

Определение следовых количеств *O*-изобутил-*S*-[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоата и токсичного продукта его гидролиза методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

*Е.И. Савельева, М.А. Ленинский, *И.А. Васильева, Г.В. Каракашев,
Н.А. Самченко*

*НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека,
188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский,
ст. Капитолово, Российская Федерация*

**Адрес для переписки: Ирина Александровна Васильева, e-mail: vasilyevaia@mail.ru*

Поступила в редакцию 26 января 2021 г., после доработки – 11 марта 2021 г.

К настоящему времени химическое оружие в Российской Федерации уничтожено. Бывшие предприятия по уничтожению химического оружия подлежат репрофилированию. Важнейшим этапом этой деятельности является установление безопасности элементов инженерной инфраструктуры объектов для оценки возможности вовлечения их в хозяйственный оборот. Из всех отравляющих веществ, обращавшихся на объектах, наиболее токсичным и персистентным является, так называемый, Ви-газ (вещество VR, *O*-изобутил-*S*-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоат). Аттестованные газохроматографические методики, применявшиеся ранее для контроля остаточных количеств этого вещества на поверхностях и в глубинных слоях материалов, основаны на конверсии вещества во фторангидрид на таблетках, импрегнированных фторидом серебра. В настоящее время эти таблетки не производятся, и применение методик невозможно. Применение жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии обеспечило прямое определение VR на уровне порога токсического действия в материалах различного матричного состава. Наряду с VR в рамках единой методики достигается также ранее методически не обеспеченное определение токсичной кислоты, образующейся при замене в молекуле VR алкильного радикала при кислороде протоном. Предложена методика высокочувствительного определения VR и наиболее токсичного продукта его гидролиза *S*-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в смывах с поверхностей и в глубинных слоях материалов различного состава. Методика основана на внесении в пробу внутреннего стандарта (параоксона), экстракции метанолом, концентрировании экстракта и последующем анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга заданных реакций (MRM). Реализация разработанной процедуры позволяет определять аналиты на уровне, соответствующем порогам токсического действия. Особое внимание в методике уделено достоверной идентификации аналитов, что имеет определяющее значение при международных расследованиях в рамках верификационной деятельности в соответствии с Конвенцией о запрещении химического оружия.

Ключевые слова: фосфорорганические вещества серии Vx; гидролиз, смывы, строительные материалы, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемное масс-селективное детектирование.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2021, vol. 25, no. 1, pp. 43-52

DOI: 10.15826/analitika.2021.25.1.005

Determination of *O*-isobutyl-*S*-[(2-diethylamino)ethyl]-methyl phosphonothioate and the hydrolysis toxic product traces by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry

**E.I. Savelieva, M.A. Leninskiy, *I.A. Vasileva, G.V. Karakashev,
N.A. Samchenko**

*Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,
Kapitolovo Station, G/P Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad Region, 188663, Russian Federation*

*Corresponding author: Irina A. Vasileva, e-mail: vasilyevaia@mail.ru

Submitted 26 January 2021, received in revised form 11 March 2021

To date, chemical weapons in the Russian Federation have been completely destroyed. Former chemical weapons destruction facilities (CWDFs) are subject to re-profiling. The most important stage of this activity is to assess the safety of engineering elements of the facilities to find out whether they can be involved in national economy. The most toxic and persistent substance processed at the CWDFs was a V-series agent. The certified gas chromatographic methods previously used for control of residual amounts of this substance on the surfaces and in deep layers of materials were based on its conversion to acid fluoride on silver fluoride pads. The latter are no longer produced, and these methods are impossible to use. The use of liquid tandem chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) provided a direct determination of VR in the different matrices at the level of the toxicity threshold. At the same time HPLC-MS/MS method allows to determine the toxic acid formed by the hydrolysis of the P–O bond in the VR molecule. Previously no methods for the determination of this acid were available. A unified procedure for the sensitive target determination of VR (*O*-isobutyl *S*-(2-diethylamino)ethyl methylphosphonothioate) and its most toxic hydrolysis product *S*-[(2-diethylamino)ethyl] methylphosphonothioic acid in surface wipes and in deep layers of various materials is proposed. The method involves the addition of an internal standard (paraoxon) to the sample, extraction with methanol, concentration of the extract, and analysis by HPLC-MS/MS in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The detection limits of the analytes are close to their toxic threshold levels. Special emphasis in the procedure is paid to the reliability of identification of the analytes, which is of key importance in international investigations under the Chemical Weapons Convention.

Key words: organophosphorus agents; hydrolysis, surface wipes, building materials, high performance liquid chromatography, tandem mass selective detection.

ВВЕДЕНИЕ

Среди компонентов химического оружия фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) наиболее токсичны [1, 2], чем и обусловлены повышенные требования к чувствительности их обнаружения. В ряду ФОВ наиболее персистентны и особенно токсичны так называемые ви-газы – серия веществ с общей аббревиатурой V_x и брутто-формулой C₁₁H₂₆NO₂PS, включающая изомеры VX, CVX, VR. Вещество *O*-изобутил-*S*-[(2-диэтиламино)этил] метилтиофосфонат (изомер VR) производили в СССР с 1972 по 1987 год. В рамках Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении, действующей с января 1996 г, в 2017 г. все запасы химического оружия в России были уничтожены, при этом мониторинг соблюдения положений Конвенции о запрещении химического оружия [3] продолжается. Большое внимание в настоящее время уделяется разработке методик определения метаболитов отравляющих веществ, в том числе и фосфорорганических, в биологических пробах [4, 5]. Российскими аналитиками предложены методики высокочувствительного определения гидролитических метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в моче [6, 7]. Недавно вышла серия работ, посвященных атрибуции (установлению происхождения) отравляющих веществ, и VR в том числе [8]. Разработка методик высокочувствительного

определения отравляющих веществ в различных объектах актуальна в антитеррористических целях [9–13], а также при ликвидации последствий деятельности предприятий по уничтожению химического оружия (УХО). Контроль безопасности деятельности объектов при реализации программы УХО проводился с использованием биохимических и газохроматографических методов. Тогда же были установлены нормативы безопасного содержания VR, которые составили 2×10⁻⁶ мг/дм² для поверхностей и 5×10⁻⁵ мг/кг для отходов, соответственно [14]. Биохимические методики отличаются экспрессностью и высокой чувствительностью, но не обеспечивают достоверной идентификации ФОВ ввиду низкой селективности [15]. Газохроматографические методики были основаны на конверсии VR во фторангидрид на таблетке, импрегнированной фторидом серебра, с последующей термодесорбцией фторангидрида в колонку газового хроматографа с масс-селективным, термоионным, пламенно-фотометрическим или пульсирующим пламенно-фотометрическим детекторами. Методики позволяли определять вещества серии V_x на уровне установленных нормативов [16]. В настоящее время эти методики невыполнимы ввиду того, что таблетки для конверсии V_x сняты с производства.

В период разработки и оптимизации технологии уничтожения VR был изучен состав реакционных масс от его нейтрализации, который насчитывал несколько десятков летучих и нелетучих органических

соединений [17]. Наряду со щелочно-спиртовыми рецептурами, для разложения V-агентов применяли гидролиз эквимольным количеством воды. В то же время в работах [18, 19] справедливо отмечено, что не все гидролитические пути деструкции приводят к детоксикации Vx. При гидролизе VR в области pH, близких к нейтральным (pH 7-10) в ряду продуктов деструкции VR обнаруживается S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоат - структурный аналог S-[2-(диизопропиламино)этил]метилфосфонотиоата, известного под кодом EA2192, который сохраняет ингибирующую активность в отношении холинэстеразы и, по разным оценкам, лишь в 3-10 раз уступает в токсичности веществу VX [20]. При этом гигиенический норматив допустимого содержания в различных средах был установлен только для самого вещества VR.

Поскольку в российских лабораториях в период действия Программы уничтожения химического оружия исследования по определению состава продуктов конверсии VR в различных средах, в том числе и в дегазирующих рецептурах, проводились преимущественно с применением газовой хроматографии (ГХ) [21], определение нелетучего и трудно поддающегося дериватизации S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата было проблематичным. Применявшиеся для контроля этого вещества методики измерений на основе методов газовой хроматографии и капиллярного электрофореза не отвечали по чувствительности предполагаемому порогу токсического действия вещества [22, 23]. В работе И.А. Родина с соавт. [23] был предложен способ определения S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в воде в диапазоне концентраций 0.02-5.0 мг/дм³. Способ отличается простотой и экспрессностью, но ориентирован на анализ только «чистых» матриц (питьевая и природная вода) и также не отвечает по чувствительности предполагаемому порогу токсического действия.

Таким образом, задача высокочувствительного определения чрезвычайно токсичного S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в сложных матрицах оставалась нерешенной. В то же время, эта проблема является актуальной, поскольку данное соединение не только представляет опасность, но и входит в перечень токсичных химикатов, подлежащих контролю в соответствии с Конвенцией о запрещении химического оружия, и, как показали эксперименты, при гидролизе VR оно может образовываться в значительных количествах.

В крупных исследовательских центрах накоплен достаточно большой опыт в области определения ФОВ и продуктов их конверсии в сложных матрицах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) [24], однако возможность разработки процедур, обеспечивающих определение маркеров ФОВ на уровне концентраций ppb и ниже наметилась лишь в последние годы с появлением tandemных

масс-спектрометров (МС/МС). В статье Стаббса (S.Stubbs) с соавт. [25] была представлена процедура определения VX в микродиализатах плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) при ионизации электрораспылением в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Способ был валидирован в диапазоне концентраций 0.002-1.0 нг/см³. Поскольку плазма крови является не менее сложной матрицей в сравнении с пробами объектов окружающей среды, задача определения веществ серии VX в смывах с поверхностей и измельченных твердых строительных материалах уже представлялась решаемой. В работе Рейтера (G. Reiter) с соавт. [26] при определении энантиомеров VX в плазме крови в качестве внутреннего стандарта использовали VR. Также в качестве внутреннего стандарта VR использовали Дебойт (C. Debouit) с соавт. [27] при разработке высокочувствительной методики определения VX в плазме крови при проведении токсикокинетических исследований. Таким образом, в ряде работ была подтверждена возможность прямого высокочувствительного определения не только VX, но и VR методом ВЭЖХ-МС/МС. Еще более привлекательной выглядела перспектива определения VR и S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в рамках одной методики, хотя в доступной литературе соответствующих примеров обнаружить не удалось.

Таким образом, цель работы состояла в разработке методики определения вещества VR и наиболее токсичного продукта его гидролиза методом ВЭЖХ-МС/МС на поверхностях и в глубинных слоях материалов различных типов с чувствительностью, отвечающей порогу токсического действия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

Для приготовления растворов аналитов использовали ГСО 8249-2004 вещества VR с массовой долей основного вещества не менее 90 %; СОП (стандарт предприятия) № 4/2019 S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата (содержание основного вещества не менее 95 %), параоксон (производства Sigma (Германия) с содержанием основного вещества не менее 95 %.

В работе применяли ацетонитрил (Panreac, кат. № 221881.1611), формиат аммония (Acros, кат. № 401152500), метанол для ВЭЖХ (J.T. Baker, кат. № 8402), муравьиную кислоту («Sigma», кат. № 251364).

Исходные растворы аналитов и внутреннего стандарта с концентрацией 10 мг/см³ готовили в отдельных хроматографических виалах растворением навесок VR, S-(2-диэтиламиноэтил)метилфосфонотиоата и параоксона в ацетонитриле. Рабочие растворы аналитов готовили путем смешивания и разбавления ацетонитрилом исходных растворов

аналитов. Рабочий раствор внутреннего стандарта с концентрацией 10 мкг/см³ готовили разбавлением исходного раствора в 1000 раз. На основе рабочих растворов аналитов и внутреннего стандарта готовили пять градуировочных растворов с концентрациями аналитов от 0.0001 до 0.1 мкг/см³ и фиксированной концентрацией внутреннего стандарта 0.1 мкг/см³. Растворы хранили в морозильной камере при температуре не выше минус 20 °С не более 2-х недель.

Тампоны для отбора проб смывов с поверхностей изготавливали вручную из отрезков марли размером примерно (40 x 40) мм, вес тампона составлял примерно 0,2 г. Тампоны хранили при комнатной температуре в новых полиэтиленовых пакетах с замками типа Zip Lock.

Для установления градуировочных зависимостей аналитов относительно внутреннего стандарта каждый градуировочный раствор анализировали не менее двух раз. Коэффициенты линейной корреляции полученных градуировочных зависимостей составляли 0,9996 для VR и 0,9994 для S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата.

Оборудование, условия ВЭЖХ-МС/МС анализа

Определение VR и S-[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоата проводили методом ВЭЖХ-МС/МС, реализованном на приборе Shimadzu LC-20AD, оснащенный автодозатором и масс-селективным детектором Shimadzu LCMS-8050 с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении, хроматографической колонкой Gemini-NX 3u C18 110A (Phenomenex) с фазой на основе силикагеля с привитыми группами C18, длиной 150 мм, диаметром 2 мм, зернением 3 мкм.

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы

Table 1

Ratio of mobile phase constituents

Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы	
	A, %	B, %
0.01	90	10
0.80	90	10
3.00	5	95
6.00	5	95
6.10	90	10
9.00	90	10

Условия хроматографического разделения.

Разделение компонентов проводили в градиентном режиме в соответствии с табл. 1, где компонент А – 0.1 М раствор формиата аммония в деионизированной воде; компонент В – 0.1 М раствор формиата аммония в метаноле.

Хроматографическое разделение проводили при скорости потока элюента 0.4 см³/мин, температуре термостата колонок 40 °С, температуре термостата отделения для проб 5 °С. Объем вводимой пробы – 0.001 см³.

Условия масс-спектрометрического детектирования. Скорость потока газа-осушителя – 10 дм³/мин; скорость потока вспомогательного газа – 10 дм³/мин; скорость потока на распылителе – 3 дм³/мин; температура интерфейса – 300 °С; температура линии десольватации – 250 °С; температура нагревателя – 400 °С; напряжение на капилляре – 3500 В.

Анализ проводили в режиме мониторинга заданных реакций (**MRM** - Multiple Reactions Monitoring)

Таблица 2

Характеристики аналитов и внутреннего стандарта для режима MRM детектирования

Table 2

Identification parameters in MRM detection mode

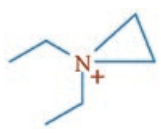
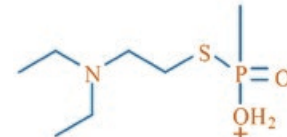
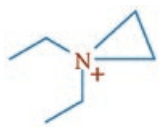
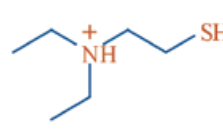
№ п/п	Название	Структурная формула	Прекурсор-ион	Продукт-ион
1	О-изобутил-S-[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоат (VR)		268.00 268.00 268.00	100.10 72.05 212.00
2	S-[(2-диэтиламино)-этил]метилфосфонотиоат		212.10 212.10	100.10 72.05
3	Параоксон (внутренний стандарт)		276.00 276.00	220.00 94.05

Таблица 3

MRM-переходы *O*-изобутил-[*S*-(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоата (VR) и *S*-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в режиме подтверждающего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения

Table 3

MRM-transitions for *O*-isobutyl-*S*-[(2-diethylamino)ethyl]-methyl phosphonothioate (VR) and *S*-[(2-diethylamino)ethyl]-methyl phosphonothioate with HPLC-MS/MS in confirmatory mode

<i>O</i> -изобутил- <i>S</i> -[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоат (VR)		<i>S</i> -[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоат	
MRM-переход	Продукт-ион	MRM-переход	Продукт-ион
268.14946→100.11208	 C ₆ H ₁₄ N ⁺	268.14946→212.08686	 C ₇ H ₁₉ NO ₂ PS ⁺
212.08686→100.11208	 C ₆ H ₁₄ N ⁺	212.08686→134.09980	 C ₆ H ₁₆ NS ⁺

при регистрации положительно заряженных ионов. Детектируемые прекурсор- и продукт-ионы приведены в табл. 2.

Для подтверждающего анализа применяли комплекс ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, включающий жидкостный хроматограф UltiMate 3000 (Thermo, США) с масс-селективным детектором Thermo Scientific Q-Exactive с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении. Анализ проводили в условиях, аналогичных условиям первичного анализа на комплексе Shimadzu.

MRM-переходы, заданные для подтверждающей идентификации аналитов, приведены в табл. 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность образования *S*-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата при гидролизе VR в водных растворах в нейтральной среде (рН 7) была оценена нами в рамках предварительных исследований [28]. С помощью метода ВЭЖХ-МС/МС было установлено, что после внесения VR в воду в концентрациях 0.4 - 4 М через трое суток содержание *S*-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в растворе может быть оценено на уровне 0.04-0.06 % от исходного содержания VR.

При разработке унифицированной, т.е. применимой к анализу объектов различных типов, методики для определения ФОВ V-типа приходится учитывать их высокую сорбционную активность, следствием которой является их необратимое удерживание, поэтому при анализе образцов на содержание ФОВ V-типа мы определяем только их долю, находящуюся в свободной форме. Задача моделирования поведения ФОВ V-типа, и VR в

частности, в различных матрицах осложняется тем, что такие факторы, как присутствие влаги и (или) органических соединений оказывают существенное влияние как на сорбцию, так и на кинетику разложения VR. Например, в материалах щелочного характера (бетон, цемент, штукатурка, известь) VR быстро разлагается, особенно в присутствии воды, а в органических гидрофобных средах (полимеры, смазочные материалы) способен существовать продолжительное время [28].

Процедура определения VR и *S*-[(2-диэтиламино)этил] метилфосфонотиоата включает внесение в пробу (смыв с поверхности или навеска измельченного твердого образца) внутреннего стандарта параоксона, экстракцию пробы органическим растворителем, концентрирование экстракта в токе азота и последующий анализ методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга заданных реакций (MRM) при регистрации положительно заряженных ионов.

Набор экспериментальных данных для метрологической аттестации методики проводили в модельных условиях на образцах непитьвающих поверхностей и твердых образцах путем нанесения на них растворов аналитов с последующим выполнением измерений в соответствии с разработанной процедурой.

Проба смыва состояла из 6 тампонов, смоченных ацетонитрилом перед протиранием поверхности площадью 10 дм² и помещенных после взятия смыва в стеклянный флакон. Флаконы со смывами герметично укупуривали и помещали на хранение в морозильную камеру при температуре минус 18 °С. Соблюдение данных условий при хранении и транспортировке позволяет сохранить отобранные образцы в неизменном виде как минимум в течение

месяца. Исследования на стабильность аналитов в смывах при более длительном сроке хранения не проводили. Также экспериментально была установлена возможность сохранения аналитов без потерь в герметично упакованных твердых пробах в течение трех месяцев при условии их транспортировки и последующего хранения до анализа при температуре не выше 4 °С.

В качестве твердых образцов использовали невпитывающие материалы (фторопласт, стекло, кварцевый песок). Перед выполнением анализа твердые образцы измельчали с применением специальных устройств или пестиком в фарфоровой ступке и просеивали через сито с диаметром отверстий 1.0 мм. Каждую из измельченных проб перемешивали и брали навески массой ~ 4 г.

В пробу смыва или навеску измельченного твердого материала добавляли 4 см³ метанола и 10 мм³ (100 нг) раствора внутреннего стандарта параоксона в ацетонитриле. Применение метанола в качестве экстрагента было обусловлено результатами ранее проведенных экспериментов по установлению полноты извлечения вещества VR из различных матриц. Полнота извлечения аналитов зависит как от природы исследуемых матриц, так и от состава общепромышленных загрязнителей, неизменно присутствующих в каждой пробе. Некоторые материалы способны необратимо удерживать VR. Таким образом, определению подлежат только извлекаемые на момент анализа количества аналитов. Полученную пробу перемешивали и подвергали двукратной ультразвуковой экстракции в течение 10 мин. Экстракты объединяли и отбирали две равные аликвоты, одну из которых подвергали ВЭЖХ-МС/МС анализу, вторую – помещали в морозильную камеру с температурой минус (20 ± 2) °С и использовали в случае необходимости в качестве арбитражной. Часть пробы, предназначенную для анализа, концентрировали в токе азота, добавляли

аликвоту 0.1 %-го водного раствора муравьиной кислоты, центрифугировали, и надосадочный слой подвергали ВЭЖХ-МС/МС анализу.

Аналиты идентифицировали по абсолютным временам удерживания, необходимым условием для идентификации аналита было также присутствие всех характеристичных продукт-ионов с соотношением сигнал/шум (S/N) не менее 3, а также соответствие относительных интенсивностей продукт-ионов аналита в масс-спектре экстракта пробы с таковыми в масс-спектре стандартного (градуировочного) раствора с концентрацией аналита, близкой к концентрации в анализируемой пробе. Относительную интенсивность продукт-иона рассчитывали относительно самого интенсивного пика в масс-спектре, интенсивность которого принимали за 100 %. Далее рассчитывали критерий идентичности, *T*, по формуле

$$T = RA_{ст} \cdot \frac{\Delta}{100},$$

где: *RA_{см}* – относительная интенсивность продукт-иона в масс-спектре стандартного раствора; *D* – допустимое расхождение (табл. 4).

Таблица 4

Допустимые расхождения (%) между относительными интенсивностями ионов для пробы и стандартного раствора

Table 4

Tolerances (%) for relative ion intensities in analyzed and standard solutions

Относительная интенсивность продукт-иона для аналитов в стандартном растворе, %	Допустимое расхождение, Δ, %
более 50	± 20
от 20 до 50	± 25
от 10 до 20	± 30
не более 10	± 50

Таблица 5

Пример расчета критерия идентичности

Table 5

The sample of identity criterion calculation

О-изобутил-S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоат						
Продукт-ион	Проба		Стандарт		Критерий идентичности, <i>T</i> , %	Результат +/-
	Площадь пика иона, <i>A_{пр}</i> , усл. ед.	Относительная интенсивность, <i>RA_{пр}</i> , %	Площадь пика иона, <i>A_{см}</i> , усл. ед.	Относительная интенсивность, <i>RA_{см}</i> , %		
100.10	860252	100	457515	100		
72.05	166381	19.34	87335	19.09	± 5.73	+
212.00	81611	9.49	42916	9.38	± 4.69	+
S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоат						
100.10	232237	100	43942	100		
72.05	55455	23,88	11285	25.68	± 6.42	+

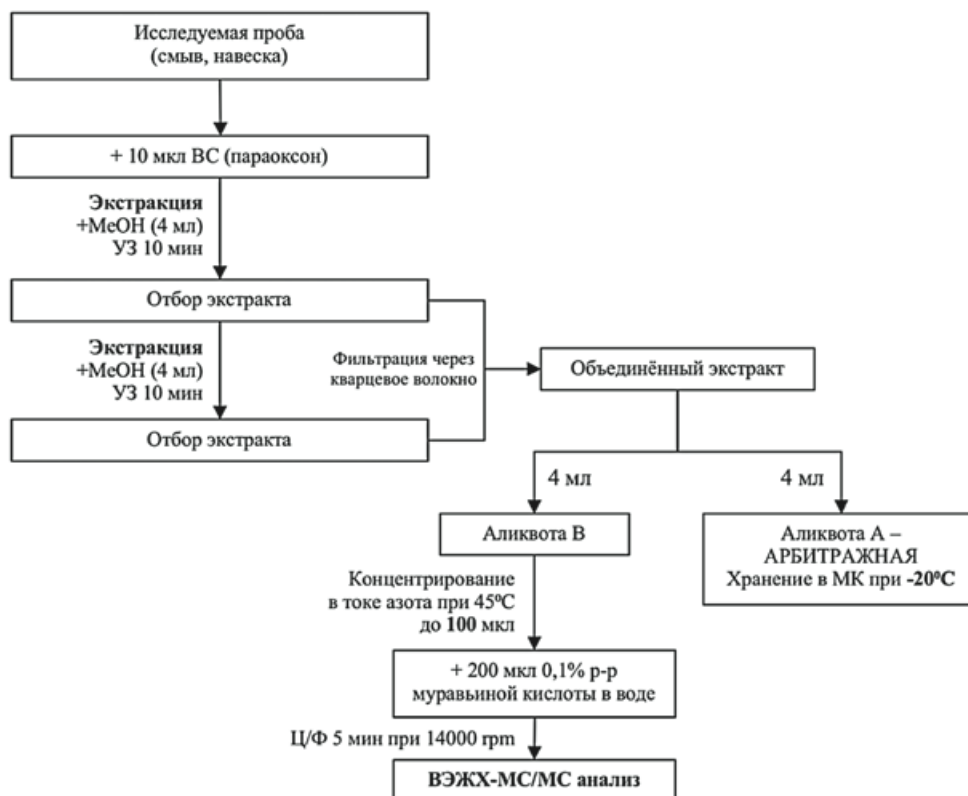


Рис. Схема определения VR и S-2-((2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата в рамках унифицированной методики при обследовании технологических сред бывших объектов по уничтожению химического оружия (составлена авторами). Обозначения на схеме: ВС- внутренний стандарт; MeOH – метанол; УЗ – ультразвуковая экстракция; МК – морозильная камера; Ц/Ф – центрифугирование.

Fig. Scheme of VR and S-[[2-diethylamino)ethyl]-methyl phosphonothioate determination under unified procedure in safety control of technical objects of former chemical weapons destruction facilities.

Таблица 6

Диапазон измерений методики, значения показателей точности, правильности и воспроизводимости при доверительной вероятности $P = 0.95$

Table 6

Measurement range, precision, reliability and reproducibility of procedure at confidence level $P = 0.95$

Определяемое вещество, единица измерений	Диапазон измерений	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности $P = 0,95$), $\pm\delta$, %	Показатель правильности (границы относительности систематической погрешности), $\pm\delta_c$, %	Показатель воспроизводимости (относительное СКО воспроизводимости), σ_R , %
Смывы				
О-изобутил-S-[(2-диэтил)аминоэтил]-метилфосфонотиоат, мг/дм ²	От 5×10^{-7} до 5×10^{-4} включ.	31	10	15
S-[(2-диэтиламиноэтил)- метилфосфонотиоат, мг/дм ²				
Фрагменты строительных конструкций, инженерной инфраструктуры				
О-изобутил-S-[(2-диэтил)аминоэтил]-метилфосфонотиоат, мг/кг	От 2.5×10^{-5} до 25 включ.	25	8	10
S-(2-диэтиламиноэтил)- метилфосфонотиоат, мг/кг				

Для положительной идентификации необходимо, чтобы значение относительной интенсивности продукт-иона в пробе не выходило за рамки значений ($RA_{cm} \pm T$) для того же продукт-иона в стандартном растворе. Принятые ОЗХО [29] допустимые расхождения и пример расчета критерия идентичности приведены в табл. 4 и 5, соответственно.

В случае обнаружения аналитов в пробе методика предполагает выполнение подтверждающего анализа методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с MRM-переходами, приведенными в табл. 3.

При реализации процедуры пределы обнаружения VR и S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата составляли соответственно $4.1 \cdot 10^{-8}$ и $6.5 \cdot 10^{-8}$ мг/дм² (для смывов); $2.1 \cdot 10^{-6}$ и $3.3 \cdot 10^{-6}$ мг/кг (для твердых матриц), что позволяет контролировать их содержание на поверхностях и в глубинных пробах на уровне $5 \cdot 10^{-7}$ мг/дм² для поверхностей и $2.5 \cdot 10^{-5}$ мг/кг для твердых образцов и отвечает установленным в РФ гигиеническим нормативам.

В настоящее время методика определения VR и S-[(2-диэтиламино)этил]метилфосфонотиоата в смывах и твердых образцах аттестована и внесена в федеральный информационный фонд под номером ФР.1.31.2020.36539. Установленная экспериментально стабильность аналитов в замороженных смывах и герметично упакованных твердых пробах позволяет проводить отбор проб на месте предполагаемой химической опасности и транспортировать их в стационарную лабораторию, располагающую высокопрецизионным оборудованием. Схема методики представлена на рисунке. Метрологические характеристики методики приведены в табл. 6. Верхний предел диапазона измерений приведен с учетом разбавления экстракта пробы в 100 раз.

Данная методика была использована при перепрофилировании бывших объектов УХО в целях вовлечения их в хозяйственный оборот. По результатам проведенных измерений часть элементов инфраструктуры была подвергнута дополнительной дегазации либо направлена на уничтожение.

ЛИТЕРАТУРА

- Romano J.A., Salem H., Lukey B.J. Chemical Warfare Agents: Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics, 2-nd ed., London: CRC Press, 2008. 723 p.
- Chemical warfare agents / S. Chauhan [et al.] // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2008. V. 26. P. 113-122.
- 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. <http://www.opcw.org>. (12.02.2021).
- 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.] // Journal of Chromatography B, 2010. V. 878 (17-18). P. 1226-1233.
- Witkiewicz Z., Neffe S. Chromatographic analysis of chemical warfare agents and their metabolites in biological samples // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020. V. 130. 115960.

- Simultaneous determination of organophosphorus nerve agent markers in urine by IC-MS/MS using anion-exchange solid-phase extraction / T. Baygildiev [et al.] // Journal of Chromatography B. 2019. V. 1132. P. 121815.
- Rapid IC-MS/MS determination of methylphosphonic acid in urine of rats exposed to organophosphorus nerve agents / T. Baygildiev [et al.] // Journal of Chromatography B. 2017. V. 1058. P. 32-39.
- Part 2: Forensic attribution profiling of Russian VX in food using liquid chromatography-mass spectrometry / D. Jansson [et al.] // Talanta. 2018. V. 186. P. 597-606.
- Haines D.D., Fox S.C. Acute and long-term impact of chemical weapons: lessons from the Iran-Iraq war // Forensic Sci. Rev. 2014. V. 26. P. 97-114.
- Tu A.T. Toxicological and chemical aspects of sarin terrorism in Japan in 1994 and 1995 // Toxin Reviews. 2007. V. 26. P. 231-274.
- Ellison D. Hank. Handbook of Chemical and Biological Warfare Agents, 2nd ed. CRC Press, 2008. 800 p.
- Dolgin E. Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs // Nat. Med. 2013. V. 19. P. 1194-1195.
- Tokyo subway sarin attack / T. Okumura [et al.] // Ann. Emerg. Med. 1996. V. 28. P. 129-135.
- Шкодич П.Е., Клаучек В.В. Гигиенические аспекты уничтожения химического оружия в Российской Федерации // Гигиена и санитария. 2003. Т. 4. С. 47-50.
- Elaboration of microplate spectroscopic method for bio-monitoring of warfare organophosphates soman and Russian VX / N. Goncharov [et al.] // The Toxicologist. 2010. V. 99. № 1. P. 397 (A1866).
- Gas chromatographic determination of trace isobutyl S-2-(N,N-diethylamino)ethylmethylphosphonothioate (VX-like compound) in soil and construction materials / I. Stan'kov [et al.] // J. Anal. Chem. 2004. V. 59, № 3. P. 260-265.
- Савельева Е.И., Зенкевич И.Г., Радилев А.С. Идентификация продуктов химической нейтрализации О-изобутил-8-(2-диэтиламиноэтил)метил-тиофосфоната в составе битумно-солевых масс // Ж. аналитической химии. 2003. Т. 58, № 2. С. 135-145.
- Davisson M., Love A., Vance A., Reynolds J. UCRLTR-209748 Environmental Fate of Organophosphorus Compounds Related to Chemical Weapons. Livermore, CA: Lawrence Livermore National Laboratory. 2005.
- Investigating the affinities and persistence of VX nerve agent in environmental matrices / A. Love [et al.] // Chemosphere. 2004. V. 57, № 10. P. 1257-1264.
- Fate, and Toxicity the chemical warfare agents Degradation Products / N. Munro [et al.] // V. Environ. Health Perspect. 1999. V. 107. P. 949-955.
- Новиков С.В. Аналитическое сопровождение работ по ликвидации химического оружия // Российский химический журнал. 2007. Т. LI, № 2. С. 109-117.
- Газохроматографическое определение микроколичеств S-[2-(N,N-диэтиламино)этил]метилтиофосфоновой кислоты в воде / И.Н. Станьков [и др.] // Ж. аналит. химии. 2008. Т. 63, № 7. С. 731-737.
- Определение продуктов гидролитической трансформации отравляющих веществ VX и VR в природных водах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии / И.А. Родин [и др.] // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12, № 2. С. 100-106.
- Liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometric and desorption electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of chemical warfare agents in office media typically collected during a forensic investigation / P.A. D'Agostino [et al.] // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1110. P. 86-94.

25. 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 // *J. Chromatogr. B*. 2010. V. 878 (17-18) P. 1253-1256.

26. Chromatographic resolution, characterization and quantification of VX enantiomers in hemolysed swine blood samples / G. Reiter [et al.] // *J. Chromatogr. B*. 2008. V. 873(1). P. 86-94.

27. Methodological contributions towards LC-MS/MS quantification of free VX in plasma: An innovative approach / C. Deboutit [et al.] // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010. V. 878, № 30. P. 3059-3066.

28. Russian VX / V. Rembovskiy [et al.] // *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents / 3rd ed.* Academic Press/Elsevier, Amsterdam / Ed, Gupta R.C. 2020, P. 127-141.

29. OPCW Quality Management System Document No.: QDOC/LAB/WI/PT04. 11 March 2019. Available from the OPCW Laboratory: proficiency@opcw.org (22.04.2020).

REFERENCES

1. Romano J.A., Salem H., Lukey B.J. *Chemical Warfare Agents: Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics*, 2-nd ed., London: CRC Press, 2008. 723 p.

2. Chauhan, S., Chauhan, S., D'Cruz, R., Faruqi, S., Singh, K. K., Varma, S. Karthik, V. Chemical warfare agents. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, vol 26, no. 2, pp. 113–122. doi: 10.1016/j.etap.2008.03.003.

3. *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. <http://www.opcw.org>. (12.02.2021).

4. 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, vol. 878, no. 17-18, pp. 1226–1233. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.12.023.

5. Witkiewicz, Z., & Neffe, S. Chromatographic analysis of chemical warfare agents and their metabolites in biological samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, vol. 130, 115960. doi: 10.1016/j.trac.2020.115960.

6. 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, vol. 1132, 121815. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121815.

7. Baygildiev, T., Zatrakha, A., Rodin, I., Braun, A., Stavriani, A., Koryagina, N., Shpigun, O. Rapid IC-MS/MS determination of methylphosphonic acid in urine of rats exposed to organophosphorus nerve agents. *Journal of Chromatography B*, 2017, pp 1058, 32–39. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.05.005.

8. Jansson D., Lindström S.W., Norlin R., Hok S., Valdez C.A., Williams A.M., Åstot C. Part 2: Forensic attribution profiling of Russian VX in food using liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 2018, vol. 186, pp. 597–606. doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.103.

9. Haines D.D., Fox S.C. Acute and long-term impact of chemical weapons: lessons from the Iran-Iraq war. *Forensic Sci. Rev.*, 2014, vol. 26. pp. 97–114.

10. Tu A.T. Toxicological and chemical aspects of sarin terrorism in Japan in 1994 and 1995. *Toxin Reviews*. 2007. vol. 26. pp. 231-274. doi: 10.1080/15569540701496321.

11. Ellison D. Hank. *Handbook of Chemical and Biological Warfare Agents*, 2nd ed. CRC Press, 2008. 800 p.

12. Dolgin E. Syrian gas attack reinforces need for better anti-sarin drugs. *Nat. Med.* 2013, vol. 19, pp. 1194–1195. doi: 10.1038/nm1013-1194.

13. Okumura T, Takasu N, Ishimatsu S, Miyanoki S, Mitsuhashi A, Kumada K, Tanaka K, Hinohara S. Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. *Ann Emerg Med.* 1996, vol. 28, no. 2, pp. 129-35. doi: 10.1016/s0196-0644(96)70052-5. PMID: 8759575.

14. Shkodich P.E., Klauček V.V. Hygienic aspects of chemical weapons destruction in Russian Federation. *Hygiene and Sanitation*, 2003. vol. 4. pp. 47–50.

15. Goncharov N., Prokofieva D., Voitenko N., Gustyleva L., Savelieva E., Radilov A., Babakov V., Ermolaeva E., Khlebnikova N., Pechenevsky Y. and Rembovsky V. Elaboration of microplate spectroscopic method for biomonitoring of warfare organophosphates soman and Russian VX. *The Toxicologist*, 2010, vol. 99, no. 1, p. 397 (A1866).

16. Stan'kov, I. N., Sergeeva, A. A., Sitnikov, V. B., Derevyagina, I. D., & Morozova, O. T. Gas-Chromatographic Determination of Trace Isobutyl S-2-(N,N-Diethylamino)ethyl Methylphosphonothioate (VX-like Compound) in Soil and Construction Materials. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, vol. 59, no. 3, pp. 260–265. doi: 10.1023/b:janc.0000018970.00124.84.

17. Savelieva E. I., Zenkevich I. G., Radilov A. S. Identification of O-Isobutyl S-(2-Diethylaminoethyl)Methylthiophosphonate Chemical Neutralization Products in Bitumen-Salt Matrices. *Journal of Analytical Chemistry*, 2003, vol. 58, pp. 114–123.

18. Davisson M., Love A., Vance A., Reynolds J. *UCRLTR-209748 Environmental Fate of Organophosphorus Compounds Related to Chemical Weapons*. Livermore, CA: Lawrence Livermore National Laboratory, 2005. doi: 10.2172/15015167.

19. Love, A. H., Vance, A. L., Reynolds, J. G., & Davisson, M. L. Investigating the affinities and persistence of VX nerve agent in environmental matrices. *Chemosphere*, 2004, vol. 57, no. 10, pp. 1257–1264. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.041.

20. Munro, N. B. Talmage, S. S. Griffin, G. D. Waters, L. C. Watson, A. P. King, J. F., Hauschild V. The Surces, Fate, and Toxicity the chemical warfare agents Degradation Products. *Environ. Health Perspect.*, 1999, vol. 107, pp. 949-955.

21. Novikov S.V. [Analytical Maintenance of Works on Liquidation of Chemical Weapons]. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal* [Russian Chemical Journal], 2007, vol. LI, no. 2, pp. 109–118 (in Russian).

22. Stan'kov, I. N., Derevyagina, I. D., Condrat'ev, V. B., Sitnikov, V. B., Sadovnikov, S. V., & Mylova, S. N. Gas-chromatographic determination of trace S-[2-(N,N)-diethylamino)ethyl] methylphosphonothioic acid in water. *Journal of Analytical Chemistry*, 2008, vol. 63, no. 7, pp. 668–673. doi: 10.1134/s1061934808070113.

23. Rodin I.A., Braun A.V., Bajgil'diev T.M., Anan'eva I.A., Shpigun O.A., Rybal'chenko I.V. [Determination of hydrolytic transformation products of toxic substances VX and VR in natural waters by liquid chromatography-mass spectrometry.] *Mass-Spectrometry* [Mass-spectrometry], 2015, vol. 12, no. 2, pp. 100–106 (in Russian).

24. D'Agostino, P. A., Hancock, J. R., Chenier, C. L., & Lepage, C. R. J. Liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometric and desorption electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of chemical warfare agents in office media typically collected during a forensic investigation. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1110, no. 1-2, pp. 86–94. doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.083.

25. 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. *J. Chromatogr. B.*, 2010, vol. 878, no. 17-18, pp. 1253-1256. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.12.007.

26. 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. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2008, vol. 873, no. 1, pp. 86-94. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.08.001.

27. Debouit, C., Bazire, A., Lallement, G., & Daveloose, D. Methodological contributions towards LC–MS/MS quantification of free VX in plasma: An innovative approach. *Journal of Chromatography B*, 2010, vol. 878, no. 30, pp. 3059–3066. doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.050.

28. Rembovskiy V., Savelieva E., Radilov A., Samchenko N., Karakashev G., Leninskiy M., Koryagina N., Kuznetsov S., Mindukshev I., Khlebnikova N., Jenkins R., Goncharov N. Russian VX . In: Gupta, R.C. (Ed.) *Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 3rd ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam, 2020, pp.127-141.

29. *OPCW Quality Management System Document No.: QDOC/LAB/WI/PT04*. 11 March 2019. Available from the OPCW Laboratory: proficiency@opcw.org (22.04.2020).