

ОБНАРУЖЕНИЕ МАРКЕРОВ НЕРВНО-ПАРАЛИТИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ УЛЬТРА- ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ - ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

**И.А. Родин¹, А.В. Браун¹, А.Н. Ставрианиди¹, О.А. Шпигун¹,
И.В. Рыбальченко²**

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

² Научно-производственная фирма «Люмэкс-Защита»
Россия, 127018, Москва, Сущевский вал, д. 47
Rodin@analyt.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 18 июня 2012 г.

С использованием метода ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии разработаны способы обнаружения метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в пробах человеческой мочи: О-изопропилметилфосфоновой кислоты (предел обнаружения – 0.5 нг·мл⁻¹), О-пинаколилметилфосфоновой кислоты (0.1 нг·мл⁻¹), О-изобутилметилфосфоновой кислоты (0.4 нг·мл⁻¹) и О-этилметилфосфоновой кислоты (0.8 нг·мл⁻¹). Определение осуществляли методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации отрицательных ионов. Для анализа биологических проб использовали обращенно-фазовый вариант ультра-высокоэффективной хроматографии на сорбентах с привитыми С18 группами. Процедура пробоподготовки основана на применении твердофазной экстракции на обращенно-фазных сорбционных патронах, содержащих сополимер стирола и дивинилбензола. В рамках межлабораторных испытаний Организации по запрещению химического оружия проведена достоверная идентификация и определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в образцах человеческой мочи, содержащих 5-50 нг·мл⁻¹ исследуемых О-алкил метилфосфоновых кислот.

Ключевые слова: Ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография тандемная масс-спектрометрия, ионизация электрораспылением, обнаружение, нервно-паралитические отравляющие вещества.

Игорь Александрович Родин – к.х.н., старший научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова.

Область научных интересов – масс-спектрометрия (анализ малых молекул), высокоэффективная жидкостная хроматография.

Количество опубликованных работ – 15.

Аркадий Владимирович Браун – аспирант МГУ имени М.В. Ломоносова.

Область научных интересов – масс-спектрометрия (анализ малых молекул), высокоэффективная жидкостная хроматография.

Количество опубликованных работ – 5.

Андрей Николаевич Ставрианиди – аспирант МГУ имени М.В. Ломоносова.

Область научных интересов – масс-спектрометрия (анализ малых молекул), высокоэффективная жидкостная хроматография, исследование аминокислот.

Количество опубликованных работ – 5.

Олег Алексеевич Шпигун – д.х.н., член корр. РАН, заведующий лабораторией хроматографии МГУ имени М.В. Ломоносова.

Область научных интересов – ионная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Количество опубликованных работ – 370.

Игорь Владимирович Рыбальченко - д.х.н., профессор, заведующий кафедрой физической и аналитической химии Московского Открытого Государственного Университета имени В.С. Черномырдина.

Область научных интересов – ионная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Количество опубликованных работ – 300.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы вопросам анализа биомедицинских проб на наличие метаболитов отравляющих веществ (ОВ) уделяется все большее внимание, особенно со стороны международной Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО). Так, в записке технического секретариата ОЗХО (ЕС-42/S/4) указывается, что в Конвенции о запрещении химического оружия [1] предусматривается отбор и анализ биомедицинских проб, источником которых являются люди и животные (пробы крови, мочи, кала, тканей и т.д.), при проведении расследований предполагаемого применения химического оружия. Такой анализ имеет целью установить, действительно ли люди или животные, которые, как предполагается, подверглись воздействию боевых отравляющих веществ в ходе нападений с применением химического оружия (ХО), подверглись воздействию ОВ и, если подверглись, то какими были эти ОВ. В тех случаях, когда доступ к месту предполагаемого применения ХО задерживается или невозможен, анализ биомедицинских проб, взятых у подвергшихся воздействию ОВ людей или животных, может оказаться единственным источником информации. Биомедицинские пробы представляют собой весьма сложный объект анализа в связи с низкими концентрациями аналитов, а также сложностью биологических матриц, поэтому важнейшее значение имеет выбор подходящих биологических

индикаторов, так называемых биомаркеров ОВ, с учетом обстоятельств предполагаемого инцидента и типа полученной пробы. Известно, что фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) легко подвергаются разложению в окружающей среде и в биосредах с формированием соответствующих О-алкилметилфосфоновых и метилфосфоновой кислот, являющихся устойчивыми признаками этих токсикантов (рис. 1) [2]. Идентификация конкретной О-алкилметилфосфоновой кислоты как в пробах окружающей среды, так и особенно в биопробах представляет важную информацию о том, какое именно ОВ было применено. В работах [3-11] продемонстрированы возможности методов ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС с ионизацией электрораспылением и химической ионизацией при атмосферном давлении для разделения метаболитов ФОВ в модельных водных растворах и при анализе объектов со сложной матрицей, таких как моча, пот и сыворотка крови. Так, в работе [11] авторами разработан способ идентификации О-изопропилметилфосфоновой кислоты (иПрМФК), О-пинаколилметилфосфоновой кислоты (ПинМФК) и О-изобутилметилфосфоновой кислоты (иБутМФК) в образцах плазмы крови методом ВЭЖХ-МС в варианте регистрации отрицательных ионов (пределы обнаружения составили 1-4 нг·мл⁻¹ при времени хроматографического разделения 15 мин). Однако в настоящее время ОЗХО ужесточает требования к методикам идентификации маркеров ФОВ, что позволяет проводить идентификацию и

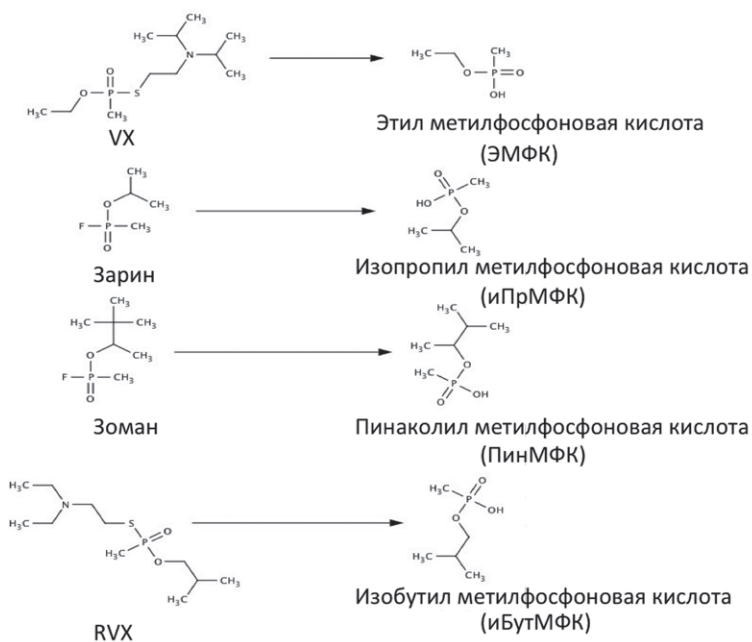


Рис. 1. Схема гидролиза основных нервно-паралитических отравляющих веществ [2]

определение наличия специфических маркеров ОВ спустя длительное время после их попадания в объекты окружающей среды и живые организмы.

В данной работе разработаны рекомендации по подготовке биопроб (человеческая моча), позволяющих достоверно проводить комплексный ультра-ВЭЖХ-МС-МС анализ на наличие характеристичных метаболитов зарина, зомана, VX и RVX (О-изопрропилметилфосфоновая кислота, О-пинаколилметилфосфоновая кислота, О-этилметилфосфоновая кислота и О-изобутилметилфосфоновая кислота, соответственно) и проведена оценка чувствительности и селективности определения метаболитов ФОВ методом ВЭЖХ-МС-МС в реальных биопробах после исследования человеческой мочи, искусственно загрязненных маркерами ФОВ, в рамках межлабораторных испытаний **ОЗХО**. Разработанным подход характеризуется более низкими пределами обнаружения (0.1-0.8 нг·мл⁻¹), высокой селективностью и экспрессностью анализа по сравнению с ранее описанными способами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: О-изопрропилметилфосфоновая кислота, О-пинаколилметилфосфоновая кислота, О-этилметилфосфоновая кислота (**ЭМФК**) и О-изобутилметилфосфоновая кислота с массовой долей основного вещества не менее 98 %, деионизованная вода (получена после очистки системой Millipore Corp., Bedford, MA), ацетонитрил (для градиентной хроматографии, Panreac, Испания), муравьиная кислота (х.ч., Химмед, Россия), аммиак водный (конц., Химмед, Россия).

Оборудование. В работе использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии Ultimate 3000 (Dionex, США) с tandemным масс-спектрометрическим детектором QTrap 3200 (AB Sciex, Канада), оснащенную источником ионов с электрораспылительной ионизацией. Исследование метаболитов ФОВ проводили на колонке Acclaim C18 (250 × 2 мм), диаметр зерна сорбента – 2.2 мкм (Dionex, США). Для процедуры пробоподготовки использовали концентрирующие картриджи Strata SDB-L (Phenomenex, США). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью персонального компьютера и программного пакета «Analyst 5.0» (США).

Определение метаболитов ФОВ

Пробоподготовка. Отбирали 1 мл мочи, затем центрифугировали 12 мин при 16000 об·мин⁻¹. После центрифугирования отбирали жидкость, подщелачивали двумя каплями водного раствора аммиака (1:1) до pH 8-9 и пропускали ее через откондиционированный картридж для твердофазной экстракции Strata SDB-L с расходом 1-3 капли·с⁻¹. Элюат собирали и исследовали хроматомасс-спектрометрически.

Условия хроматомасс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника ионов с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выделенных ионных переходов соответствующих фосфоновых кислот. Температура переходного капилляра составляла 350 °С, напряжение на распыляющем капилляре – 4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 15 psi. Разделение пробы проводили в режиме градиентного элюирования, скорость потока составляла 0.45 мл·мин⁻¹. Подвижная фаза А – 0.5 % об. муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В – 0.5 % об. муравьиной кислоты в ацетонитриле. Программа градиентного элюирования: 0–1.5 мин: 2 % В, 1.5 – 8 мин: 2 – 100 % В, 8 – 8.3 мин: 100 – 2 % В. Объем вводимой пробы составлял 0.02 мл.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования. Оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования проводили в режиме прямого ввода, непосредственно вводя растворы стандартов алкилметилфосфонатов в источник ионов, минуя хроматографическую колонку. Детектирование осуществляли в режиме регистрации отрицательных ионов, диапазон сканирования 80-300 *m/z*, скорость сканирования 1000 *m/z* ·с⁻¹. Выбор оптимальных параметров работы масс-спектрометра включает исследование влияния напряжения на распыляющем капилляре, потенциала декластеризация (напряжение, подаваемое на нулевой квадруполь) и энергии фрагментации в ячейке соударений на величину аналитического сигнала соответствующих метаболитов нервно-паралитических ОВ. В табл. 1

Таблица 1

Оптимальные настройки работы масс-детектора при определении иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК (режим регистрации отрицательных ионов)

Соединение	Потенциал декластеризации, В	Энергия фрагментации, В	Выбранный ионный переход №1, <i>m/z</i>	Выбранный ионный переход №2, <i>m/z</i>
ЭМФК	-18	-14	123 → 95	123 → 79
иПрМФК	-22	-16	137 → 95	137 → 79
иБутМФК	-28	-21	151 → 95	151 → 79
ПинМФК	-29	-21	179 → 95	179 → 79

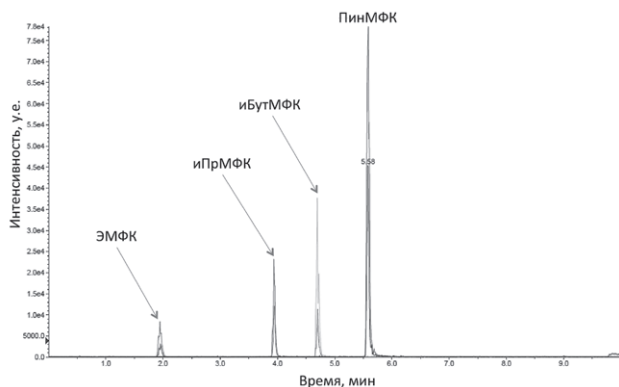


Рис. 2. Масс-хроматограмма стандартного водного раствора, содержащего 20 нг/мл ЭМФК, 20 нг/мл иПрМФК, 20 нг/мл иБутМФК и 20 нг/мл ПинМФК

представлены результаты проведенной процедуры настройки масс-анализатора и оптимальные пары выбранных ионных переходов, которые в дальнейшем использовали для селективного определения иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК в человеческой моче, искусственно загрязненной алкил метилфосфоновыми кислотами.

При варьировании напряжения на распыляющем капилляре установлено, что его снижение со стандартного значения -4500 В до -3500 В приводит к падению интенсивности аналитического сигнала на один порядок, при этом уровень шума снижается на 30 %, что не позволяет заметно увеличить чувствительность метода.

Выбор условий хроматографического разделения. В рамках данной работы исследовали поведение метаболитов ФОВ в варианте «быстрой» обращенно-фазовой хроматографии с использованием сорбента Acclaim C18. Данный

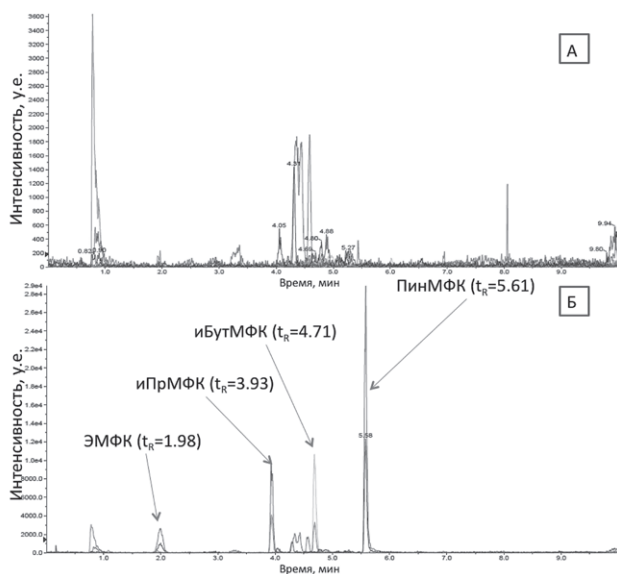


Рис. 3. Масс-хроматограмма образцов человеческой мочи, не содержащей метаболитов ФОВ (А) и человеческой мочи, искусственно загрязненного 10 нг/мл ЭМФК, 10 нг/мл иПрМФК, 10 нг/мл иБутМФК и 10 нг/мл ПинМФК (Б)

тип неподвижной вазы характеризуется маленьким размером зерен сорбента (2.2 мкм) и позволяет существенно повысить эффективность и селективность хроматографического разделения исследуемых веществ.

Для того чтобы уменьшить диссоциацию молекул разделяемых алкил метилфосфоновых кислот в подвижной фазе, в элюент добавляли муравьиную кислоту, чтобы уменьшить размывание хроматографических пиков и, как следствие, увеличить эффективность и селективность определения иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК. При оптимизации условия одновременного хроматографического определения иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК использовали программу градиентного элюирования (представлена в экспериментальной части), в условиях которой разрешение и эффективность пиков разделяемых алкил метилфосфоновых кислот позволяли достичь максимальной чувствительности и экспрессности разрабатываемого подхода. Эффективность колонки при хроматографическом определении иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК составила $(1.0 - 4.1) \cdot 10^4$ т.т. (теоретических тарелок) и является приемлемой для полного разделения пиков исследуемых соединений (величина разрешения пиков составила 7.5 - 18.0). На рис. 2 представлена масс-хроматограмма по выбранным ионным переходам стандартного водного раствора, содержащего иПрМФК (время задержки $t_R = 3.93$ мин), ПинМФК (5.59 мин), иБутМФК (4.69 мин) и ЭМФК (1.97 мин) в оптимальных условиях хромато-масс-спектрометрического определения данных веществ.

Оценка предела обнаружения и апробация на реальных объектах. Оценку характеристик разработанного подхода определения маркеров отравляющих веществ О-изопропилметилфосфоновой

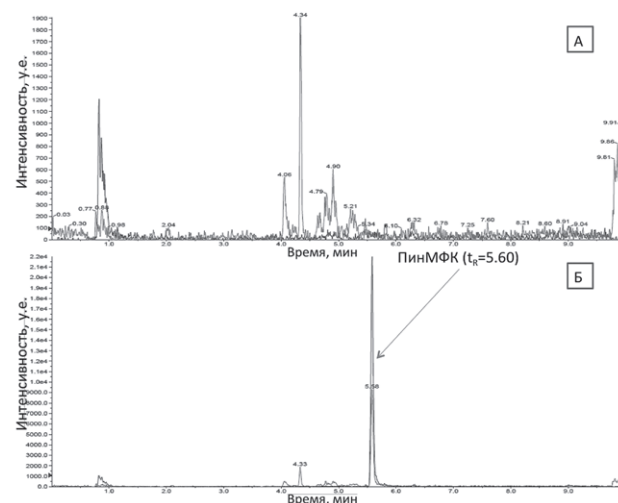


Рис. 4. Масс-хроматограммы образцов человеческой мочи, не содержащей иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК (А), и образца зашифрованной пробы человеческой мочи «В-LC-3», полученные при детектировании выбранных ионных переходов ПинМФК (Б)

Таблица 2

Метрологические характеристики разработанного подхода определения метаболитов ФОВ в модельных образцах человеческой мочи (уравнение градуировочной зависимости представлено в виде $C = ky$, где C – концентрация компонента, нг·мл⁻¹; y – площадь хроматографического пика, отн. ед.; k – параметр уравнения, нг·мл⁻¹·отн. ед.⁻¹).

Параметр	ЭМФК	иПрМФК	ПинМФК	иБутМФК
Параметр уравнения $10^3 \cdot k$, н·мл ⁻¹ ·отн. ед. ⁻¹	21.0	17.0	3.3	10.7
R , коэффициент корреляции	0.999	0.999	0.999	0.999
Предел обнаружения C_{\min} , нг·мл ⁻¹	0.8	0.5	0.1	0.4
Диапазон линейности градуировочной зависимости, нг·мл ⁻¹	2-2000	1-1000	1-1000	1-1000

кислоты, О-пинаколилметилфосфоновой кислоты, О-изобутилметилфосфоновой кислоты и О-этилметилфосфоновой кислоты проводили в пробах человеческой мочи, искусственно загрязненных метаболитами ФОВ. В качестве критерия установления присутствия иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК в пробах использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных переходов, соответствующих определяемым компонентам.

При анализе биологических образцов возникает проблема эффекта матрицы. Наблюдается меньшая стабильность времен удерживания определяемых веществ вследствие перегрузки хроматографической колонки сопутствующими компонентами пробы, содержание которых в биопробах всегда высоко, значительно более сильное размывание хроматографических пиков по сравнению с анализом объектов с простой матрицей. Наиболее эффективный способ борьбы с нежелательным влиянием матрицы – это проведение селективной процедуры пробоподготовки. Для решения поставленной задачи применяли метод ТФЭ. Схема пробоподготовки с использованием Strata SDB-L (сорбент на основе сополимера стирола и дивинилбензола) позволяет эффективно удалять мешающие компоненты человеческой мочи и получать воспроизводимые результаты определения иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК в модельных образцах человеческой мочи, искусственно загрязненных данными веществами (рис. 3).

Предел обнаружения разработанного способа находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика не меньше 3). В табл. 2 представлены метрологические характеристики метаболитов ФОВ, полученные для серии модельных растворов человеческой мочи, искусственно загрязненных иПрМФК, ПинМФК, иБутМФК и ЭМФК.

Для апробации разработанного способа определения алкиловых эфиров метилфосфоновой кислоты проанализированы образцы человеческой мочи с неизвестным содержанием внесенных метаболитов ФОВ в рамках международных

межлабораторных испытаний под эгидой ОЗХО. На рис. 4 представлены хроматограммы образца мочи, не содержащей алкиловых эфиров метилфосфоновой кислоты (рис. 4, А) и пробы мочи, в которой удалось надежно идентифицировать ПинМФК (рис. 4, Б). Полученные данные полностью подтверждены независимым ГХ-МС-МС анализом с применением реакции дериватизации с гептафторбутирилимидазолом, который проводился в сторонней аккредитованной лаборатории.

Таким образом, разработанный способ обладает высокой чувствительностью и позволяет проводить надежную идентификацию маркеров ФОВ – зарина, зомана, VX и российского VX (RVX), в человеческой моче с пределом обнаружения 0.1-0.8 нг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны рекомендации по подготовке биопроб (человеческая моча) и определены оптимальные условия количественного определения, позволяющие достоверно проводить количественный ультра-ВЭЖХ-МС-МС анализ на наличие метаболитов ФОВ (О-изопропилметилфосфоновой кислоты, О-пинаколилметилфосфоновой кислоты, О-изобутилметилфосфоновой кислоты и О-этилметилфосфоновой кислоты). Разработанный подход успешно применен при анализе проб человеческой мочи в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. ООН, Женева, 1993. 170 с.
2. Kataoka M., Seto Y. Discriminative determination of alkyl methylphosphonates and methylphosphonate in blood plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry after tert.-butyldimethylsilylation // Chromatogr. B. 2003. V. 795. P. 123-132.
3. Газохроматографический анализ биологических проб. Определение метаболитов токсичных химикатов / И.В. Рыбальченко и [др.] // Росс. Хим. ж. 2005. Т. 49, № 2. С. 26-30.

4. 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 // *J. Chromatogr. A*. 1997. V. 759, № 2. P. 79-92.
5. Hayes T.H., 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. 121-127.
6. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage / D. Noort et [al.] // *Arch. Toxicol.* 1998. V. 72, № 10. P. 671-675.
7. 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 // *J. Anal. Chimica Acta*. 2004. V. 512, № 1. P. 93-101.
8. GC–MS and LC–MS analysis of nerve agents in body fluids: Intra-laboratory verification test using spiked plasma and urine samples / M. Koller et [al.] // *J. Chromatogr. B*. 2010. V. 878. P. 1226-1233.
9. Isotope dilution LC/MS/MS for the detection of nerve agent exposure in urine / T. Croley et [al.] // *J. Chromatogr. B*. 2007. V. 846. P. 42-50.
10. Stable adducts of nerve agents sarin, soman and cyclosarin with TRIS, TES and related buffer compounds—Characterization by LC-ESI-MS/MS and NMR and implications for analytical chemistry / J. Gab et [al.] // *J. Chromatogr. B*. 2010. V. 878. P. 1382-1390.
11. Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии / И.А. Родин. и [др.] // *Масс-спектрометрия*. 2011. Т.8. № 1. С. 45 – 50.

DETECTION OF BIOMARKERS OF NERVE AGENTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

I.A. Rodin¹, A.V. Braun, A.N. Stavriani, O.A. Shpigun, I.V. Ribalshenko²

¹*Chemistry Department M.V. Lomonosov Moscow State University
Russia, 119991, Leninsky Gory 1, bl. 3*

²*Scientific-Production company «Lumex-Zashita»
Russia, 127018, Sushevsky Val, 47.
Rodin@analyt.chem.msu.ru*

Using the liquid chromatography tandem mass spectrometry, the approach for the organophosphorous warfare agents (OWA) metabolites detection in urine samples: O-isopropyl-methylphosphonic acid (detection limit – 0.5 ng ml⁻¹), O-pinacolyl- methylphosphonic acid (detection limit – 0.1 ng ml⁻¹), O-isobutyl-methylphosphonic acid (detection limit – 0.4 ng ml⁻¹) and O-ethyl-methylphosphonic acid (detection limit – 0.8 ng ml⁻¹) was developed. OWA metabolites removal correlations for human biomaterial samples, spiked with these metabolites, were obtained. Compounds determination using electrospray ionization in negative ion mode and applying deprotonated molecules as detecting ions was carried out. Biological samples analysis was carried out by reversed-phase chromatography using C18 sorbent. Solid phase extraction, based on reversed-phase adsorption cartridges containing copolymer of sterol and divinylbenzene, for sample preparation procedure was suggested. Under the world test of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) significant identification and determination of metabolites in human urine spiked with 5-50 ng / ml of the O-alkyl methylphosphonic acids were carried out.

Keywords: High performance liquid chromatography/mass spectrometry, detection, nerve agents.