILIC). Несмотря на широкую распространенность ОФ-ВЭЖХ и ее совместимость с МС-детектированием при ИЭР, основным ее ограничением является слабое удерживание полярных гидрофильных фосфоновых кислот. HILIC представляет собой разновидность нормально-фазовой хроматографии с полярной неподвижной фазой и высоким содержанием органического растворителя в подвижной фазе. В качестве преимуществ HILIC можно выделить такие важные аспекты, как устойчивость неподвижной фазы при более высоких содержаниях воды в ПФ, по сравнению с сорбентом более старых нормально-фазовых колонок. Подробный механизм HILIC описан в работе [131], более того также описаны основные преимущества использования HILIC хроматографии в сочетании с ИЭР-МС [132]. Использование гидрофильного варианта хроматографии имеет преимущество перед ОФ-ВЭЖХ, поскольку анализ АФК и АМФК можно проводить в органических растворителях, не опасаясь размывания пиков из-за самоэлюирования, поэтому он хорошо совместим с прямым анализом разбавленных проб окружающей среды, образцов после ТФЭ, где зачастую

содержится большое количество органических растворителей, а также совместим с анализом крови, плазмы или сыворотки, так как преципитацию белков обычно проводят как раз органическими растворителями. При HPLC-МС анализе продуктов НПОВ, МФК из-за высокой полярности слишком долго удерживается на колонке, поэтому большинство работ направлено на определение других менее полярных аналитов. Однако существует ряд работ, в которых МФК определяют с помощью именно этого режима. Например, в работе [133] МФК и другие АФК определяли масс-спектрометрически в виде положительно заряженных аддуктов с реагентом, добавляемого в поток после колонки перед источником ионизации. Достигнутые пределы обнаружения составили 10 нг/мл. В диссертационной работе [134] МФК определяли в режиме гидрофильной хроматографии после предварительного проведения реакции дериватизации п-бромфенацил бромидом. Аналогичный подход был реализован в [135] для определения МФК в водных объектах.

В работе [136] проводили оптимизацию условий ИЭР в режиме HPLC для повышения чувствительности определения АМФК. Сообщалось, что увеличение интенсивности сигнала происходит при увеличении содержания ацетонитрила в ПФ вплоть до 80%. При дальнейшем увеличении содержания ацетонитрила до 100% чувствительность снижалась из-за повышения нестабильности ИЭР и низкой концентрации акцепторов протонов, необходимых для образования анионов [132, 137]. Как видно из табл. 5, большинство работ с использованием HPLC выполнены в режиме изократического элюирования. Это может быть связано с довольно длительным временем уравнивания колонки перед анализом при использовании градиентного элюирования.

В режиме адсорбционной хроматографии удерживание аналита за счет процесса сорбции-десорбции на поверхности сорбента [158]. Существует большое количество различных сорбентов для адсорбционной хроматографии, однако для определения полярных АФК и АМФК наибольший интерес представляет пористый графитированный углеродный сорбент (ПГУС). ПГУС в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ обладает весьма уникальными свойствами и описан в посвященной ему работах [159, 160]. Для неполярных соединений ПГУС ведет себя аналогично ОФ-сорбентам с алкильными группами (напр. C18) – такие соединения сильно удерж-

**Таблица 5. ВЭЖХ-МС анализ продуктов гидролиза НПОВ**

Тип хроматографии	Колонка, условия разделения	Тип ионизации	Объект анализа	Аналиты	ПО, нг/мл	Ссылка
ОФ-ВЭЖХ	C8-C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, ТФУ	ХИАД	Вода, почва	АФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК и др.	10-400	[138]
"	C8-C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, ТФУ	ХИАД, ИЭР	Вода	АФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК и др.	< 50	[123]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, формиат аммония	ХИАД	Вода	МФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	10-400	[139]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, формиат аммония	ИЭР	Вода, почва	МФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	0,25-5	[140]
"	C18/изократика/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, муравьиная к-та	ХИАД, ИЭР	Вода	МФК	10	[141]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, уксусная к-та	ИЭР	Слюна, моча	ЭМФК, иПМФК, цГМФК, ПинМФК	10-50	[142]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, муравьиная к-та	ИЭР	Моча	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	НОК <0,5	[143]
"	C8-C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, муравьиная к-та	ИЭР	Сыворотка крови свиной	иПМФК, цГМФК	2	[37]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, муравьиная к-та	ИЭР	Моча	иПМФК, иБМФК, ПинМФК	0,5	[126]

Продолжение таблицы 5

Тип хроматографии	Колонка, условия разделения	Тип ионизации	Объект анализа	Аналиты	ПО, нг/мл	Ссылка
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, муравьиная к-та	ИЭР	Ногти	иПМФК, ПинМФК	7,5 и 0,3 нг/г	[144]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O- CH <sub>3</sub> CN, ацетат аммония	ИЭР	Почва	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	<0,5	[145]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O- CH <sub>3</sub> CN, муравьиная к-та	ИЭР	Плазма крови	МФК	3	[146]
ОФ-УВЭЖХ	C18/градиент/H <sub>2</sub> O- CH <sub>3</sub> CN, муравьиная к-та	ИЭР	Смывы с поверхностей	МФК, ЭМФК, иПМФК, ПинМФК	0,013-0,08 нг/см <sup>2</sup>	[125]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, гидроксид аммония	ИЭР	Вода	МФК, ЭМФК, иПМФК, ПинМФК	1-50	[147]
ОФ капиллярная ВЭЖХ	C18/градиент/H <sub>2</sub> O- CH <sub>3</sub> CN, ТФУ	ИЭР	Образец VX после деградации	ЭМФК и другие	-	[128]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, ТФУ	ИЭР	Почвенные экстракты	иПМФК, ПинМФК	-	[129]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, ТФУ	ИЭР	Снег	МФК, иПМФК	-	[130]
ОФ-ВЭЖХ с постколоночной дериватизацией	C18/изократика/H <sub>2</sub> O, ацетат аммония	ХИАД	Стандартный образец	МФК	-	[148]

Продолжение таблицы 5

Тип хроматографии	Колонка, условия разделения	Тип ионизации	Объект анализа	Аналиты	ПО, нг/мл	Ссылка
Ион-парная	C18/изократика/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, соли тетраалкил аммония с ацетатом аммония	Термораспыление	Стандартный образец	МФК, ЭМФК, иПМФК, цГМФК, ПинМФК	>20	[117]
"	C8/изократика/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, разные ион-парные реагенты	Индуктивно-связанная плазма	Стандартный образец	МФК, ЭМФК, иПМФК	0,14-0,26	[118]
"	C18/градиент/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, гептафтормасляная к-та	ИЭР	Стандартный образец	МФК, ЭМФК, иПМФК и др.	-	[127]
Ионообменная	Анионообменная /изократика/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, муравьиная к-та	ИЭР	Сыворотка крови	иПМФК	4	[149]
"	Анионообменная /изократика/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, муравьиная и уксусная к-ты и буферы	ИЭР	Моча крыс	МФК	4	[119]
Смешанного типа	ОФ-анионообменная /изократика/H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> CN, формиат аммония	ИЭР	Моча	МФК, иПМФК	-	[150]
Адсорбционная	Пористая углеродная колонка/изократика и градиент/летучие к-ты	ИЭР	Водопроводная вода	МФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК и др.	<1000	[151]

Продолжение таблицы 5

Тип хроматографии	Колонка, условия разделения	Тип ионизации	Объект анализа	Аналиты	ПО, нг/мл	Ссылка
"	Пористая углеродная колонка/градиент/ H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH, формиат аммония	ИЭР	Вода	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, ПинМФК и др.	20-200	[152]
Гидрофильная	Изократика/CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, формиат аммония	ИЭР	Моча	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	0,03-0,3	[58]
"	Изократика/CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, ацетат аммония	ИЭР	Стандартный образец	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	-	[136]
"	Изократика/ CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, ацетат аммония	ИЭР	Моча	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	1	[153]
"	Изократика/CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, формиат аммония	ИЭР	Моча	иПМФК	-	[150]
"	Градиент/CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, уксусная кислота	ИЭР	Сыворотка крови и моча	ЭМФК, иПМФК, цГМФК, ПинМФК	0,04-0,12	[154]
"	Изократика/CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, ацетат аммония	ИЭР	Кровь и сыворотка	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	0,09-0,43	[155]
"	Предколоночная дериватизация Градиент/CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, ацетат аммония	ИЭР	Грунт и образцы окружающей среды	МФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, ПинМФК	0,05-0,2	[156]
"	Градиент/ CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O, ацетат аммония	ИЭР	Растворы стандартных образцов	ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК	-	[157]

живаются на сорбенте. Однако удерживание полярных соединений на этих сорбентах отличается: полярные группы в структуре уменьшают время удерживания в обращенно-фазовых системах, в то время как на ПГУС такого эффекта не наблюдается. Такое поведение ПГУС и его высокая устойчивость при экстремальных значениях рН позволяет использовать его для решения сложных задач в хроматографии. В работе [151] колонку Nupercarb на основе ПГУС с размером частиц 7 мкм использовали для разделения нескольких АФК. В данном варианте использовали режим градиентного элюирования с подвижной фазой, состоящей из 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила. Авторы выявили, что трифторуксусная кислота лучше остальных кислот подходит для разделения АФК. Гончаровой и др. [161] удалось разделить семь алкил- и алкилметил-фосфоновых кислот на ПГУС колонке при использовании раствора муравьиной кислоты. Достигнутые значения ПО оказались крайне низкими (0,1-0,2 нг/мл) даже без использования ТФЭ, что доказывает перспективность применения такого рода колонок для высокочувствительного определения полярных продуктов НПОВ. В ряде работ [152, 162-164] также изучали свойства колонок на основе ПГУС для обнаружения и определения АФК и АМФК.

Из-за ионной природы АФК и АМФК являются полярными соединениями, при диссоциации которых в растворе образуются анионные остатки кислот, поэтому для их ВЭЖХ-определения также можно использовать режим ионообменной хроматографии. Основной проблемой является совместимость подвижных фаз, используемых в ионообменной хроматографии, с МС-детектированием. Поскольку в источник ионизации масс-спектрометра не должно попадать большое количество нелетучих компонентов, то для ВЭЖХ-МС анализа АФК и АМФК необходимы летучие соли, которые не будут оставаться на поверхности компонентов источника ионизации. В литературе описано всего несколько работ по совместному определению полярных фосфоновых кислот в режиме анионообменной хроматографии. Так, одним из наиболее ранних примеров является работа [149], в которой применяли анионообменную колонку для определения иПМФК в сыворотке крови пострадавших от теракта в 1995 году в Японии. Аналитический подход для определения АМФК с применением коммерческого оборудования для ИХ-МС/МС описан в «Синей книге» [165], однако в работе использовали

исключительно стандартные растворы без апробации на экологических или биологических объектах. Применение ИХ-МС/МС подхода для анализа сложных объектов описано в работах [119, 166]. Байгильдиев с соавторами использовали ИХ-МС/МС-ИЭР для анализа МФК, образующейся в моче крыс после отравления заринном, зоманом и VR [119]. Авторы использовали некоммерческую анионообменную хроматографическую колонку на основе полистирол-дивинилбензола с высокоселективной неподвижной фазой. Предложенный подход обладал высокой чувствительностью по отношению к МФК с пределом обнаружения 4 нг/мл, что позволило выявить воздействие НПОВ на крыс в нелетальных дозах. Для определения МФК и ряда АМФК разработан и апробирован на сыворотке и моче подход с пределом обнаружения в диапазоне 0,5-5 нг/мл [166].

Из-за наличия в структуре АМФК гидрофобной алкильной группы ВЭЖХ в смешанном режиме, при котором вещества удерживаются по нескольким механизмам, также является перспективным вариантом для определения маркеров НПОВ. ОФ неподвижная фаза с привитыми ион-парными группами может улучшить совместное определение АФК и АМФК. Однако в литературе мало упоминаний применения этого режима для ВЭЖХ-МС анализа фосфоновых кислот. В работе [150] использовалась хроматографическая колонка смешанного типа для разделения МФК и фторметилфосфоновой. Преимущество колонок смешанного типа состоит в том, что с их помощью можно улучшить удерживание кислых соединений за счет ионообменного механизма, наряду с хорошим удерживанием неполярных соединений за счет гидрофобного механизма. Следовательно, АФК и АМФК подходят для анализа в этом режиме разделения.

В некоторых процедурах анализ на присутствие маркеров ХО может быть выполнен за короткое время, например, разделение тирозиновых аддуктов НПОВ занимает около 2,5 мин [40]. Изократический режим используется очень редко. В этом режиме разработана методика, позволяющая тестировать около 200 образцов за 24 ч [167]. Некоторые аналитические подходы разрабатываются исключительно для обеспечения максимально возможной скорости анализа, например, 650 вколов за 24 часов [120]. Такие экспрессные методики могут найти применение для идентификации ОВ в случаях поражения большого количества людей, например, во время терактов.

Теоретически, подходящим методом для обнаружения НПОВ в живых организмах является определение степени ингибирования АХЭ. Однако на практике данный способ не имеет смысла, так как изначальная концентрация фермента в организме неизвестна и индивидуальна для каждого человека. Обнаружение, идентификация и определение НПОВ в живом организме также имеет низкое практическое значения, поскольку нативные ОВ очень быстро гидролизуются или образуют аддукты с белковыми молекулами. Несмотря на это ученые провели анализ крови для обнаружения VX с помощью ВЭЖХ в изократичном режиме [168]. Время анализа составило всего 6 минут, а время удерживания VX – 3,5 мин. Для проведения анализа потребовалось около 30 мл образца, и НОК VX составила 0,002 нг/мл.

Аддукты НПОВ с АХЭ, БХЭ, альбумином и тирозином являются характерными биомаркерами применения ОВ, которые можно анализировать ВЭЖХ-МС методом после ферментативного расщепления в плазме, например, после отравления VX и зоманом [169]. В работе [48] использовали УВЭЖХ-МС/МС для разделения менее чем за 5,5 мин аддуктов VX, зарина и МФК с БХЭ в плазме и сыворотке крови после ферментативного гидролиза пепсином. Данный подход был реализован без использования дейтерированных внутренних стандартов, несмотря на это были получены ПО ниже 1 нг/мл и оценить уровень воздействия ОВ. Некоторые экспрессные методики для анализа биомаркеров НПОВ позволяют анализировать сотни образцов в день, например, в работе [26] описан экспрессный способ микро-ВЭЖХ для анализа 7 аддуктов тирозина с НПОВ G- и V-типа, позволяющий проводить анализ 480 образцов в день.

#### ***1.4. Ненаправленный анализ***

В литературе мало описанных работ по ненаправленному анализу биологических объектов для поиска новых биомаркеров, связанных с отравлением НПОВ. В настоящее время использование профилирования ВЭЖХ-МС данных в сочетании с алгоритмами машинного обучения все чаще используется химиками-аналитиками для выявления статистически значимых признаков, характеризующих различия между несколькими экспериментальными группами [170]. Этот подход чаще всего используется для поиска биомаркеров различных заболеваний, однако

его также можно успешно использовать для поиска новых метаболитов воздействия токсичных химических веществ или изучения путей его метаболизма [171, 172].

Недавно были проведены протеомное и нецелевое метаболомное исследования образцов плазмы крови, собранных у морских свинок, которым внутривенно вводили VX [173]. В результате, авторы работы выдвинули предположение о том, что воздействие VX приводит к ингибированию фермента изоцитратдегидрогеназы 2, который участвует в процессе реакции образования  $\alpha$ -кетоглутарата из изоцитрата в цикле трикарбоновых кислот, также известном как цикл Кребса. Также было показано, что введение в клетки  $\alpha$ -кетоглутарата может спасти клетки от острых последствий отравления VX. Протеомные и метаболомные исследования свидетельствуют о том, что отравление VX приводит к немедленному, но длительному по времени нарушению энергетических процессов в организме.

Hayton и др. [174] на культуре нейронов наблюдали различия в реакциях на воздействие инсектицидов – малатиона (карбофоса) и перметрина. Воздействие малатиона приводило к повышению уровня промежуточных продуктов цикла Кребса по сравнению с отсутствием воздействия. С помощью нецелевой метаболомики авторы смогли определить важные клеточные процессы, связанные с токсическим воздействием: нарушение энергетического метаболизма и активация защитных механизмов от эксайтотоксичности. При использовании метода главных компонент были выбраны ключевые метаболиты, содержание которых изменялось при химическом воздействии.

Getnet и др. [175] описали изменение фекальной микробиоты и метаболома мочи после интоксикации зоманом. Повышенные уровни катаболизма триптофана (изменение более чем в 2 раза), выявляемые при обнаружении в моче кинуреновой кислоты и хинолина, были связаны с интоксикацией зоманом. Представление о воспалительной невропатологии воздействия зомана было дополнительно подтверждено обнаружением повышенных системных уровней эйкозаноидного медиатора воспаления – лейкотриена C4– в моче животных.

На сегодняшний день общепринято, что нецелевые методы весьма малоэффективны для выявления отравлений, поэтому более важным является взаимосвязь между используемым токсикантом и обширным ответом организма на

его воздействие. Однако исследования в этом направлении могут быть полезны для понимания метаболических процессов, связанных с отравлением.

\*\*\*

Таким образом, несмотря на большое количество работ, посвященных обнаружению и определению маркеров применения НПОВ, тема является до сих пор актуальной в связи с участившимися инцидентами нарушения Конвенции. В основном для обнаружения маркеров используют наиболее современные варианты хромато-масс-спектрометрии, такие как ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС. При использовании ГХ-МС нелетучие полярные маркеры ОВ необходимо переводить в летучие формы посредством реакции дериватизации, а также возможно анализировать ОВ в нативном виде. Помимо этого, несомненным преимуществом ГХ-МС является наличие библиотек масс-спектров различных соединений, что позволяет идентифицировать соединения без наличия стандартов. Для анализа на присутствие низкомолекулярных продуктов деградации НПОВ или белковых аддуктов наиболее выгодным методом является ВЭЖХ-МС/МС, позволяющий добиться высокой селективности и чувствительности обнаружения. При использовании ВЭЖХ нет необходимости проводить дополнительную длительную процедуру дериватизации аналитов, а высокая вариативность параметров при ВЭЖХ-МС/МС анализе позволяет выбрать наиболее оптимальные условия. Применение современных способов извлечения и концентрирования аналитов из сложных объектов и использование изотопно-меченных аналогов повышают аналитические характеристики хромато-масс-спектрометрических подходов обнаружения продуктов деградации ОВ за счет снижения матричного влияния. Также в последнее время повышенное внимание уделяется ненаправленному анализу для поиска новых маркеров применения ОВ, которые могут помочь более детально изучить метаболические процессы, происходящие при отравлении высокотоксичными соединениями.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Реагенты

Использовали следующие стандарты фосфорорганических кислот с чистотой > 98% (Sigma Aldrich, США): МФК, ЭФК, нПФК, иПФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК и ПинМФК. В качестве внутренних стандартов использовали синтезированные в лаборатории в соответствии с [176] 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 <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P). Исходные индивидуальные растворы кислот с концентрацией 1000 мкг/мл готовили путем растворения соответствующих навесок точной массы в ацетонитриле и хранили при температуре -20 °С. Рабочие растворы с необходимой концентрацией в необходимом растворителе готовили из исходных растворов путем последовательного разбавления непосредственно перед анализом.

В качестве растворителей для элюентов использовали HPLC grade ацетонитрил (Panreac, Испания) и деионизованную воду, полученную с помощью системы очистки воды Milli-Q (Millipore, США). Также использовали следующие модификаторы подвижных фаз: ацетат аммония с чистотой >98% (Roth, Германия), формиат аммония с чистотой >98% (Sigma Aldrich, США), муравьиная и уксусная кислоты с чистотой > 98% (Panreac, Испания). Аммиак 25% (Panreac, Испания).

Для проведения реакции дериватизации использовали реагент ПМФБ (2-бром-1-(4-метоксифенил)этан-1-он) чистотой > 98%, а также 2-хлор-1-(4-фторфенил)этан-1-он, 2-бром-1-(4-хлорфенил)этан-1-он, 2-бром-1-(4-бромфенил)этан-1-он, 2-бром-1-(4-метоксифенил)этан-1-он, 2-бром-N-(4-фторфенил)ацетамид, 2-бром-N-(3-метилфенил)ацетамид и 2-хлор-N-(2,4-дифторфенил)ацетамид (все Sigma Aldrich, США). Карбонат калия и гидрокарбонат натрия чистотой > 99% (Merck, Германия), триэтиламин и триметиламин (Sigma Aldrich, США). Необходимые растворы готовили растворением точных навесок в соответствующих растворителях в день проведения анализа.

Для экспонирования крыс заринном использовали ГСО 8246-2003 (Российский национальный стандартный образец) чистотой 91,0-95,0 %. Чистота стандарта на уровне 92% подтверждена ЯМР.

## 2.2. Оборудование

Для количественного анализа с помощью тандемной масс-спектрометрии в сочетании с хроматографией использовали:

– 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). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst 1.5.1 (ABSciex, Канада);

– ВЭЖХ-МС/МС систему (Shimadzu, Япония), которая включала в себя насосы NexeraX2 LC-30AD с дегазаторами DGU-20A<sub>5R</sub>, автосамплер NexeraX2 SIL-30AC, термостат колонки NexeraX2 CTO-30A, и тройной квадрупольный масс-спектрометр LCMS-8050 с источником ионизации электрораспылением. Данные ЖХ-МС/МС были получены в режиме отрицательных ионов и обрабатывались программным обеспечением LabSolution (Shimadzu, Япония);

– 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.

Для метаболомных исследований использовали приборы Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония) с заявленным разрешением >10000 (для  $m/z$  200) и ВЭЖХ-МС систему, 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 μм (Dionex, США);

– Shimpack GISS C18 (100 × 2,1 мм) с размером зерна сорбента 1.8 μм (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 [177] 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 в соответствии с [177]. Микросферические частицы ПСДВБ (степень сшивания: 50%, размер частиц: 5,5 мкм, площадь поверхности: 670 м<sup>2</sup>/г, средний размер пор: 100 Å) использовали в качестве субстрата для синтеза. Полученный анионообменный материал помещали в хроматографическую колонку из нержавеющей стали размером 100 мм × 4 мм в соответствии с процедурой, описанной в [178];

– 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.

***Картриджи для твердофазной экстракции:***

– Анионообменный CHROMABOND SB (200 мг, MACHEREY-NAGEL, Германия) – силикагель, модифицированный четвертично-аммониевыми группами;

– Обращенно-фазовый CHROMABOND HR-P (200 мг, MACHEREY-NAGEL, Германия) – высокопористый сополимер стирола и дивинилбензола;

– Chromabond SiOH (1 мл/ 100 мг, Macherey-Nagel, Германия);

– Картридж на основе сверхсшитого полистирола (СПС);

***Вспомогательное оборудование:***

Для отбора жидких проб использовали автоматические дозаторы объемом 5-50 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 1-5 мл с пределом допускаемой погрешности измерения не более ± 5% (LABMATE, Польша) и наконечники необходимых объемов. Для взвешивания точных навесок использовали аналитические весы «Vibra» (Япония) с погрешностью измерения масс 0,0001 г.

Термостат Thermo Block TDB-120 (Biosan, Латвия) для проведения реакции дериватизации. Для проведения ТФЭ применяли систему, состоящую из вакуумной камеры на 12 позиций (манифолд) фирмы CHROMOBOND SPE (MACHEREY-NAGEL, Германия), соединенной с мембранным вакуумным насосом N 86 КТ.18 серии LABOPORT (KNF, Германия). Упаривание в токе азота проводили с помощью концентратора проб Stuart SBHCONC/1 (Великобритания).

Ультразвуковая ванна («Сапфир», Россия). Шприцевые мембранные фильтры Chromafil Xtra PET-45/25 (размер пор 0,45 мкм, диаметр фильтра 25 мм; Macherey-Nagel, Германия).

### ***2.3. Процедура для совместного определения АФК и АМФК методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС с предварительной дериватизацией ПМФБ***

#### Условия ТФЭ из мочи и дериватизации.

В образцы мочи объемом 1 мл вносили добавки растворов АМФК и разбавляли 9 мл ацетонитрила. Полученный раствор центрифугировали в течение 3 минут при 14000 об/мин и загружали на картридж SILICA (Agilent Technologies, 100 mg, 1ml), предварительно активированный 1 мл смеси ацетонитрил/вода (75-25% об.) и 2 мл ацетонитрила. После пропускания раствора аналитов картридж промывали ацетонитрилом (1 мл). Целевые аналиты элюировали дважды смесью ацетонитрил/вода (75-25% об.) объемом 1 мл. Элюат концентрировали при 80 °С в токе азота. Сухой остаток растворяли в 100 мкл ацетонитрила содержащего 5 мг/мл ПМФБ. К полученному раствору добавляли 10 мл раствора триэтиламин с концентрацией 100 мг/мл и смесь нагревали при 80 °С в течение 120 мин.

#### Условия ГХ-МС/МС

Хроматографическое разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм, с неподвижной жидкой фазой DB-5MS толщиной 0,25 мкм. Разделение проводили в режиме программирования температуры: 40 °С – 1 мин, нагрев от 40 до 280 °С со скоростью 30 °С/мин, 280 °С – 25 мин. Температура инжектора 250 °С, температура интерфейса 290 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме электронной ионизации со следующими параметрами: энергия ионизации 70 эВ, температура источника ионов – 230 °С, температура масс-фильтра – 150 °С, диапазон сканируемых масс – от 40 до 500 а.е.м., частота сканирования – 10000 скан/сек. В качестве газа в соударительной ячейке использовали азот со скоростью 1,5 мл/мин. Для детектирования продуктов реакции дериватизации АМФК с ПМФБ в условиях

электронной ионизации использовали следующие селективные переходы с их оптимальными значениями энергии соударений: ЭМФК-ПМФБ  $m/z$  272  $\rightarrow$   $m/z$  135.0441 (5 эВ), иПМФК-ПМФБ  $m/z$  286  $\rightarrow$   $m/z$  135.0441 (5 эВ), иБМФК-ПМФБ  $m/z$  300  $\rightarrow$   $m/z$  135.0441 (10 эВ), ПинМФК-ПМФБ  $m/z$  328  $\rightarrow$   $m/z$  135.0441 (10 эВ).

#### Условия ВЭЖХ-МС/МС

ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили с помощью жидкостного хроматографа (Dionex Ultimate 3000), подключенного к масс-спектрометру AB Sciex Qtrap 3200 (AB Sciex, Канада). Хроматографическое разделение проводили на обращенно-фазовой колонке Acclaim RSLC C18 120 Å (150 × 2,1 мм) с размером зерна сорбента 3 мкм (Dionex, США). Колонку термостатировали при 35°C. Подвижная фаза А состояла из 0,1% водного раствора муравьиной кислоты. Подвижная фаза Б представляла собой ацетонитрил. Применяли следующий градиент программного элюирования: 0–1 мин (10% Б), 1–13 мин (10–90% Б), 13–17 мин (90% Б), 17–18 мин (90–10% Б), 18–22 мин (10% Б). Объем ввода составлял 20 мкл для каждого образца.

Параметры работы масс-спектрометра (AB Sciex Qtrap 3200): режим регистрации положительных ионов, электрораспылительная ионизация; напряжение распыляющего капилляра +5500 В; температура нагревания в источнике ионов (в термоблоке) 350 °С; давление распыляющего газа (воздух): 30 psi<sup>1</sup>; давление нагревающего газа (воздух): 40 psi; газ-завеса (азот): 15 psi; поток газа в ячейке соударений (азот): high.

#### ***2.4. Процедура проведения совместного определения АФК и АМФК при использовании анионообменной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.***

##### Образцы для анализа.

Образцы мочи для анализа получали внесением в мочу здоровых добровольцев маркеров НПОВ для достижения определенной концентрации.

##### Подготовка образцов для анализа.

Картриджи для ТФЭ Chromabond SB (200 мг) очищали и кондиционировали последовательным пропусканием трех миллилитров ацетонитрила и трех миллилитров воды с помощью 12-портового манифолда. Перед пропусканием через

---

<sup>1</sup> psi (фунт на квадратный дюйм) - внесистемная единица измерения давления: 1 psi = 0,0689 бар

картриджи 600 мкл образцов мочи с предварительно внесенными дейтерированными внутренними стандартами разбавляли 600 мкл деионизированной воды. 1 мл полученных растворов медленно пропускали через ТФЭ картриджи, затем промывали 1 мл воды и 2 мл 0,0025% аммиака в смеси вода-ацетонитрил 30:70% (об). Аналиты элюировали 1 мл 2,5% аммиака в смеси вода-ацетонитрил (1:1, об.). Полученные элюаты упаривали досуха в токе азота при 82 °С и перерастворяли в 500 мкл воды. Данные растворы анализировали согласно разработанному способу.

#### Условия ВЭЖХ-МС/МС

ВЭЖХ-МС/МС анализ проводили с помощью жидкостного хроматографа (Dionex Ultimate 3000), подключенного к масс-спектрометру AB Sciex Qtrap 3200 (AB Sciex, Канада), а также системы Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu, Япония). Хроматографическое разделение проводили на анионообменной колонке на основе полистирол-дивинилбензола с ковалентно-привитыми четвертично-аммониевыми группами. Колонку термостатировали при 35°С. Подвижная фаза А состояла из смеси ацетонитрила и воды 23-77 % (об.), содержащей 27 мМ ацетата аммония. Подвижная фаза Б состояла из смеси ацетонитрила и воды 70-30 (об), содержащей 27 мМ ацетата аммония. Применяли следующий градиент программного элюирования: 0–4,5 мин (100% А), 4,5–9,5 мин (100% А – 100% Б), 9,5–13,5 мин (100% Б), 13,5–14,5 мин (100% Б – 100% А), 14,5–18,5 мин (100% А). Объем ввода составлял 10 мкл для каждого образца.

Параметры работы масс-спектрометра (AB Sciex Qtrap 3200): режим регистрации отрицательных ионов, электрораспылительная ионизация; напряжение распыляющего капилляра -4500 В; температура в источнике ионов 350 °С; поток распыляющего газа (воздух) 30 psi; поток нагревающего газа (воздух), 40 psi; газ-завеса (азот), 15 psi; поток газа в ячейке соударений (азот), high.

Параметры работы масс-спектрометра (Shimadzu LCMS-8050): режим регистрации отрицательных ионов, электрораспылительная ионизация; напряжение распыляющего капилляра -3000 В, поток распыляющего газа 3 л/мин, потоки нагревающего и осушающего газа 10 л/мин оба, температура интерфейса 300 °С, температура нагревательного блока 400 °С, температура линии десольватации 250 °С, давление газа для ячейки соударений 270 кПа.

## ***2.5. Токсикологический эксперимент по отравлению крыс заринном и отбор образцов мочи***

Токсикологический эксперимент проводили в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека (Ленинградская область, Россия).

Биологические образцы были получены в эксперименте *in vivo* от белых беспородных крыс-самцов с массой тела 270 – 295 г. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 N 267). Для сбора мочи использовали метаболические камеры АЕ0906. В течение всего эксперимента крысы имели свободный доступ к воде. При содержании животных и проведении манипуляций руководствовались правилами гуманного обращения с животными (ГОСТ 33216-2014 - Межгосударственный стандарт руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (“Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits”). Условия и факторы, влияющие на здоровье животных, соблюдались в соответствии с ГОСТ 33215-2014, п.6.1 и 6.4. При выведении животных из эксперимента эвтаназия проводилась в соответствии с ГОСТ 33215-2014, п.6.11.

В работе использовали ГСО 8246-2003 состава зарина с массовой долей основного вещества (91,0-95,0%). Методом спектроскопии ЯМР содержание основного вещества установлено на уровне 92 %.

Раствор зарина в ДМСО с концентрацией 75 мкг/мл объемом 0,2 мл вводили подкожно каждой крысе под анестезией в количестве  $\frac{1}{4}$ ЛД<sub>50</sub> (51-56 мкг/кг в зависимости от веса крысы). Для приготовления этого раствора 3 мкл раствора 50 мг/мл зарина в ДМСО разбавляли ДМСО для получения 2 мл раствора.

Контрольные образцы мочи крыс отбирали перед токсикологическим экспериментом и использовали в качестве холостых (бланковых) матриц для разработки процедуры целевого анализа и валидации. Перед заражением крыс заринном в течение четырех суток вводили воду внутривентрикулярно. На четвертые сутки, спустя 2 часа после введения воды в желудок, вводили подкожно раствор зарина. Образцы мочи отбирали на 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22,

25, 26 сутки после заражения и хранили в аликвотах по 2 мл при -20°C. Для каждой даты это суточная моча, которую отбирали в течение 24-х часов. На 26 сутки после отбора мочи снова вводили внутривенно воду и через 2 часа подкожно раствор зарина. На 27 день отбирали мочу и проводили эвтаназию животных.

## ***2.6. Процедура проведения совместного ВЭЖХ-МС/МС определения МФК и АМФК в моче крыс при использовании колонки смешанного типа.***

### Образцы для анализа.

Образцы мочи крыс, отравленных заринном подкожно, были предоставлены НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека (Ленинградская область, Россия).

### Пробоподготовка образцов для анализа.

Образцы мочи крыс размораживали при комнатной температуре, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин. Надосадочную жидкость отделяли от остатка и фильтровали через мембранный фильтр Chromafil Xtra PET-45/25. Картриджи для ТФЭ Chromabond SiOH (1 мл/100 мг) кондиционировали последовательным пропуском 1 мл воды и 1 мл ацетонитрила при использовании 12-портового манифолда. Перед загрузкой отфильтрованные образцы мочи разбавляли ацетонитрилом в 10 раз: 500 мкл мочи и 4500 мкл ацетонитрила. Полученные растворы (5 мл) медленно пропускали через сорбент ТФЭ картриджей, затем промывали 1 мл ацетонитрила и 1 мл водно-ацетонитрильной смеси (1:9, об.). Аналиты элюировали 1 мл смеси вода-ацетонитрил (1:3, об.). Элюаты упаривали досуха в слабом потоке азота при 82 °С и перерастворяли в 500 мкл водно-ацетонитрильной смеси (95:5, об.). Полученные растворы переносили в вials для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

### Условия ВЭЖХ-МС/МС.

Использовали систему LCMS-8050 (Shimadzu; Япония) с источником ионизации электрораспылением. Данные ВЭЖХ-МС/МС были получены в режиме регистрации отрицательных ионов. Хроматографическое разделение проводили на колонке Primesep SB. Температура термостата колонки 35°C. Подвижная фаза А представляла из себя 20 mM формиатно-аммонийный буфер при pH 3,4 в смеси ацетонитрила и воды 30:70 (об.). Подвижная фаза Б представляла собой 40 mM

формиатно-аммонийный буфер при рН 4,5 в смеси ацетонитрила и воды 70:30 (об.). Приведены значения рН конечных водно-ацетонитрильных растворов. Для доведения рН использовали муравьиную кислоту. Применяли следующий градиент элюирования: 0,0–4,5 мин (100% А), 4,5–6,5 мин (100% А–100% В), 6,5–18 мин (100% В), 18,0–19,0 мин (100% Б – 100 % А), 19,0 – 24,0 мин (100 % А – 100 % А). Объем ввода пробы составлял 20 мкл для каждого образца. Температура автосамплера составляла 8 °С. Параметры МС-детектирования были следующими: режим регистрации отрицательных ионов, электрораспылительная ионизация; напряжение капилляра –3000 В, поток распыляющего газа 3 л/мин, поток нагревающего и осушающего газов по 10 л/мин, температура интерфейса 300 °С, температура термоблока 400 °С, температура линии десольватации 250 °С, давление газа для ячейки соударений 270 кПа.

## ***2.7. Процедура проведения совместного ВЭЖХ-МС/МС определения МФК и АМФК в растениях и почве при использовании колонки смешанного типа***

### Извлечение аналитов из растения и почвы.

Целое растение *Nedera Helix* (состоящее из листьев, стеблей и корней) замораживали жидким азотом и измельчали в фарфоровой ступке. Полученный растительный материал взвешивали и 1 г помещали в пластиковую пробирку объемом 5 мл. Всю почву из горшка, в которой произрастало растение, равномерно распределяли на листе бумаги и оставляли до полного высыхания на несколько часов после отделения почвы от растения. После полного высыхания с разных участков листа отбирали по 0,1 г почвы и помещали в пластиковую пробирку объемом 5 мл. Затем к образцам добавляли по 10 мкл раствора смеси дейтерированных внутренних стандартов и перемешивали содержимое на вортексе в течение 10 минут. Далее добавляли 2 мл 10% (об.) раствора ацетонитрила в воде. Исследуемые аналиты экстрагировали в ультразвуковой ванне Сапфир-2,8 (Сапфир, Россия) в течение 10 минут. Экстракты центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант фильтровали через мембранный фильтр Chromafil Xtra 0,25 мкм (Macherey-Nagel, Германия). Далее повторяли процедуру УЗ-экстракции, центрифугирования и фильтрации, с дальнейшим объединением полученных

фракций в пластиковой пробирке объемом 5 мл. Полученный раствор выпаривали досуха при 70 °С в токе азота с использованием концентратора образцов SBHCONC1 (Stuart, UK) и остаток растворяли в 200 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты в смеси ацетонитрила и воды в соотношении 5-95 %. Полученный раствор переносили в стеклянную виалу для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

#### Условия ВЭЖХ-МС/МС.

Данные ВЭЖХ-МС/МС были получены с использованием комбинации жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Dionex, США) и tandemного масс-спектрометра 3200 QTrap (AB Sciex, Канада). Разделение проводили на аналитической колонке смешанного типа Primesep SB (150 мм × 2,1 мм, 5 мкм, SIELC, США). Колонку термостатировали при 35°С. Подвижная фаза А представляла собой 20 mM буфер формиата аммония с рН 3,4 в смеси ацетонитрил:вода 30:70 (об.). Подвижная фаза Б состояла из смеси ацетонитрила и воды 70:30 (об.) с рН 4,3, содержащей 40 mM формиата аммония. Применялась следующая программа градиентного элюирования: 0,0-4,5 мин (0% Б), 4,5-6,5 мин (0% Б - 100% Б), 6,5-18,0 мин (100% Б), 18,0-19,0 мин (100% Б - 0 % Б), 19,0-24,0 мин (0 % Б). Объем ввода автосэмплером составлял 20 мкл. Температура в автосэмплере составляла 10 °С. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,4 мл/мин.

Условия ИЭР-МС/МС при стокновительной фрагментации на AB Sciex Qtrap 3200 были следующими: режим регистрации отрицательных ионов; напряжение на игле источника -4500 В; температура нагревания 350 °С; газ (воздух) для распыления, 30 psi; нагревающий газ (воздух) для осушения растворителя, 40 psi; газ-завеса (N<sub>2</sub>), 15 psi; газ в ячейке соударения (N<sub>2</sub>), high.

## ***2.8. Процедура проведения метаболомного профилирования***

#### Образцы для анализа.

Образцы мочи крыс, отравленных заринном подкожно, были предоставлены НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека (Ленинградская область, Россия) в замороженном состоянии (-20 °С).

#### Условия ВЭЖХ-МС/МС.

Данные ВЭЖХ-МС были получены на приборе Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония) в режиме регистрации отрицательных и положительных ионов.

Разрешение прибора не менее 10000 ( $m/z$  200) по данным производителя, погрешность определения значения  $m/z < 5$  ppm. Разделение проводили на аналитической колонке Shimpack GISS C18 (Shimadzu, Япония). Температура колонки поддерживалась при 35 °С. Подвижная фаза А состояла из 0,1% (об.) водного раствора муравьиной кислоты. Подвижная фаза Б представляла собой ацетонитрил. Применялся следующий градиент элюирования: 0,0 – 5,0 мин (5% Б), 5,0 – 25,0 мин (5% Б – 40% Б), 25,0 – 27,0 мин (40% Б – 95% Б), 27,0 – 30,0 мин (95%В – 95%В), 30,0 – 31,0 мин (95%В – 5%В), 31,0 – 36,0 мин (5%В – 5%В), объем ввода пробы составил 5 мкл для каждого образца.

Параметры МС в режиме регистрации как положительных, так и отрицательных ионов были следующими: температура линии десольватации – 275°С, температура термоблока – 275°С, расход распыляющего газа – 1,5 л/мин, давление осушающего газа – 102 кПа, напряжение на игле капилляра электрораспыления – 4,5 кВ (режим положительных ионов) и -3,5 кВ (режим отрицательных ионов). МС-спектры регистрировали в сканирующем режиме в диапазоне  $m/z$  80 – 850. Время полного цикла – 300 мс, количество повторов – 3, время накопления ионов – 30 мс. Спектры фрагментации в режиме МС/МС (режим CID) для предварительной идентификации получали отдельно для каждого выбранного метаболита в диапазоне  $m/z$  от 80 Да до массы иона-предшественника +5 Да при следующих условиях МС<sup>2</sup>-уровня: ширина выделения ионов-предшественников 3 Да; время накопления ионов – 50 мс; повтор – 1; газ в ячейке соударений (аргон) 50 %.

Все образцы мочи, предварительно разбавленные в 2 раза деионизированной водой, были проанализированы в режиме сканирования несколькими партиями в случайном порядке для предотвращения систематической погрешности. Калибровка прибора по массам проводилась перед каждой партией при использовании стандартного раствора образца трифторацетата натрия в смеси вода-ацетонитрил. В начале каждой партии хроматографическая система кондиционировалась последовательным введением бланкового образца и образца pQC. Бланковые образцы представляли собой деионизированную воду. Образцы pQC готовили путем смешивания всех образцов мочи крыс в равных пропорциях. Каждая аналитическая партия состояла из пятнадцати исследуемых образцов мочи. Образцы pQC

анализировали в начале партии и после каждых пяти инъекций (всего четыре образца pQC в партии). В конце каждой партии проводили чистку источника ионов, поскольку пробоподготовка мочи заключалась лишь в разбавлении водой перед анализом.

Масс-спектры первого и второго поколения предложенных потенциальных биомаркеров действия зарина дополнительно получали с помощью масс-спектрометра высокого разрешения Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, США). Величина разрешения масс-спектрометра была не менее 30000, погрешность определения значения  $m/z$  не превышала 3 ppm (для  $m/z$  200). Напряжение на распылительном капилляре составляло ( $\pm$ )3500 В, значения распыляющего газа, вспомогательного газа и газа-завесы составляли 50, 10 и 1 у.е., соответственно. Температура трубки переноса ионов и испарителя составляла 325°C и 350°C, соответственно. Спектры МС получали в диапазоне  $m/z$  80 – 400 Да. МС<sup>2</sup> спектры для идентификации получали отдельно для каждого метаболита в диапазоне масс от 80 Да до массы иона-предшественника плюс 15 Да при энергии столкновений (режим CID) 25 эВ с шириной выделения иона-предшественника 1,6 Да. В качестве газа для ячейки соударений использовали азот.

#### Обработка данных.

Программное обеспечение LabSolution (версия 3.80.410, Shimadzu, Япония) использовали для получения данных ЖХ-МС и их преобразования в формат CDF. Все остальные расчеты проводились с помощью языка программирования R (версия 4.0.0) [179] на компьютере Intel Xeon с тактовой частотой 2,66 ГГц.

Многогрупповой fold-change анализ проводили с помощью базовых пакетов R. Обобщенная аддитивная смешанная модель GAMM [180] была реализована пакетом gamm4 (0.2-6). Моделирование «доза-эффект» было проведено с помощью DRomics (2.2-0) [181]. Интеграцию пиков и выравнивание выполняли отдельно для каждой полярности с помощью XCMS (3.9.1) [182], параметры оптимизировали с помощью IPO (1.14.0) [183] с образцами pQC. Коррекцию сигнала проводили по алгоритму QC-XGB [184]. Заполнение отсутствующих значений проводилось в пакете missForest (1.4) [185]. Для аннотации таблицы пиков использовали CAMERA [186]. Также использовали ggplot2, reshape2 (построение точечной диаграммы) и FactoMineR, factoextra (график PCA). Обработку данных проводили в соответствии с исследованием [184, 187], программный скрипт статистического анализа доступен по адресу [188]. Все программные коды скриптов доступны на GitHub [187, 188].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ ДЕРИВАТИЗАЦИИ АЛКИЛФОСФОНОВЫХ И АЛКИЛМЕТИЛФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ П-МЕТОКСИФЕНАЦИЛ БРОМИДОМ <sup>2</sup>

Низкие молекулярные массы наряду с высокой полярностью алкилфосфоновых (АФК) и алкилметилфосфоновых (АМФК) кислот создают проблемы для экспрессного их определения методами ГХ и ОФ-ВЭЖХ. Для ГХ анализа нелетучие АФК и АМФК предварительно необходимо дериватизировать для блокирования гидроксильных групп и перевода в более летучие формы. Превалирующее количество исследований включают в себя стандартные процедуры дериватизации АФК и АМФК для ГХ-МС с получением силильных, метильных, реже – ацильных, производных [189]. Низкая гидрофобность создает препятствия при определении кислот методом ОФ-ВЭЖХ, которое проявляется в слабом удерживании аналитов на неполярном сорбенте колонки и элюировании в зоне «мертвого времени», вследствие чего такие подходы обладают недостаточной чувствительностью для их обнаружения [119, 142]. Использование реакций дериватизации, приводящих к блокированию гидроксильных групп АФК и АМФК, позволяет увеличить молекулярную массу и снизить полярность соединений, и, таким образом, существенно уменьшить пределы обнаружения и улучшить метрологические характеристики определения как методом ГХ-МС, так и ВЭЖХ-МС. Однако эффективных универсальных методов дериватизации, пригодных как для ГХ-МС, так и для ВЭЖХ-МС до настоящего времени предложено не было. Вместе с тем, наличие универсальных процедур дериватизации позволило бы, наряду с повышением чувствительности, существенно упростить и ускорить процесс получения одних и тех же производных, применимых как для ГХ-МС, так и для ВЭЖХ-МС анализа. В данной главе среди 7 дериватирующих реагентов, потенциально решающих проблему одновременного определения производных

---

<sup>2</sup> При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: *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. (Импакт-фактор Web of Science – 1,069, Q4) 50%; *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. (Импакт-фактор Web of Science – 1,237, Q4) 30%.

фосфоновых кислот методами ВЭЖХ-МС и ГХ-МС, выбран реагент п-метоксифенацилбромид.

### 3.1. Выбор дериватизирующего реагента

В качестве дериватизирующих 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, с которыми реакция дериватизации АФК и АМФК имеет одинаковый механизм. На рис.2 приведены структуры выбранных дериватизирующих реагентов, а именно, 2-хлор-1-(4-фторфенил)этан-1-она, 2-бром-1-(4-хлорфенил)этан-1-она, 2-бром-1-(4-бромфенил)этан-1-она, 2-бром-1-(4-метоксифенил)этан-1-она, 2-бром-N-(4-фторфенил)ацетамида, 2-бром-N-(3-метилфенил)ацетамида и 2-хлор-N-(2,4-дифторфенил)ацетамида.

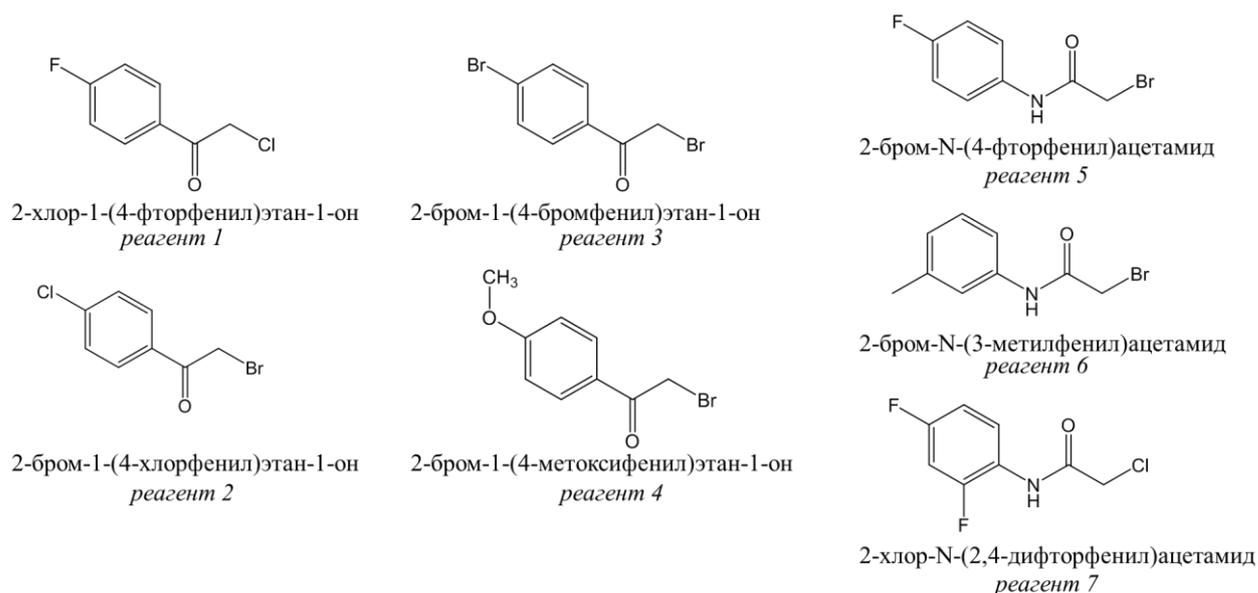
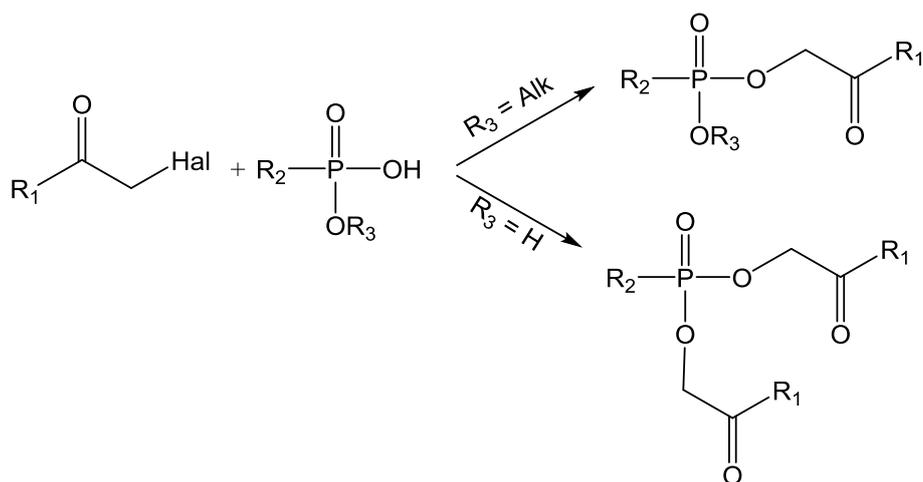


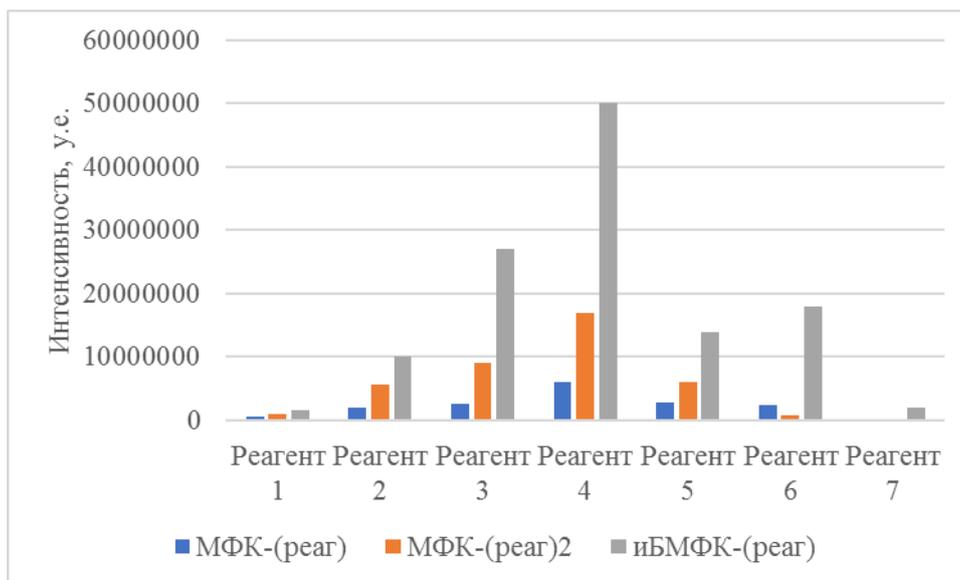
Рис.2. Структуры дериватизирующих реагентов

Реакция между АФК и АМФК с выбранными дериватизирующими 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 (рис. 3). В случае же АМФК, когда атом водорода одной ОН-группы АФК замещен на алкильную группу, продукт реакции может быть только один.



**Рис.3. Схема реакции АФК и АМФК с выбранными дериватирующими реагентами**

Для 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. На рис. 4 представлена диграмма интенсивностей продуктов дериватизации МФК и иБМФК в зависимости от используемого дериватирующего реагента. Видно, что наибольшая чувствительность наблюдается для реагента 4. Поскольку интенсивности продуктов дериватизации с реагентом 4 (2-бром-1-(4-метоксифенил)этан-1-он или п-метоксифенацилбромид) были наибольшими в режиме сканирования положительных и отрицательных ионов, то для дальнейшего исследования возможностей хромато-масс-спектрометрического обнаружения продуктов дериватизации АФК и АМФК выбрали именно его.



**Рис.4. Интенсивности пиков продуктов дериватизации МФК и иБМФК различными реагентами**

Реакция между фосфоновыми кислотами и ПМФБ протекает по реакции нуклеофильного замещения. Для повышения эффективности протекания реакции необходима щелочная среда для создания условий диссоциации фосфорорганических кислот с образованием активного аниона. Для этого можно использовать как органические основания (например, амины), так и неорганические (например, КОН). Для повышения выхода реакции при проведении дериватизации использовали большой избыток реагента.

### ***3.2. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования***

#### **3.2.1. ВЭЖХ-МС/МС**

Для повышения чувствительности и селективности разрабатываемого подхода определения АФК и АМФК с предварительной дериватизацией ПМФБ использовали тандемную масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ИЭР) в режиме мониторинга множественных реакций. На аналитический сигнал в данном режиме влияет множество факторов, таких как температура и поток газов в источнике, потенциал декластеризации (ПД), энергия соударений (ЭС), входной потенциал.

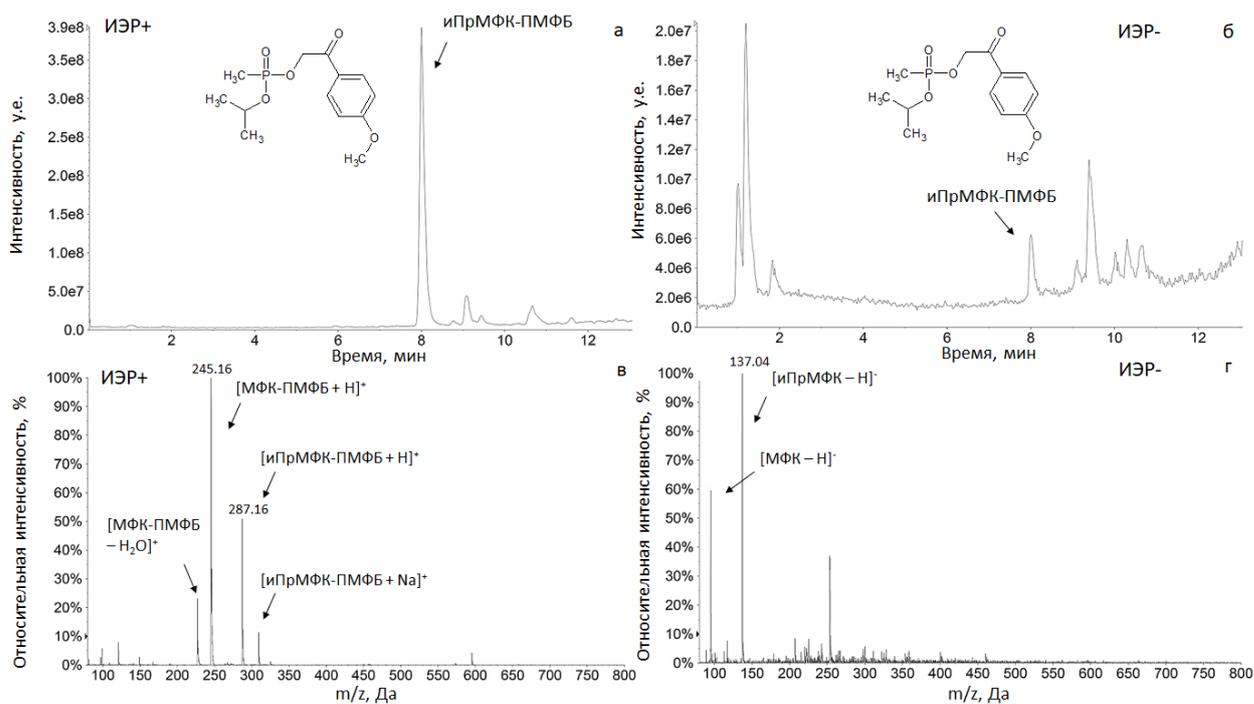
На первом этапе изучали закономерности ионизации и выбирали ионы-предшественники и ионы-продукты для продуктов дериватизации кислот. Для этого предварительно проводили реакцию дериватизации стандартных растворов АФК и

АМФК выбранным реагентом. Поскольку при проведении реакции использовали избыток ПМФБ, подбор условий МС-детектирования был невозможен при инъекции растворов продуктов дериватизации в источник масс-спектрометра с помощью шприцевого насоса – ионы реагента ПМФБ подавляли ионизацию продуктов дериватизации и в масс-спектре наблюдались в основном ионы реагента, поэтому выбор МС-условий проводили при предварительном хроматографическом разделении продуктов дериватизации на хроматографической колонке. Для разделения использовали колонку Acclaim RSLC C18 120 Å (150 × 2,1 мм) с диаметром зерна сорбента 3 мкм и градиентное элюирование с двумя элюентами: А – 0,1% раствор муравьиной кислоты, Б – ацетонитрил. Скорость подвижной фазы 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл. Применение программы градиентного элюирования, представленной в табл. 6, позволило добиться хорошего разделения всех продуктов реакции дериватизации.

**Таблица 6. Режим градиентного элюирования для выбора условий МС-детектирования**

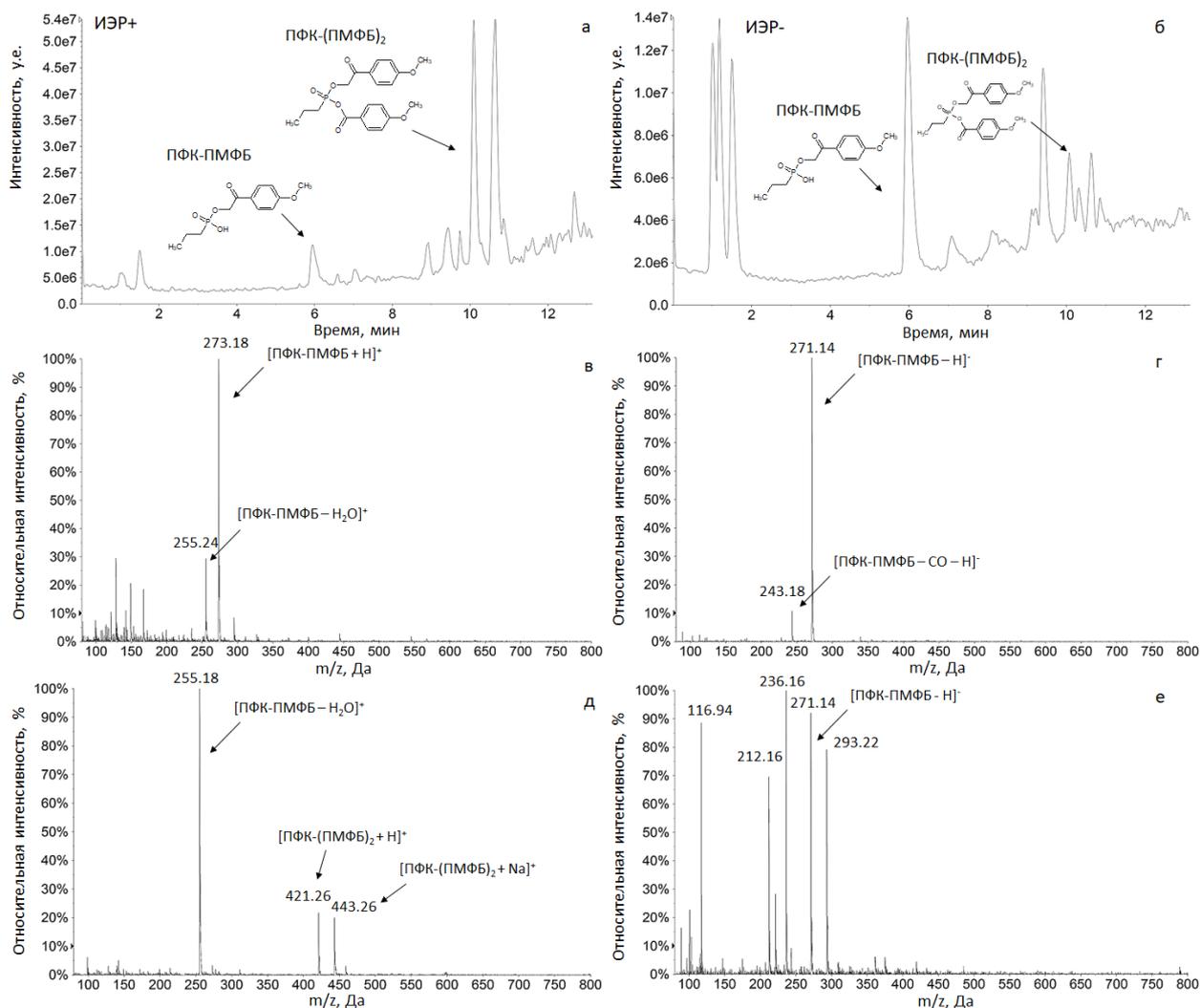
Время, мин	0	1	13	17	18	22
Элюент Б, %	10	10	90	90	10	10

В режиме регистрации положительно заряженных молекул для всех продуктов дериватизации АМФК характерно присутствие в масс-спектре сигналов протонированных молекул (рис. 5в), которые частично подвергались фрагментации с образованием протонированной молекулы деривата МФК с  $m/z$  245. В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов было обнаружено, что депротонированные молекулы продуктов дериватизации АМФК нестабильны (рис. 5г), так как в масс-спектрах наблюдались только сигналы, соответствующие депротонированным молекулам исходных кислот.



**Рис. 5.** Хроматограммы производного иПМФК-ПМФБ в режиме регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов. Масс-спектры деривата иПМФК в режиме регистрации положительно (в) и отрицательно заряженных ионов (г).

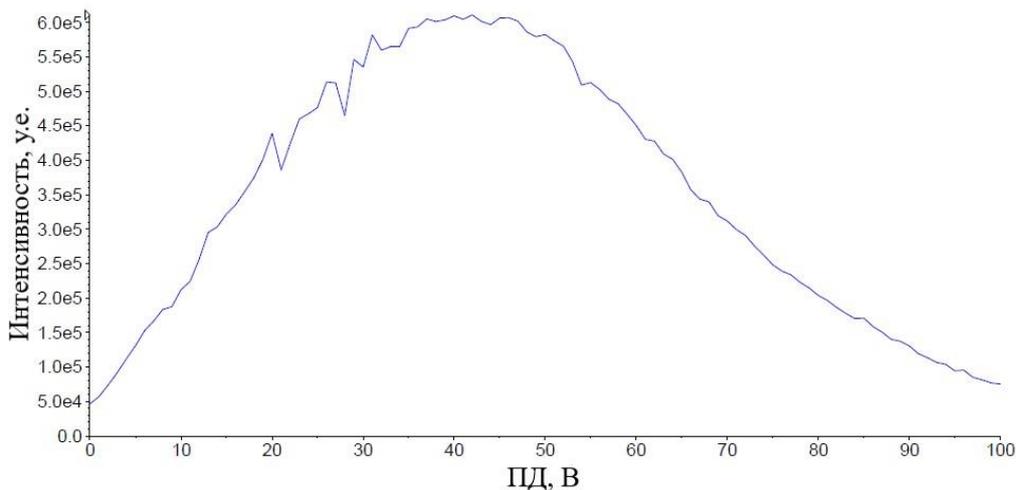
Аналогичная закономерность при образовании ионов в источнике ИЭР была замечена и для АФК (рис. 6). Протонированные молекулы продуктов дериватизации АФК по двум ОН-группам были зарегистрированы в режиме регистрации положительных ионов (рис. 6д) и также были нестабильны в режиме регистрации отрицательно заряженных молекул (рис. 6е). Однако в случае продуктов дериватизации 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. 6г), в режиме положительно заряженных ионов – протонированная (рис. 6в). Такое поведение может объясняться наличием в структуре продукта дериватизации одной непрореагировавшей гидроксильной группы, которая в условиях ИЭР может существовать как в депротонированной, так и в протонированной форме. Таким образом, для совместного определения алкилфосфоновых кислот и алкиловых эфиров МФК наиболее выгодным является режим регистрации положительно заряженных молекул, так как все продукты дериватизации могут быть зарегистрированы одновременно в виде ионов  $[M+H]^+$ .



**Рис. 6. Хроматограммы продукта дериватизации ПФК с ПМФБ в режиме регистрации положительно (а) и отрицательно (б) заряженных ионов (ионизация электрораспылением). Масс-спектры продукта дериватизации ПФК по одной ОН-группе (в) и двум ОН-группам (д) в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Масс-спектры продукта дериватизации ПФК по одной ОН-группе (г) и двум ОН-группам (е) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.**

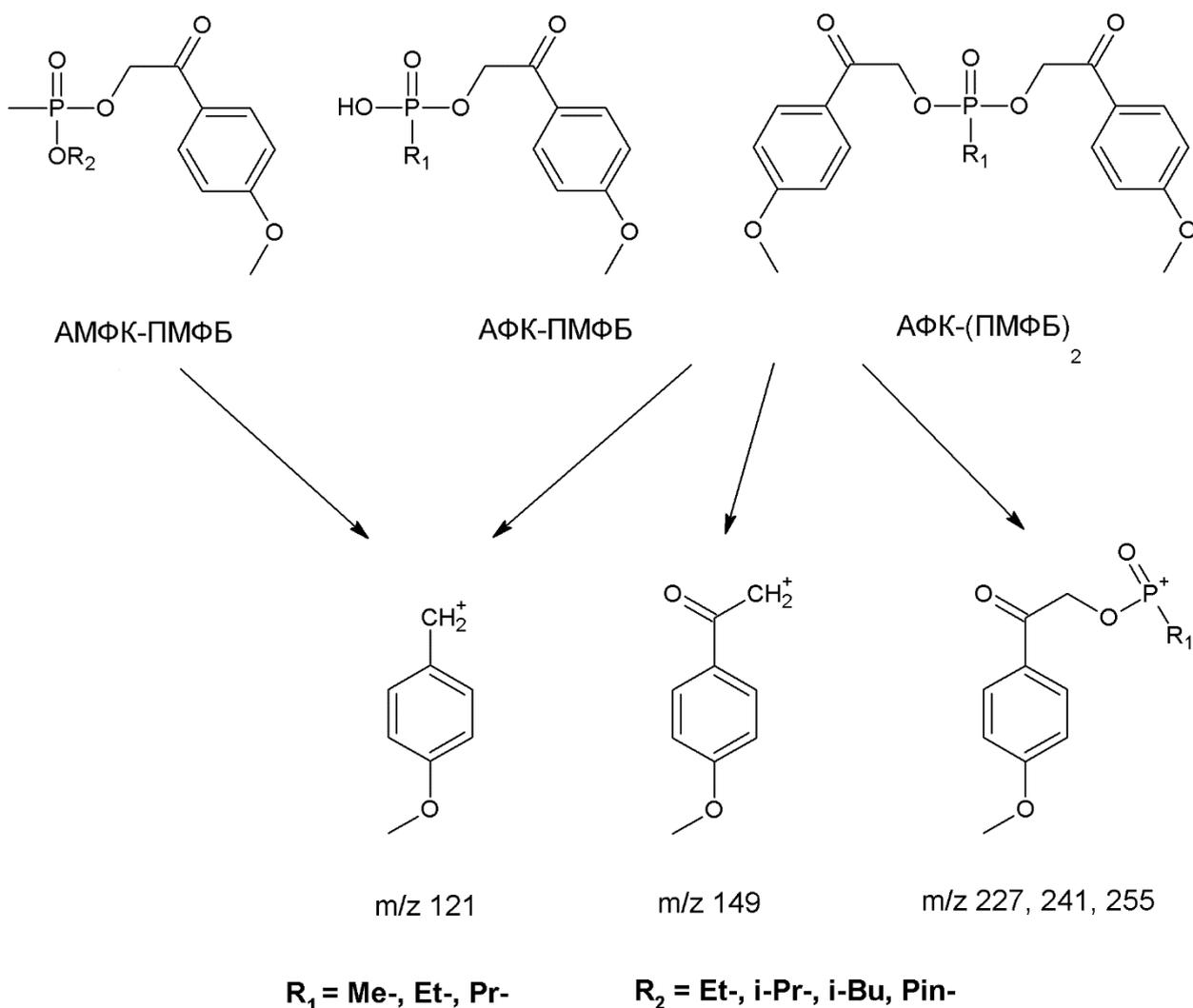
Для повышения чувствительности по отношению к ионам, представляющих собой протонированные молекулы продуктов дериватизации АФК и АМФК с ПМФБ, на следующем этапе выбирали значение потенциала декластеризации (ПД) – потенциал, действующий на ионы в низковакуумной области (несколько мбар), придающий им скорость (импульс) и заставляющий сталкиваться с молекулами остаточного газа (обычно, азот), для минимизации образования кластеров ионов с молекулами подвижной фазы. Однако слишком высокие значения ПД могут вызвать нежелательную фрагментацию, а также повлиять на линейность отклика. Критерием выбора наиболее подходящего значения ПД являлась максимальная интенсивность

сигнала протонированных молекул продуктов дериватизации. Для выбора оптимальных значений получали зависимости интенсивности сигналов протонированных молекул АФК-ПМФБ, АФК-(ПМФБ)<sub>2</sub> и АМФК-ПМФБ от ПД. На рис. 7 представлена зависимость интенсивности сигнала продукта дериватизации иПМФК от ПД, проходящая через максимум, форма которой характерна и для других аналитов. Как видно, оптимальное значение ПД для иПМФК-ПМФБ находится на вершине пика в диапазоне от 35 до 50 В.



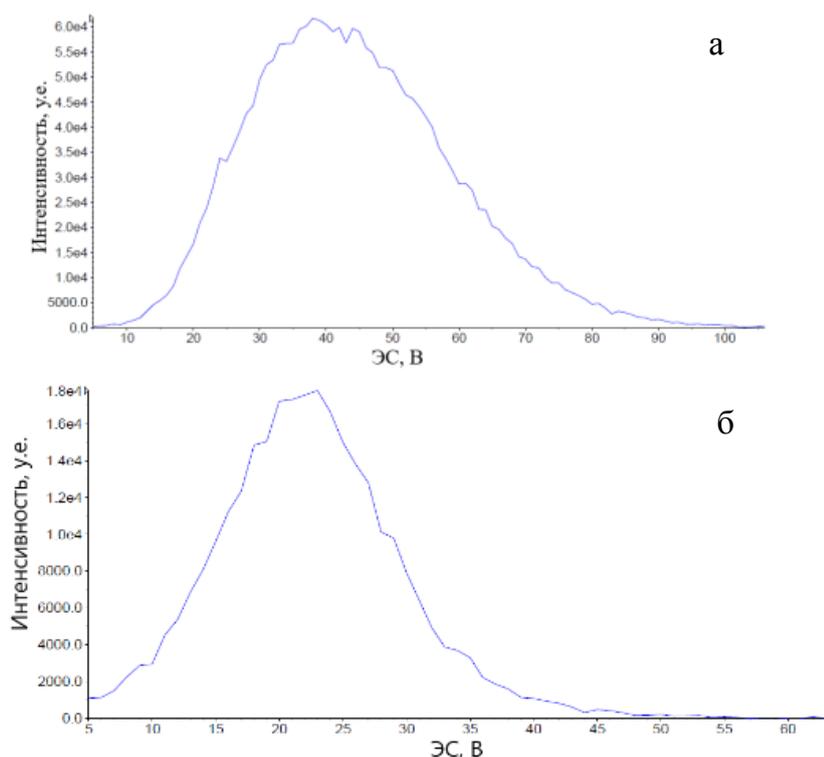
**Рис. 7.** Зависимость интенсивности сигнала, соответствующего протонированной молекуле продукта дериватизации иПМФК с  $m/z$  287 Да, от значений ПД.

Далее выбирали самые интенсивные сигналы ионов-продуктов, образованных в результате фрагментации протонированных молекул в ячейке соударений масс-спектрометра. Для этого для всех продуктов дериватизации АФК и АМФК были получены масс-спектры второго поколения (МС<sup>2</sup> спектры). Наиболее интенсивными сигналами в масс-спектрах практически всех анализируемых соединений являлись сигналы ионов с  $m/z$  149 и  $m/z$  121 Да (рис. 8), соответствующие положительно заряженным фрагментам реагента. Однако в масс-спектрах АФК по двум ОН-группам могут быть зарегистрированы более интенсивные характеристичные пики ионов с  $m/z$  227, 241 и 255, которые в своей структуре содержат фрагменты как АФК, так и реагента.



**Рис. 8. Структура предполагаемых ионов-продуктов, образованных из протонированных молекул продуктов дериватизации АФК и АМФК**

После выбора ионных реакций (ион-предшественник → ион-продукт) оптимизировали энергию соударений (ЭС) – энергия, которая придается иону-предшественнику благодаря разности потенциалов в столкновительной ячейке. Ионы-предшественники получают энергию и сталкиваются с молекулами газа, образуя фрагментные ионы. Чем выше ЭС, тем сильнее будет фрагментация. Для иПМФК зависимость интенсивности сигналов МРМ-переходов от ЭС представлена на рис. 9. Таким образом, в случае продукта дериватизации иПМФК максимальная интенсивность сигналов ионов-продуктов с  $m/z$  121 и 149 Да достигается при значениях ЭС, равных 35 и 20 эВ, соответственно.



**Рис. 9. Зависимость интенсивности сигналов для ионных реакций 287 → 121 (а) и 287 → 149 (б) от значений энергии соударений**

Таким образом, для повышения чувствительности и селективности ВЭЖХ-МС/МС определения АФК и АМФК после дериватизации ПМФБ в режиме МРМ, были выбраны ионные реакции (табл. 7), а также выбраны оптимальные значения ПД и ЭС. На рис. 10 представлена хроматограмма смеси производных АФК и АМФК в выбранных условиях. Не удалось добиться полного разделения некоторых продуктов дериватизации, например, МФК-(ПМФБ)<sub>2</sub> и иБМФК, а также ПФК-(ПМФБ)<sub>2</sub> и ПинМФК, однако это не мешает идентификации и определению вследствие уникальности ионных реакция. Продукты дериватизации идентичных по химическим свойствам изомеров ПФК (иПФК и нПФК) имеют одинаковое время выхода в режиме ОФ-ВЭЖХ, однако в этом случае они также имеют одинаковые МРМ-переходы, следовательно, определить содержание отдельного изомера при их совместном присутствии невозможно. Также невозможно идентифицировать, какая именно кислота присутствует в растворе. Можно обнаружить ПФК без информации о строении или определить суммарное содержание иПФК и нПФК.

Таблица 7. Оптимизированные условия МС-детектирования продуктов реакции дериватизации

Аналит	m/z (1), Да	m/z (2), Да	ПД, В	ЭС, В	t <sub>R</sub> , 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) <sub>2</sub>	393	227	40	20	8,8	определение
		121		60		подтверждение
ЭФК-ПМФБ	259	121	40	27	5,1	определение
		149		15		подтверждение
ЭФК-(ПМФБ) <sub>2</sub>	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) <sub>2</sub>	421	255	40	10	10,0	определение
		121		50		подтверждение

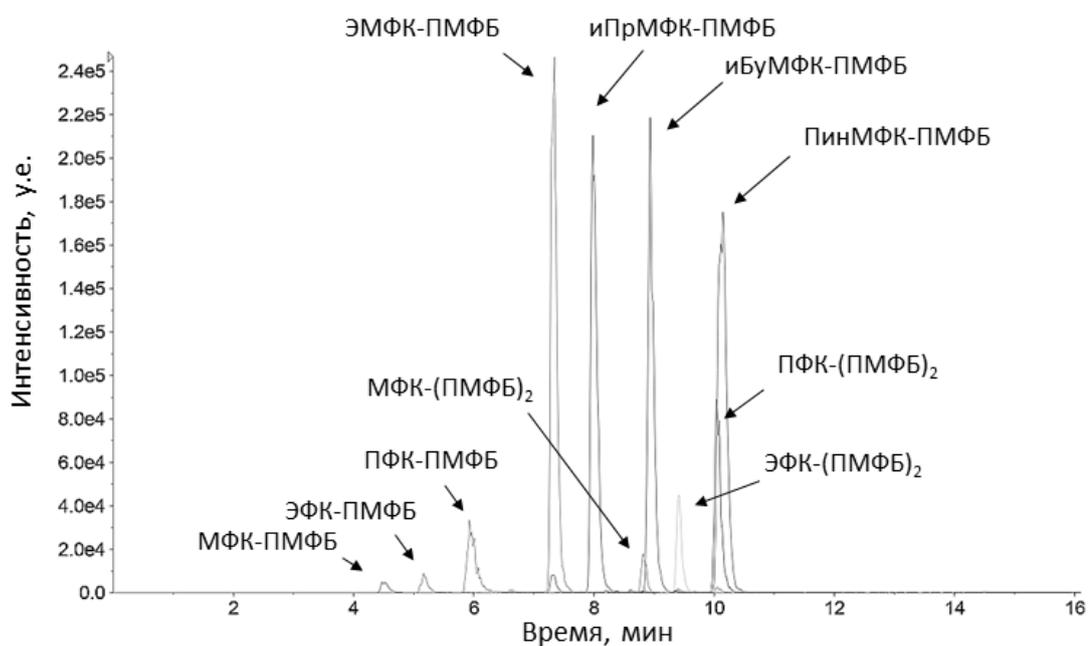


Рис. 10. Масс-хроматограмма смеси производных АФК и АМФК по выбранным ионным реакциям в режиме обращенно-фазового разделения

### 3.2.2. ГХ-МС/МС

Выбор оптимальных условий для ГХ-МС определения АФК и АМФК в виде продуктов дериватизации ПМФБ проводили при предварительном разделении продуктов реакции на хроматографической колонке при следующем режиме программирования температуры: 40 °С – 1 мин, нагрев от 40 до 280 °С со скоростью 30 °С/мин, 280 °С – 25 мин.

При изучении масс-спектров электронной ионизации (ЭИ) было выявлено, что продукты дериватизации АФК нельзя определять методом ГХ-МС. Это может быть связано с высокой полярностью и низкой летучестью дериватов по одной ОН-группе, и слишком высокой молекулярной массой продуктов дериватизации по двум ОН-группам. Для продуктов дериватизации АМФК с ПМФБ удалось получить масс-спектры, важной особенностью которых является наличие молекулярных ионов дериватов (рис. 11), что ранее не удавалось наблюдать для продуктов дериватизации 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 молекулярных ионов в МС<sup>2</sup> спектрах продуктов реакции АМФК с ПМФБ наиболее интенсивным является ион с  $m/z$  135, который является фрагментом молекулы ПМФБ и также присутствует в МС<sup>1</sup> спектрах продуктов дериватизации АМФК, поэтому именно он был выбран в качестве иона-продукта для селективных переходов: ЭМФК-ПМФБ  $m/z$  272 → 135,0441, и ПМФК-ПМФБ  $m/z$  286 → 135,0441, и БМФК-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. Значения ЭС для ионных переходов продуктов дериватизации АМФК представлены в табл. 8.

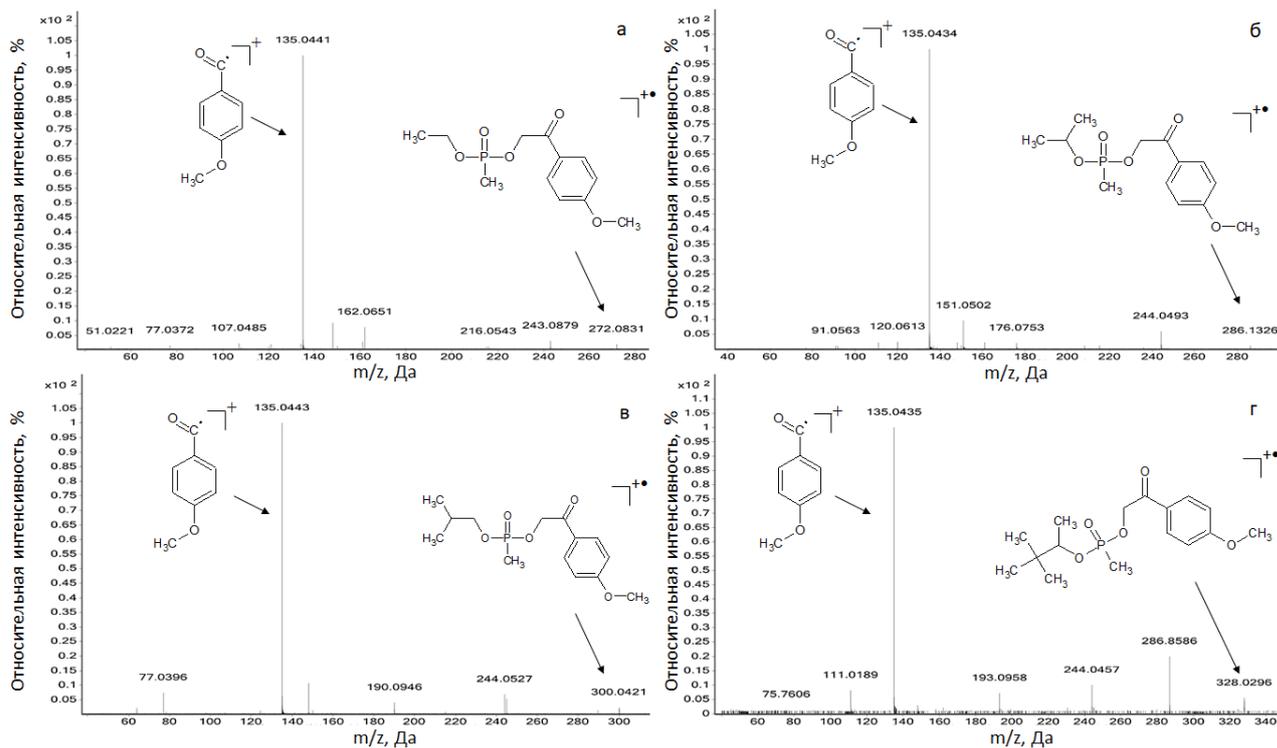


Рис. 11. Масс-спектры электронной ионизации ЭМФК-ПМФБ (а), иПМФК-ПМФБ (б), иБМФК-ПМФБ (в) и ПинМФК-ПМФБ (г)

Таблица 8. Оптимальные значения энергии соударений для ионных переходов продуктов дериватизации АМФК с ПМФБ

Аналит	$m/z$ 1 $\rightarrow$ $m/z$ 2	ЭС, эВ
ЭМФК-ПМФБ	272 $\rightarrow$ 135,0441	5
иПМФК-ПМФБ	286 $\rightarrow$ 135,0441	5
иБМФК	300 $\rightarrow$ 135,0441	10
ПинМФК-ПМФБ	328 $\rightarrow$ 135,0441	10

При подобранных условиях ГХ-МС детектирования удалось добиться приемлемого разделения пиков (рис. 12). Более того, стоит отметить, что в результате реакции дериватизации ПинМФК с ПМФБ образуются два стереоизомера, которые получилось разделить при выбранных условиях. На рис. 12 видно, что продукту дериватизации ПинМФК с ПМФБ соответствуют два

хроматографических пика с одинаковыми МРМ-переходами, вероятно, соответствующие энантиомерам.

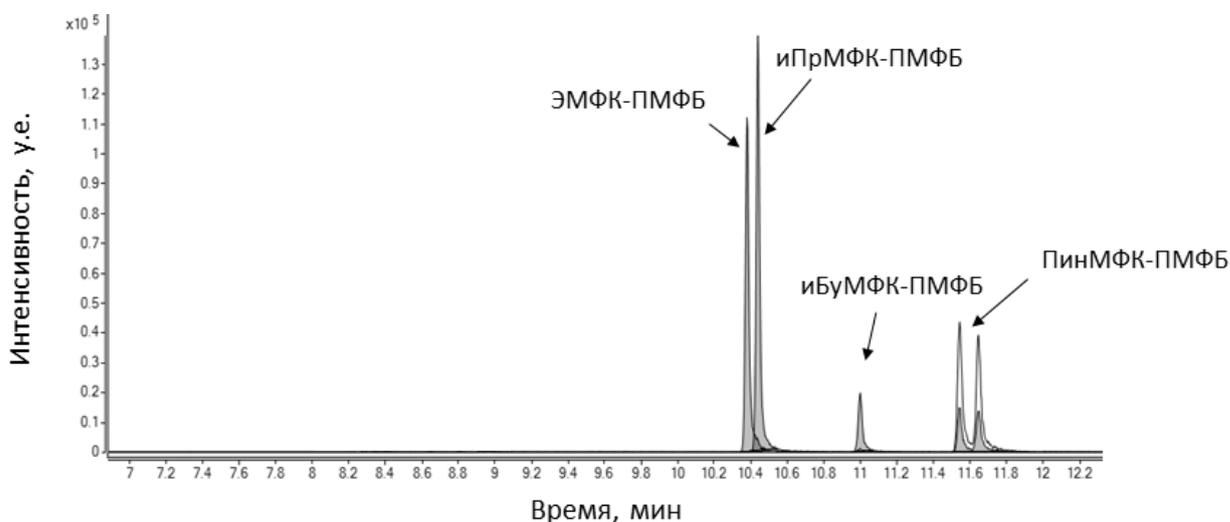


Рис. 12. ГХ-МС хроматограмма смеси 1000 нг мл<sup>-1</sup> смеси АФК и АМФК в выбранных условиях

### 3.3. Оптимизация условий проведения реакции дериватизации фосфоновых кислот *n*-метоксифенацил бромидом

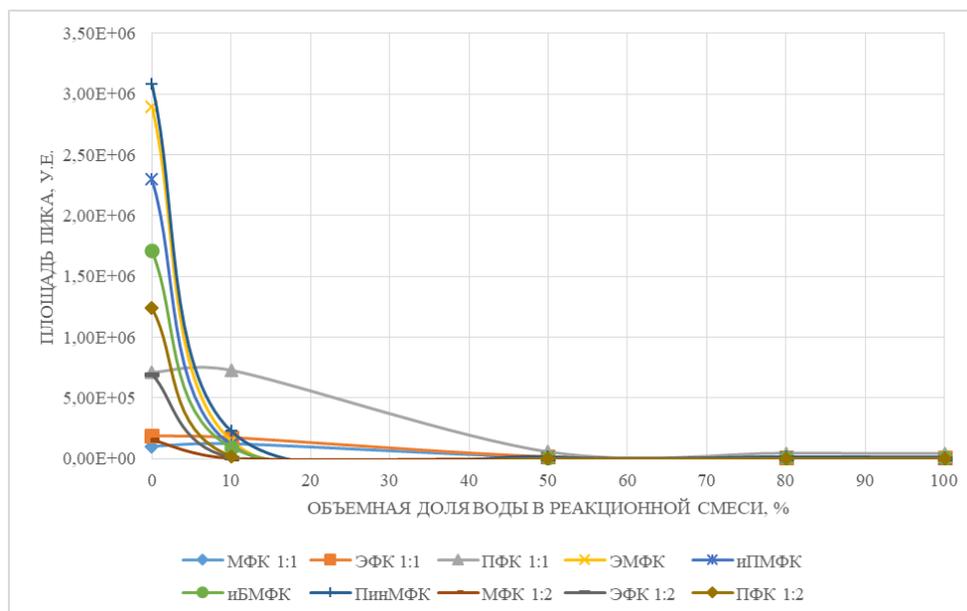
Поскольку оптимизацию дериватизации проводили при совместном присутствии фосфоновых кислот в растворе, необходимо было выбрать критерий, по которому можно делать правильные выводы о наибольшем выходе реакции по всем кислотам сразу. Простым сравнением площадей дериватов АФК и АМФК из-за большого количества продуктов (10 продуктов реакции: по два на МФК, ЭФК, ПФК, и по одному на ЭМФК, иПМФК, иБМФК, ПинМФК) ограничиться было нельзя, поскольку интерпретация результатов затруднялась из-за отсутствия значительных различий в площадях для разных условий. Поэтому для обоснования выбора той или иной модели проведения эксперимента был дополнительно использован статистический показатель  $D$ , % [190, 191], который рассчитывали для всех значений варьируемого параметра по формуле:

$$D_k = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n \frac{S_i}{\max S_k}}$$

где  $S_i$  – площадь  $i$ -ого продукта дериватизации в  $k$ -ом эксперименте,  $\max S_k$  – максимальная площадь для  $i$ -ого продукта дериватизации в ходе всех  $k$  экспериментов по оптимизации,  $n$  – количество продуктов реакции,  $k$  – количество значений оптимизируемого параметра. Данный параметр позволяет провести оптимизацию, одинаково учитывая выход реакции для каждого продукта независимо от количественного содержания его в пробе. В эксперименте, в котором данный показатель наибольший, параметры наиболее оптимальны.

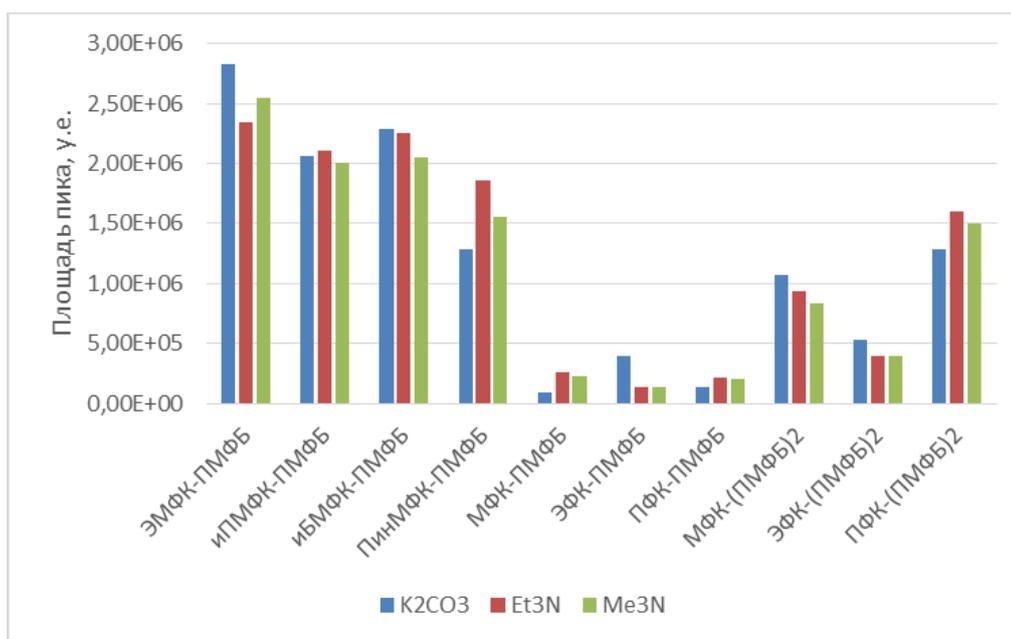
В работе [134], в которой впервые был предложен ПМФБ в качестве дериватирующего реагента для определения МФК, реакцию проводили в водной среде. Однако, учитывая механизм нуклеофильного замещения для реакции фосфоновых кислот с реагентом, вода конкурирует с кислотами в процессе замещения атома брома в молекуле ПМФБ, тем самым снижая эффективность дериватизации. Поэтому на первой стадии подбора условий реакции дериватизации АФК и АМФК с ПМФБ изучали влияние воды на выход реакции. Для этого готовили раствор объемом 1 мл смеси АФК и АМФК с концентрацией 1 мкг/мл каждой кислоты с различным содержанием воды (0, 10, 50, 80, 100 % об.). Далее добавляли 100 мкл ацетонитрильного раствора реагента (10 мг/мл) и 20 мкл водного раствора карбоната калия (20 мг/мл). Проводили дериватизацию при 80 °С в течение 40 минут. Полученные растворы разбавляли в 10 раз водой и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. В результате было обнаружено (рис. 13), что небольшое содержание воды (до 10%) значительно снижает (в среднем в 20 раз) выход реакции дериватизации АМФК и АФК по двум ОН-группам, однако практически не влияет на выход продуктов реакции дериватизации АФК по одной ОН-группе. Дальнейшее увеличение содержания воды также снижает выход реакции АФК по одной ОН-группе. Максимальное значение коэффициента  $D = 98$  может быть получено при проведении реакции дериватизации в 100 % ацетонитриле, поэтому дальнейшее исследование реакции дериватизации проводили в среде чистого ацетонитрила.

После выявления негативного влияния воды на реакцию дериватизации, было предложено заменить водный раствор карбоната калия для создания щелочной среды на органическое основание, которое растворяется в ацетонитриле в отличие от неорганической соли. Для этого были выбраны третичные амины: триметиламин



**Рис. 13. Зависимость площади пиков продуктов реакции дериватизации АФК и АМФК от содержания воды в реакционной смеси**

и триэтиламин. Сравнивали три раствора после дериватизации с использованием карбоната калия, триметиламина и триэтиламина (рис. 14). По данной диаграмме сложно оценить, какое из оснований является предпочтительным для проведения реакции дериватизации, однако показатель *D* для триэтиламина был наибольшим – 84 против 79 для карбоната калия и 81 для триметиламина. Поэтому в качестве основания в дальнейшем использовали ацетонитрильный раствор триэтиламина.



**Рис. 14. Диаграмма изменения площадей продуктов дериватизации в зависимости от используемого основания**

Для более детальной оптимизации условий реакции дериватизации АФК и АМФК с ПМФБ использовали полнофакторный экспериментальный дизайн  $3^3$ . В качестве трех факторов были выбраны концентрация реагента и триэтиламина, добавляемых к раствору АФК и АМФК, а также время проведения дериватизации. Каждый из трех оптимизируемых параметров (факторов) в данном дизайне должен иметь 3 значения (уровня). Таким образом, для проведения полнофакторного дизайна необходимо было провести 27 экспериментов. Однако для определения корректных уровней каждого фактора проводили предварительную однофакторную оптимизацию каждого параметра. Для этого проводили дериватизацию при различных значениях одного фактора при фиксированных значениях других факторов и строили зависимости площадей пиков дериватов (рис. 15). При увеличе-

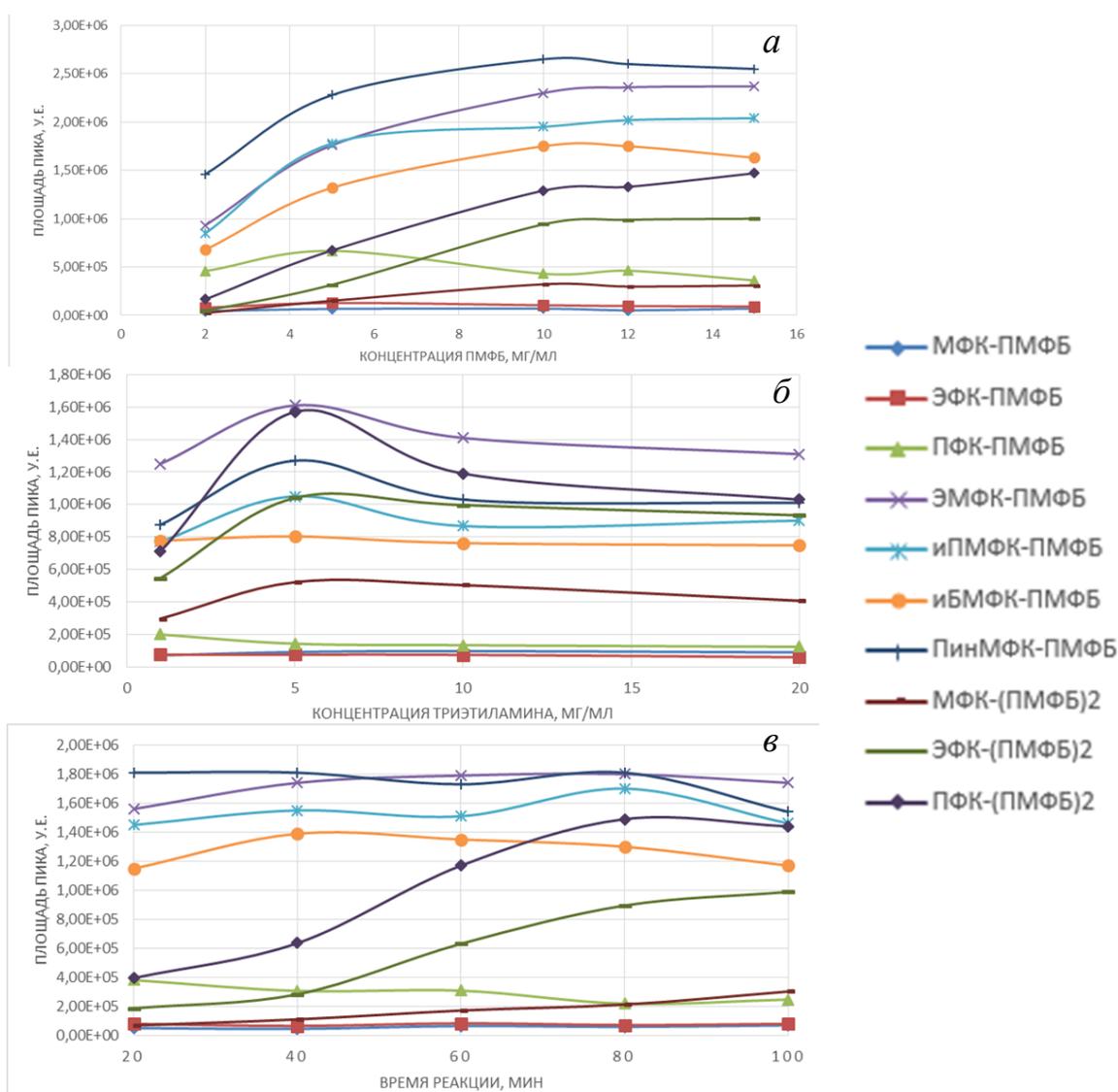


Рис. 15. Зависимости площадей пиков дериватов от значений концентрации ПМФБ (а), концентрации триэтиламина (б), времени реакции (в)

нии концентрации ПМФБ для большинства продуктов дериватизации площади пиков растут вплоть до 10 мг/мл, однако дальнейшее увеличение концентрации влияет не значительно (рис. 15а). Для продуктов дериватизации по одной группе ОН для АФК зависимость имеет максимум при 5 мг/мл. Поэтому в качестве уровней для концентрации ПМФБ для полнофакторного дизайна были выбраны значения 1, 5 и 10 мг/мл из диапазона, в котором наблюдаются наибольшие изменения. Для концентрации основания выбраны значения 1.8, 5 и 10 мг/мл, а для времени реакции выбрали 40, 80 и 120 минут.

После выбора значений оптимизируемых параметров для полнофакторного эксперимента была составлена таблица рандомизированной последовательности приготовления и анализа растворов после дериватизации (табл. 9), согласно которой проводился эксперимент.

**Таблица 9. Данные приготовленной серии растворов, используемой для изучения условий реакции дериватизации**

	<b>Стандартный порядок</b>	<b>Порядок приготовления</b>	<b>c(реар), мкг/мл</b>	<b>t, мин</b>	<b>c(осн) , мкг/мл</b>
<b>n1</b>	18	1	5000	120	10000
<b>n2</b>	16	2	5000	120	1800
<b>n3</b>	22	3	10000	80	1800
<b>n4</b>	12	4	5000	40	10000
<b>n5</b>	17	5	5000	120	5000
<b>n6</b>	24	6	10000	80	10000
<b>n7</b>	3	7	1000	40	10000
<b>n8</b>	7	8	1000	120	1800
<b>n9</b>	13	9	5000	80	1800
<b>n10</b>	8	10	1000	120	5000
<b>n11</b>	23	11	10000	80	5000
<b>n12</b>	10	12	5000	40	1800
<b>n13</b>	20	13	10000	40	5000
<b>n14</b>	6	14	1000	80	10000
<b>n15</b>	15	15	5000	80	10000
<b>n16</b>	4	16	1000	80	1800
<b>n17</b>	25	17	10000	120	1800
<b>n18</b>	21	18	10000	40	10000
<b>n19</b>	2	19	1000	40	5000
<b>n20</b>	19	20	10000	40	1800
<b>n21</b>	9	21	1000	120	10000
<b>n22</b>	27	22	10000	120	10000
<b>n23</b>	1	23	1000	40	1800
<b>n24</b>	11	24	5000	40	5000
<b>n25</b>	5	25	1000	80	5000
<b>n26</b>	26	26	10000	120	5000
<b>n27</b>	14	27	5000	80	5000

После проведения реакции дериватизации смеси АФК и АМФК с равными концентрациями при различных условиях проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ, далее рассчитывали показатель  $D$  для каждого эксперимента, максимальное значение которого наблюдалось в эксперименте n1 (рис. 16) при следующих условиях: время термостатирования – 120 минут, концентрация ПМФБ – 5 мг/мл, концентрация триэтиламина – 10 мг/мл.



Рис. 16. Значения показателя  $D$  для 27 экспериментов

### ***3.4. Оценка чувствительности, правильности и воспроизводимости определения АФК и АМФК в моче с предварительной дериватизацией ПМФБ в условиях ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС.***

Поскольку моча является водным объектом с большим количеством веществ, дериватизация чистой мочи нецелесообразна – вода, как было изучено, снижает выход реакции. Компоненты мочи также могут ухудшать эффективность дериватизации из-за реакции с реагентом. Поэтому перед проведением дериватизации необходимо извлечь АФК и АМФК из мочи и избавиться от матричных компонентов. Для этого был выбран метод ТФЭ. Поскольку аналиты полярные, то в качестве сорбента был выбран полярный силикагель двух производителей: SILICA (Agilent Technologies, 100 mg, 1ml) и SiOH (Macherey-nagel, 100 mg, 1 ml). Для оценки степеней извлечения аналитов вносили одинаковые добавки в две пробы: в холостую мочу до экстракции (и проводили экстракцию) и в

элюат после экстракции холостой мочи. После этого проводили упаривание в токе азота, дериватизацию и разделение полученной смеси аналитов с использованием ВЭЖХ-МС. Степень извлечения рассчитывали как отношение площадей в образце с добавкой до ТФЭ и после. Степени извлечения АФК и АМФК представлены в табл. 10. Как видно из таблицы, степени извлечения на обоих картриджах для всех аналитов были близки. Для дальнейших экспериментов был выбран SILICA.

**Таблица 10. Степени извлечения АФК и АМФК, полученные на различных картриджах для ТФЭ.**

Вещество	Степень извлечения, %	
	SiOH	SILICA
МФК	90	92
ЭФК	87	85
ПФК	84	90
ЭМФК	56	60
иПМФК	64	67
иБМФК	65	66
ПинМФК	67	71

Для построения градуировочных зависимостей, а также оценки наименьшей определяемой концентрации (НОК) и предела обнаружения (ПО) фосфоновых кислот готовили серию растворов аналитов в 1 мл мочи человека с концентрациями 0,1; 0,5; 1; 10; 20; 100; 250; 1000; 2500; 5000; 10000 нг/мл. Полученные растворы в моче разбавляли в 10 раз ацетонитрилом для предотвращения самоэлюирования кислот с силикагеля при загрузке неразбавленной мочи. Далее загружали их на картридж SILICA, предварительно активированный 1 мл смеси ацетонитрил:вода (75:25% по объему) и 2 мл ацетонитрила. После загрузки аналитов на картридж промывали 1 мл ацетонитрила и элюировали 2 мл смеси ацетонитрил:вода (75:25%). Элюат концентрировали при 80 °С в токе азота. К сухому остатку добавляли 100 мкл ацетонитрила содержащего 5 мг/мл ПМФБ, добавляли 10 мкл раствора триэтиламина с концентрацией 100 мг/мл и проводили дериватизацию. После завершения реакции дериватизации 1 мкл полученного растворов вводили в ГХ-МС систему. Для анализа методом ВЭЖХ-МС/МС растворы в ацетонитриле предварительно упаривали в токе воздуха при температуре 82 °С, перерастворяли в 200 мкл смеси вода-ацетонитрил (90:10 по объему) и вводили 20 мкл в хроматограф. ПО и НОК определяли, как концентрацию, при которой достигается соотношение сигнала анализируемой пробы к шуму холостой пробы равное 3 и 10,

соответственно. В случае АФК оценку НОК и ПО проводили по продуктам дериватизации по двум группам из-за более интенсивных пиков по сравнению с продуктами по одной ОН-группе. Достигнутые ПО и НОК в случае ВЭЖХ составили от 0,1 до 1 нг/мл, а методом ГХ-МС – от 50 до 200 нг/мл (табл. 11).

**Таблица 11. ПО и НОК, достигнутые методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС**

Метод	Вещество в форме продукта дериватизации	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) <sub>2</sub>	0,4	1,0
	ЭФК-(ПМФБ) <sub>2</sub>	0,4	1,0
	ПФК-(ПМФБ) <sub>2</sub>	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

Правильность разработанного способа была проверена методом «введено-найдено» (табл. 12). Для этого вносили добавки АФК и АМФК в образцы мочи на трех уровнях концентраций в случае ВЭЖХ-МС/МС-анализа, и АМФК на двух уровнях концентраций в случае ГХ-МС/МС. Анализируя данные табл. 12 можно сделать вывод, что разработанный подход характеризуется приемлемыми значениями правильности и воспроизводимости, что свидетельствует о его высокой надежности определения АФК и АМФК в моче.

Таким образом, в данной главе использовали предложенный ранее реагент для дериватизации МФК [134] для совместного определения АМФК в моче методами ВЭЖХ и ГХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Продукты дериватизации АМФК с ПМФБ, как было показано, возможно детектировать сразу двумя методами – ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС – однако ПО аналитов при использовании первого метода заметно хуже. Это может быть связано с меньшим вводимым объемом пробы ввиду меньшей емкости капиллярных колонок. Исходя из этого можно заключить, что дериватизация АФК и АМФК ПМФБ является привлекательным подходом для обнаружения маркеров НПОВ с высокой

чувствительностью, в котором для подтверждения наличия маркеров ОВ можно использовать сразу два независимых метода. Однако стоит отметить, что стадия дериватизации является трудоемкой, времязатратной и может являться причиной дополнительной ошибки результатов анализа. Помимо этого, при использовании сложных объектов для исследования, таких как моча, необходимо дополнительно использовать процедуру извлечения аналитов, чтобы реакция проходила селективно, что делает такой способ еще более длительным. Именно поэтому далее в работе мы сосредоточились на прямом (без дериватизации) совместном определении АФК и АМФК в сложных объектах.

**Таблица 12. Результаты «введено-найдено» разработанного способа при ГХ- и ВЭЖХ-МС/МС анализе (n = 3, p = 0,95)**

ГХ-МС/МС						
Вещество	Введено, нг мл <sup>-1</sup>	Найдено, нг мл <sup>-1</sup>	Введено, нг мл <sup>-1</sup>	Найдено, нг мл <sup>-1</sup>	Введено, нг мл <sup>-1</sup>	Найдено, нг мл <sup>-1</sup>
ЭМФК	200	190 ± 20	500	495 ± 11		
иПМФК	200	215 ± 26	500	507 ± 14		
иБМФК	150	152 ± 5	500	500 ± 26		
ПинМФК	150	152 ± 6	500	500 ± 25		
ВЭЖХ- МС/МС						
Вещество	Введено, нг мл <sup>-1</sup>	Найдено, нг мл <sup>-1</sup>	Введено, нг мл <sup>-1</sup>	Найдено, нг мл <sup>-1</sup>	Введено, нг мл <sup>-1</sup>	Найдено, нг мл <sup>-1</sup>
МФК	5	4,5 ± 1,4	50	57 ± 10	500	490 ± 40
ЭФК	5	4,9 ± 1,0	50	48 ± 7	500	520 ± 28
ПФК	5	5,5 ± 1,5	50	50 ± 5	500	517 ± 38
ЭМФК	1	1,21 ± 0,35	50	45 ± 6	500	507 ± 18
иПМФК	1	0,86 ± 0,32	50	52 ± 5	500	489 ± 25
иБМФК	1	1,10 ± 0,28	50	47 ± 7	500	487 ± 21
ПинМФК	1	0,91 ± 0,35	50	49 ± 8	500	530 ± 30

#### ГЛАВА 4. СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФК И АМФК МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОРБЕНТА С ГИДРОФИЛЬНЫМ ПОКРЫТИЕМ<sup>3</sup>

АФК и АМФК в водных растворах диссоциируют и существуют в анионных формах в широком диапазоне рН (рКа<sub>1</sub> для наиболее полярной МФК составляет 2,12, рКа для менее полярной ПинМФК равен 2,50) [192, 193]. В связи с этим, ионная хроматография (ИХ) кажется перспективной для задач идентификации и определения изучаемых аналитов. ИХ с кондуктометрическим детектированием и непрямим УФ-детектированием уже были описаны для разделения и определения МФК и некоторых АМФК в образцах воды и плазмы. Однако данные подходы были очень трудоемкими и слабочувствительными (НОК > 40 нг/мл) [194, 195], а также характеризовались слабой селективностью [196, 197]. В работе [119] описана комбинация анионообменной хроматографии с чувствительным и селективным МС-детектором для определения МФК в моче без необходимости сопряжения ионного хроматографа с масс-спектрометром. Получен очень низкий предел обнаружения (4 нг/мл) и хорошее разделение с компонентами матрицы, поэтому в рамках данной главы мы сконцентрировались на изучении возможности одновременного определения МФК с большим количеством других АФК (ЭФК, иПФК, нПФК) и АМФК (ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК) методом ионной хроматографии в сочетании с тандемным масс-селективным детектором двух производителей (AB Sciex QTrap 3200 и Shimadzu LCMS-8050) при использовании дейтерированных аналогов кислот в качестве внутренних стандартов. Для этих целей выбрали колонку, заполненную сорбентом ВТМА [177] на основе гидрофобной матрицы сополимеров стирола и дивинилбезола с разветвленным гидрофильным функциональным слоем, содержащим четвертичные аммониевые фрагменты, обеспечивающие анионообменный механизм удерживания.

---

<sup>3</sup> При подготовке данной главы диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которой, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: 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. (Импакт-фактор Web of Science – 3,004, Q2), 50%.

#### 4.1. Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования в режиме МРМ

С помощью шприцевого насоса, присоединенного к источнику ионизации масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200, при постоянной скорости потока, равной 5 мкл/мин, вводили в него индивидуальные растворы кислот с концентрацией 10 мкг/мл. Для выбора молекулярного иона получали масс-спектры первого поколения АФК и АМФК, а также их дейтерированных аналогов, в режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных молекул. Так, в МС<sup>1</sup>-спектре дейтерированной МФК (d3-МФК) в режиме регистрации отрицательных ионов наблюдается интенсивный сигнал депротонированной молекулы с m/z 98 Да и сигнал фрагментного иона с m/z 79, образующегося при ранней фрагментации в источнике ионизации (рис. 17а). В режиме регистрации положительно заряженных молекул наиболее интенсивный сигнал имел соотношение m/z 100 Да, что соответствует протонированной молекуле d3-МФК (рис. 17б). Поскольку кислота в растворе диссоциирована, интенсивность сигнала молекулярного иона в отрицательной области сканирования была выше, чем в положительной, поэтому для детектирования использовали режим регистрации отрицательных ионов.

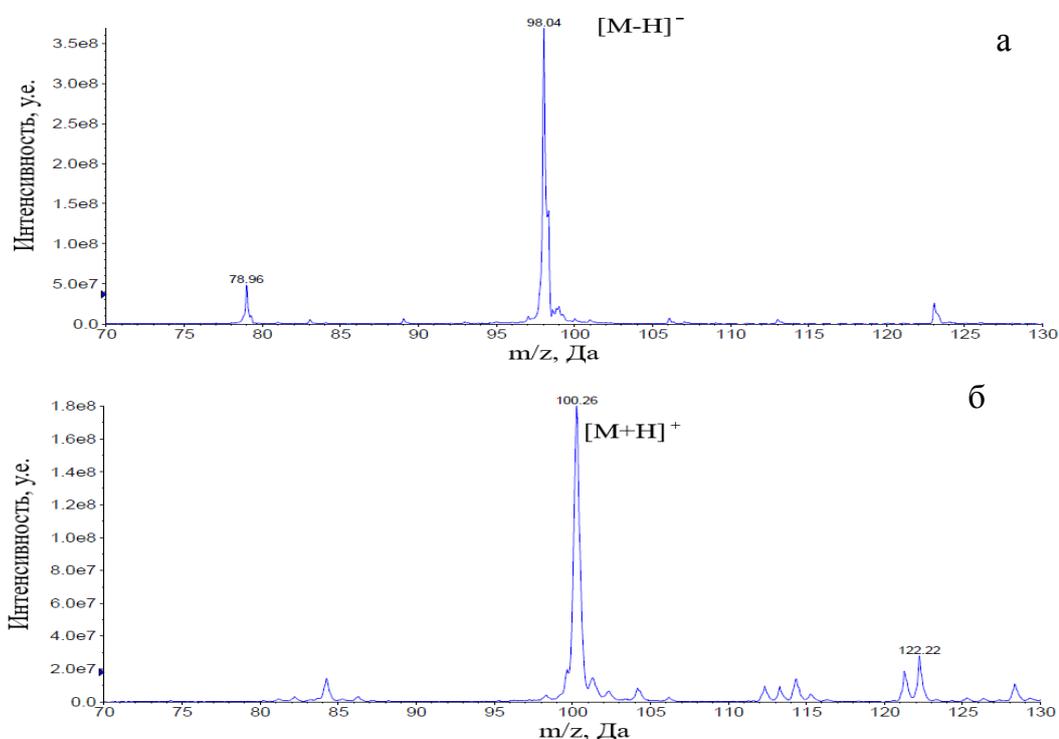
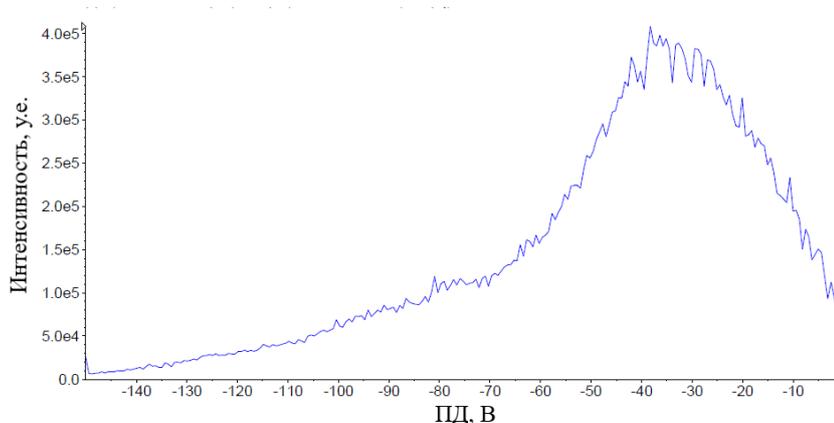


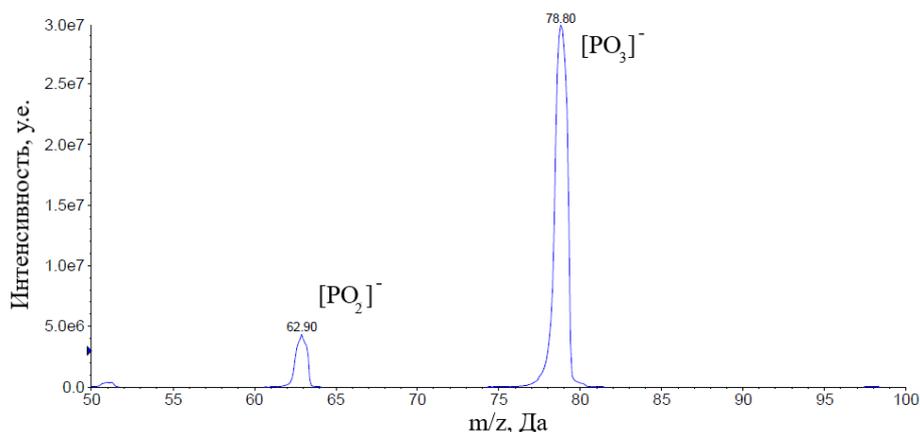
Рис. 17. МС<sup>1</sup>-спектры d3-МФК, полученные в режиме регистрации отрицательных (а) и положительных ионов (б).

Для поиска условий, при которых наблюдаются наибольшие интенсивности сигналов депротонированных молекул, регистрировали зависимости отклика детектора от ПД. Из рис. 18, на котором представлена зависимость сигнала  $[M-H]^-$  для d3-МФК от ПД, видно, что оптимальное значение для этой кислоты ПД -40 В.



**Рис. 18.** Зависимость интенсивности сигнала депротонированной молекулы d3-МФК от значений ПД.

После этого изучали закономерности фрагментации депротонированных молекул кислот. Например, в масс-спектре фрагментации депротонированной молекулы d3-МФК (рис. 19) наблюдались два сигнала с  $m/z$  79 и 63, которые можно отнести к ионам  $[PO_3]^-$  и  $[PO_2]^-$ , соответственно. Аналогичные ионы наблюдались в  $MS^2$ -спектрах АФК. Для АМФК наиболее интенсивными фрагментными ионами были ионы с  $m/z$  95 и 79 Да, соответствующие депротонированной молекуле МФК и  $[PO_3]^-$ . В случае дейтерированных АМФК, наиболее интенсивными фрагментными ионами были ионы с  $m/z$  98 и 79 Да, соответствующие депротонированной молекуле d3-МФК и  $[PO_3]^-$  (рис. 20).



**Рис. 19.** Масс-спектр фрагментации депротонированной молекулы d3-МФК.

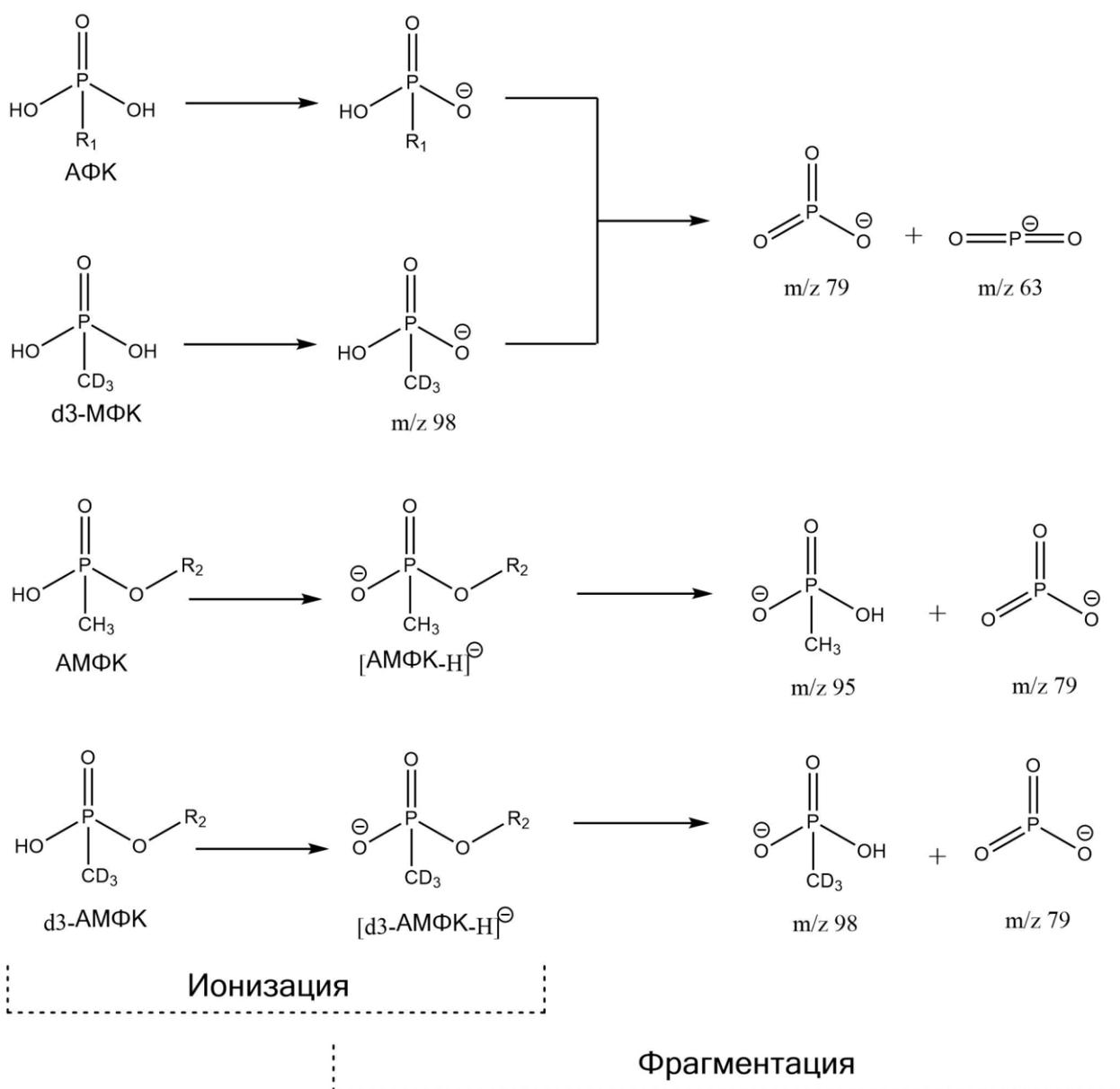
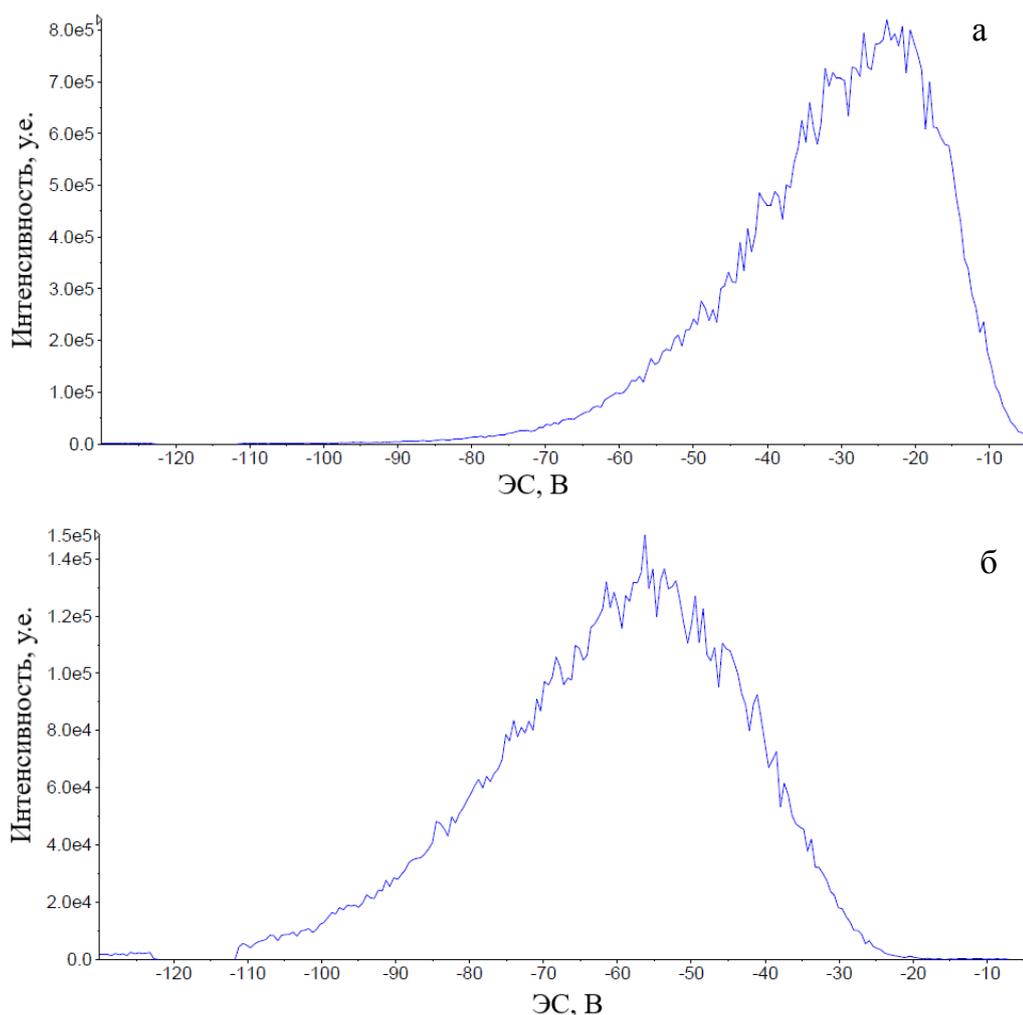


Рис. 20. Схема ионизации и фрагментации АФК и АМФК и дейтерированных аналогов (R<sub>1</sub> – метил, этил, и-пропил, н-пропил, R<sub>2</sub> – этил, и-пропил, и-бутил, пинаколил, ц-гексил). Представлены предполагаемые структуры ионов.

После выбора ионных реакций (ион-предшественник и ион-продукт) для изучаемых аналитов подбирали значение ЭС, при котором наблюдается максимальный ионный ток детектора. Для d3-MFA зависимость интенсивности сигнала по двум МРМ-переходам от ЭС представлена на рис. 21. Видно, что оптимальное значение ЭС для фрагментации депротонированной молекулы кислоты до иона-предшественника с большей m/z (79 Да) меньше, чем в случае иона-продукта с m/z 63. Эта закономерность часто наблюдается в режиме МРМ: чем больше фрагментный ион, тем меньше энергии необходимо передать иону-предшественнику для фрагментации.



**Рис. 21. Зависимости интенсивности от ЭС для МРМ-переходов  $m/z$  98→79 (а) и  $m/z$  98→63 (б) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.**

После выбора оптимальных условий ионных реакций АФК и АМФК при использовании системы с масс-спектрометром АВ Sciex 3200, подбирали условия МРМ-детектирования для системы с более современным масс-спектрометром Shimadzu-8050. Данный инструмент в режиме МРМ имеет некоторые отличные параметры, которые можно варьировать для поиска наибольшей интенсивности сигнала, например, у него нет параметра ПД, но есть фокусирующее напряжение перед квадруполем (pre-rod bias, В) для первого и третьего квадруполей. Поскольку в обоих масс-спектрометрах фрагментация происходит в столкновительной ячейке, параметр ЭС присутствует в обоих вариантах. Так как оба масс-спектрометра оснащены источником ионизации электрораспылением и ячейкой соударений, процессы ионизации-фрагментации (ионные переходы) оказались идентичны. Поэтому подбор условий (pre-rod bias, ЭС) проводили для МРМ-переходов, таких же как при использовании масс-спектрометра Sciex 3200 и оптимальными были

выбраны значения, при которых наблюдался максимум по ионному току. Таким образом, были подобраны оптимальные условия МС-детектирования в режиме МРМ для четырех АФК (МФК, ЭФК, иПФК, нПФК), пяти АМФК (ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК, ПинМФК) и пяти дейтерированных кислот (d3-МФК, d3-ЭМФК, d3-иПМФК, d3-иБМФК, d3-цГМФК), на двух масс-спектрометрах разных производителей (табл. 13).

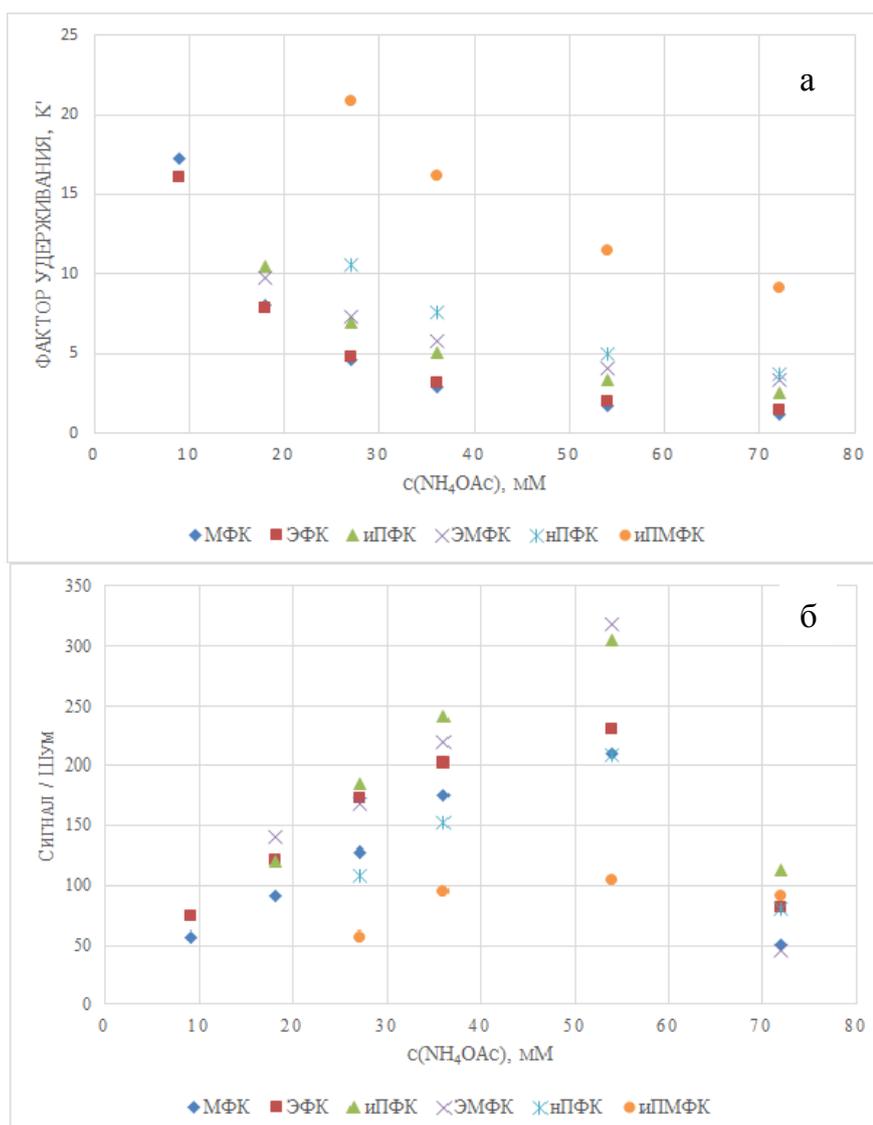
#### ***4.2. Оптимизация условий хроматографического разделения***

Для выбора условий хроматографического разделения на анионообменнике ВТМА на основе ПС-ДВБ, при которых возможно определение широкого круга фосфорорганических кислот, изучали элюирующую способность смесей ацетонитрила с водными растворами ацетата аммония разной концентрацией. В работе [119] описан подход по определению МФК с помощью ионной хроматографии при использовании в качестве подвижной фазы водного раствора муравьиной кислоты. Однако элюирующей силы данной подвижной фазы оказалось недостаточно для получения приемлемых коэффициентов удерживания для ПФК, а также иБМФК, ПинМФК и цГМФК. Именно поэтому мы выбрали в качестве ПФ раствор ацетата аммония, имеющий более высокую элюирующую силу по сравнению с муравьиной кислотой.

При исследовании влияния количества ацетата аммония в ПФ на удерживание фосфоновых кислот и чувствительность строили зависимости факторов удерживания аналитов и отношение сигнал/шум от концентрации соли в ПФ (рис. 22). При увеличении содержания ацетата аммония удерживание аналитов уменьшается (рис. 22а), а чувствительность определения растет, вплоть до концентрации ацетата аммония в ПФ 54 ммоль/л (рис. 22б). Однако дальнейшее увеличение содержания соли ведет к резкому уменьшению сигнал/шум из-за уменьшения интенсивности целевых сигналов, которое можно объяснить подавлением ионизации из-за высокого содержания ацетата аммония. Более того, дальнейшее увеличение концентрации соли слабо влияло на удерживание иБМФК, ПинМФК и цГМФК – факторы удерживания превышали значение 25 – из чего можно сделать вывод о преобладании неполярных взаимодействий длинных углеводородных частей АМФК с сорбентом колонки. В качестве оптимальной концентрации ацетата аммония было выбрано значение 27 мМ из-за наилучшего соотношения факторов удерживания и отношения сигнал/шум.

Таблица 13. Выбранные условия для ВЭЖХ-ИЭР-МС/МС определения АФК и АМФК в режиме регистрации отрицательных ионов.

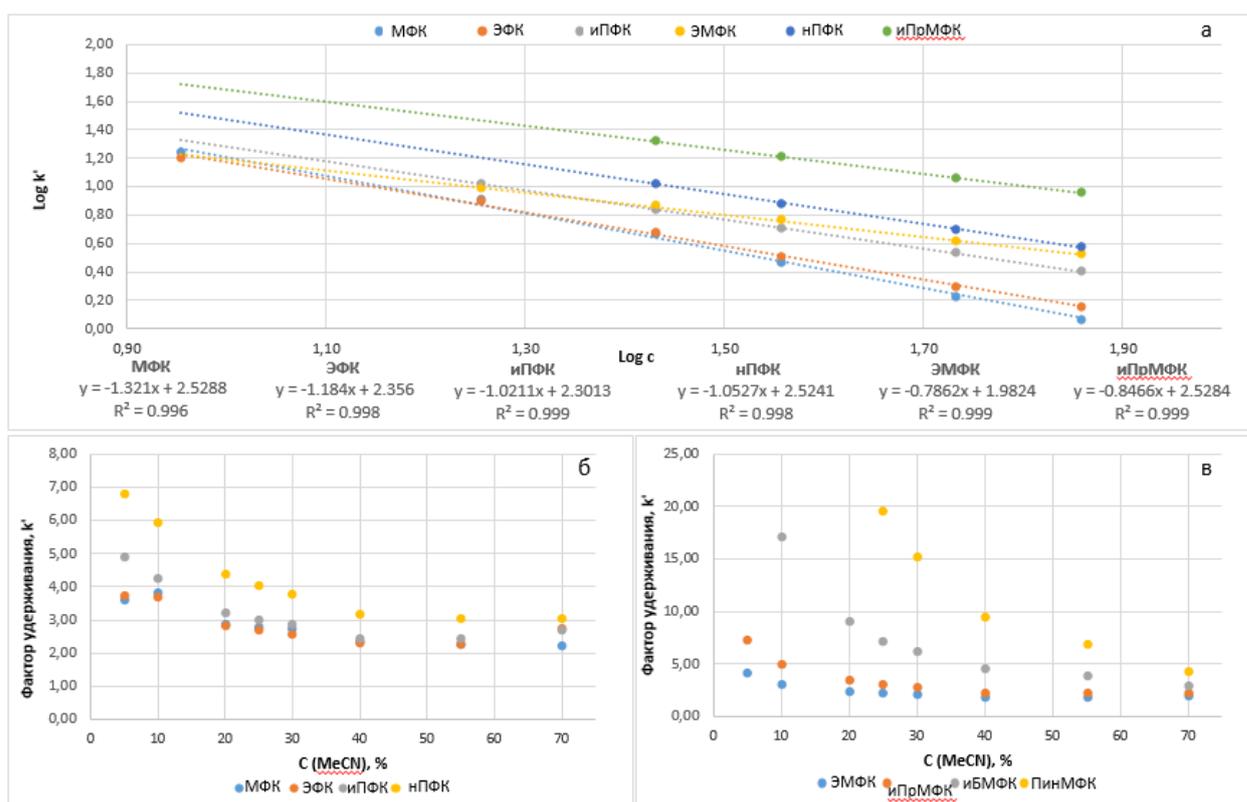
Аналит	Переход 1	Переход 2	AB Sciex Qtrap 3200			Shimadzu LCMS-8050				
			ПД, В	ЭС, В		Q1 Pre-rod Bias, В	ЭС, В		Q3 Pre-rod Bias, В	
				Переход 1	Переход 2		Переход 1	Переход 2	Переход 1	Переход 2
МФК	95→79	95→63	-40	-25	-55	11	22	50	28	20
d3-МФК	98→79	98→63								
ЭМФК	123→95	123→79	-30	-17	-35	15	16	29	17	28
d3- ЭМФК	126→98	126→79								
иПМФК	137→95	137→79	-26	-18	-37	15	16	30	13	28
d3- иПМФК	140→98	140→79	-26							
иБМФК	151→95	151→79	-29	-21	-45	18	16	30	15	28
d3- иБМФК	154→98	154→79	-29							
ПинМФК	179→95	179→79	-33	-26	-45	18	22	37	20	28
d3- ПинМФК	182→98	182→79	-33							
цГМФК	177→95	177→79	-30	-25	-45	14	21	35	17	29
d3- цГМФК	180→98	180→79	-30							
ЭФК	109→79	109→63	-45	-33	-58	13	22	47	27	23
нПФК	123→79	123→63	-40	-25	-80	14	21	54	27	23
иПФК	123→79	123→63	-50	-37	-68	14	21	54	27	23



**Рис. 22.** Зависимость факторов удерживания (а) и отношения сигнал/шум (б) АФК и АМФК от концентрации  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  в ПФ. Скорость потока ПФ составляла 0,8 мл/мин.

Для изучения вклада гидрофобных и ионообменных взаимодействий при удерживании различных по полярности кислот строили зависимости логарифма факторов удерживания от логарифма концентрации ацетата аммония (рис. 23а). Из рис. 23 видно, что угловые коэффициенты по модулю уменьшаются в ряду АФК-АМФК, что может указывать на то, что для АМФК в удерживание больший вклад вносят гидрофобные взаимодействия. Рис. 23б,в подтверждают значительно большую зависимость факторов удерживания АМФК от содержания ацетонитрила в ПФ, в то время как факторы удерживания АФК изменяются в небольшом диапазоне с увеличением концентрации ацетонитрила. Исходя из этого был сделан вывод о смешанном режиме удерживания анализов: АФК преимущественно удерживаются благодаря электростатическим взаимодействиям, а АМФК –

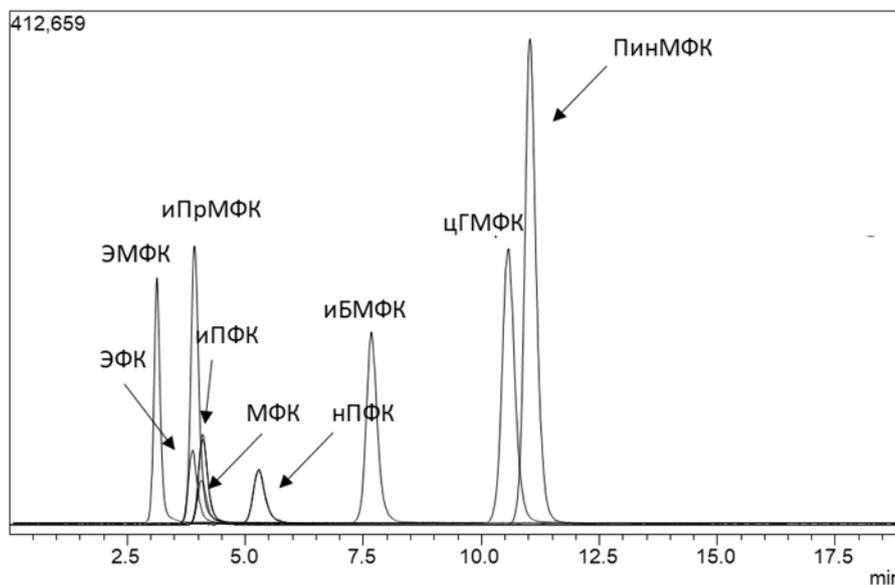
гидрофобным. Таким образом, для сорбента ВТМА установлена возможность реализации не только ионообменных взаимодействий, но и гидрофобных, что, вероятно, вызвано влиянием неполярной матрицы ПС-ДВБ. Подобные многофункциональные свойства и проявление нескольких режимов удерживания (обращенно-фазового, ионообменного и гидрофильного) продемонстрированы в работах [198, 199] для сорбентов аналогичной структуры на основе гидрофобного ПС-ДВБ с гидрофильными разветвленными и гиперразветвленными функциональными слоями. Для совместного определения широкого круга АФК и АМФК, значительно различающихся по полярности, такие многофункциональные сорбенты особенно актуальны, поскольку можно добиться приемлемых факторов удерживания для всех аналитов, особенно для полярных АФК, что труднодостижимо при использовании, например, сорбента с привитыми октадецильными группами.



**Рис. 23.** 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)

Так как содержание в ПФ ацетонитрила оказывает сильное влияние на удерживание АМФК, использовали смесь ацетонитрила с водным раствором ацетата

аммония для сокращения времени анализа. Таким образом, элюент А состоял из смеси ацетонитрила и воды в объемном соотношении 23:77 % с общим содержанием ацетата аммония 27 мМ. Элюент А пропускали через хроматографическую колонку в течение 4,5 минут после введения образца. В течение этого времени АФК, ЭМФК и иПМФК были разделены. Далее, для уменьшения времени удерживания остальных АМФК с длинной алкильной частью в структуре в течение 5 минут заменяли элюент А на Б. Элюент Б состоял из смеси ацетонитрила и воды (70:30 % об.) и содержал 27 мМ ацетат аммония. Повышение доли органического растворителя позволило существенно уменьшить факторы удерживания для наиболее гидрофобных АМФК. Элюент Б прокачивали в течение 4 минут для элюирования АМФК и возможных сильноудерживаемых матричных компонентов. Стадия уравнивания колонки на начальную фазу занимала 5 минут. Таким образом, при выбранных условиях хроматографирования, удалось добиться значений факторов удерживания для АФК превышающих факторы удерживания для ЭМФК и иПМФК. Хроматограмма смеси АФК и АМФК в выбранных условиях представлена на рис. 24.



**Рис. 24.** МРМ-хроматограммы смеси фосфовых кислот в воде, полученные с помощью масс-спектрометра Shimadzu-8050 – пики представлены в виде суммы двух переходов для каждого аналита ( $t_m = 1,0$  мин).

### ***4.3. Извлечение фосфовых кислот из водных объектов и мочи***

Реальные объекты окружающей среды или биологические объекты содержат большое количество веществ, осложняющие анализ. Матричные компоненты могут ухудшать разделение аналитов, снижать чувствительность определения, уменьшать

время жизни хроматографических колонок. Учитывая тот факт, что природная вода и моча являются многокомпонентными объектами анализа, для увеличения времени корректной работы хроматографической системы и уменьшения загрязнения источника ионизации масс-спектрометра использовали твердофазную экстракцию (ТФЭ). В качестве картриджей для ТФЭ использовали 2 коммерческих картриджа на основе сополимера стирола и дивинилбензола от производителя MACHEREY-NAGEL с массой сорбента 200 мг: анионообменный CHROMABOND SB и обращенно-фазовый CHROMABOND HR-P и один картридж, полученный при самостоятельной набивке сверхсшитого полистирола (СПС) в пустой картридж. Картриджи последовательно кондиционировали 3 мл метанола и 3 мл воды перед загрузкой 1 мл раствора смеси АФК и АМФК в воде (1 мкг/мл). Элюаты после пропускания через картриджи собирали и анализировали. Степень извлечения оценивали сравнением площадей пиков аналитов в элюатах и стандартном водном растворе с концентрацией 1 мкг/мл. В случае картриджа SB в элюатах АФК и АМФК не были обнаружены, что означает полное удерживание аналитов на анионообменном картридже, однако при использовании картриджей HR-P и СПС в элюатах содержалось значительное количество АФК и АМФК (рис. 25). Таким образом, анионообменный картридж SB показал наилучшую эффективность извлечения всех аналитов, что легко объясняется их способностью к ионному обмену. Обращенно-фазовый HR-P сорбент имел меньшую эффективность по отношению к наиболее полярным АФК и АМФК, однако для извлечения АМФК с длинной алкильной группой (и-бутил, пинаколил, ц-гексил) не уступал SB. ПинМФК и цГМФК хорошо удерживались на картридже с СПС, однако более полярные кислоты характеризовались крайне низкими степенями извлечения. В результате анионообменный картридж SB был выбран как наиболее эффективный для дальнейшей экспериментальной работы по одновременному извлечению группы аналитов.

Поскольку сорбция кислот на Chromabond-SB происходила за счет анионообменных взаимодействий, в качестве раствора для элюирования АФК и АМФК с картриджа был предложен раствор аммиака. В результате подбора условий для количественного извлечения аналитов из водосодержащих объектов с помощью ТФЭ картриджа SB было выявлено, что 2,5 % раствор аммиака отлично подходит в

качестве элюента – 1 мл водно-ацетонитрильного (50-50% об.) раствора количественно элюировал сразу все кислоты. Ацетонитрил в данном случае использовали для уменьшения времени упаривания элюата в токе азота при 82 °С.

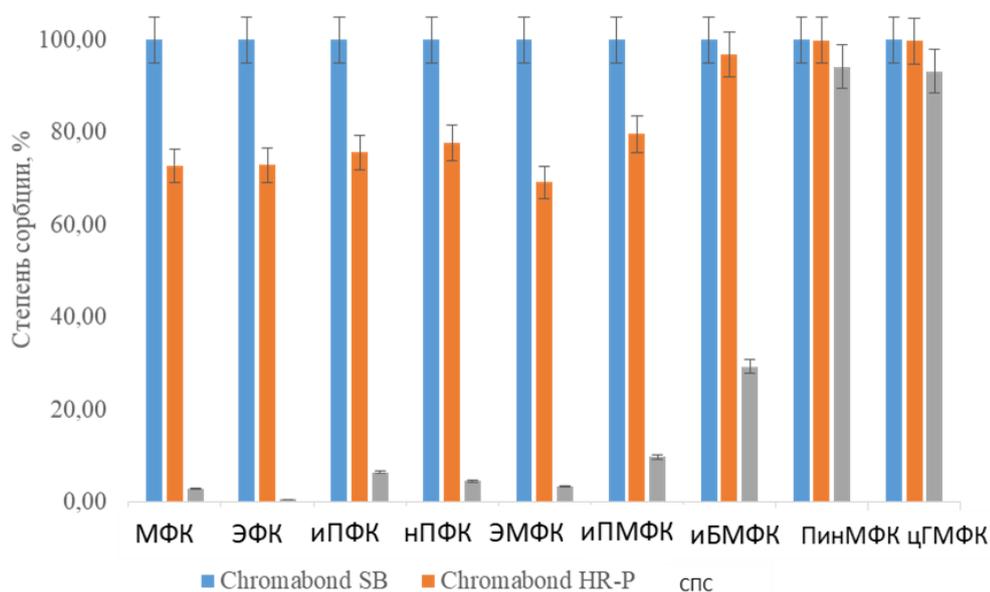


Рис. 25. Сравнение извлечения на трех ТФЭ картриджах (n=3, p=0,95)

Также для удаления с картриджа возможных мешающих компонентов матрицы, перед элюированием промывали картридж 1 мл 0,0025% раствора аммиака в смеси ацетонитрил-вода (70-30% об.).

#### 4.4 Оценка метрологических характеристик разработанного способа определения АФК и АМФК в моче

##### 4.4.1. Степень извлечения

В образцы мочи, не содержащие АФК и АМФК, были внесены добавки АФК (МФК, ЭФК, н-/и-ПФК) и АМФК (ЭМФК, иПМФК, иБМФК, ПинМФК, цГМФК) для достижения конечной концентрации 100 нг/мл. Далее 600 мкл мочи с добавкой разбавляли водой в 2 раза, отбирали 1 мл полученного раствора и пропускали через предварительно кондиционированный ТФЭ картридж SB. После этого картриджи промывали последовательно 1 мл воды и 1 мл 0,0025% раствором аммиака в водно-ацетонитрильной смеси (3:7, об.). Аналиты элюировали 1 мл 2,5% аммиака в смеси вода-ацетонитрил (1:1, об.) и проводили процесс упаривания элюата досуха в токе азота при температуре 82°С. Остаток перерастворяли в 500 мкл воды при ультразвуковом воздействии в течение 2 минут. Холостой образец мочи без

добавления фосфоновых кислот готовили таким же образом, и соответствующие концентрации аналитов добавляли к конечным экстрактам для оценки степени извлечения. Степень извлечения для каждой кислоты рассчитывали как отношение площадей холостой мочи с добавкой кислот до и после подготовки проб. Рассчитанные степени извлечения представлены на рис. 26.

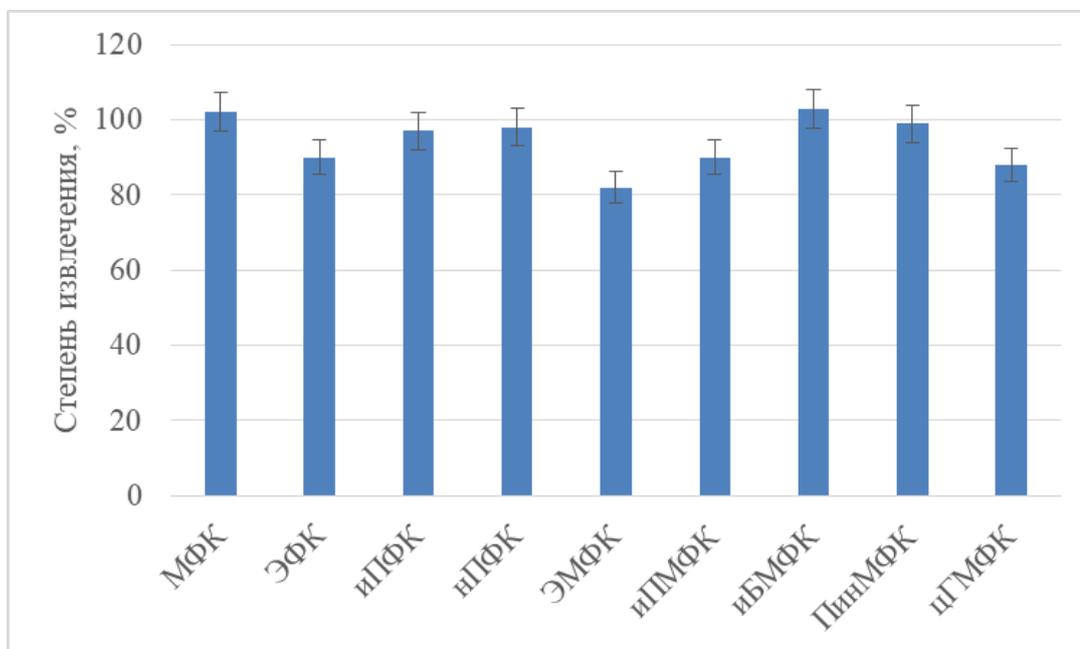


Рис. 26. Степени извлечения АФК и АМФК разработанного способа совместного определения фосфорорганических кислот (n=3, p=0,95)

**4.4.2. Предел обнаружения и наименьшая определяемая концентрация, линейный диапазон градуировочных кривых**

Для построения градуировочных зависимостей в холостые образцы мочи добавляли фосфоновые кислоты в диапазоне концентраций от 0,5 нг/мл до 1000 нг/мл, а также их дейтерированные внутренние стандарты (50 нг/мл). Для ЭФК, иПФК и нПФК в качестве внутреннего стандарта использовали d3-МФК, так как эти соединения близки по физико-химическим свойствам, а также имеют близкое время удерживания. Полученные образцы мочи подготавливали для анализа в соответствии с разделом 2.4. По оси ординат откладывали отношение площадей недейтерированных кислот к их дейтерированным внутренним стандартам, по оси абсцисс – концентрации аналитов. ПО и НОК оценивали по отношению сигнал/шум, равному 3 и 10, соответственно (табл. 14).

#### **4.4.3. Воспроизводимость и правильность**

В холостые образцы мочи вносили аналиты на трех уровнях концентраций, не совпадающие с калибровочными уровнями, а также внутренние стандарты (50 нг/мл). Эти образцы использовались в качестве образцов контроля качества (QC). Для экспериментов на масс-спектрометре AB Sciex 3200 Qtrap использовали следующие концентрации образцов QC: 100, 400 и 800 нг/мл для МФК; 60, 100 и 800 нг/мл для ЭФК; 50, 100, 800 нг/мл для нПФК, иПФК и ЭМФК; 20, 70, 150 нг/мл для иПМФК; 40, 70, 150 нг/мл для иБМФК; 10, 40, 150 нг/мл для цГМФК и 10, 100, 400 нг/мл для ПинМФК. Для экспериментов на Shimadzu LCMS-8050 использовали следующие концентрации QC: 10, 100, 400 нг/мл для МФК; 2, 30 и 150 нг/мл для ЭФК, нПФК, иПФК; 10, 30, 150 нг/мл для ЭМФК, 3, 30, 150 нг/мл для иПМФК, иБМФК и цГМФК; 3, 100, 400 нг/мл для ПинМФК. Образцы QC готовили вместе с градуировочными растворами и анализировали в один день 5 раз для оценки внутрисуточной воспроизводимости. Междневная воспроизводимость была оценена в виде ОСО путем анализа образцов контроля качества на каждом уровне 5 раз в день в течение трех дней ( $n = 15$ ). Точность рассчитывали путем сравнения найденных концентраций аналитов в QC по градуировочным зависимостям с известными количествами аналитов, добавленных в мочу. Полученные правильность и воспроизводимость представлены в табл. 14.

#### ***4.5. Апробация разработанного способа определения на искусственно зараженных образцах мочи***

В рамках апробации разработанного подхода были выбраны три образца мочи: один холостой (S1), не содержащий ни один из маркеров НПОВ, и два тестовых (S2, S3), в которых содержались маркеры НПОВ в неизвестных количествах. В образцы S2 и S3 был добавлен раствор дейтерированных внутренних стандартов для получения концентрации 50 нг/мл и подготовили образцы для ВЭЖХ-МС/МС анализа в соответствии с разработанным подходом. Полученные элюаты анализировали на двух масс-спектрометрах. В результате анализа в образце S2 обнаружена иПМФК, а в S3 – цГМФК. На рис. 27 и рис. 28 представлены МРМ-хроматограммы образцов S1-3 по переходам, соответствующим иПМФК, цГМФК и дейтерированным аналогам, полученные на двух масс-спектрометрах.

**Таблица 14. Метрологические характеристики разработанного ВЭЖХ-МС/МС подхода определения АФК и АМФК в режиме анионообменной хроматографии**

Инструмент	AB Sciex Qtrap 3200									Shimadzu LCMS-8050								
	МФК	ЭФК	ПФК	иПФК	ЭМФК	иПМФК	иБМФК	цГМФК	ПинМФК	МФК	ЭФК	ПФК	иПФК	ЭМФК	иПМФК	иБМФК	цГМФК	ПинМФК
ПО, нг/мл	20	11	9.3	6.7	12	3.2	5	1.0	1.9	5	0.4	0.3	0.4	1.3	0.5	0.5	0.5	0.7
НОК, нг/мл	60	36	31	22	28	11	20	3.3	6.2	13	1	0.9	1.3	4.5	1.6	1.6	1.8	2.2
Линейный диапазон, нг/мл	60-1000	36-1000	31-1000	22-1000	28-1000	11-200	20-200	3.3-200	6.2-500	13-500	1-500	0.9-500	1.3-500	4.5-500	1.6-200	1.6-200	1.8-200	2.2-200
ОСО внутри дня, % <sup>1</sup>	9	7	5	3	9	7	8	7	2	1	1	2	2	4	4	2	2	4
	7	11	8	7	7	7	7	6	7	1	2	2	3	2	3	3	2	7
	5	6	9	10	4	3	8	3	8	2	4	2	2	2	1	1	2	6
ОСО между днями, % <sup>1</sup>	12	9	11	10	9	11	10	7	12	2	3	2	3	4	7	5	5	10
	9	10	8	8	7	8	9	6	14	4	4	3	4	5	3	4	4	9
	6	9	9	11	8	9	9	6	10	12	11	14	11	4	2	2	2	11
Правильность, % <sup>1</sup>	3	8	6	9	2	11	2	1	11	2	1	6	3	3	3	1	1	7
	3	1	2	3	8	2	7	5	2	2	4	2	3	6	1	2	1	8
	3	1	3	9	6	2	1	8	12	4	2	3	11	2	5	2	2	12
Степень извлечения, %	102	90	98	98	81	90	104	88	99									

<sup>1</sup> Ячейка показывает значения на низком, среднем и высоком уровне QC сверху вниз.

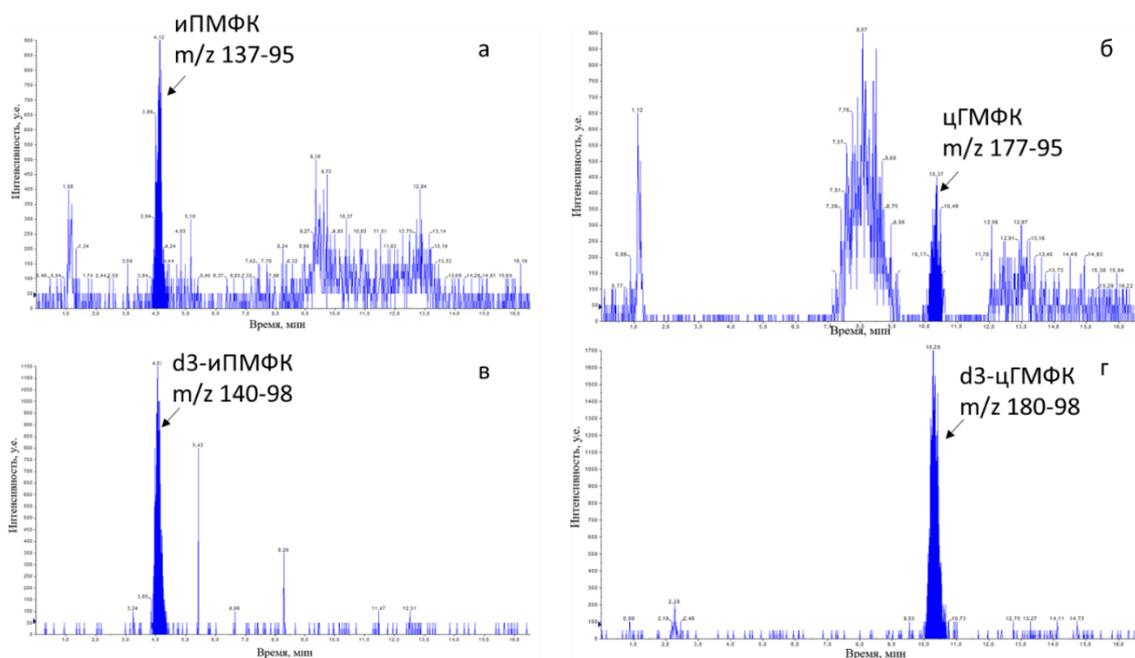


Рис. 27. МРМ-хроматограммы образцов S2 (а, в) и S3(б, г), полученные с помощью AB Sciex 3200.

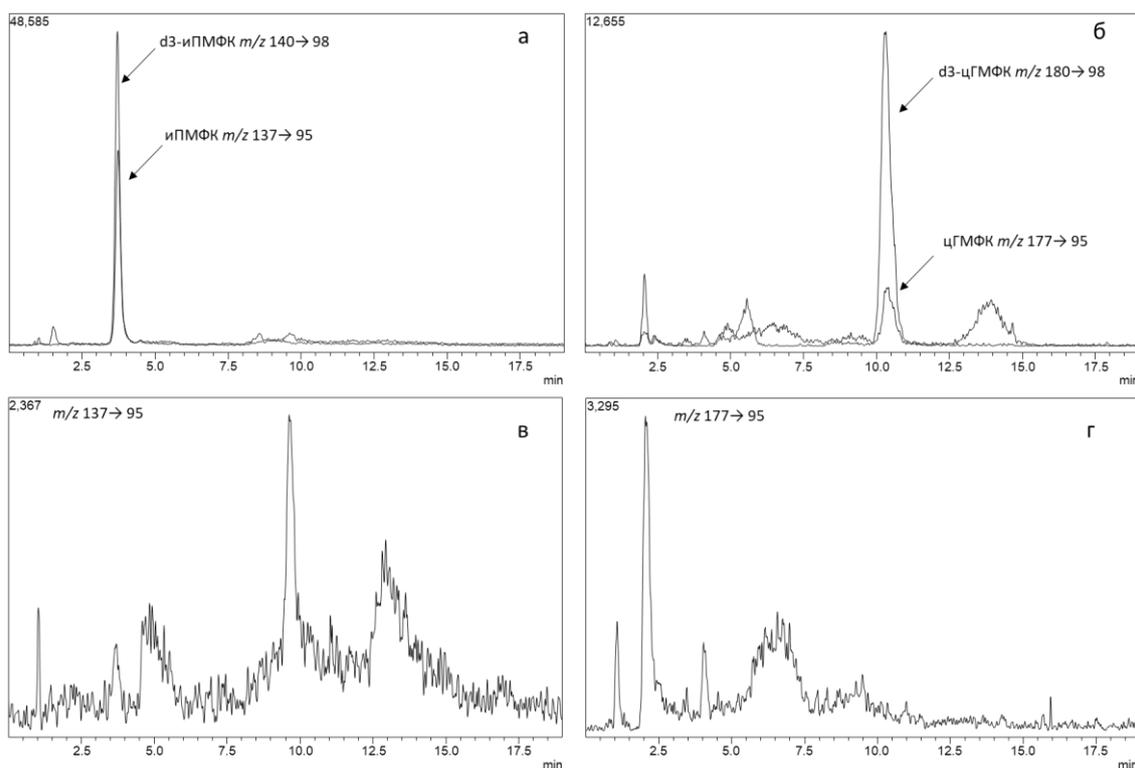


Рис. 28. МРМ-хроматограммы образцов S2 (а), S3 (б) и S1 (в, г), полученные при использовании Shimadzu-8050.

Помимо обнаружения, удалось провести количественный анализ, результаты которого представлены в табл. 15. Как видно из нее, результаты количественного анализа, полученные с помощью разных инструментов, близки между собой, что

свидетельствует о достоверности результатов и надежности разработанного метода. Помимо этого, для оценки относительной погрешности разработанного подхода в холостой образец S1 добавляли иПМФК и цГМФК для достижения концентрации каждой 20 нг/мл. Относительную погрешность рассчитывали как отношение абсолютной погрешности измерения концентрации к концентрации добавки, умноженной на 100. Относительная погрешность при использовании системы Shimadzu LCMS-8050 для иПМФК и цГМФК составила 4 % и 2 %, соответственно, при использовании AB Sciex 3200 Qtrap в сочетании с хроматографом Dionex Ultimate 3000 – 10 % и 4 %.

**Таблица 15. Результаты количественного анализа образцов мочи**

		AB Sciex Qtrap 3200	Shimadzu LCMS-8050
Обнаруженный маркер (образец)	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл (n=3, p=0,95)	Найдено, нг/мл (n=3, p=0,95)
иПМФК (S2)	30	30 ± 5	28 ± 3
цГМФК (S3)	5	7,0 ± 2,0	6,0 ± 1,0

\*\*\*

Таким образом, при использовании анионообменника ВТМА на основе неполярного ПС-ДВБ, синтезированного в лаборатории хроматографии химического факультета МГУ, проявляющего многофункциональные свойства при удерживании АФК и АМФК, разработан высокочувствительный и надежный ВЭЖХ-МС/МС способ обнаружения низкомолекулярных маркеров применения НПОВ. Показано, что изучаемые аналиты на сорбенте с полярными слоями, содержащими четвертичные аммониевые группы и неполярной матрицей, характеризуются хорошим удерживанием даже для наиболее полярных АФК, что позволяет уменьшить матричное влияние, как следствие, повысить количественные характеристики подхода. Поэтому в дальнейшем было предложено использовать для разделения АФК и АМФК коммерческую многофункциональную хроматографическую колонку SIELC SB, однако имеющую преимущественно неполярные функциональные слои и, вероятно, полярную матрицу (производитель не раскрывает состав матрицы).

## ГЛАВА 5. СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МФК И АМФК В БИОПРОБАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОРБЕНТА С ГИДРОФОБНЫМ ПОКРЫТИЕМ<sup>4</sup>

### 5.1. Выбор условий хромато-масс-спектрометрического детектирования

Масс-спектрометрическое определения АФК и АМФК в моче проводили на ВЭЖХ-МС/МС системе Shimadzu-8050, в почве и растениях – на AB Sciex 3200, в режиме регистрации отрицательных ионов при использовании ИЭР. Для МРМ-режима использовали ранее выбранные ионные реакции при оптимальных параметрах масс-спектрометра (табл. 13).

Для разделения аналитов предложена хроматографическая колонка Primesep SB. Сорбент колонки содержит октадецильные цепи и четвертичные аммониевые группы, а состав матрицы неизвестен, однако, учитывая узкий рабочий диапазон рН (от 1,5 до 5), предположительно, в качестве матрицы может использоваться полярный силикагель. Учитывая узкий диапазон рН, в качестве подвижных фаз использовали буферные растворы. Для достижения рабочего рН было предложено применять аммонийно-формиатный и аммонийно-ацетатный буферы, поскольку они наилучшим образом подходят для масс-спектрометрического анализа вследствие летучести солей. Однако из-за более слабых кислотных свойств уксусной кислоты ( $pK_a^{CH_3COOH} = 4,756$ ,  $pK_a^{HCOOH} = 3,745$ ), для достижения буферных растворов с  $pH < 5$  требовалось ее довольно большое количество (более 1 % об.). Такое высокое содержание кислоты в ПФ негативно влияет на чувствительность масс-спектрометрического детектирования вследствие подавления сигнала. Поэтому в качестве ПФ использовали именно аммонийно-формиатные буферы. В процессе подбора оптимальных элюентов для достижения хорошего разделения было выявлено, что при увеличении концентрации соли в ПФ, уменьшаются времена

---

<sup>4</sup> При подготовке данной главы диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: *Vokuev M. F., Baygildiev T. M., Plyushchenko I. V., Ikhalaynen 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. (Импакт-фактор Web of Science – 4,478, Q1), 30%; *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. (Импакт-фактор Web of Science – 4,601, Q1), 70%;

выхода анализов, что характерно для анионообменного-механизма удерживания. Поэтому в качестве элюента А и Б использовали 20 мМ и 40 мМ раствор формиата аммония. При увеличении содержания ацетонитрила в элюентах, удерживание фосфоновых кислот также уменьшалось, что характерно для обращенно-фазовой хроматографии. Таким образом, можно заключить, что удерживание фосфоновых кислот на сорбенте колонки происходит в смешанном режиме (анионообменном и обращенно-фазовом).

При выборе подвижных фаз и программы градиентного элюирования, было замечено, что время выхода анализов было тем больше, чем более гидрофобный алкильный фрагмент содержится в молекуле, т.е. первая выходила МФК, последняя – ПинМФК. Такое удерживание анализов отличается от удерживания на колонке с сорбентом ВТМА (где  $t_R(\text{ЭМФК}) < t_R(\text{МФК})$ ) и более схоже с удерживанием на обращенно-фазовых сорбентах (например, С18). Таким образом, можно сделать вывод о преимущественном вкладе гидрофобных взаимодействий в удерживание АМФК на колонке Primesep SB. Для полного разделения изучаемых кислот (рис. 29) в качестве элюентов были выбраны следующие растворы: А — 20мМ раствор формиата аммония в смеси ацетонитрил-вода (30 : 70 % об.) при рН 3,4 (примерно 0,3% HCOOH), Б – 40мМ раствор формиата аммония в смеси ацетонитрил-вода (70 : 30 % об.) при рН 4,4 (примерно 0,7% HCOOH).

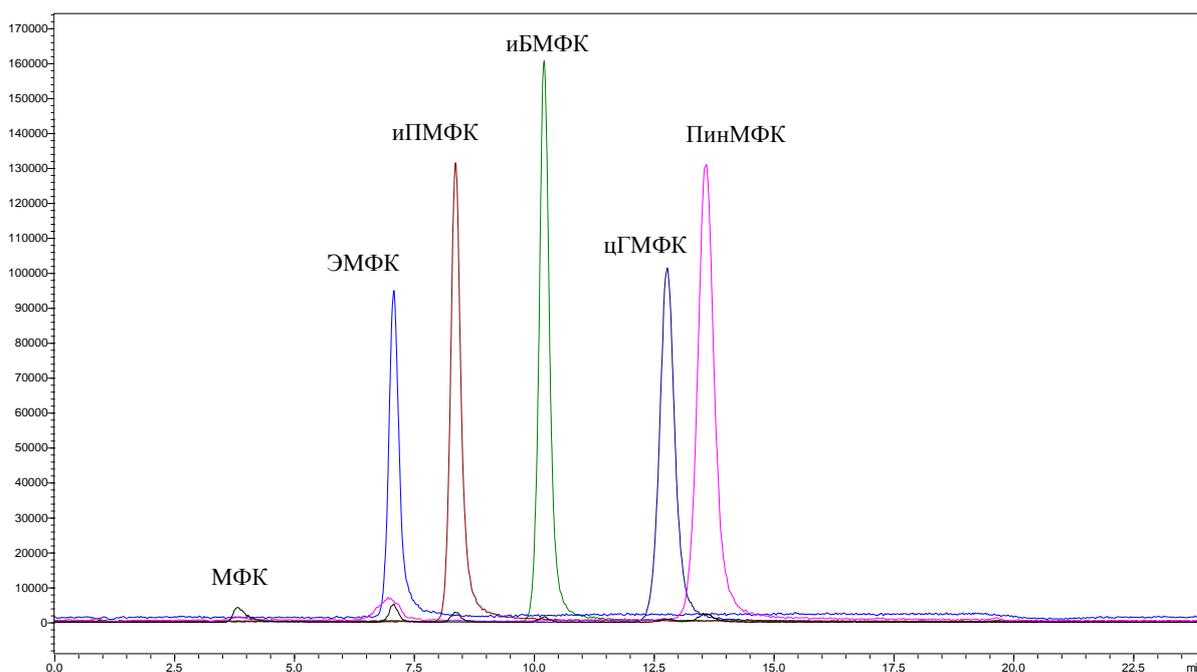


Рис. 29. Масс-хроматограмма МФК и АМФК, полученная при выбранных условиях для колонки SIELC Primesep SB, полученная на приборе Shimadzu LCMS-8050 ( $t_m = 1,2$  мин).

## **5.2. ВЭЖХ-МС/МС анализ мочи крыс**

### **5.2.1. Пробоподготовка мочи для ВЭЖХ-МС/МС анализа**

Для извлечения МФК и АМФК использовали ТФЭ. Был выбран полярный картридж Chromabond SiOH (1 мл/ 100 мг, Macherey-Nagel, Германия). Сорбент перед загрузкой раствора кислот кондиционировали последовательным пропусканием 1мл воды и 1мл ацетонитрила. Эффективность сорбции оценивали по содержанию аналитов в элюате после пропускания водно-ацетонитрильного (10:90%) раствора МФК и АМФК с концентрацией 10 мкг/мл через картридж. Такое содержание ацетонитрила необходимо для предотвращения самоэлюирования кислот в процессе загрузки. Степень сорбции составила 100 % для всех кислот. Из-за высокой полярности МФК и сорбента, нельзя было добиться полного элюирования ее с картриджа даже чистой водой – МФК смывалась постепенно. Однако АМФК удалось количественно элюировать первым миллилитром смеси ацетонитрил-вода (75-25 %, об.). Поскольку после элюирования необходимо было сконцентрировать образец упариванием для повышения чувствительности анализа, в качестве элюента для десорбции с сорбента смеси кислот использовали 2 мл смеси ацетонитрил-вода (3:1). Большое количество ацетонитрила в смеси позволило снизить время на упаривание элюата после ТФЭ.

Были оценены степени извлечения МФК и АМФК из растворов (рис. 30). Из-за высокой полярности МФК не удалось добиться высоких степеней извлечения из-за сильного удерживания аналита на сорбенте, однако менее полярные АМФК удерживались на полярном сорбенте слабее, следовательно, степени извлечения были довольно высокими.

Таким образом, была подобрана следующая процедуры извлечения кислот из мочи: картриджи Chromabond SiOH кондиционировались последовательным пропусканием 1 мл ацетонитрила и 1 мл воды; перед загрузкой 500 мкл раствора кислот разбавляли 4500 мкл ацетонитрила; полученные растворы объемом 5 мл медленно загружали в картриджи, затем промывали 1 мл ацетонитрила и 1 мл смеси вода-ацетонитрил (10:90%, об.); аналиты элюировали 2 мл смеси вода-ацетонитрил (1:3, об.). Элюаты выпаривали досуха в токе азота при 82 °С и перерастворяли в 500 мкл смеси вода-ацетонитрил (95:5%, об.).

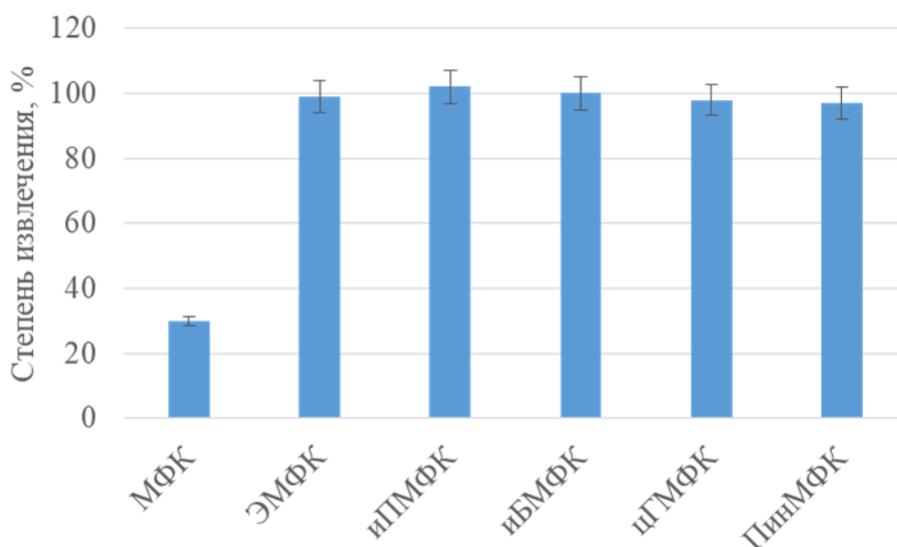


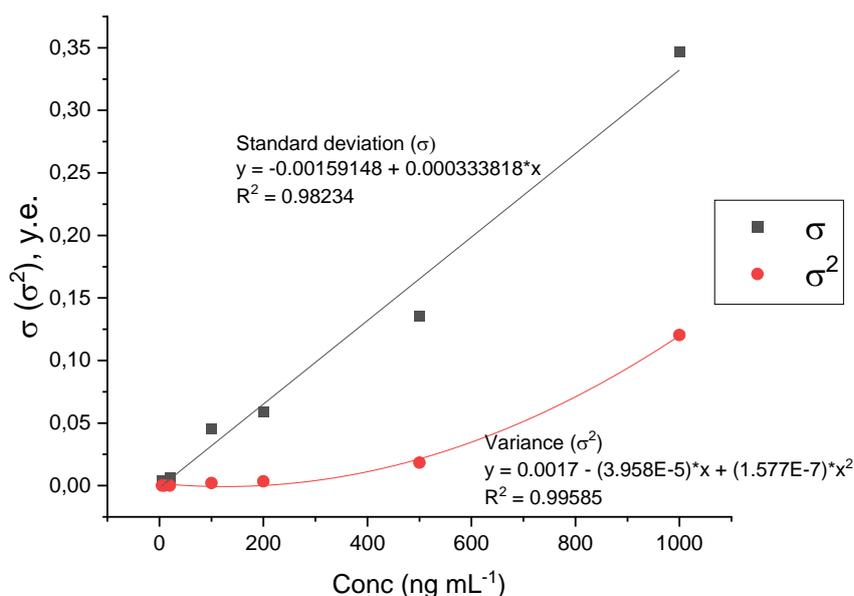
Рис. 30. Степени извлечения фосфоновых кислот при использовании ТФЭ картриджа SiOH (n=3, p=0,95)

### 5.2.2. Валидация разработанного подхода по определению МФК и иПМФК в моче

Поскольку для заражения крыс использовали зарин, то в рамках целевого анализа определяли содержания в моче МФК и иПМФК как биомаркеров зарина. Для этого необходимо было построить калибровочные зависимости с оценкой основных валидационных параметров для подтверждения правильности получаемых результатов. Определенные количества МФК и иПМФК добавляли в холостую мочу крыс для достижения следующих концентраций: 5, 10, 20, 100, 200, 500, 1000 нг/мл. Растворы, добавленные в холостую мочу, были приготовлены из исходной смеси аналитов с концентрацией 1 мг/мл путем последовательного разбавления ацетонитрилом. Для предотвращения разбавления матрицы и, соответственно, снижения матричного эффекта, добавляли к 480 мкл мочи небольшой объем растворов аналитов (20 мкл). Затем добавляли 10 мкл раствора смеси дейтерированных МФК и иПМФК в качестве внутренних стандартов. Образцы мочи крыс, подвергшихся воздействию зарина, образцы QC и калибровочные растворы были подготовлены в соответствии с разделом 2.5 для определения концентрации МФК и иПМФК, правильности и воспроизводимости.

Взвешенный метод наименьших квадратов следует использовать в биоаналитических ВЭЖХ-МС/МС подходах при построении калибровочных кривых в широких диапазонах концентраций [200]. Получаемые ВЭЖХ-МС/МС

данные часто гетероскедастичны, т.е. стандартное отклонение отклика прибора зависит от концентрации. Поэтому сложно добиться приемлемой точности при низких уровнях концентрации, если при построении калибровочной кривой используется невзвешенный метод наименьших квадратов. В процессе построения калибровочных кривых для определения МФК и иПМФК в моче была изучена зависимость стандартного отклонения и дисперсии отклика детектора от концентрации. На рис. 31 хорошо видно, что стандартное отклонение отклика прибора коррелирует с концентрацией, т.е. ошибка отклика возрастает с ростом концентраций аналита. В связи с этим был выбран весовой коэффициент  $1/c^2$  ( $1/x^2$ ), при котором правильность на всех уровнях концентрации была наименьшей. Таким образом, были получены градуировочные зависимости с коэффициентами детерминации 0,9997 и 0,9927 для МФК и иПМФК, соответственно.



**Рис. 31. Зависимость стандартного отклонения и дисперсии площади пиков иПМФК, нормированного на внутренний стандарт, от концентрации.**

Все количественные характеристики разработанного способа, такие как НОК, ПО, линейный диапазон, внутри- и междневная воспроизводимость, правильность, степень извлечения и матричный эффект (МЭ), были определены и приведены в табл. 16. Фактические концентрации образцов QC сравнивались с концентрациями QC, рассчитанными по калибровочной кривой, чтобы определить правильность разработанного подхода. Расчетные значения правильности на разных уровнях

концентраций варьировались от 2 до 4% для иПМФК и от 7 до 16% для МФК. Внутривневная и междневная воспроизводимость также рассчитывались с использованием образцов QC. Каждый уровень концентрации QC анализировался 5 раз (по одному разу каждый из пяти индивидуально приготовленных растворов) в течение одного дня для определения внутривневого ОСО. Каждый уровень концентрации QC анализировался 5 раз в день в течение 5 дней для определения междневного ОСО. ОСО для иПМФК находились в диапазоне от 2 до 4%, из чего можно сделать вывод о хорошей воспроизводимости анализа. ОСО для МФК были больше, но даже в этом случае они не превышали критического значения в 15%. ПО и НОК определяли как концентрации, при которых отношение сигналов количественного МРМ-перехода исследуемого маркера к шуму, вызванному компонентами матрицы, составляло 3:1 и 10:1, соответственно. Для оценки этих параметров анализировали экстракты из мочи с добавками исследуемых маркеров (в области концентраций ожидаемых ПО и НОК) и без соответствующих добавок (холостые пробы). МЭ оценивали для обоих аналитов. Показатель МЭ для иПМФК, равный 85 %, был ниже, чем для МФК (92,5%), несмотря на большее удерживание на хроматографической колонке (рис. 32). Исходя из значений МЭ, можно отметить низкое влияние матрицы крысиной мочи на определение МФК и иПМФК после процедуры пробоподготовки. Это можно объяснить повышенным удержанием полярных биомаркеров на колонке смешанного типа по сравнению с обычной обращенно-фазовой колонкой C18.

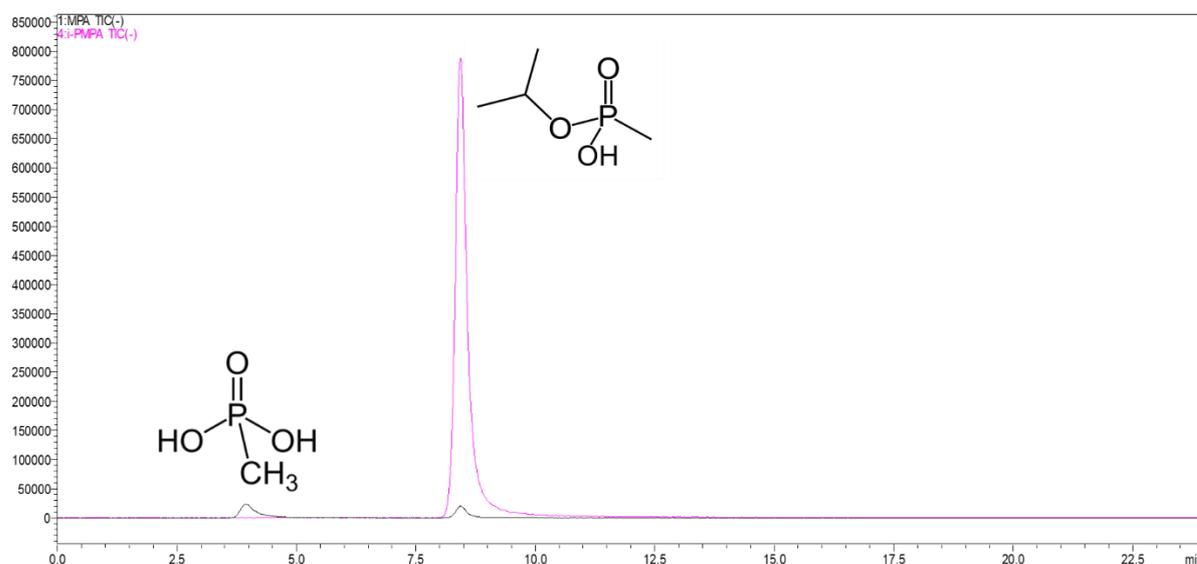


Рис. 32. Хроматограмма экстракта мочи с добавкой МФК и иПМФК 1 ppm ( $t_m=1,2$  мин).

### **5.2.3. Анализ образцов мочи крыс после воздействия заринном**

Разработанная методика была использована для определения содержания МФК и иПМФК в моче крыс, подвергшихся подкожному воздействию зарина. Всего для количественного анализа было собрано 19 образцов мочи от каждой из пяти подопытных крыс (№ 1-5): через 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 дней после первого воздействия, а также на 27 день – после повторного заражения. МФК не была обнаружена ни в одной пробе, скорее всего, из-за высокого предела обнаружения используемого подхода. Содержание иПМФК в образцах мочи превышало НОК в течение первых пяти дней после первичного отравления крыс, а также после повторного отравления на 27 день. Содержание иПМФК в образцах, отобранных на следующий день после отравления, было наибольшим и составляло порядка единиц мкг/мл. Полученные результаты по кинетике выведения биомаркеров из организма с мочой хорошо согласуются с известными данными [201, 202] о скорости выведения метаболита зарина. Данные о содержании иПМФК в моче крыс после отравления, полученные с помощью разработанной методики, представлены в табл. 17. Из данных таблицы можно заметить, что после повторного подкожного отравления крыс заринном, содержание биомаркера зарина в моче, отобранный на следующий день после отравления, меньше, чем после первичного отравления.

Таблица 16. Количественные параметры целевого анализа

Маркер	t <sub>R</sub> , мин	НОК (ПО), нг мл <sup>-1</sup>	Линейный диапазон, нг мл <sup>-1</sup>	Уравнение (w = 1/c <sup>2</sup> )	R <sup>2</sup>	Внутридневная воспроизводимость (междневная) <sup>a</sup> , %	Правильность <sup>a</sup> , %	Степень извлечения, %	Матричный эффект, %
МФК	4.0	100 (50)	100-1000	$y = (0.86x - 39) \cdot 10^{-3}$	0.9997	10 (12) 8 (12)	16 7	21	92.5
иПМФК	8.5	5 (2)	5-1000	$y = 0.0127x - 0.0262$	0.9927	2 (3) 2 (2) 3 (4)	2 4 4	107	85

<sup>a</sup> Представленные значения определены при различных уровнях концентрации с использованием образцов QC и приведены в соответствии с увеличением концентрации

**Таблица 17. Измеренная концентрация иПМФК (нг мл<sup>-1</sup>) 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

### ***5.3. Анализ почвы и растений *Hedera Helix****

#### **5.3.1. Образцы для анализа**

В качестве объектов исследования были выбраны почва, и произрастающее в ней растение плющ обыкновенный (*Hedera Helix*). Четыре растения в горшках с почвой были куплены в цветочном магазине. В почву трех растений однократно вводили 50 мл раствора смеси МФК, ЭМФК, иПМФК, иБМФК, цГМФК и ПинМФК с концентрацией 50 мкг/мл, а затем поливали чистой водопроводной водой до отбора проб растений и почвы. Растение с почвой без добавок аналитов (холостые образцы) использовали в качестве основы для построения градуировочной зависимости. Каждое растение и почву (через 1, 2 и 4 недели после внесения аналитов в почву) анализировали трижды.

#### **5.3.2. Подготовка растений и почвы для анализа**

Сравнивали два метода гомогенизации растений: измельчение в ступке предварительно замороженных жидким азотом и диспергирование с помощью гомогенизатора IKA T18 Ultra-Turrax. Второй вариант оказался менее подходящим из-за толстого и жесткого стебля. Напротив, процесс замораживания всего растения жидким азотом, его гомогенизации в ступке и взвешивания гомогенизированного материала занимал около 10 мин. Процесс пробоподготовки почвы включал стадию сушки почвы в течение нескольких часов на листе бумаги, измельчение почвы и перемешивание. Затем почву снова переносили на лист бумаги и отбирали 3 пробы из разных мест для дальнейшей экстракции.

Жидкостную экстракцию при ультразвуковом воздействии в течение 2, 10 и 30 мин использовали для извлечения МФК и АМФК из растений и почвы. Гомогенизированное растение и почву экстрагировали 2 мл 10% раствора ацетонитрила в воде для выбора оптимального времени процесса экстракции. Было установлено, что двукратной УЗ-экстракции в течение 10 мин достаточно для полного извлечения аналитов из каждой матрицы. Далее экстрагенты объединяли для упаривания. Поскольку использовали дейтерированные внутренние стандарты d3-МФК и d3-АМФК и существенного подавления сигнала аналитов не наблюдалось, было решено не увеличивать время пробоподготовки за счет дополнительных стадий очистки (например, ТФЭ), и ограничиться только очисткой полученных экстрактов после ультразвуковой экстракции.

### **5.3.3. Валидация разработанного ВЭЖХ-МС/МС способа для определения МФК и АМФК в растении и почве.**

#### **Градуировочные зависимости, НОК и ПО**

На основе растений и почвы, не содержащих аналиты, готовили растворы для построения градуировочных кривых. Холостые образцы были взяты из образца растения, в почву которого не вносили раствор смеси исследуемых маркеров. Аналиты вносили в холостые образцы для получения следующих концентраций в конечных экстрактах для анализа ВЭЖХ-МС/МС: 25, 50, 100, 250, 1000, 2500, 10000 и 25000 нг/мл для растений и 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000 и 25000 нг/мл для почвы. Каждый калибровочный раствор анализировали 3 раза. Калибровочные кривые с весовым коэффициентом  $1/x^2$  строились путем построения отношения площадей пиков аналитов и внутренних стандартов (y) к концентрации аналита (x). В случае МФК весовой коэффициент не использовался. Коэффициенты корреляции для каждой калибровочной кривой превышали 0,992 (табл. 18). ПО и НОК определяли как концентрацию, при которой отношение сигнал/шум (S/N) было равно 3 и 10, соответственно. ПО АФК и АМФК в почве оказались ниже, чем в растении. Это связано с негативным влиянием матричных компонентов при определении аналитов в растении.

### Матричный эффект и степень извлечения

МЭ рассчитывали как отношение площадей пиков аналита двух экстрактов: первого экстракта, полученного при пробоподготовке растения/почвы с добавкой аналитов, второго экстракта, полученного при пробоподготовке модельной смеси воды и ацетонитрила (90:10, об.) с добавкой аналитов. Таким образом, МЭ показывает влияние на определение аналитов матричных компонентов, содержащихся в растении и почве. Степень извлечения рассчитывали как отношение площадей пиков аналита двух растворов: первый – экстракт, полученный при пробоподготовке растения/почвы с добавкой аналитов, второй – экстракт из холостой матрицы, в который сделали добавку аналитов в той же концентрации после экстракции. Таким образом, степень извлечения показывает, насколько подготовка пробы влияет на количественный анализ.

Степень извлечения и МЭ представлены в табл. 19 как средние значения, определенные на четырех уровнях концентраций аналитов: 75, 750, 1500 и 15000 нг/мл для растения; 75, 400, 2000 и 15000 нг/мл для почвы.

НОК для МФК и ЭМФК была выше, чем некоторые концентрации, которые были выбраны для определения МЭ и степени извлечения, поэтому количество повторений было меньше 4, что привело к значительному увеличению доверительного интервала. Степени извлечения для всех аналитов находились в пределах от 84 до 101%, что подтверждает практически полное извлечение анализируемых маркеров из растений и почвы. Анализируя значения МЭ, можно отметить, что матричные компоненты растений оказывают существенное негативное влияние на определение МФК и АМФК, в то время как матричные компоненты почвы мало влияют на определение. Почвенные значения МЭ для большинства аналитов находились в пределах от 86 до 112 %, и только для иБМПА значение МЭ составило 55 %. Однако применение дейтерированных внутренних стандартов компенсирует МЭ.

Таблица 18. Количественные характеристика разработанного способа определения АФК и АМФК в растении и почве

	Аналит	ПО, нг/мл	НОК, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R <sup>2</sup>	Правильность, % (n = 3) <sup>c</sup>				ОСО, % (n = 3) <sup>c</sup>			
						QC1 (75)	QC2 (750)	QC3 (1500)	QC4 (15000)	QC1 (75)	QC2 (750)	QC3 (1500)	QC4 (15000)
Растение	МФК	300	1000	1000- 25000	0.9993	N/A	N/A	12	11	N/A	N/A	2.9	4
	ЭМФК	80	250	250-25000	0.9949	N/A	18	12	0	N/A	0.26	0.4	4
	иПМФК	15	50	50-25000	0.9961	11	12	11	4	0.8	1,9	6	13
	иБМФК	15	50	50-25000	0.996	9	6	16	5	9	1.6	0.6	5
	цГМФК	15	50	50-25000	0.9976	9	3	6	5	6	7	5	3.4
	ПинМФК	8	25	25-25000	0.9949	15	4	3	11	2.2	3.5	5	2.0
	Аналит	ПО, нг/мл	НОК, нг/мл	Линейный диапазон, нг/мл	R <sup>2</sup>	Правильность, % (n = 3) <sup>c</sup>				ОСО, % (n = 3) <sup>c</sup>			
						QC1 (75)	QC2 (400)	QC3 (2000)	QC4 (15000)	QC1 (75)	QC2 (400)	QC3 (2000)	QC4 (15000)
Почва	МФК	80	250	250-25000	0.9985	N/A	2	15	6	N/A	3.3	2.3	7
	ЭМФК	30	100	100-25000	0.9992	N/A	9	4	4	N/A	7	3.9	1.7
	иПМФК	8	25	25-25000	0.992	18	5	3	4	2.5	4	3.2	2.6
	иБМФК	8	25	25-25000	0.9929	24	3	1	2	5	5	3.0	2.1
	цГМФК	8	25	25-25000	0.9925	29	12	5	8	4	9	6	7
	ПинМФК	8	25	25-25000	0.9953	21	8	5	2	2.2	1.3	5	3.4

Таблица 19. Степени извлечения и матричный эффект для АФК и АМФК (  $p = 95\%$ ,  $n = 4$ ).

Аналит	Степень извлечения, %		Матричный эффект, %	
	Почва	Растение	Почва	Растение
МФК	96 ± 47*	92 ± 90**	112 ± 11*	43 ± 34**
ЭМФК	92 ± 33*	86 ± 12*	88 ± 24*	42 ± 4*
иПМФК	101 ± 25	87 ± 11	86 ± 11	45 ± 6
иБМФК	92 ± 18	84 ± 3	55 ± 13	33 ± 7
цГМФК	98 ± 22	92 ± 4	87 ± 14	56 ± 4
ПинМФК	95 ± 13	91 ± 6	91 ± 11	51 ± 6

\*n=3 \*\*n=2

#### Правильность и воспроизводимость

Образцы контроля качества (QC) использовали для проверки прогностической функции калибровочных кривых и оценки правильности и воспроизводимости количественного анализа растений/почвы. Эти пробы готовили следующим образом: к холостым пробам растения или почвы, перед процедурой пробоподготовки добавляли определенное количество раствора исследуемой смеси кислот и проводили пробоподготовку для получения конечных экстрактов. Были выбраны четыре уровня концентрации образцов QC в конечных экстрактах: 75 (QC1), 750 (QC2), 1500 (QC3) и 15000 (QC4) нг/мл для растений; 75 (QC1), 400 (QC2), 2000 (QC3) и 15000 (QC4) нг/мл для почвы. Затем по калибровочным кривым рассчитывали концентрации аналитов в образцах QC и сравнивали с истинными концентрациями. Таким образом, правильность рассчитывали по следующей формуле:  $\text{правильность, \%} = \frac{|\text{Измеренная концентрация} - \text{Истинная концентрация}|}{\text{Истинная концентрация}} \times 100$ . Каждый образец QC анализировали по три раза для оценки воспроизводимости. Рассчитанные значения правильности и ОСО представлены в табл. 18. ОСО для каждого образца QC «растение/почва» в трехкратной повторности не превышало 13 %. Правильность не превышала 15% для большинства образцов QC, кроме QC1 в почве – для этого уровня правильность находилась в диапазоне от 18 до 29 %, что превышает допустимые 20 % для QC, равного  $3 \times \text{LOQ}$ . Однако данный факт не повлиял на определение АФК и АМФК в реальных образцах, так как их содержание было значительно выше, чем в QC1. Таким образом, приемлемые значения правильности подтверждают хорошую прогностическую функцию градуировочных кривых, поэтому можно использовать ее для анализа образцов почвы и растений.

### Анализ реальных образцов

После проверки способности градуировочных кривых правильно оценивать концентрации, определяли содержание МФК и АМФК в образцах растений и почвы, спустя 1, 2 и 4 недели после внесения раствора смеси аналитов в почву. Для каждого объекта отбирали три образца из гомогенизированных растений и почвы для дальнейшей экстракции для получения репрезентативных результатов содержания маркеров. Средние концентрации МФК и АМФК в экстрактах с доверительными интервалами ( $n = 3$ ,  $p = 95\%$ ) представлены на рис. 33. Содержание изучаемых маркеров во всех образцах растений и почвы было достаточным для использования разработанного ВЭЖХ-МС/МС подхода. Наибольшее содержание в пробах наблюдалось для МФК. Этот факт может объясняться тем, что МФК является конечным продуктом превращения АМФК, а устойчивость АМФК в водных средах значительно ниже, чем у МФК. Содержание МФК в растениях спустя две недели с момента внесения кислот в почву становится примерно в 3 раза выше, чем в образцах спустя неделю, а затем с течением времени несколько снижается. Содержание АМФК в растениях изменяется не так существенно, как содержание МФК. Концентрация ЭМФК, иБМФК и цГМФК в конечных растительных экстрактах составляла около 1 мкг/мл, что эквивалентно содержанию в растении ~0,2 мкг/г, а концентрация иПМФК и ПинМФК составляет около 2 мкг/мл (0,4 мкг/г). Также стоит отметить, что содержание всех анализируемых маркеров в растении спустя 4 недели после загрязнения почвы было выше, чем в растении, собранном спустя 1 неделю. Это может свидетельствовать о накоплении МФК и АМФК в организме растения, которое растет в загрязненной аналитами почве. При анализе почвы наблюдались следующие средние значения содержания аналитов в конечных экстрактах из почвы (и почве) в 1-ю и 4-ю неделю: МФК – 27 и 20 мкг/мл (54 и 40 мкг/г), ЭМФК – 2,7 и 1,6 мкг/мл (5,4 и 3,2 мкг/г), иПМФК – 4,4 и 2,6 мкг/мл (8,8 и 5,2 мкг/г), иБМФК – 3,3 и 1,9 мкг/мл (6,6 и 3,8 мкг/г), цГМФК – 4,3 и 2,3 мкг/мл (8,6 и 4,6 мкг/мл), ПинМФК – 9,9 и 7,1 мкг/мл (19,8 и 14,2 мкг/г). Таким образом, можно сделать вывод о применимости разработанного подхода для анализа растительного сырья и почвы.

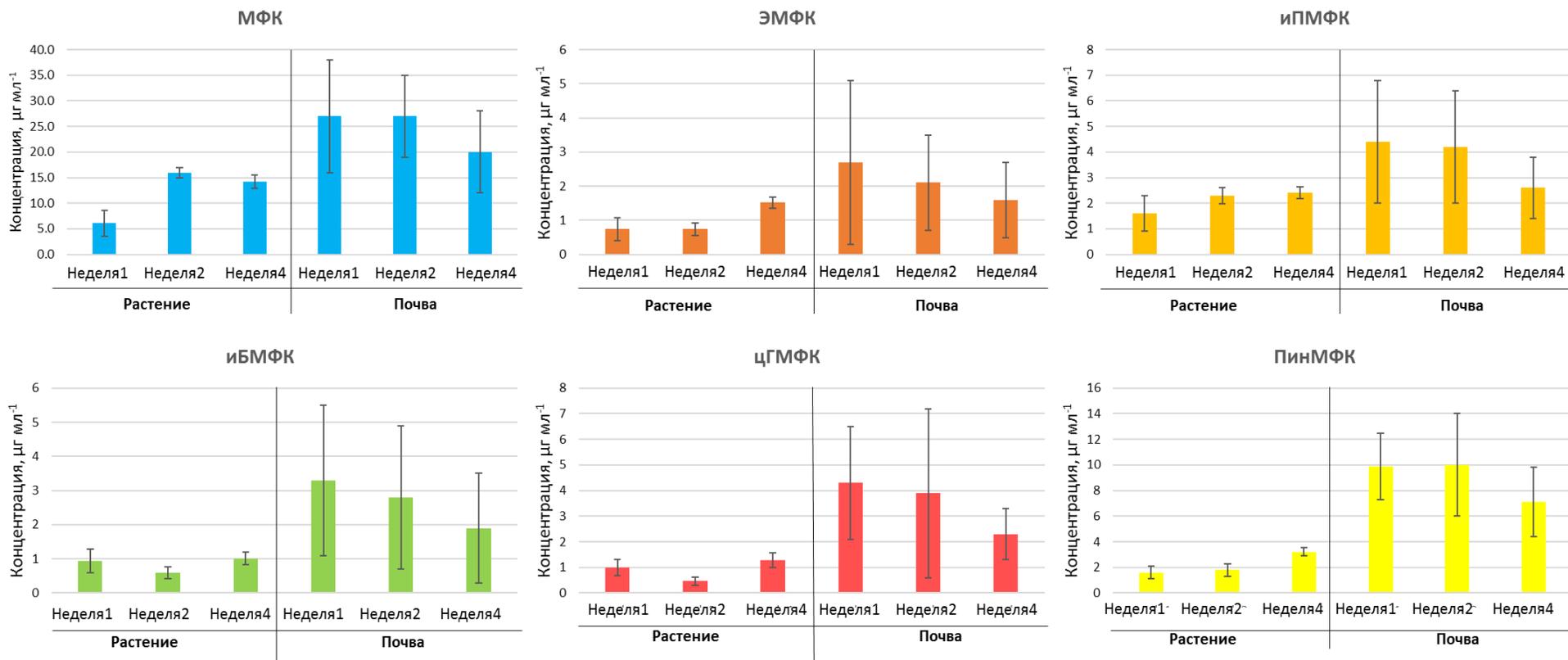


Рис. 33. Концентрации маркеров в экстрактах из образцов растения и почвы через 1, 2 и 4 недели после заражения (n = 3, p = 95 %)

## ГЛАВА 6. НЕЦЕЛЕВОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ МОЧИ КРЫС, ОТРАВЛЕННЫХ ЗАРИНОМ<sup>5</sup>

Помимо количественного анализа образцов мочи крыс (глава 5) их использовали в рамках метаболомного исследования для поиска новых вероятных соединений, по наличию или изменению содержания в биоматериале которых можно судить о факте интоксикации зарином. В качестве образцов для нецелевого анализа были выбраны образцы мочи всех пяти особей крыс, полученные на 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 сутки после отравления, а также образцы сравнения, полученные до отравления; всего 19 образцов для каждой особи. Образец мочи после повторного отравления не анализировали, поскольку дальнейший сбор биоматериала был окончен, а для правильной интерпретации результатов после отравления зарином необходимо иметь достаточное количество образцов для мониторинга изменений организма во времени. Из всех 95 образцов мочи приготовили смесь в равных соотношениях (pQC), которую использовали для корректировки возможного изменения сигнала внутри последовательности.

### **6.1. Обработка данных**

Сырые хромато-масс-спектрометрические данные, полученные в обеих полярностях на IT-TOF, были обработаны пакетом XCMS (версия 3.17.3) [182] с оптимальными параметрами, подобранными пакетом IPO [183] (версия 1.20.0). Недостающие значения в таблицах пиков заполнялись по алгоритму половины минимального значения, а затем проводилась процедура коррекции QC-XGB [184, 203]. Наилучший метод коррекции предварительно выбирали из трех алгоритмов QC-LOESS, QC-RF и QC-XGB по трем критериям: количество признаков с воспроизводимостью (RSD) ниже 30% в образцах pQC, среднее расстояние Бхаттачария для центров кластеров образцов pQC между партиями и средняя мера несхожести pQC на графике PCA [184, 203, 204, 205]. Результаты оценки методов

---

<sup>5</sup> При подготовке данной главы диссертации использована следующая публикация, выполненная автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: *Vokuev M. F., Baygildiev T. M., Plyushchenko I. V., Ikhalaynen Y. A., Ogorodnikov R. L., Solontsov I. K., Braun A.V., Saveliyeva 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. (Импакт-фактор Web of Science – 4,478, Q1), 30%.

коррекции сигнала представлены в табл. 20. Метод QC-XGB был выбран среди других алгоритмов как наилучший по всем критериям.

Далее удаляли сигналы, RSD которых превышала 30 % в образцах pQC. После этого было получено 915 и 878 пиков для положительной и отрицательной полярности. Аддукты и изотопные пики были аннотированы с помощью пакета CAMERA (версия 1.50.0) [186]. Необходимость нормализации образца проверялась путем сравнения интенсивностей внутри группы. Если дисперсия числа метаболитов в образце была незначительной, то диаграммы относительной логарифмированной интенсивности (RLA) должны иметь медиану, близкую к нулю, и низкую дисперсию вокруг этой медианы. Графики RLA, представленные на рис. 34, показывают, что распределение интенсивностей для всех биологических повторов в обеих полярностях одинаково, поэтому нормализация не требуется, следовательно, можно сделать вывод о том, что процесс отравления крыс и организм животных совпадали настолько, насколько это было возможно. Затем таблицы данных были объединены по столбцам. Хотя нецелевая метаболомика позволяет получить многопараметрический ответ биологической системы по тысячам признаков и может быть полезна для исследования изменений в метаболомных путях, невозможно надежно определить и воспроизводимо проанализировать тысячи соединений. По этой причине мы сосредоточились на изучении только наиболее информативных соединений-признаков как потенциальных биомаркеров, связанных с отравлением заринном. Последовательная процедура выбора информативных биомаркеров приведена ниже.

**Таблица 20. Результаты сравнения методов коррекции по трем критериям**

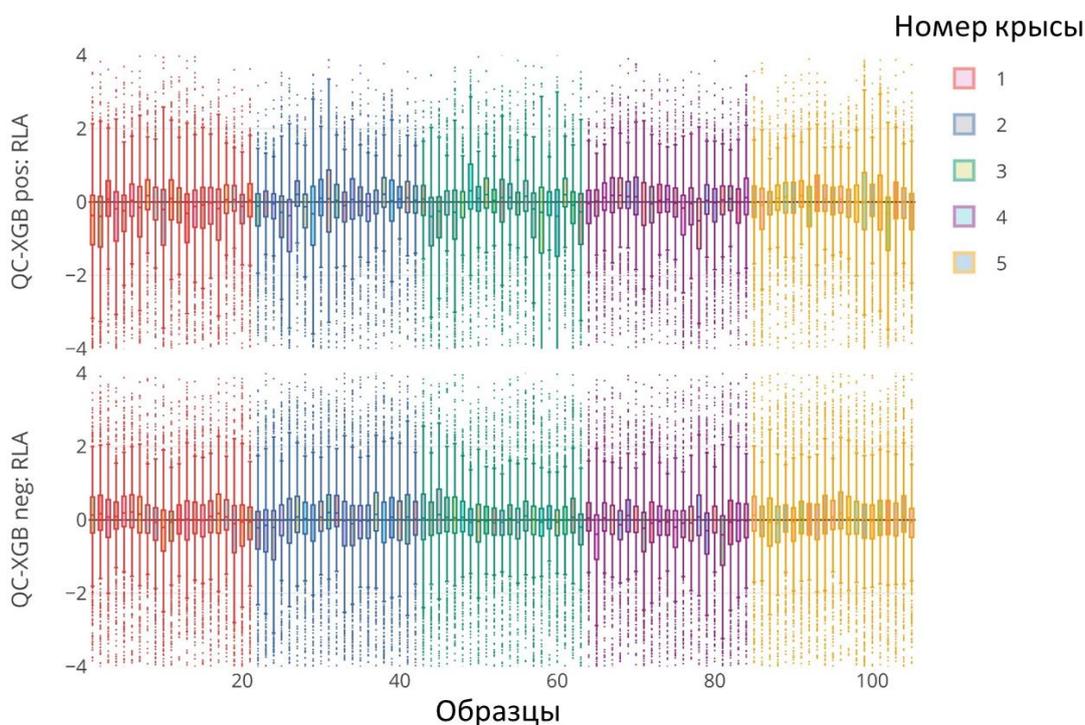
	Без коррекции		QC RF		QC LOESS		QC XGBoost	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Полярность								
RSD 30% (процент оставшихся признаков), %	34	19	76	62	54	35	99	98
Средняя оценка различий	24,76	25,95	23,37	18,52	23,62	22,14	20,26	15,34
среднее расстояние Bhattacharyya	16,14	175,53	10,01	1,30	2,90	2,30	0,74	0,69

Сначала была построена GAMM-модель (GAMM - обобщенная аддитивная смешанная модель, пакет gamm4 версия 0.2-6) для каждого потенциального

метаболита (зависимая переменная), день после отравления и группа в качестве независимых переменных с фиксированным эффектом и индекс крысы в качестве случайного эффекта:

$$\Phi_i = f \left( I_i \sim \beta_{0,i} + \mu_0 + \sum_{j=1}^n \beta_{j,i} x_j + \varepsilon_i \right)$$

где,  $i$  – индекс метаболита,  $j$  – индекс независимой переменной  $j = 1, 2, \dots, n$  (фиксированные эффекты),  $\Phi$  – GAMM-модель, описываемая функцией  $f$ ,  $\beta_0$  – константа пересечения,  $\varepsilon$  – случайная ошибка,  $\beta$  – коэффициент регрессионной модели,  $x$  – независимая переменная (фиксированный эффект),  $I$  – зависимая переменная (вектор значений интенсивности),  $\mu_0$  – случайный эффект.

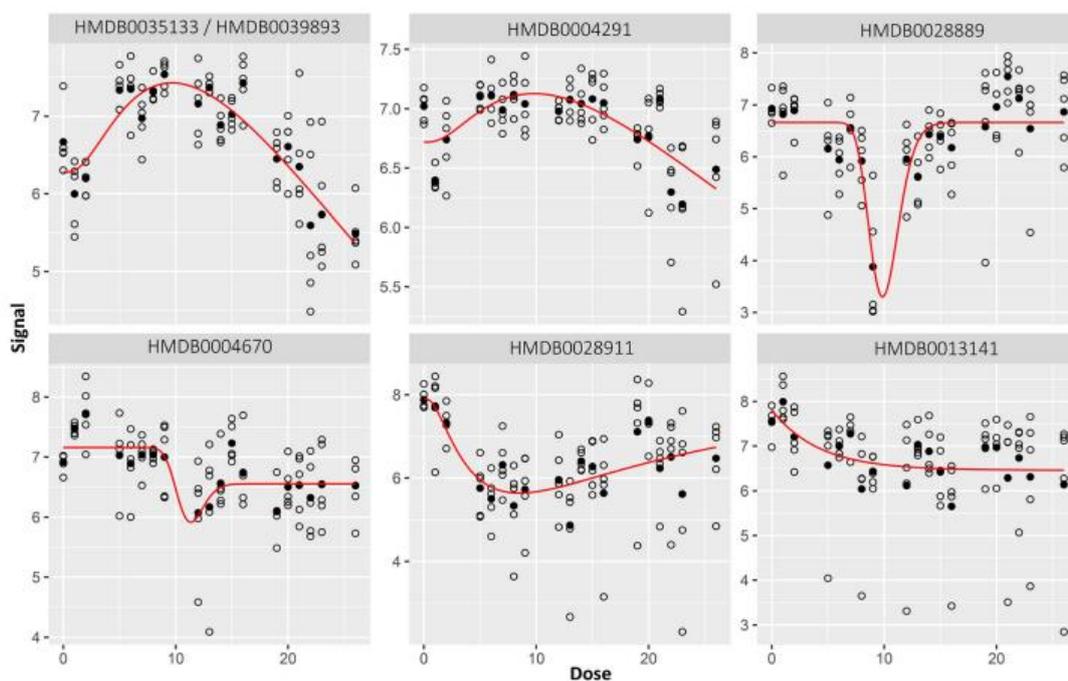


**Рис. 34.** Графики RLA для наборов данных после QC-XGB в положительной (сверху) и отрицательной (снизу) полярностях.

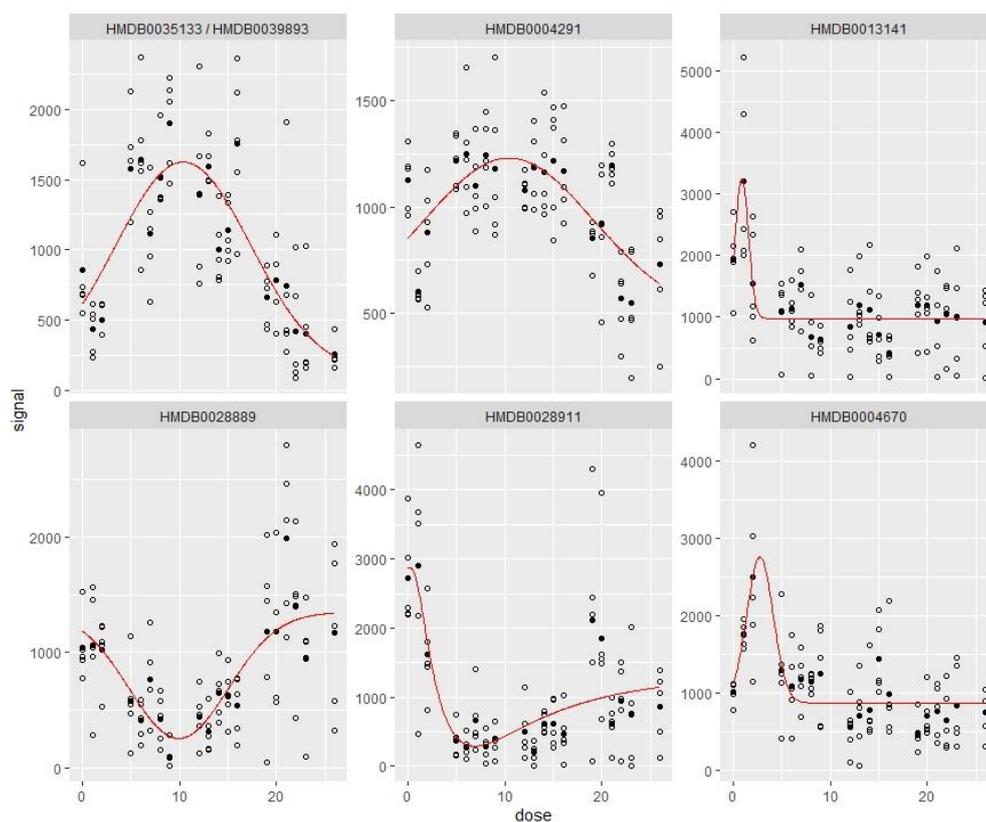
После построения GAMM-модели для потенциальных метаболитов далее исследовали только те признаки, которые имели статистически значимые профили зависимости интенсивности от дня после воздействия заринном ( $p$ -значение  $< 1e-7$ , полученное с помощью метода корректировки Беньямина-Хохберга для множественных сравнений). Затем был проведен многогрупповой fold-change (диапазон изменения) анализ (FD), и были отобраны признаки со средним значением  $FD \geq 1,0$  между всеми попарными сравнениями. В конце был проведен анализ «доза-

эффект» с квадратичной функцией [206] (пакет Dromics версия 2.4-0) и пороговым значением FDR 0,05 (с поправкой Беньямина-Хохберга на р-значения). Все тренды классифицированы по U- или колоколообразной форме и подогнаны по модели Гаусс-пробит. Профили для выбранных признаков-метаболитов после log-преобразования и для исходных данных представлены на рис. 35 и 36, соответственно.

В целом, форма аппроксимирующих кривых описывается квадратичной функцией. Точка перегиба соответствует временному интервалу 8-15 дней. Клиническое преимущество для диагностических целей может быть достигнуто путем дальнейшей валидации и определения референсных нормальных значений концентрации метаболитов в моче.



**Рис. 35. Профили «доза-эффект» в логарифмической шкале для выбранных метаболитов. Каждый рисунок представляет собой логарифмическую зависимость интенсивности ("сигнал", ось y) от дня после воздействия зарином ("доза", ось x), красным цветом выделена аппроксимирующая кривая**



**Рис. 36. 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.**

Таким образом, GAMM-моделирование с fold-change анализом является мощной и эффективной процедурой снижения размерности для улучшения выбора признаков и анализа "доза-эффект". Последовательная процедура статистического анализа позволяет выбрать относительно небольшое количество потенциальных биомаркеров из большого количества признаков для дальнейшей клинической валидации и отобрать наиболее значимые признаки. Программный код представлен по адресу: <https://github.com/plyush1993/DReamGAMM>.

Помимо визуализации в виде диаграммы рассеяния (рис. 37), также использовали диаграмму PCA (рис. 38). График PCA для набора данных с выбранными биомаркерами показал тесную кластеризацию по дням после воздействия заринном, что является показательным для иллюстрации многомерной отклика биологической системы на воздействие. Наблюдения с наименьшим и наибольшим временем после воздействия сгруппированы в правой части графика и четко разделены между собой. В то время как образцы со средним временем после воздействия сгруппированы в левой части. Таким образом, график показателей PCA

повторяет форму кривой "доза-эффект" на многомерном уровне и подтверждает правильность выбора среди многих признаков всего 6 метаболитов, наиболее лучшим образом характеризующие ответ биологического организма на отравление заринном.

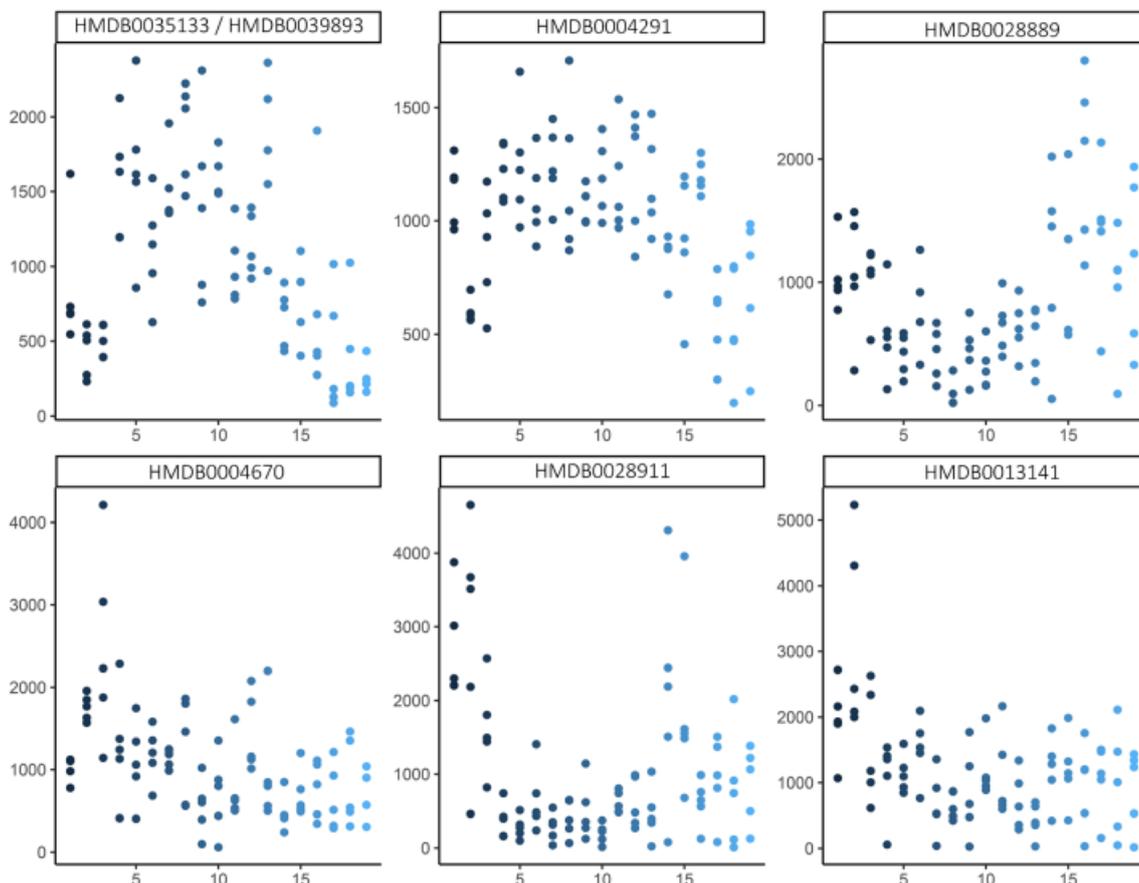
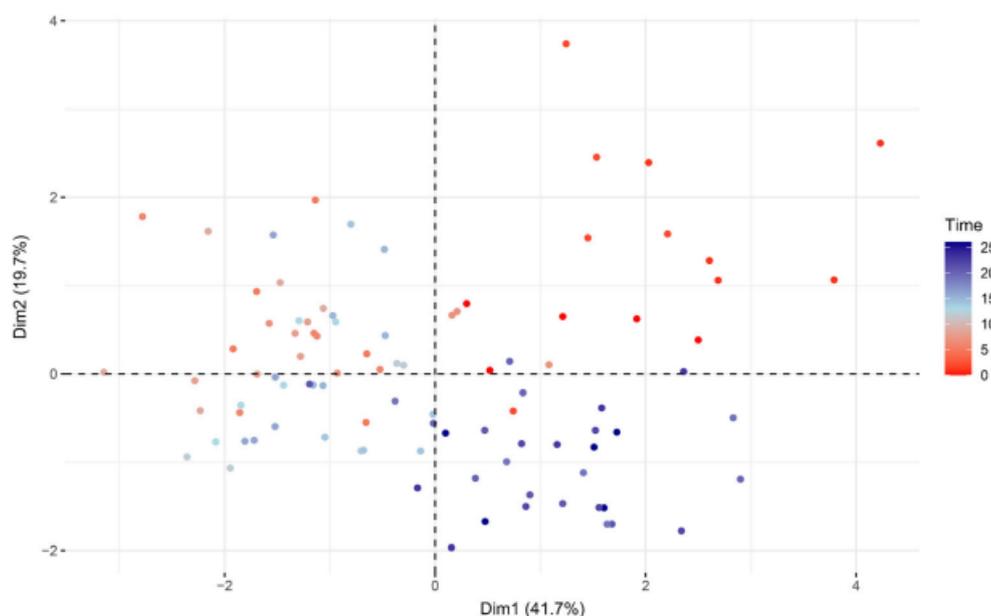


Рис. 37. Диаграммы рассеяния для каждого выбранного метаболита. Интенсивность (ось y) по отношению ко дню после воздействия (ось x).

## 6.2. Идентификация выбранных соединений и их биологическая роль

После выбора шести соединений, наиболее подходящих в качестве биомаркеров воздействия зарина, проводили их идентификацию в соответствии с двухэтапной последовательной процедурой, включающей предварительный выбор биомаркеров (HMDB, KEGG, RefMet), точные молекулярные массы которых совпадали с экспериментально измеренной массой, и последующую идентификацию на основе изучения фрагментации и сравнения с  $MS^2$  спектрами из баз данных CFM-ID и MetFrag. Выбирали биомаркеры по совпадению точной массы иона-предшественника и ионов-продуктов в спектрах фрагментации. Идентификацию потенциальных биомаркеров воздействия зарина в моче проводили с помощью масс-



**Рис. 38. График счетов для многомерной иллюстрации реакции биологической системы на воздействие. Образцы были спроецированы на две первые главные компоненты по дням после воздействия. Все метки класса определены цветом.**

спектрометрии высокого разрешения на приборе с орбитальной ионной ловушкой Orbitrap Fusion Lumos в дополнение к времяпролетному LCMS-IT-TOF для повышения точности и достоверности идентификации. Кроме того, учитывали значения LogP (ALOGPS 2.1) потенциальных биомаркеров, которые должны были соответствовать временам удерживания. Биологическая роль метаболитов была взята из баз данных HMDB, KEGG, ChEBI. В результате из 6 соединений-признаков, выбранных с помощью обработки сырых данных, при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения удалось идентифицировать 5 соединений, для которых ошибка определения масс ионов-предшественников была приемлемой (не более 5 ppm). Подробная информация об идентифицированных биомаркерах приведена в табл. 21. Для одного соединения с  $m/z$  положительного иона 269,1674 Да не удалось найти подходящий биомаркер в используемых базах данных метаболитов, масса иона-прекурсора которого и масс-спектры фрагментации были бы близки к таковым, экспериментально полученным. Биомаркер из баз данных, масса которого оказалась наиболее близкой к экспериментальной, однако с очень большой ошибкой, равной 25 ppm, был гистидил-лейцин. Слишком большая ошибка определения массы не позволяет предложить данное соединение в качестве потенциального биомаркера отравления.

Все пять предложенных соединений принимают участие в различных метаболических процессах, например, 5-пиридоксолактон является метаболитом витамина В6, участвует в метаболизме ксенобиотиков в организме человека, а также является уринарным метаболитом. Дипептиды изолейцил-лейцин и гистидил-лейцин являются продуктами неполного распада белков. Изолейцил-лейцин был обнаружен в стволе головного мозга телят [207]. 1-Метилгипоксантин является эндогенным метаболитом, который может быть обнаружен в моче человека и крыс. Повышенное содержание 1-метилгипоксантина было обнаружено в моче крыс с опухолью Йошида [208] и в моче пациентов с гестационным диабетом [209]. 3,7-Диметил-3-октен-1,2,6,7-тетраол и 4-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-1-метилциклогексан-1,2-диол – органические соединения, которые можно отнести к липидоподобным молекулам. Оба эти соединения принимают участие в метаболизме липидов. С нарушением процесса метаболизма жиров и липидов могут быть связаны некоторые заболевания, поэтому изменения в содержании этих соединений могут быть связаны с влиянием некоторых внешних факторов на организм, например, таких как отравление заринном, поэтому наблюдение за содержанием этих соединений в моче в рамках метаболомного исследования может быть полезным. Альфа-диморфеколевая кислота относится к эндогенным жирным кислотам, подавляющая процесс синтеза ДНК, следовательно, изменения концентрации в моче крыс могут указывать на нарушения биохимических процессов, связанных с метаболизмом ДНК или липидов.

Нарушение метаболизма липидов и аминокислот скорее можно отнести к общему токсическому отравлению, чем к специфичному воздействию зарина или группы фосфорорганических НПОВ. Известно, что хроническое отравление мышьякосодержащими соединениями и острое отравление заринном представляют собой совершенно разные токсикокинетические модели. Тем не менее, Ванг и др. сообщили [210], что хроническое воздействие мышьяка нарушает метаболизм липидов и аминокислот у крыс. Стоит отметить, что данный результат был получен при использовании сыворотки крови для нецелевого метаболомного профилирования, в то время как уриномика используется гораздо реже в целях изучения метаболомных эффектов. На сегодняшний день нет достаточного количества данных для того, чтобы приписать изменения в метаболомных профилях

мочи к воздействию определенных групп токсикантов, поэтому накопление и структурирование этой информации является актуальной и важной задачей. В данном разделе представлен один из вариантов методологического подхода для продвижения в этой области.

Таким образом, представленные метаболиты участвуют в разнообразных метаболомных процессах и значительное изменение концентрации этих соединений указывают на то, что зарин имеет множество вторичных механизмов воздействия на живые организмы, которые приводят к серьезным метаболическим нарушениям. Данные метаболиты могут быть полезны для понимания процессов, происходящих при отравлении, и для развития токсикологии. Предложенные биомаркеры в дополнение к общеизвестным биомаркерам зарина могут быть полезны для выявления отравления спустя более пяти дней после воздействия.

**Таблица 21. 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] <sup>+</sup>	2,14	5-пиридоксолактон (HMDB0004291)	Метаболит витамина B6, метаболизм ксенобиотиков	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	165,0425	165,0426	-0,60	0,42
269,1674 (269,1650)	[M+H] <sup>+</sup>	2,50	-	-	-	268,1601	-	-	-
245,1862 (245,1795)	[M+H] <sup>+</sup>	2,65	Изолейцил-лейцин (HMDB0028911)	Продукт неполного катаболизма белков	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	244,1789	244,1786	1,23	-0,96
151,0614 (151,0614)	[M+H] <sup>+</sup>	2,96	1-метилгидроксантин (HMDB0013141)	Метаболиты человека и крысы	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O	150,0541	150,0541	0	-0,69
203,1298 (203,1301)	[M-H] <sup>-</sup>	13,8	3,7-диметил-3-октен-1,2,6,7-тетрол (HMDB0035133)	Транспорт липидов Метаболизм липидов Метаболизм жирных кислот	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	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] <sup>-</sup>	27,2	α-диморфеколевая кислота (HMDB0004670)	Транспорт липидов Метаболизм липидов	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	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  $3^3$  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 *n*-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 зарином, 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 AB Sciex 3200. Продемонстрировано, что концентрация иПМФК в моче крыс после отравления зарином 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 зарином. Предложены 5 новых потенциальных биомаркеров, которые могут свидетельствовать об отравлении зарином.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Convention on the Prohibition of the Development, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction. Technical Secretariat of the Organisation for Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, 1997. URL: <http://www.opcw.org>. (25.12.2022).
2. *Morita H., Yanagisawa N., Nakajima T., Shimizu M., Hirabayashi H., Okudera H., Mimura S.* Sarin poisoning in Matsumoto, Japan // *Lancet*. 1995. V. 346. № 8970. P. 290-293.
3. *Nagao M., Takatori T., Matsuda Y., Nakajima M., Iwase H., Iwadate K.* Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway // *Toxicology and applied pharmacology*. 1997. V. 144. №. 1. P. 198-203.
4. *Sellström A., Cairns S., Barbeschi M.* United Nations Mission to Investigate Allegations of the Use of Chemical Weapons in the Syrian Arab Republic, Final Report. <https://unoda-web.s3.amazonaws.com/wp-content/uploads/2013/12/report.pdf> (27.02.2023)
5. *Chai P., Boyer E., Al-Nahhas H., Erickson T.* Toxic chemical weapons of assassination and warfare: nerve agents VX and sarin // *Toxicology communications*. 2017. V. 1. №. 1. P. 21-23.
6. *Brletich N., Waters M., Bowen G., Tracy M.* US and foreign military CWA detectors / *Worldwide Chemical Detection Equipment Handbook*. Aberdeen, MD: Chemical and Biological Defense Information Analysis Center, 1995. 470 p.
7. *Рыбальченко И.В.* Идентификация токсичных химикатов // *Журн. Рос. хим. общества им. ДИ Менделеева*. 2002. Т. 46. № 2. С. 64-70.
8. *Kanu A., Haigh P., Hill H.* Surface detection of chemical warfare agent simulants and degradation products // *Analytica Chimica Acta*. 2005. V. 553. № 1-2. P. 148-159.
9. What is a Chemical Weapon? <https://www.opcw.org/our-work/what-chemical-weapon>. (28.02.2023)
10. *Dolgin E.* Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs // *Nature medicine*. 2013. V. 19. №. 10. P. 1194-1196.
11. *Minami M., Hui D. M., Katsumata M., Inagaki H., Boulet C. A.* Method for the analysis of the methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997. V. 695. №. 2. P. 237-244.

12. *Haines D., Fox S. C.* Acute and long-term impact of chemical weapons: lessons from the Iran-Iraq war // *Forensic Sci Rev.* 2014. V. 26. №. 2. P. 97-114.
13. *John H., van der Schans M., Koller M., Spruit H., Worek F., Thiermann H., Noort D.* Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network // *Forensic toxicology.* 2018. V. 36. P. 61-71.
14. *Sidell F., Borak J.* Chemical warfare agents: II. Nerve agents // *Annals of emergency medicine.* 1992. V. 21. №. 7. P. 865-871.
15. *Wiener S., Hoffman R.* Nerve agents: a comprehensive review // *Journal of intensive care medicine.* 2004. V. 19. №. 1. P. 22-37.
16. *Black R.* History and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare agent detection // *Journal of Chromatography B.* 2010. V. 878. №. 17-18. P. 1207-1215.
17. *Hoening S.* Compendium of chemical warfare agents / New York: Springer, 2007. 238 p.
18. *John H., Balszuweit F., Steinritz D., Kehe K., Worek F., Thiermann H.* Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants // *Handbook of toxicology of chemical warfare agents.* Academic Press, 2015. P. 817-856.
19. *Li B., Eyer P., Eddleston M., Jiang W., Schopfer L. M., Lockridge O.* Protein tyrosine adduct in humans self-poisoned by chlorpyrifos // *Toxicology and applied pharmacology.* 2013. V. 269. №. 3. P. 215-225.
20. *Bao Y., Liu Q., Chen J., Lin Y., Wu B., Xie J.* Quantification of nerve agent adducts with albumin in rat plasma using liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry // *Journal of chromatography A.* 2012. V. 1229. P. 164-171.
21. *Read R., Riches J., Stevens J., Stubbs S., Black R.* Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy // *Archives of toxicology.* 2010. V. 84. P. 25-36.
22. *Williams N., Harrison J., Read R., Black R.* Phosphorylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents // *Archives of toxicology.* 2007. V. 81. P. 627-639.
23. *Noort D., Hulst A., Van Zuylen A., Van Rijssel E., Van Der Schans M.* Covalent binding of organophosphorothioates to albumin: a new perspective for OP-pesticide biomonitoring? // *Archives of toxicology.* 2009. V. 83. №. 11. P. 1031-1036.
24. *John H., Breyer F., Thumfart J., Höchstetter H., Thiermann H.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detection and identification of albumin phosphorylation by organophosphorus pesticides

- and G-and V-type nerve agents // Analytical and bioanalytical chemistry. 2010. V. 398. P. 2677-2691.
25. *Li B., Schopfer L., Hinrichs S., Masson P., Lockridge O.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411 // Analytical biochemistry. 2007. V. 361. № 2. P. 263-272.
  26. *Crow B., Pantazides B., Quiñones-González J., Garton J., Carter M., Perez J., Johnson R.* Simultaneous measurement of tabun, sarin, soman, cyclosarin, VR, VX, and VM adducts to tyrosine in blood products by isotope dilution UHPLC-MS/MS // Analytical chemistry. 2014. V. 86. № 20. P. 10397-10405.
  27. *Baygildiev T. M., Vokuev M. F., Braun A. V., Yashkir V. A., Rybalchenko I. V., Rodin I. A.* Identification of 2-(diethylamino) ethylthiol dipeptide (Cys-Pro) adduct as biomarker of nerve agents VR and CVX in human plasma using liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2021. V. 413. P. 1905-1916.
  28. *John H., Siegert M., Gandor F., Gawlik M., Kranawetvogl A., Karaghiosoff K., Thiermann H.* Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys34 using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis // Toxicology letters. 2016. V. 244. P. 103 - 111.
  29. *Gandor F., Gawlik M., Thiermann H., John H.* Evidence of sulfur mustard exposure in human plasma by LC–ESI–MS–MS detection of the albumin-derived alkylated HETE–CP dipeptide and chromatographic investigation of its cis/trans isomerism // Journal of Analytical Toxicology. 2015. V. 39. № 4. P. 270-279.
  30. *Kranawetvogl A., Küppers J., Gütschow M., Worek F., Thiermann H., Elsinghorst P. W., John, H.* Identification of novel disulfide adducts between the thiol containing leaving group of the nerve agent VX and cysteine containing tripeptides derived from human serum albumin // Drug Testing and Analysis. 2017. V. 9. № 8. P. 1192-1203.
  31. *Kranawetvogl A., Küppers J., Siegert M., Gütschow M., Worek F., Thiermann H., John H.* Bioanalytical verification of V-type nerve agent exposure: simultaneous detection of phosphorylated tyrosines and cysteine-containing disulfide-adducts derived from human albumin // Analytical and bioanalytical chemistry. 2018. V. 410. P. 1463-1474.

32. Note by the director-general status of laboratories designated for the analysis of authentic biomedical samples. Document No.: S/2093/2022. <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2022/08/s-2093-2022%28e%29.pdf> (28.03.2023)
33. Note by the director-general status of laboratories designated for the analysis of authentic environmental samples. Document No.: S/2089/2022. <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2022/08/s-2089-2022%28e%29.pdf> (28.03.2023)
34. *Tu A.T.* Toxicological and chemical aspects of sarin terrorism in Japan in 1994 and 1995 // *Toxin Reviews*. 2007. V. 26. № 3. P. 231-274.
35. *Munro N., Talmage S., Griffin G., Waters L., Watson A., King J., Hauschild V.* The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // *Environmental health perspectives*. 1999. V. 107. № 12. P. 933-974.
36. *Kranawetvogl A., Worek F., Thiermann H., John H.* Modification of human serum albumin by the nerve agent VX: microbore liquid chromatography/electrospray ionization high-resolution time-of-flight tandem mass spectrometry method for detection of phosphorylated tyrosine and novel cysteine containing disulfide adducts // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2016. V. 30. № 19. P. 2191-2200.
37. *Evans R., Jakubowski E., Muse W., Matson K., Hulet S., Mioduszewski R., Thomson S., Totura A., Renner J., Crouse C. L.* Quantification of sarin and cyclosarin metabolites isopropyl methylphosphonic acid and cyclohexyl methylphosphonic acid in minipig plasma using isotope-dilution and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry // *Journal of analytical toxicology*. 2008. V. 32. № 1. P. 78-85.
38. *Halme M., Pesonen M., Hakala U., Pasanen M., Vähäkangas K., Vanninen, P.* Applying human and pig hepatic in vitro experiments for sulfur mustard study: Screening and identification of metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2015. V. 29. № 14. P. 1279-1287.
39. *Read R.W., Riches J.R., Stevens J.A., Stubbs S.J., Black R.M.* Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy // *Archives of toxicology*. 2010. V. 84. P. 25-36.
40. *Carter M.D., Crow B.S., Pantazides B.G., Watson C.M., Thomas J.D., Blake T.A., Johnson R.C.* Direct quantitation of methyl phosphonate adducts to human serum

- butyrylcholinesterase by immunomagnetic-UHPLC-MS/MS // *Analytical chemistry*. 2013. V. 85. №. 22. P. 11106-11111.
41. *Reiter G., Mikler J., Hill I., Weatherby K., Thiermann H., Worek F.* Chromatographic resolution, characterisation and quantification of VX enantiomers in hemolysed swine blood samples // *Journal of Chromatography B*. 2008. V. 873. №. 1. P. 86-94.
  42. *Gandor F., Gawlik M., Thiermann H., John H.* Evidence of sulfur mustard exposure in human plasma by LC–ESI–MS–MS detection of the albumin-derived alkylated HETE–CP dipeptide and chromatographic investigation of its cis/trans isomerism // *Journal of Analytical Toxicology*. 2015. V. 39. №. 4. P. 270-279.
  43. *Golime R.R., Chandra B., Palit M., Dubey D. K.* Adductomics: a promising tool for the verification of chemical warfare agents' exposures in biological samples // *Archives of toxicology*. 2019. V. 93. P. 1473-1484.
  44. *Emwas A.H., Roy R., McKay R.T., Tenori L., Saccenti E., Gowda G.N., Raftery D., Alahmari F., Jaremko L., Jaremko M., Wishart D.S.* NMR spectroscopy for metabolomics research // *Metabolites*. 2019. V. 9. №. 7. P. 123.
  45. *Sporty J. L., Lemire S.W., Jakubowski E.M., Renner J.A., Evans R.A., Williams R.F., Schmidt J.G., van der Schans M.J., Noort D., Johnson R.C.* Immunomagnetic separation and quantification of butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum // *Analytical chemistry*. 2010. V. 82. №. 15. P. 6593-6600.
  46. *Marsillach J., Hsieh E.J., Richter R.J., MacCoss M.J., Furlong C.E.* Proteomic analysis of adducted butyrylcholinesterase for biomonitoring organophosphorus exposures // *Chemico-biological interactions*. 2013. V. 203. №. 1. P. 85-90.
  47. *Marsillach J., Richter R.J., Kim J.H., Stevens R.C., MacCoss M.J., Tomazela D., Suzuki S.M., Schopfer L.M., Lockridge O., Furlong C.E.* Biomarkers of organophosphorus (OP) exposures in humans // *Neurotoxicology*. 2011. V. 32. №. 5. P. 656-660.
  48. *Pantazides B.G., Watson C.M., Carter M.D., Crow B.S., Perez J.W., Blake T.A., Thomas J.D., Johnson R.C.* An enhanced butyrylcholinesterase method to measure organophosphorus nerve agent exposure in humans // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014. V. 406. P. 5187-5194.
  49. *Aryal U.K., Lin C.T., Kim J.S., Heibeck T.H., Wang J., Qian W.J., Lin, Y.* Identification of phosphorylated butyrylcholinesterase in human plasma using immunoaffinity purification and mass spectrometry // *Analytica chimica acta*. 2012. V. 723. P. 68-75.

50. Summary of the report on activities carried out in support of a request for technical assistance by the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. [https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S\\_series/2018/en/s-1612-2018\\_e\\_.pdf](https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2018/en/s-1612-2018_e_.pdf) (18.04.2023)
51. *McGuire J.M., Taylor J.T., Byers C.E., Jakubowski E.M., Thomson S.A.* Determination of VX-G analogue in red blood cells via gas chromatography-tandem mass spectrometry following an accidental exposure to VX // *Journal of analytical toxicology*. 2008. V. 32. №. 1. P. 73-77.
52. *Renner J.A., Dabisch P.A., Evans R. A., McGuire J.M., Totura A.L., Jakubowski E.M., Thomson S.A.* Validation and application of a GC-MS method for determining soman concentration in rat plasma following low-level vapor exposure // *Journal of analytical toxicology*. 2008. V. 32. №. 1. P. 92-98.
53. *Van der Meer J.A., Trap H.C., Noort D., Van der Schans M.J.* Comprehensive gas chromatography with Time of Flight MS and large volume introduction for the detection of fluoride-induced regenerated nerve agent in biological samples // *Journal of Chromatography B*. 2010. V. 878. №. 17-18. P. 1320-1325.
54. *Kanaujia P. K., Tak V., Pardasani D., Gupta A.K., Dubey D.K.* Application of cation-exchange solid-phase extraction for the analysis of amino alcohols from water and human plasma for verification of Chemical Weapons Convention // *Journal of Chromatography A*. 2008. V. 1185. №. 2. P. 167-177.
55. *Baygildiev T., Vokuev M., Ogorodnikov R., Braun A., Rybalchenko I., Rodin I.* 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.
56. *Koller M., Becker C., Thiermann H., Worek F.* GC-MS and LC-MS analysis of nerve agents in body fluids: Intra-laboratory verification test using spiked plasma and urine samples // *Journal of Chromatography B*. 2010. V. 878. №. 17-18. P. 1226-1233.
57. *Hamelin E. I., Bragg W., Shaner R.L., Swaim L.L., Johnson R.C.* Comparison of high-resolution and tandem mass spectrometry for the analysis of nerve agent metabolites in urine // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2013. V. 27. №. 15. P. 1697-1704.
58. *Mawhinney D.B., Hamelin E.I., Fraser R., Silva S.S., Pavlopoulos A.J., Kobelski R.J.* The determination of organophosphonate nerve agent metabolites in human urine by

- hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography B. 2007. V. 852. №. 1-2. P. 235-243.
59. *Harvey D.J., Horning M.G.* Derivatives for the characterization of alkyl- and aminoalkylphosphonates by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 1973. V. 79. P. 65-74.
60. *Sass S., Fisher T.L.* Chemical ionization and electron impact mass spectrometry of some organophosphonate compounds // Organic Mass Spectrometry. 1979. V. 14. №. 5. P. 257-264.
61. *Tingfa D.* Gas Chromatographic Determination of O-Ethyl S-(N, N-Diisopropylamino) Ethyl Methylphosphonothiolate and O, O-Diisopropyl S-Benzyl Phosphorothiolate as Corresponding Phosphonofluoridate and Phosphorofluoridate // International journal of environmental analytical chemistry. 1986. V. 27. №. 1-2. P. 151-158.
62. *Wils E. R. J., Hulst A. G.* Mass spectra of some pinacolyl-containing organophosphorus compounds // Organic mass spectrometry. 1986. V. 21. №. 11. P. 763-765.
63. *Reynolds M.L., Little P.J., Thomas B.F., Bagley R.B., Martin B.R.* Relationship between the biodisposition of [3H] soman and its pharmacological effects in mice // Toxicology and applied pharmacology. 1985. V. 80. №. 3. P. 409-420.
64. *Witkiewicz Z., Mazurek M., Szulc J.* Chromatographic analysis of chemical warfare agents // Journal of Chromatography A. 1990. V. 503. P. 293-357.
65. *Söderström M.T., Ketola R.A.* Identification of nerve agents and their homologs and dialkyl methylphosphonates by gas-chromatography-Fourier-transform infrared spectrometry (GC-FTIR). 1. spectral interpretation // Fres. J. Anal. Chem. 1994. V. 350. P. 162-167.
66. *Söderström M.T., Ketola R.A., Kostianen O.* Identification of some nerve agent homologues and dialkyl methylphosphonates by gas chromatography/Fourier transform infrared spectrometry: Part II: Spectral search with the help of retention indices // Fresenius' journal of analytical chemistry. 1995. V. 352. P. 550-556.
67. *Durst H.D., Mays J.R., Ruth J.L., Williams B.R., Duevel R.V.* Micro-scale synthesis and in-situ spectroscopic characterization of some chemical weapons related organophosphonate compounds // Analytical letters. 1998. V. 31. №. 8. P. 1429-1444.
68. *Куреев А.Ф., Рыбальченко И.В., Савчук В.И., Суворкин В.Н., Холстов В.И.* Идентификация производных алкилфосфоновых кислот методами масс- и ИК-спектроскопии // Журн. аналит. химии. 2000. Т. 55. С. 933-941.

69. *Kientz C.E.* Chromatography and mass spectrometry of chemical warfare agents, toxins and related compounds: state of the art and future prospects // *Journal of Chromatography A*. 1998. V. 814. №. 1-2. P. 1-23.
70. *Hooijschuur E.W. J., Kientz C.E., Udo A.* Analytical separation techniques for the determination of chemical warfare agents // *Journal of Chromatography A*. 2002. V. 982. №. 2. P. 177-200.
71. *D'Agostino P.A.* Chemical warfare agents // *Handbook of analytical separations*. 2008. V. 6. P. 839-872.
72. *Lakso H.Å., Ng W.F.* Determination of chemical warfare agents in natural water samples by solid-phase microextraction // *Analytical Chemistry*. 1997. V. 69. №. 10. P. 1866-1872.
73. *Kuitunen M.L., Hartonen K., Riekkola M.L.* Analysis of chemical warfare agents in soil samples by off-line supercritical fluid extraction and capillary gas chromatography // *Journal of Microcolumn Separations*. 1991. V. 3. №. 6. P. 505-512.
74. *Wylie P.L., Sullivan J.J., Quimby B.D.* An investigation of gas chromatography with atomic emission detection for the determination of empirical formulas // *Journal of High Resolution Chromatography*. 1990. V. 13. №. 7. P. 499-506.
75. *Black R.M., Clarke R.J., Cooper D.B., Read R.W., Utley D.* Application of headspace analysis, solvent extraction, thermal desorption and gas chromatography—mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples containing sulphur mustard and related compounds // *Journal of Chromatography A*. 1993. V. 637. №. 1. P. 71-80.
76. *Black R.M., Clarke R.J., Read R.W., Reid M.T.* Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products // *Journal of Chromatography A*. 1994. V. 662. №. 2. P. 301-321.
77. *Рыбальченко И.В., Байгильдиев Т.М., Родин И.А.* Хромато-масс-спектрометрические методы определения маркеров и биомаркеров отравляющих веществ // *Журнал аналитической химии*. 2021. Т. 76. №. 1. С. 32-50.
78. *Borrett V.T., Mathews R.J., Mattsson E.R.* Verification of the chemical weapons convention: mass spectrometry of alkyl methylphosphonofluoridates // *Australian Journal of Chemistry*. 1994. V. 47. №. 11. P. 2065-2074.
79. *Verweij A., Degenhardt C., Boter H.L.* The occurrence and determination of PCH<sub>3</sub>-containing compounds in surface water // *Chemosphere*. 1979. V. 8. №. 3. P. 115-124.

80. *Tornes J.A., Johnsen B.A.* Gas chromatographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide // *Journal of Chromatography A*. 1989. V. 467. P. 129-138.
81. *Amphaisri K., Palit M., Mallard G.* Thermally assisted methylation and subsequent silylation of scheduled acids of chemical weapon convention for on-site analysis and its comparison with the other methods of methylation // *Journal of Chromatography A*. 2011. V. 1218. №. 7. P. 972-980.
82. *Valdez C.A., Leif R.N., Alcaraz A.* Effective methylation of phosphonic acids related to chemical warfare agents mediated by trimethyloxonium tetrafluoroborate for their qualitative detection and identification by gas chromatography-mass spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 2016. V. 933. P. 134-143.
83. *Bauer G., Vogt W.* Gas chromatographic determination of acids derived from phosphorus by trimethylsilylation with N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide // *Analytical Chemistry*. 1981. V. 53. №. 6. P. 917-919.
84. *Rohrbaugh D.K., Sarver E.W.* Detection of alkyl methylphosphonic acids in complex matrices by gas chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 1998. V. 809. №. 1-2. P. 141-150.
85. *Creasy W.R., Rodriguez A.A., Stuff J.R., Warren R.W.* Atomic emission detection for the quantitation of trimethylsilyl derivatives of chemical-warfare-agent related compounds in environmental samples // *Journal of chromatography A*. 1995. V. 709. №. 2. P. 333-344.
86. *Purdon J.G., Pagotto J.G., Miller R.K.* Preparation, stability and quantitative analysis by gas chromatography and gas chromatography—electron impact mass spectrometry of tert.-butyldimethylsilyl derivatives of some alkylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids // *Journal of Chromatography A*. 1989. V. 475. №. 2. P. 261-272.
87. *Kataoka M., Tsunoda N., Ohta H., Tsuge K., Takesako H., Seto Y.* Effect of cation-exchange pretreatment of aqueous soil extracts on the gas chromatographic–mass spectrometric determination of nerve agent hydrolysis products after tert.-butyldimethylsilylation // *Journal of Chromatography a*. 1998. V. 824. №. 2. P. 211-221.
88. *Pardasani D., Mazumder A., Gupta A.K., Kanaujia P.K., Tak V., Dubey D.K.* Determination of hydrolytic degradation products of nerve agents by injection port fluorination in gas chromatography/mass spectrometry for the verification of the

- Chemical Weapons Convention // *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*. 2007. V. 21. №. 18. P. 3109-3114.
89. *Shih M.L., Smith J.R., McMonagle J.D., Dolzine T.W., Gresham V.C.* Detection of metabolites of toxic alkylmethylphosphonates in biological samples // *Biological mass spectrometry*. 1991. V. 20. №. 11. P. 717-723.
90. *Fredriksson S. Å., Hammarström L.G., Henriksson L., Lakso H.Å.* Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biological samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry // *Journal of Mass Spectrometry*. 1995. V. 30. №. 8. P. 1133-1143.
91. *Miki A., Katagi M., Tsuchihashi H., Yamashita M.* Determination of alkylmethylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-liquid-solid-phase-transfer-catalyzed pentafluorobenzoylation // *Journal of analytical toxicology*. 1999. V. 23. №. 2. P. 86-93.
92. *Nyholm J. R., Gustafsson T., Östin A.* Structural determination of nerve agent markers using gas chromatography mass spectrometry after derivatization with 3-pyridyldiazomethane // *Journal of Mass Spectrometry*. 2013. V. 48. №. 7. P. 813-822.
93. *Байгильдиев Т.М., Вокуев М.Ф., Орешкин Д.В., Браун А.В., Годовиков И.А., Рыбальченко И.В., Родин И.А.* п-Метоксифенацилбромид–универсальный реагент для определения алкилфосфоновых и алкилметилфосфоновых кислот методами высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // *Масс-спектрометрия*. 2019. Т. 16. №. 3. С. 180.
94. *Black R. M., Muir B.* Derivatization reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products // *Journal of Chromatography A*. 2003. V. 1000. №. 1-2. P. 253-281.
95. *Kroening K.K., Easter R.N., Richardson D.D., Willison S.A., Caruso J.A.* Analysis of chemical warfare degradation products. John Wiley & Sons, 2011. P. 146
96. *Crenshaw M.D., Cummings D.B.* Preparation, derivatization with trimethylsilyldiazomethane, and GC/MS analysis of a “pool” of alkyl methylphosphonic acids for use as qualitative standards in support of counterterrorism and the chemical weapons convention // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*. 2004. V. 179. №. 6. P. 1009-1018.

97. *Noami M., Kataoka M., Seto Y.* Improved tert-butyldimethylsilylation gas chromatographic/mass spectrometric detection of nerve gas hydrolysis products from soils by pretreatment of aqueous alkaline extraction and strong anion-exchange solid-phase extraction // *Analytical chemistry*. 2002. V. 74. №. 18. P. 4709-4715.
98. *Kanamori-Kataoka M., Seto Y.* Measurement of breakthrough volumes of volatile chemical warfare agents on a poly (2, 6-diphenylphenylene oxide)-based adsorbent and application to thermal desorption–gas chromatography/mass spectrometric analysis // *Journal of Chromatography A*. 2015. V. 1410. P. 19-27.
99. *Terzic O., Swahn I., Cretu G., Palit M., Mallard G.* Gas chromatography–full scan mass spectrometry determination of traces of chemical warfare agents and their impurities in air samples by inlet based thermal desorption of sorbent tubes // *Journal of Chromatography A*. 2012. V. 1225. P. 182-192.
100. *Fraga C.G., Pérez Acosta G.A., Crenshaw M.D., Wallace K., Mong G. M., Colburn H.A.* Impurity profiling to match a nerve agent to its precursor source for chemical forensics applications // *Analytical chemistry*. 2011. V. 83. №. 24. P. 9564-9572.
101. *Kanaujia P.K., Purohit A., Pardasani D., Tak V., Dubey D.K.* Multiwalled carbon nanotubes as efficient adsorbent for solid-phase extraction of chemical warfare agents and related chemicals from water // *Journal of separation science*. 2010. V. 33. №. 23-24. P. 3726-3733.
102. *Lee H.S.N., Sng M.T., Basheer C., Lee H.K.* Determination of degradation products of chemical warfare agents in water using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in-situ derivatisation followed by gas chromatography–mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2007. V. 1148. №. 1. P. 8-15.
103. *Pardasani D., Kanaujia P.K., Gupta A.K., Tak V., Shrivastava R.K., Dubey D.K.* In situ derivatization hollow fiber mediated liquid phase microextraction of alkylphosphonic acids from water // *Journal of Chromatography A*. 2007. V. 1141. №. 2. P. 151-157.
104. *Subramaniam R., Åstot C., Juhlin L., Nilsson C., Östin A.* Determination of S-2-(N, N-diisopropylaminoethyl)- and S-2-(N, N-diethylaminoethyl) methylphosphonothiolate, nerve agent markers, in water samples using strong anion-exchange disk extraction, in vial trimethylsilylation, and gas chromatography–mass spectrometry analysis // *Journal of Chromatography A*. 2012. V. 1229. P. 86-94.
105. *Terzic O.* Screening of degradation products, impurities and precursors of chemical warfare agents in water and wet or dry organic liquid samples by in-sorbent tube

- silylation followed by thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 2010. V. 1217. №. 30. P. 4987-4995.
106. *Савельева Е.И., Радиков А.С., Кузнецова Т.А., Волинец Н.Ф.* Определение метилфосфоновой кислоты и ее эфиров как химических маркеров фосфорорганических отравляющих веществ // Журнал прикладной химии. 2001. Т. 74. №. 10. С. 1671-1677.
107. *Kostiainen O.* Gas chromatography in screening of chemicals related to the chemical weapons convention // Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: Sample Collection, Preparation and Analytical Methods. Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2005. P. 185-248.
108. *Василевский С.В., Куреев А.Ф., Рыбальченко И.В., Суворкин В.Н.* Масс-спектрометрическая идентификация силилированных производных алкилфосфоновых, алкилтиофосфоновых и диалкиламидофосфорных кислот // Журнал аналитической химии. 2002. Т. 57. №. 6. С. 597.
109. *Black R.M., Read R.W.* Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents // Journal of Chromatography A. 1997. V. 759. №. 1-2. P. 79-92.
110. *Read R.W., Black R.M.* Analysis of  $\beta$ -lyase metabolites of sulfur mustard in urine by electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Journal of analytical toxicology. 2004. V. 28. №. 5. P. 346-351.
111. *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. № 3. 2012. С. 254-259.
112. *Hamelin E.I., Bragg W., Shaner R.L., Swaim L.L., Johnson R.C.* Comparison of high-resolution and tandem mass spectrometry for the analysis of nerve agent metabolites in urine // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2013. V. 27. №. 15. P. 1697-1704.
113. *Bossle P.C., Martin J.J., Sarver E.W., Sommer H.Z.* High-performance liquid chromatography analysis of alkyl methylphosphonic acids by derivatization // Journal of Chromatography A. 1983. V. 267. P. 209-212.

114. *Roach M.C., Ungar L.W., Zare R.N., Reimer L.M., Pompliano D.L., Frost J.W.* Fluorescence detection of alkylphosphonic acids using p-(9-anthroyloxy) phenacyl bromide // *Analytical Chemistry*. 1987. V. 59. №. 7. P. 1056-1059.
115. *Bossle P.C., Reutter D.J., Sarver E.W.* Analysis of alkyl methylphosphonic acids in aqueous matrices by ion-pair reversed-phase ion chromatography // *Journal of Chromatography A*. 1987. V. 407. P. 399-404.
116. *Kientz C.E., Verweij A., Boter H.L., Poppema A., Frei R.W., De Jong G.J., Brinkman U.T.* On-line flame photometric detection in micro-column liquid chromatography // *Journal of Chromatography A*. 1989. V. 467. P. 385-394.
117. *Wils E.R.J., Hulst A.G.* Determination of organophosphorus acids by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 1988. V. 454. P. 261-272.
118. *Richardson D.D., Sadi B.B.M., Caruso J.A.* Reversed phase ion-pairing HPLC-ICP-MS for analysis of organophosphorus chemical warfare agent degradation products // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2006. V. 21. №. 4. P. 396-403.
119. *Baygildiev T., Zatirakha A., Rodin I., Braun A., Stavrianidi A., Koryagina N., Rybalchenko I., Shpigun. O.* Rapid IC-MS/MS determination of methylphosphonic acid in urine of rats exposed to organophosphorus nerve agents // *Journal of Chromatography B*. 2017. V. 1058. P. 32-39.
120. *Bevan M.J., Wogen M.T., Lunda M.D., Saravia S.A.* High throughput quantitative analysis of the  $\beta$ -lyase sulfur mustard metabolite, 1, 1'-sulfonylbis [2-(methylsulfinyl) ethane] in urine via high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2017. V. 1051. P. 1-8.
121. *Hamelin E.I., Schulze N.D., Shaner R.L., Coleman R.M., Lawrence R.J., Crow B.S., Jakubowski E.M., Johnson R.C.* Quantitation of five organophosphorus nerve agent metabolites in serum using hydrophilic interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry // *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014. V. 406. P. 5195-5202.
122. *Black R.M., Read R.W.* Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents // *Archives of toxicology*. 2013. V. 87. №. 3. P. 421-437.
123. *Black R.M., Read R.W.* Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation // *Journal of Chromatography A*. 1998. V. 794. №. 1-2. P. 233-244.

124. Zhou S., Hamburger M. Effects of solvent composition on molecular ion response in electrospray mass spectrometry: Investigation of the ionization processes // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1995. V. 9. №. 15. P. 1516-1521.
125. Willison S. A. Investigation of the persistence of nerve agent degradation analytes on surfaces through wipe sampling and detection with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Analytical chemistry*. 2015. V. 87. №. 2. P. 1034-1041.
126. Rodin I., Braun A., Stavrianidi A., Baygildiev T., Shpigun O., Oreshkin D., 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.
127. B'Hymer, C., Cheever, K.L.; Chemical warfare agent degradation products: HPLC/MS analysis. // *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd edition. Chemical Rubber Company, Boca Rotan, Florida, Taylor & Francis, (2010); P. 386-394.
128. D'Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R. Analysis of O-ethyl S-[2-(diisopropylamino) ethyl] methylphosphonothiolate (VX) and its degradation products by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry // *Journal of Chromatography a*. 1999. V. 837. №. 1-2. P. 93-105.
129. D'Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R. Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2001. V. 912. №. 2. P. 291-299.
130. D'Agostino P.A., Chenier C.L., Hancock J.R. Packed capillary liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of snow contaminated with sarin // *Journal of Chromatography a*. 2002. V. 950. №. 1-2. P. 149-156.
131. Hemstrom, P., Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography // *Journal of Separation Science*. 2006. V. 29. P. 1784-1824.
132. Nguyen H.P., Schug K.A. The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications // *Journal of Separation Science*. 2008. V. 31. №. 9. P. 1465-1480.
133. Tak V., Pardasani D., Purohit A., Dubey D.K. Detection and identification of alkylphosphonic acids by positive electrospray ionization tandem mass spectrometry using a tricationic reagent // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011. V. 25. №. 22. P. 3411-3416.

134. *Байгильдиев Т.М.* Новые подходы к определению метилфосфоновой кислоты жидкостной tandemной хроматомасс-спектрометрией : Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. - МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2017 - 142 с.
135. *Rodin I., Baygildiev T., Stavrianidi 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. P. 585-591.
136. *Mawhinney D.B., Stanelle R.D., Hamelin E.I., Kobelski R.J.* Enhancing the response of alkyl methylphosphonic acids in negative electrospray ionization liquid chromatography tandem mass spectrometry by post-column addition of organic solvents // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2007. V. 18. №. 10. P. 1821-1826.
137. *Cech N.B., Enke C.G.* Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides // *Analytical Chemistry*. 2000. V. 72. №. 13. P. 2717-2723.
138. *Black R.M., Read R.W.* Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents // *Journal of Chromatography A*. 1997. V. 759. №. 1-2. P. 79-92.
139. *Read R.W., Black R.M.* Rapid screening procedures for the hydrolysis products of chemical warfare agents using positive and negative ion liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation // *Journal of Chromatography A*. 1999. V. 862. №. 2. P. 169-177.
140. *Liu Q., Hu X., Xie J.* Determination of nerve agent degradation products in environmental samples by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization // *Analytica Chimica Acta*. 2004. V. 512. №. 1. P. 93-101.
141. *Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Akhmerova D.I., Shpigun O.A., Rybal'chenko I.V.* Time-efficient LC/MS/MS determination of low concentrations of methylphosphonic acid // *Inorganic Materials*. 2017. V. 53. P. 1382-1385.
142. *Hayes T. L., Kenny D. V., Hernon-Kenny L.* Feasibility of direct analysis of saliva and urine for phosphonic acids and thiodiglycol-related species associated with exposure to chemical warfare agents using LC-MS/MS // *J. Med. Chem. Def.* 2004. V. 2. №. 1. P. 121-144.

143. *Ciner F.L., McCord C.E., Plunkett Jr R.W., Martin M.F., Croley T.R.* Isotope dilution LC/MS/MS for the detection of nerve agent exposure in urine // *Journal of Chromatography B*. 2007. V. 846. №. 1-2. P. 42-50.
144. *Appel A.S., Logue B.A.* Analysis of nerve agent metabolites from nail clippings by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2016. V. 1031. P. 116-122.
145. *Røen B.T., Sellevåg S.R., Dybendal K.E., Lundanes E.* Trace determination of primary nerve agent degradation products in aqueous soil extracts by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry using ZrO<sub>2</sub> for enrichment // *Journal of Chromatography A*. 2014. V. 1329. P. 90-97.
146. *Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Shpigun O.A., Rybalchenko I.V.* Determination of Methylphosphonic Acid in Human Blood Plasma by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry // *Journal of analytical chemistry*. 2017. V. 72. P. 1307-1311.
147. *Tak V., Purohit A., Pardasani D., Goud D.R., Jain R., Dubey D.K.* Simultaneous detection and identification of precursors, degradation and co-products of chemical warfare agents in drinking water by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2014. V. 1370. P. 80-92.
148. *Creasy W.R.* Postcolumn derivatization liquid chromatography/mass spectrometry for detection of chemical-weapons-related compounds // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1999. V. 10. №. 5. P. 440-447.
149. *Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H., Polhuijs M., Benschop H.P.* Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage // *Archives of Toxicology*. 1998. V. 72. P. 671-675.
150. *Riches J.* Analysis of polar nerve agent hydrolysis products // *Chromatography Today*. 2013. V. 6. P. 36-38.
151. *Mercier J.P., Morin P., Dreux M., Tambute A.* Liquid chromatography analysis of phosphonic acids on porous graphitic carbon stationary phase with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection // *Journal of Chromatography A*. 1999. V. 849. №. 1. P. 197-207.
152. *Tak V., Pardasani D., Kanaujia P.K., Dubey D.K.* Liquid–liquid–liquid microextraction of degradation products of nerve agents followed by liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2009. V. 1216. №. 20. P. 4319-4328.
153. *Swaim L.L., Johnson R.C., Zhou Y., Sandlin C., Barr J.R.* Quantification of organophosphorus nerve agent metabolites using a reduced-volume, high-throughput sample processing format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Journal of analytical toxicology*. 2008. V. 32. №. 9. P. 774-777.
154. *Røen B. T., Sellevåg S. R., Lundanes E.* Quantification of nerve agent biomarkers in human serum and urine // *Analytical chemistry*. 2014. V. 86. №. 23. P. 11833-11840.
155. *Schulze N. D., Hamelin E.I., Winkeljohn W.R., Shaner R.L., Basden B.J., deCastro B.R., Pantazides B.G., Thomas J.D., Johnson R.C.* Evaluation of multiple blood matrices for assessment of human exposure to nerve agents // *Journal of analytical toxicology*. 2016. V. 40. №. 3. P. 229-235.
156. *Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Lebedev A.T., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A.* 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.
157. *O'Connor A.M.* Analysis of Nerve Agent Degradation Products by UPLC/MS/MS, Application Note // Waters Corporation, Milford, MA. 2007.
158. *Hurtubise R.J.* Adsorption chromatography // *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd ed. Taylor & Francis, Chemical Rubber Company, Boca Rotan, Florida. 2010. P. 10-13.
159. *Pereira L.* Porous graphitic carbon as a stationary phase in HPLC: theory and applications // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®*. 2008. V. 31. №. 11-12. P. 1687-1731.
160. *Goncharova E.N., Statkus M.A., Tsizin G.I., Zolotov Y.A.* Porous graphitized carbon for the separation and preconcentration of hydrophilic substances // *Journal of analytical chemistry*. 2020. V. 75. P. 423-442.
161. *Goncharova E.N., Statkus M.A., Nesterenko P.N., Tsysin G.I., Zolotov Y.A.* Solid-phase extraction of alkylphosphonic and O-alkyl alkylphosphonic acids followed by HPLC separation using porous graphitic carbon sorbent // *Journal of Chromatography A*. 2021. V. 1653. P. 462420.

162. Гончарова Е.Н., Статкус М.А., Цизин Г.И. Концентрирование гидрофильных фосфорорганических веществ на сорбенте Нуркарб // Журнал аналитической химии. 2021. Т. 76. №. 5. Р. 399-407.
163. Гончарова Е. Н. Концентрирование и ВЭЖХ определение гидрофильных фосфорорганических соединений с помощью сорбента Нуркарб : Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. - МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2019 - 170 с.
164. Статкус М.А. Новые способы динамического сорбционного концентрирования веществ в гибридных и комбинированных методах химического анализа : Дис. ... докт. хим. наук: 02.00.02. - МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2022 - 238 с.
165. Tokarz J.A., Ginter J.M., Shefcheck K.J. Ion chromatography (IC). / Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament / Vanninen P (ed). University of Helsinki, Finland. 2017. С. 405–415.
166. Otsuka M., Miyaguchi H. Analysis of degradation products of nerve agents in biological fluids by ion chromatography–tandem mass spectrometry // Forensic Toxicology. 2023. V. 41. №. 1. P. 71-80.
167. McKenna J., Dhumakupt E.S., Connell T., Demond P.S., Miller D.B., Nilles J.M., Manicke N.E., Glaros T. Detection of chemical warfare agent simulants and hydrolysis products in biological samples by paper spray mass spectrometry // Analyst. 2017. V. 142. №. 9. P. 1442-1451.
168. Stubbs S.J., Read R.W. Liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to quantitation of the organophosphorus nerve agent VX in microdialysates from blood probes // Journal of Chromatography B. 2010. V. 878. №. 17-18. P. 1253-1256.
169. Liu C.C., Huang G.L., Xi H.L., Liu S.L., Liu J.Q., Yu H.L., Zhou S.K., Liang L.H., Yuan L. Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adduct and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procainamide-gel separation method combined with UHPLC–MS/MS // Journal of Chromatography B. 2016. V. 1036. P. 57-65.
170. Plyushchenko I., Shakhmatov D., Bolotnik T., Baygildiev T., Nesterenko P.N., Rodin I. An approach for feature selection with data modelling in LC-MS metabolomics // Analytical Methods. 2020. V. 12. №. 28. P. 3582-3591.
171. Misra B.B. Metabolomics tools to study links between pollution and human health: an exposomics perspective // Current Pollution Reports. 2019. V. 5. №. 3. P. 93-111.
172. Mesnage R., Teixeira M., Mandrioli D., Falcioni L., Ibragim M., Ducarmon Q.R., Zwittink R.D., Amiel C., Panoff J.M., Bourne E., Savage E., Mein C.A., Belpoggi F.,

- Antoniou M.N.* Multi-omics phenotyping of the gut-liver axis reveals metabolic perturbations from a low-dose pesticide mixture in rats // *Communications Biology*. 2021. V. 4. №. 1. P. 471.
173. *Glaros T., Dhummakupt E.S., Rizzo G.M., McBride E., Carmany D.O., Wright L.K., Forster J.S., Renner J.A., Moretz R.W., Dorsey R., Marten M.R., Huso W., Doan A., Dorsey C.D., Phillips C., Benton B., Mach P.M.* Discovery of treatment for nerve agents targeting a new metabolic pathway // *Archives of Toxicology*. 2020. V. 94. P. 3249-3264.
174. *Hayton S., Maker G.L., Mullaney I., Trengove R.D.* Untargeted metabolomics of neuronal cell culture: A model system for the toxicity testing of insecticide chemical exposure // *Journal of Applied Toxicology*. 2017. V. 37. №. 12. P. 1481-1492.
175. *Getnet D., Gautam A., Kumar R., Hoke A., Cheema A.K., Rossetti F., Schultz C.R., Hammamieh R., Lumley L.A., Jett M.* Poisoning with soman, an organophosphorus nerve agent, alters fecal bacterial biota and urine metabolites: a case for novel signatures for asymptomatic nerve agent exposure // *Applied and environmental microbiology*. 2018. V. 84. №. 21. P. e00978-18.
176. *Bennet A.J., Kovach I.M., Bibbs J.A.* Catalytic recruitment by phosphonyl derivatives as inactivators of acetylcholinesterase and substrates for imidazole-catalyzed hydrolysis: beta.-deuterium isotope effects // *Journal of the American Chemical Society*. 1989. V. 111. №. 16. P. 6424-6427.
177. *Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Nesterenko P.N., Shpigun O.A.* Anion exchangers with branched functional ion exchange layers of different hydrophilicity for ion chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2015. V. 1408. P. 78-86.
178. *Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Shchukina O.I., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Covalently-bonded hyperbranched poly (styrene-divinylbenzene)-based anion exchangers for ion chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2016. V. 1470. P. 97-103.
179. Team R Development Core. A Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput [Internet]. 2018;2. URL: [http:// www.r-project.org](http://www.r-project.org) (20.03.2023)
180. *Wood S.N.* Generalized additive models: an introduction with R. CRC press, 2017. P. 476.
181. *Larras F., Billoir E., Baillard V., Siberchicot A., Scholz S., Wubet T., Tarkka M., Schmitt-Jansen M., Delignette-Muller M.L.* DRomics: a Turnkey Tool to support the use of the dose–response framework for omics data in ecological risk assessment // *Environmental science & technology*. 2018. V. 52. №. 24. P. 14461-14468.

182. *Tautenhahn R., Böttcher C., Neumann S.* Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS // *BMC bioinformatics*. 2008. V. 9. №. 1. P. 1-16.
183. *Libiseller G., Dvorzak M., Kleb U., Gander E., Eisenberg T., Madeo F., Neumann S., Trausinger G., Sinner F., Pieber T., Magnes C.* IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters // *BMC bioinformatics*. 2015. V. 16. №. 1. P. 1-10.
184. *Plyushchenko I.V., Fedorova E.S., Potoldykova N.V., Polyakovskiy K.A., Glukhov A.I., Rodin I.A.* Omics untargeted key script: R-based software toolbox for untargeted metabolomics with bladder cancer biomarkers discovery case study // *Journal of Proteome Research*. 2021. V. 21. №. 3. P. 833-847.
185. *Stekhoven D.J., Bühlmann P.* MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-type data // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. №. 1. P. 112-118.
186. *Kuhl C., Tautenhahn R., Böttcher C., Larson T.R., Neumann S.* CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets // *Analytical chemistry*. 2012. V. 84. №. 1. P. 283-289.
187. GitHub [Internet]. URL: [https:// github.com/plyush1993/OUKS](https://github.com/plyush1993/OUKS) (20.03.2023)
188. GitHub [Internet]. URL: [https:// github.com/plyush1993/DREAMGAMM](https://github.com/plyush1993/DREAMGAMM) (20.03.2023)
189. Recommended operating procedures for CWC-related analysis / The Ministry of Foreign Affairs of Finland and University of Helsinki ; Ed. P. Vanninen. Helsinki. 2011. C. 809.
190. *Laric Z.R.* Design of experiments in chemical engineering. A practical guide. // John Wiley & Sons, Weinheim. 2004. C. 157-184.
191. *Sarvin B., Fedorova E., Shpigun O., Titova M., Nikitin M., Kochkin D., Rodin I., Stavrianidi A.* LC-MS determination of steroidal glycosides from *Dioscorea deltoidea* Wall cell suspension culture: Optimization of pre-LC-MS procedure parameters by Latin Square design // *Journal of Chromatography B*. 2018. V. 1080. P. 64-70.
192. *Serjeant E. P., Dempsey B.* Ionisation constants of organic acids in aqueous solution // *IUPAC chemical data series*. 1979. V. 23. P. 160-190.
193. *Pianetti G.A., Baillet A., Traore F., Mahuzier G.* Chromatographic analysis of some alkylphosphonic acids using a conductimetric detection. Application to fosfomycin determination // *Chromatographia*. 1993. V. 36. P. 263-267.
194. *Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H.* Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acids, in human serum by indirect photometric detection ion chromatography // *Journal of*

- Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1997. V. 698. №. 1-2. P. 81-88.
195. *Pianetti G.A., De Campos L.M., Chaminade P., Baillet A., Baylocq-Ferrier D., Mahuzier G.* Application of ion chromatography with indirect spectrophotometric detection to the sensitive determination of alkylphosphonic acids and fosfomycin // *Analytica chimica acta*. 1993. V. 284. №. 2. P. 291-299.
196. *Piao H., Marx R.B., Schneider S., Irvine D.A., Staton J.* Analysis of VX nerve agent hydrolysis products in wastewater effluents by ion chromatography with amperometric and conductivity detection // *Journal of Chromatography A*. 2005. V. 1089. №. 1-2. P. 65-71.
197. *Vermillion W.D., Crenshaw M.D.* In-line respeciation: an ion-exchange ion chromatographic method applied to the separation of degradation products of chemical warfare nerve agents in soil // *Journal of Chromatography A*. 1997. V. 770. №. 1-2. P. 253-260.
198. *Gorbovskaia A.V., Talipova I.I., Timichev A.A., Uzhel A.S., Shpigun O.A.* Novel stationary phases based on epoxidized polystyrene-divinylbenzene for three modes of liquid chromatography // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2023. В печати.
199. *Popov A.S., Spiridonov K.A., Uzhel A.S., Smolenkov A.D., Chernobrovkina A.V., Zatirakha A.V.* Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography // *Journal of Chromatography A*. 2021. V. 1642. P. 462010.
200. *Gu H., Liu G., Wang J., Aubry A.F., Arnold M.E.* Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weighting factors on curve stability, data quality, and assay performance // *Analytical Chemistry*. 2014. V. 86. №. 18. P. 8959-8966.
201. *Shih M.L., McMonagle J.D., Dolzine T.W., Gresham V.C.* Metabolite pharmacokinetics of soman, sarin and GF in rats and biological monitoring of exposure to toxic organophosphorus agents // *Journal of applied toxicology*. 1994. V. 14. №. 3. P. 195-199.
202. *Riches J., Morton I., Read R.W., Black R.M.* The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography–ion trap negative ion tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2005. V. 816. №. 1-2. P. 251-258.

203. *Плющенко И.В.* Разработка методов обработки данных нецелевого метаболомного анализа методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии для поиска биомаркеров : Дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02. - МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 2022 - 200 с.
204. *Wehrens R., Hageman J.A., van Eeuwijk F., Kooke R., Flood P.J., Wijnker E., Keurentjes J.J.B., Lommen A., van Eekelen H.D.L.M., Hall R.D., Mumm R., de Vos R.C.* Improved batch correction in untargeted MS-based metabolomics // *Metabolomics*. 2016. V. 12. P. 1-12.
205. *Caesar L.K., Kvalheim O.M., Cech N.B.* Hierarchical cluster analysis of technical replicates to identify interferents in untargeted mass spectrometry metabolomics // *Analytica chimica acta*. 2018. V. 1021. P. 69-77.
206. *Larras F., Billoir E., Scholz S., Tarkka M., Wubet T., Delignette-Muller M.L., Schmitt-Jansen M.* A multi-omics concentration-response framework uncovers novel understanding of triclosan effects in the chlorophyte *Scenedesmus vacuolatus* // *Journal of hazardous materials*. 2020. V. 397. P. 122727.
207. *Versteeg D.H.G., Witter A.* Isolation and identification of  $\alpha$ -aspartyl-serine, alanylphenylalanine and isoleucylleucine from calf brain stem // *Journal of Neurochemistry*. 1970. V. 17. №. 1. P. 41-52.
208. *Hanski C., Stehlik G.* Increased concentration of 7-methylguanine and 1-methylhypoxanthine in urine of rats bearing Yoshida tumour // *Cancer Letters*. 1980. V. 9. №. 4. P. 339-343.
209. *Law K.P., Han T.L., Mao X., Zhang H.* Tryptophan and purine metabolites are consistently upregulated in the urinary metabolome of patients diagnosed with gestational diabetes mellitus throughout pregnancy: A longitudinal metabolomics study of Chinese pregnant women part 2 // *Clinica chimica acta*. 2017. V. 468. P. 126-139.
210. *Wang X., Mu X., Zhang J., Huang Q., Alamdar A., Tian M., Liu L., Shen H.* Serum metabolomics reveals that arsenic exposure disrupted lipid and amino acid metabolism in rats: a step forward in understanding chronic arsenic toxicity // *Metallomics*. 2015. V. 7. №. 3. P. 544-552.