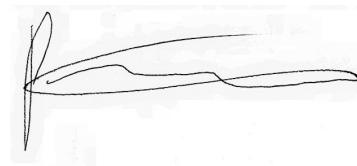


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Химический факультет

на правах рукописи



Родин Игорь Александрович

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

02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Диссертация на соискание учёной степени

доктора химических наук

Москва 2016

Список используемых сокращений

АТД	автоматическая термическая десорбция
АЭД	атомно-эмиссионное детектор
ВПМС	временной пролетный масс-анализатор
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ультраВЭЖХ	ВЭЖХ при повышенном давлении
микроВЭЖХ	микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ	газовая хроматография
ДИТ	2-(диизопропиламино)-этансульфоновая кислота
ДМТ	диметилтаурин
ДМТЛ	2,3-димеркаптотолуолом
ДПТ	2-(дипропиламино)-этансульфоновая кислота
ДФАЦ	дифениларсин цианид
ДФАХ	дифениларсин хлорид
ДЭТ	2-(диэтиламино)-этансульфоновая кислота
иБутМФК	О-изобутилметилфосфоновая кислота
иПрМФК	О-изопропилметилфосфоновая кислота
КЗХО	конвенция о запрете разработки, хранения и использования химического оружия
КЗЭ	капиллярный зонный электрофорез
КЭ	капиллярный электрофорез
МС	масс-спектрометрия
МСМТЭСЭ	1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этан
МФК	метилфосфоновая кислота
ОВ	отравляющие вещества
ОЗХО	организации по запрещению химического оружия
ПДТ	1,3-пропандитиол
ПинМФК	О-пинаколилметилфосфоновая кислота
ПМФК	О-н-пропилметилфосфоновая кислот
ППФД	пульсирующий пламенно-фотометрический детектор
ПФД	пламенно-фотометрический детектор
СБАЦЭ	1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана]

СБМСЭ	1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этан]
ТБДМС	третбутил диметилсилан
ТФМЭ	твёрдофазная микроэкстракция
ТФЭ	твёрдофазная экстракция
УФ	ультрафиолетовый
ФОВ	фосфорсодержащие отравляющие вещества
ХВАК	2-хлорвиниларсонистая кислота
ХВАО	2-хлорвинил арсин оксид
ХВАОК	2-хлорвиниларсоновая кислота
ХИ	химическая ионизация
ХИАД	химическая ионизация
ХО	химическое оружие
ЭДТ	1,3- этандитиол
ЭЗД	электрон-захватный детектор
ЭИ	электронная ионизация
ЭМФК	О-этилметилфосфоновая кислота
ЭРИ	электрораспылительная ионизация
МФК	метилфосфоновая кислота

Оглавление

Введение	6
1. Обзор литературы	16
1.1 Методы обнаружения и определения нервно-паралитических ОВ	18
1.2 Методы обнаружения и определения сернистых и азотистых ипритом	58
1.3 Методы обнаружения и определения мышьяксодержащих ОВ	67
1.4 Методы обнаружения и определения других ОВ	73
1.5 Использование реакций дериватизации	74
2. Оборудование, материалы, техника эксперимента	79
2.1 Оборудование и материалы	79
2.2 Техника эксперимента	82
3. Разработка способов обнаружения и определения продуктов трансформации нервно-паралитических ОВ	93
3.1 Разработка способа определения продуктов окисления V-газов методом капиллярного зонного электрофореза	93
3.2 Разработка способа определения продуктов окисления V-газов методом ВЭЖХ-МС	106
3.3 Разработка процедуры обнаружения продуктов трансформации фосфорорганических отравляющих веществ в биосредах методом ВЭЖХ-МС	117
3.4 Разработка подхода одновременного определения характеристичных продуктов трансформации ФОВ ультраВЭЖХ-МС-МС	138
3.5. Экспрессное определение МФК в природных водах	154
3.6. Определение МФК в виде производного с п-бромфенацил бромидом в природных водах.....	159

3.7. Совместное определение МФК и АМФК в грунто-пылевой смеси методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.....	170
3.8 Определение продуктов гидролитической трансформации VX и VR в водных экстрактах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии.....	184
4. Разработка способов аналитического контроля продуктов трансформации сернистого иприта в биопробах.....	194
4.1 Разработка подхода хромато-масс-спектрометрического определения 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана].....	195
4.2 Разработка подхода одновременного хромато-масс-спектрометрического определения 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана	208
4.3 Экспрессное определение ТДГК в природных водах и моче методом ВЭЖХ-МС/МС.....	218
5. Разработка способа обнаружения и определения продуктов трансформации люизита методом ВЭЖХ-МС-МС.....	226
5.1. Определение хлорвиниларсонистой и хлорвиниларсоновой кислот в водных объектах методом капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием.....	226
5.2 Разработка способа одновременного обнаружения и определения ХВАК и ХВАОК методом ВЭЖХ-МС-МС.....	235
Выводы.....	253
Литература.....	255

Введение

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

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

специфичность) детектирования, что обеспечивает возможность решения наиболее сложных задач.

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

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

Список токсических веществ и их прекурсоров, для которых должны быть созданы и апробированы надежные способы обнаружения, указаны в Приложениях 1-3 Конвенции о запрещении разработки, производства, хранения и использования химического оружия КЗХО. Эти Приложения включают тысячи химических соединений, в частности, большую часть из них составляют органические вещества с различными физико-химическими свойствами: кислоты, основания, соединения с группами, содержащими гетероатомы фосфора, серы, мышьяка, фтора и/или хлора. В настоящей работе в качестве аналитов выбраны несколько классов элементарноорганических соединений, являющихся основными

продуктами трансформации нервно-паралитических ОВ (диалкилтаурины и О-алкилметилфосфоновые кислоты, алкилфосфоновые кислоты), иприта (продукты разложения под действием фермента β -лиазы, тиодигликолевая кислота) и люизита (2-хлорвиниларсоновая и 2-хлорвиниларсонистая кислоты), обладающих свойствами полярных соединений и относящихся к нелетучим веществам. Указанные вещества являются специфичными маркерами основных классов отравляющих веществ, т.е. не встречаются в окружающей среде и способны сохраняться в объектах анализа в течение длительного времени, а также по своему происхождению являются продуктами превращений отравляющих веществ.

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

Цель работы

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

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Поиск условий хроматографического разделения в различных вариантах (обращенно-фазовом и гидрофильном) ВЭЖХ анализа и характера ионизации и фрагментации в условиях масс-спектрометрического анализа с

электрораспылительной ионизацией и химической ионизацией при атмосферном давлении продуктов трансформации ОВ: диалкилтауринов и О-алкилметилфосфоновых кислот, алкилфосфоновых кислот, а также S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида (продукты разложения нервно-паралитических ОВ), метаболитов иприта, которые образуются в живых организмах под действием фермента β -лиазы, продуктов окислительного гидролиза иприта в живых организмах и в окружающей среде – тиодигликолевой кислоты, двух основных продуктов разложения люизита (хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот) в объектах окружающей среды и биопробах.

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

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

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

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

6. Расширение возможностей метода ВЭЖХ-МС(/МС) для обнаружения следов соединений, являющихся продуктами трансформации ОВ с

использованием упрощенных процедур пробоподготовки с последующим созданием стандартизованных подходов для определения соединений различных классов в ходе единственного цикла анализа.

Научная новизна

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

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

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

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

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

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

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

Практическая значимость

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

Предложены способы высокочувствительного определения:

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

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

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

- пинаколилметилфосфоновой кислоты, изобутилметилфосфоновой кислоты, изопропилметилфосфоновой кислоты и этилметилфосфоновой кислоты в

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты изучения ионизации продуктов трансформации боевых отравляющих веществ (серо-, мышьяк-, фосфорсодержащих и т.д.) и их

производных в условиях электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении.

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

- S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида в природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС.

5. Схемы скрининга:

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

Апробация работы и публикации

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

(Москва, Россия, 2015), 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (Шиофок, Венгрия, 2015), X Всероссийская конференция по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2016» (Углич, Россия, 2016).

Вклад автора

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

Публикации результатов

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

Структура и объём работы

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

1. Обзор литературы

Химическое оружие впервые было применено в ходе Первой Мировой Войны. В последующие годы оно использовалось неоднократно в локальных и международных конфликтах.

Известные боевые отравляющие вещества можно разделить на несколько групп, наиболее опасная из которых – это нервно-паралитические ОВ. Название данной группы ОВ обусловлено их направленным воздействием на нервную систему живых организмов. Нервно-паралитические ОВ необратимо связываются с ферментом ацетилхолинэстеразой, который отвечает за метаболизм ацетилхолина - медиатора, регулирующего работу нервной системы. В частности, один из представителей этого класса, зарин (изопропиловый эфир метилфторфосфоновой кислоты), применялся в боевых действиях против курдского населения Ирака в 1988 во время Ирано-Иракской войны, террористами в Японии в 1994 году, а также в токийском метро – в 1995 году. Несмотря на то, что террористы использовали примитивную тактику атаки (пакеты с заринном протыкались зонтиком) и применяли зарин с большим количеством примесей, жертвами этих терактов стали 12 человек и пострадали более 5000 человек, многие из которых остались инвалидами. Другой хорошо известный представитель класса нервно-паралитических ОВ О-этил-S-2-диизопропиламиноэтилметилфосфонат (VX) является одним из самых токсичных химических веществ когда-либо синтезированных человеком, имеет смертельную дозу, при экспозиции которой погибает 50 % испытуемых (LD_{50}), около 10 мг мин м^{-3} при аэрозольном поступлении в атмосферу.

Другая группа ОВ – кожно-нарывного действия – используется для причинения максимального числа ранений личному составу. Эти боевые отравляющие вещества воздействуют на слизистую оболочку глаз, легких что приводит к образованию блистеров (болезненных пузырей, наполненных жидкостью) на открытых участках кожи, подверженных воздействию ОВ. Иприт (1-хлор-2-(2'-хлорэтилтио)-этан) использовался в качестве основного боевого отравляющего вещества в годы Первой Мировой Войны и во второй половине 1980-х годов во время ирано-иракской войны. К данной группе ОВ также относится люизит (смесь изомеров β -хлорвинилдихлорарсина

(α -люизита), бис-(β -хлорвинил)хлорарсина (β -люизита) и трихлорида мышьяка), который является стойким ОВ и токсичен для человека при любых формах воздействия. Иприт и люизит способны проникать через материал защитных костюмов и противогазов.

К третьей группе ОВ относятся вещества, которые блокируют поступление кислорода в кровь и могут вызвать смерть от удушья. Основным представителем этого класса ОВ – синильная кислота – применялся в ходе Первой Мировой Войны.

К четвертой группе ОВ относятся вещества, обладающие не смертельным физиологическим воздействием на живой организм и воздействующие на психику и/или вызывающие рвоту. Данная классификация ОВ не является полной, но охватывает большинство общеизвестных ОВ.

Рекомендации по стратегии проведения анализа для обнаружения присутствия ОВ в объектах окружающей среды, биологических жидкостях и других объектах подробно описаны в работе Рыбальченко [2]. Задача определения ОВ и продуктов их трансформации важна при исследованиях в области оборонной промышленности, например, при разработках оборудования, которое используется для защиты от воздействия ОВ, обнаружения и дезактивации ОВ. При таких исследованиях требуется отбор проб газов, жидкостей и сложных матриц. Немаловажной является задача определения следовых количеств ОВ и продуктов их разложения в объектах окружающей среды при рекультивации площадок ликвидированных заводов, производивших ОВ, мест хранения ОВ, а также объектов по уничтожению ОВ.

Наиболее часто используемые методы для надежного обнаружения и идентификации ОВ, их прекурсоров и продуктов разложения, основаны на применении газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и/или тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС-МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС) и спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) [3-8].

1.1 Методы обнаружения и определения нервно-паралитических ОВ

Нервно-паралитические ОВ являются достаточно летучими соединениями и, наиболее часто используемым методом их определения является газовая хроматография, прежде всего в вариантах ГХ-МС и ГХ-МС-МС. Однако в водных объектах окружающей среды и живых организмах фосфорорганические нервно-паралитические ОВ быстро гидролизуются с образованием характерных нетоксичных соединений содержащих связи С-Р, которые редко встречаются в природе. Соответствующие примеры представлены на рисунке 1. Наиболее важным продуктом трансформации нервно-паралитических ОВ является замещенные алкилфосфоновые кислоты, каждая из которых уникальна и соответствует определенному нервно-паралитическому отравляющему веществу. В связи с этим, задача определения данного класса кислот является важной при исследованиях, направленных на установления факта присутствия соответствующего ОВ в местах возможного производства и хранения ОВ, даже в случаях если отравляющее вещество полностью разложилось.

1.1.1 Газовая хроматография и газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Методы ГХ-МС и ГХ-МС-МС распространенные подходы, используемые при обнаружении и идентификации нервно-паралитических ОВ и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды при их дезактивации. ГХ-МС анализ нервно-паралитических ОВ в варианте электронной ионизации (ЭИ) приводит к сильной фрагментации молекул, что дает ценную информацию о структуре неизвестных компонентов, тогда как применение более мягкого способа химической ионизации (ХИ), при использовании в качестве газов-реагентов метана, изобутана или аммиака, обычно позволяет получить информацию только о молекулярной массе.

Разработано большое число подходов, позволяющих проводить обнаружение и идентификацию нервно-паралитических ОВ и их метаболитов в объектах окружающей среды методами газовой хроматографии масс-спектрометрии и газовой хроматографии тандемной масс-спектрометрии [9-16].

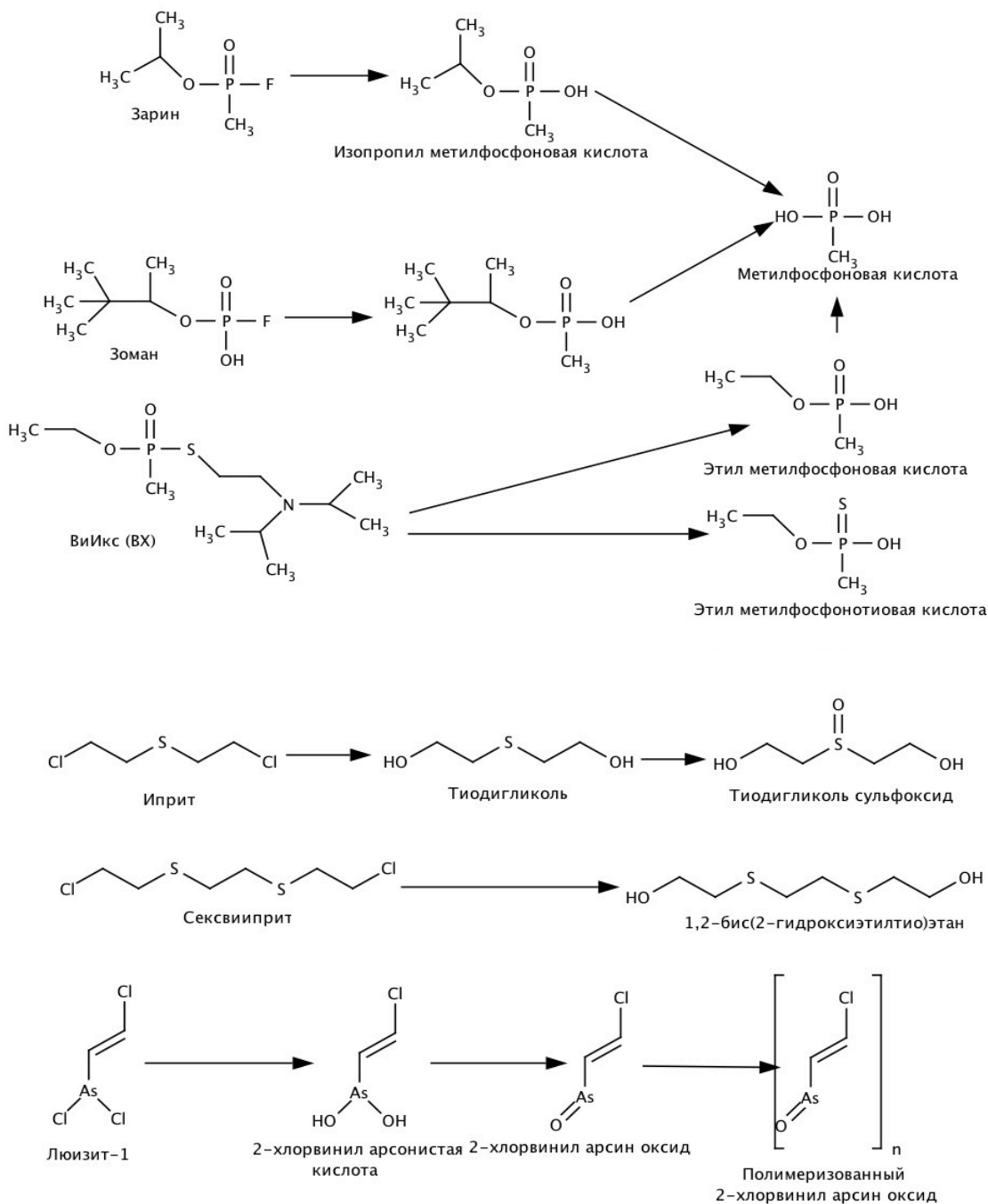


Рис. 1. Схемы реакций гидролиза фосфорорганических ОВ, иприта, его аналога (1,2-бис-(2-хлорэтилтио)-этана) и люизита.

Carrick и соавторы применяли автоматическую термическую десорбцию (АТД) для полуколичественного ГХ-МС анализа паров, содержащих смеси различных ОВ [17]. Пары отбирали при помощи сорбента Tenax TA. Преимуществом использования АТД по сравнению с десорбцией растворителем является увеличение чувствительности определения, так как анализируется весь образец, значительно сокращается время

анализа и отсутствует пик растворителя на хроматограмме. Предел обнаружения достигнутый в работе 50 нг/мл. К недостаткам этого подхода относится отсутствие образца для проведения повторного исследования. Stuff и соавторы применяли метод ГХ-МС для обнаружения следовых количеств зарина при исследовании эффективности разложения зарина этаноламином [18].

ГХ-МС/МС является мощным методом определения алкилфосфоновых кислот, однако его использование затрудняется недостаточной летучестью алкилфосфоновых кислот, поэтому для их определения методами газовой хроматографии требуется проведение предварительной дериватизации, которая может приводить к дополнительным ошибкам и увеличению трудоемкости анализа. В работе [19] в качестве дериватирующего реагента использовали триметилхлорсилан. Для изучения была выбрана смесь алкил метилфосфоновых кислот: этил- (ЭМФК), изопропил- (иПрМФК), изобутил- (иБуМФК), пинаколил- (ПинМФК), циклогексил- (ЦГМФК), которая была хроматографически разделена за 9 минут. Масс-спектр электронной ионизации (Рис. 2.) содержит основной сигнала m/z 153, во всех спектрах. Для него была предложена структура $\text{MeP}[\text{O}][\text{OH}][^+\text{O}=\text{Si}(\text{CH}_3)_2]$, соответствующая потере алкилсодержащей группы и триметилсилильного фрагмента. В режиме регистрации выбранных ионов наблюдался сигнал с m/z 75 $[\text{Me}_2\text{Si}=\text{OH}]^+$. Все 5 компонентов также фрагментируются с образованием общего иона, которому соответствует сигнал с m/z 169 (10-50 % интенсивности основного сигнала). Этому иону соответствует протонированная форма $\text{MeP}[\text{O}][\text{OH}]\text{OSi}[\text{Me}]_3$, получающаяся потерей алкилсодержащей группы. При замене способа ионизации на химическую, основные направления фрагментации сохранились, однако интенсивность сигнала с m/z 169 превосходила интенсивности сигнала с m/z 153. Максимальная селективность и чувствительность были достигнуты при использовании тандемной масс-спектрометрии. Определение проводили в режиме сканирования выделенных ионных переходов (m/z 153→75) Пределы обнаружения составили 2 мкг/мл для всех кислот, кроме ЦГМФК, для ЦГМФК – 5 мкг/мл.

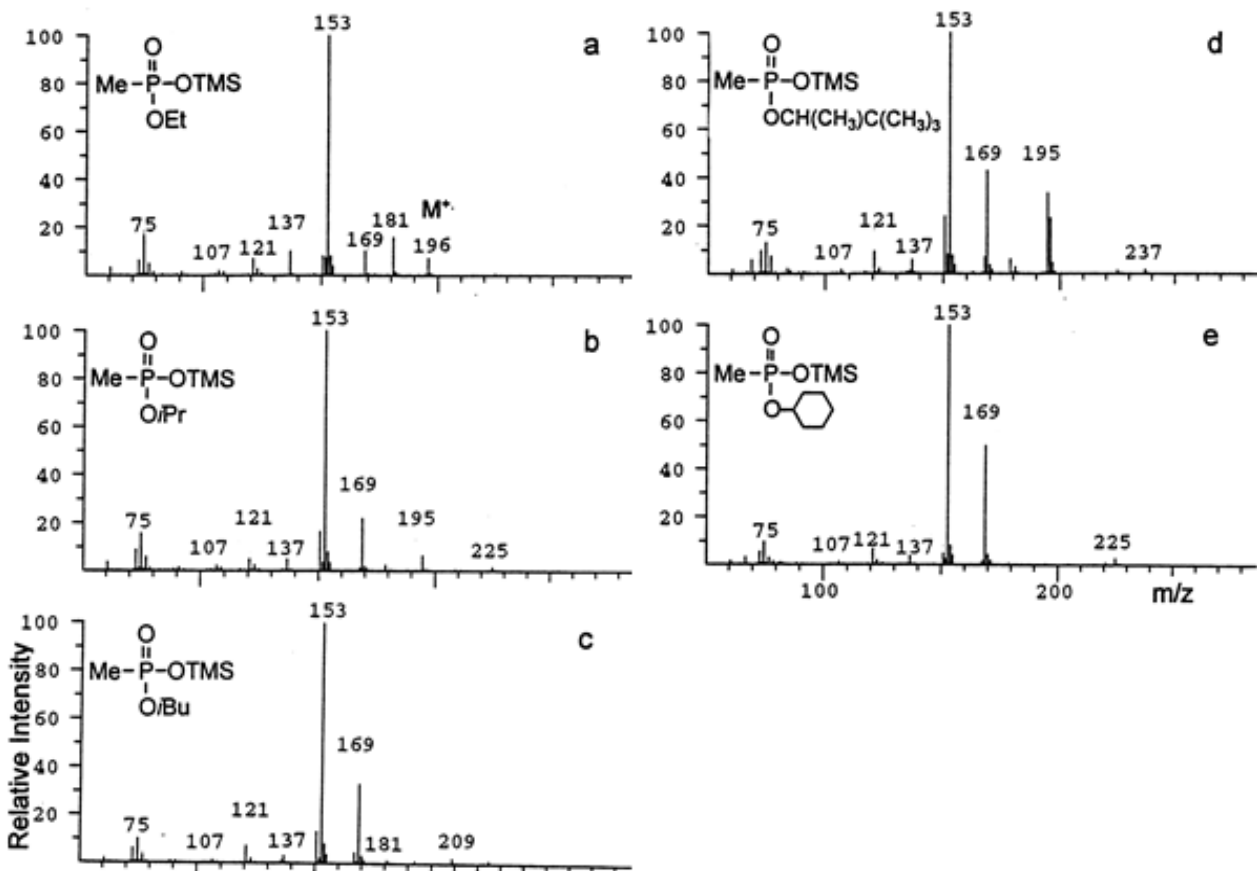


Рис. 2. Масс-спектры электронной ионизации триметилсильных эфиров алкил метилфосфоновых кислот: а – ЭМФК, б – иПрМФК, с – иБуМФК, д – ПинМФК, е – ЦГМФК.

Rohrbaugh опубликовал две работы на данную тему. Первой была опубликована работа, посвященная использованию ГХ-МС в вариантах электронной и химической ионизации при определении продуктов гидролиза VX [20]. Позднее работа посвященная определению продуктов термической деструкции образцов VX [21]. Сравнивались масс-спектры полученные при использовании в качестве газов-реагентов метана и метанола. Использование метанола оказалось более предпочтительным, так как в масс-спектрах наблюдалось снижение интенсивности фрагментных ионов по сравнению с метаном, что приводило к увеличению чувствительности определения. Отмечается, что метанол удобнее при хранении и транспортировке, в отличие от метана или других газов-реагентов, требующих баллоны для их хранения. Идентификация и исследование специфических фрагментов маркеров применения фосфорорганических отравляющих веществ описано в ряде работ [22, 23]. Данные подходы позволяют с высокой надежностью определять и идентифицировать соединения этого класса.

Kataoka и соавторы изучали экстракционное извлечение алкилфосфоновых кислот из различных почв, морской воды и напитков, используя дериватизацию с трет-бутилдиметилсиланом (ТБДМС) с последующим ГХ-МС определением [24 - 26]. Авторы наблюдали невысокие степени извлечения и низкие выходы реакции дериватизации. На основании полученных данных авторы сделали вывод, что предварительная очистка водных экстрактов почв и морской воды на макропористых анионообменных сорбентах позволяет эффективно удалять мешающие дериватизации компоненты, несмотря на то, что выход реакции дериватизации силилированием ТБДМС составляет 28 - 71% для производных VX. Алкилфосфоновые кислоты сорбировали на смоле и элюировали 0.1 М раствором HCl. Элюат нейтрализовали NaHCO₃ (до pH 7) и высушивали с последующим перерастворением, дериватизацией и вводом в хроматографическую систему ГХ-МС. Предел обнаружения в режиме регистрации выбранных характеристичных ионов составил 0.2 мг на грамм почвы с повторяемостью результатов 20 %.

Авторы работ [27, 28, 29] использовали процедуру твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) при извлечении нервно-паралитических ОВ из водных растворов. В работе [28] зарин экстрагировали из водных растворов и проб воздуха, в работе [29] в ходе экстракции использовали дериватизацию ТБДМС с дальнейшим анализом проб методом ГХ-МС. Образцы после процедуры ТФМЭ подвергали воздействию дериватирующего реагента в течение 5 мин с последующим экстрагированием получаемых производных. Пределы обнаружения составили 10-100 нг/мл при определении алкилметилфосфоновых кислот. Воспроизводимость представленного метода ТФМЭ недостаточна (повторяемость результатов составляет 10-35 %). Тем не менее, метод ТФМЭ является подходящим для сбора образцов и последующей доставки их в лабораторию для дальнейшего анализа.

При определении метилфосфоновых кислот в сыворотке крови человека появляются дополнительные сложности с выделением исследуемых веществ. Авторами статьи [30] была предложена следующая схема пробоподготовки для анализа ЭМФК, представленная на Рис. 3.

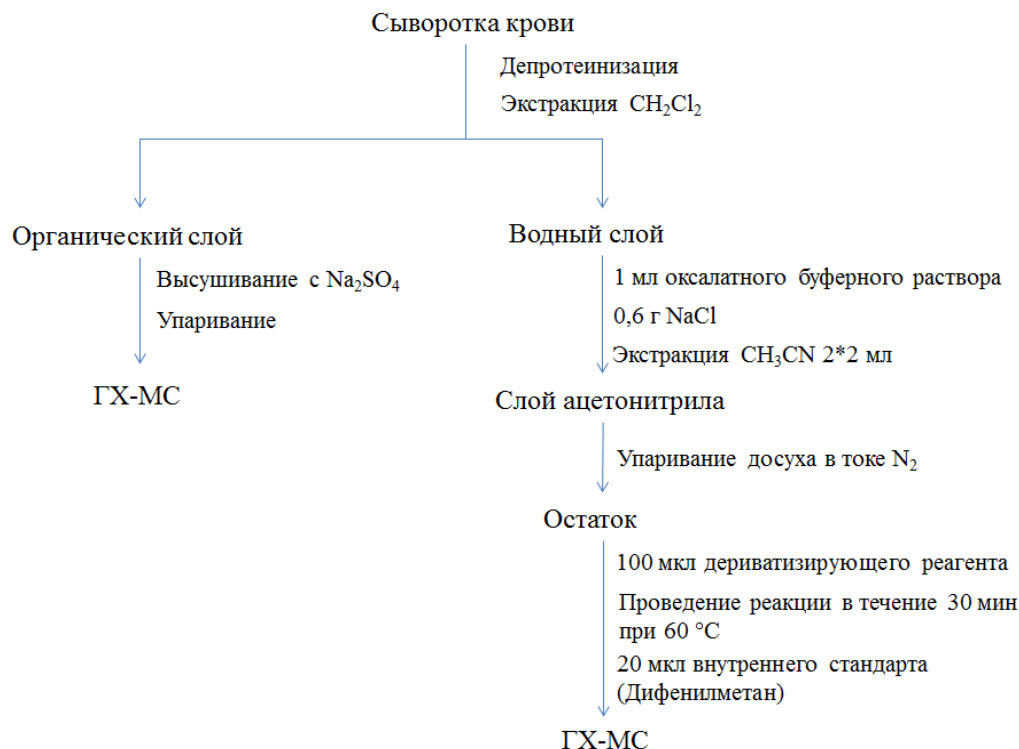


Рис. 3. Схема проведения пробоподготовки для анализа ЭМФК в сыворотке крови.

Образцы сыворотки крови очищали от белков при помощи ультрафильтрации. Затем определяемые компоненты из фильтрата экстрагировали 1 мл дихлорметана и путем центрифугирования разделяли органический и водный слои. Органический слой анализировали на содержание VX, тогда как водный слой подвергали повторной экстракции и дериватизации. В качестве дериватирующего реагента была выбрана смесь, состоящая из трет-бутилдиметилсилилового эфира (1%) и N-метил-N-(трет-бутилметилсилил)трифторацетамида (99%)

Предложены различные способы очистки веществ: жидкостная экстракция, твердофазная экстракция и упаривание досуха в токе азота при температуре 60°C без экстрагирования. Для первого способа максимальная степень извлечения возможна при использовании ацетонитрила в качестве экстрагирующего растворителя. Для второго способа использовали анионообменный картридж Sep-Pak QMA. Исследуемые образцы элюировали 0.1 М HCl в метаноле, а затем упаривали досуха в токе азота. В спектрах, получаемых при исследовании образцов, подготовленных по данной схеме присутствовали сигналы посторонних компонентов, поэтому данный способ сразу был

отклонен. Наименьшее количество примесей зафиксировано в хроматограмме при использовании третьего способа, однако степень извлечения первым способом была значительно выше, поэтому жидкостная экстракция оказалась предпочтительна остальным способам пробоподготовки. Детектирование вели в режимах полного сканирования и регистрации выбранных ионов, используя электронную ионизацию. Градуировочный график линеен в диапазоне от 50 до 500 нг/мл в режиме полного сканирования, и в диапазоне от 5 до 50 нг/мл в режиме регистрации выбранных ионов.

При использовании газовой хроматографии дериватизацию можно проводить не только предварительно в растворе, но и в инжекторе газового хроматографа. Авторы статьи [31] предложили способ дериватизации метилфосфоновых кислот гидроксидом триметилфениламмония. Смесь метилфосфоновых кислот (иПрМФК; 1,2,2-триметилпропил МФК) в смеси с гидроксидом триметилфениламмония в метаноле вводилась в инжектор газового хроматографа при высокой температуре. Максимальный выход дериватизации наблюдался при температуре инжектора 300°C. Предел обнаружения для иПрМФК и 1,2,2-триметилпропил МФК составил 2 нг/мл при соотношении сигнал / шум равном 3.

В работе [32] был предложен усовершенствованный вариант дериватизации, без перевода метилфосфоновых кислот в органическую фазу. В раствор МФК добавляли K_2CO_3 , диазопропиламин и алкилбромид в качестве дериватирующего реагента. Алкилбромид при взбалтывании с водным раствором образовывал микроэмульсию. Затем в реакционную смесь добавляли ацетонитрил и перемешивали в течение 4 часов при температуре 100°C. После протекания реакции в реакционную смесь добавляли дихлорметан для разрушения микроэмульсии, отделяли органический слой, а остатки продукта из водного слоя экстрагировали диэтиловым эфиром. Степень извлечения составила около 65 %.

Также помимо масс-спектрометрических детекторов, хорошие результаты были получены при применении пламенно-фотометрического детектора. Например, в работе [33] представлены данные по определению МФК, ЭМФК, иПрМФК при помощи ГХ и пламенно-фотометрического детектора в образцах грунтовых вод. Смесь

метилфосфоновых кислот была протериватизирована в инжекторе газового хроматографа метанольным раствором гидроксидом триметилфенилammония при температуре 200°C. Полное разделение и определение проходило за 7 минут, пределы обнаружения составили 8.5, 4.5, 2.9 нг/мл для МФК, ЭМФК, иПрМФК соответственно. Степени извлечения: 53% для МФК, 95% для ЭМФК и 91% для иПрМФК.

В работе [186] описано использование фотоионизации при атмосферном давлении для ГХ-МС определения ряда производных метилфосфоновых кислот.

1.1.2 Ионная хроматография и ионная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Бразильские авторы проводили определение МФК, ЭФК, ПФК и БуФК при помощи ионной хроматографии с косвенным спектрофотометрическим детектированием [34]. В качестве внутреннего стандарта использовали фенилфосфоновую кислоту (ФФК). В работе проводили сравнения 4 хромофорных анионов-элюентов: фталата, бензоата, фенилфосфоната и п-толуолсульфата. При использовании фталата в качестве элюента было достигнуто приемлемое разделение и получен широкий диапазон линейности градуировочного графика.

Хроматографическое разделение проводили на колонке IC-Pak Anion LC column (50 мм × 4.6 мм) с емкостью 30 мэкв/мл. Оптимальным значением концентрации фталата натрия была выбрана концентрация 0,4 мМ (рН 8,5). Скорость потока составила 1 мл/мин. Разделение было достигнуто за 13 минут с временами удерживания для: МФК – 8.6; ЭФК – 8.0; ПФК – 8.4; БуФК – 9.1 и 13.2 для ФФК.

Детектирование проводили при длине волны 272 нм. Для исследуемых веществ были получены следующие пределы обнаружения, представленные в Табл. 1.

Табл. 1. Пределы обнаружения алкилфосфоновых кислот

Соединение	МФК	ЭФК	ПФК	БуФК
Предел обнаружения, мкг/мл	0.4	0.2	0.45	1

Авторами статьи [35] был предложен простой, быстрый и надежный способ определения метилфосфоновых кислот (МФК, ЭМФК, иПрМФК, ПинМФК) в сыворотке крови человека при помощи ионной хроматографии с косвенным спектрофотометрическим детектированием.

Было испробовано три способа пробоподготовки: упаривание досуха в токе азота, твердофазная экстракция и экстракция ацетонитрилом. Наилучшие результаты продемонстрировала первая методика, в которую, однако, была включена очистка образцов от высокого содержания хлоридов при помощи ионообменного Ag^+ картриджа. Степени извлечения составили от 80 до 95 % для различных метилфосфоновых кислот.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Shim-pack IC-A3 (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из 0,5 мМ фталевой кислоты, 0.1 мМ Трис и 5% ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Разделение было достигнуто за 30 мин. На Рис. 4 представлена хроматограмма образца сыворотки крови с концентрациями аналитов 250 нг/мл.

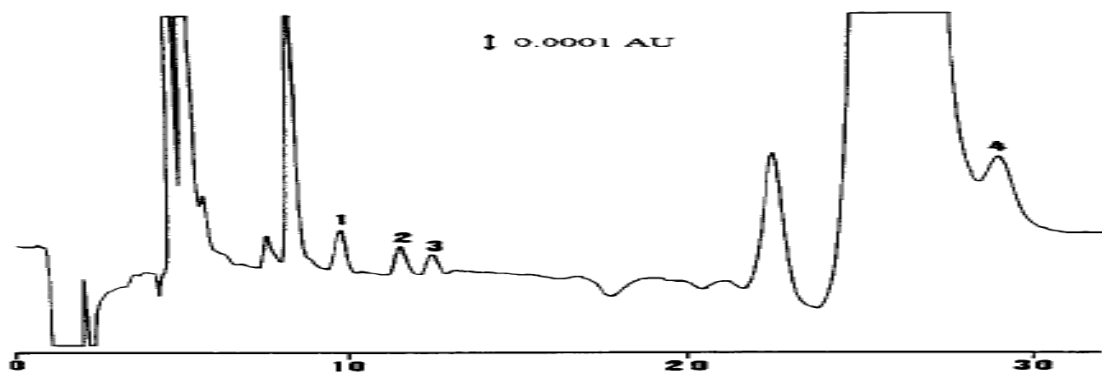


Рис. 4. Хроматограмма сыворотки крови с концентрациями аналитов 250 нг/мл. 1 – МФК, 2 – ЭМФК, 3- иПрМФК, 4 – ПинМФК.

Детектирование проводили при длине волны 266 нм. Пределы обнаружения составили 40 нг/мл для МФК, ЭМФК, иПрМФК и 80 нг/мл для ПинМФК.

Описана попытка стыковки ионного хроматографа с масс-спектрометрическим детектором для определения схожего по свойствам с алкилфосфоновыми кислотами соединения - метилфосфоната. В работе [36] использовали обычную колонку для ионной хроматографии IonPac AS 11. В качестве подвижной фазы выступал гидроксид

натрия. Разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Путем изменения концентрации NaOH от значения 4 mM до 36 mM было достигнуто полное разделение за 15 минут. Так как гидроксид натрия плохо сочетается с масс-спектрометром, то до подачи в камеру с электрораспылительной ионизацией, после прохождения подавителя поток подвижной фазы разделяли в соотношении 99:1 и смешивали с равным количеством смеси ацетонитрил-вода с содержанием 0.5% аммиака.

1.1.3 Капиллярный электрофорез и капиллярный электрофорез с масс-спектрометрическим детектированием.

Одну из первых работ [37], в которых алкилфосфоновые кислоты определялись методом капиллярного электрофореза, опубликовали Robins и Wright. Алкилфосфоновые кислоты не поглощают в УФ диапазоне, это свойство делает невозможным их определение при помощи наиболее распространенного для КЭ УФ детектора. Авторы нашли выход из сложившейся ситуации путем перевода алкилфосфоновых кислот в комплекс с боратом натрия, который поглощает УФ излучение в диапазоне от 220 до 280 нм. Борат натрия использовался также в качестве основы буферного раствора. Структура образующегося комплекса представлена на Рис. 5.

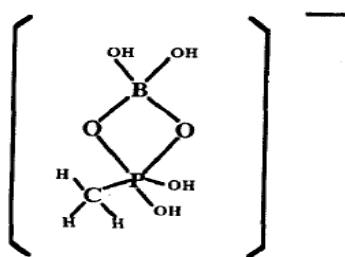


Рис. 5. Структура комплекса МФК с боратом натрия.

Для подтверждения структуры комплекса применяли ИК спектроскопию, ЯМР и масс-спектрометрию. Для алкилфосфоновых кислот была получена высокая эффективность разделения от 229000 ГТ для МФК и 1740000 ГТ для ЭФК. Также было показано, что в случае прямого УФ детектирования, число теоретических тарелок преобладало в 6 раз над числом теоретических тарелок в случае косвенного УФ детектирования.

Bossle и Oehrle [38] определяли продукты гидролиза ФОВ: МФК, ЭМФК, иПрМФК, ПинМФК при помощи капиллярного электрофореза и косвенного УФ детектирования (254 нм). Разделение проходило за 5 минут. В качестве буферного электролита использовали хромат-ион с добавками модификатора, обращающего электроосмотический поток. Для удаления мешающего влияния карбонат-ионов, элюирующихся вместе с МФК, образцы пропускали через картридж Milli-Trap H⁺. Образцы воды с высоким содержанием хлоридов, пропускали через смолу с привитыми ионами Ag⁺. После данных стадий пробоподготовки удалось добиться полного удаления мешающего влияния матричных компонентов.

В работе [39] проводилось одновременное определение 9 продуктов гидролиза ФОВ, среди которых были МФК и ЭФК. Алкилфосфоновые кислоты и эфиры алкилфосфоновых кислот определяли методом капиллярного зонного электрофореза и косвенного УФ детектирования. Сорбат-анион был выбран в качестве хромофорного соединения из-за его высокого коэффициента молярного поглощения, а декаметоний бромид для снижения электроосмотического потока. При оптимальном составе электролита (5 мМ сорбиновая кислота, 0,1 мМ декаметоний бромид и рН 6) удается добиться одновременного разделения аналитов менее чем за 15 минут. Градуировочный график в экстрактах из почв был линейен в диапазоне от 5-50 мкг/мл.

В работе [40] авторы одновременно определяли алкилалкилфосфоновые кислоты при помощи капиллярного зонного электрофореза с косвенным УФ детектированием. Для уменьшения времени анализа и увеличения эффективности, авторы обращали электроосмотический поток за счет промывки кварцевого капилляра 0,2% водным раствором полибрена. В работе были тщательно исследованы и подобраны значения напряжения на концах капилляра и температура капилляра. Для исследования соотношения сигнал-шум и воспроизводимости электроосмотического потока в систему был добавлен гидроксилламин, увеличивающий емкость буфера. Электролит, состоящий из 5 мМ сорбат-аниона (рН 6) и 1.6 мМ гидроксилламина позволял провести анализ алкилфосфоновых кислот всего за 6 минут.

Kostiainen и соавторы [41] одни из первых определяли алкилфосфоновые кислоты методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием и электрораспылительной ионизацией. В работе использовали 20 мМ ацетат аммония (рН 9) в качестве буферного раствора. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации отрицательных ионов. В спектрах наблюдались интенсивные депротонированные молекулы $[M-H]^-$, практически без фрагментации. Фрагментные ионы получали при помощи повышения входного напряжения. Данным методом удастся достичь очень хорошего хроматографического разрешения алкилфосфоновых кислот. Диапазон линейности градуировочного графика лежал в диапазоне от 5-100 мкг/мл.

Mercier с коллегами опубликовали статью [42], в которой использовали капиллярный электрофорез с масс-спектрометрическим детектированием. В работе определяли алкилфосфоновые кислоты при помощи косвенного УФ детектирования, а также тандемной масс-спектрометрии. Применение сорбата аммония (рН 6.5) в качестве электролита позволило одновременно проводить как косвенное УФ, так и масс-спектрометрическое детектирование. Масс-спектры получали в варианте регистрации отрицательных ионов при помощи электрораспылительной ионизации. Алкилфосфоновые кислоты давали интенсивные сигналы депротонированных молекул $[M-H]^-$, а также характерно фрагментировались в режиме MS-MS. В режиме регистрации выбранных ионов были получены пределы обнаружения на уровне 5 мкг/мл.

Mélanie Lagarrigue опубликовал работу [43] по капиллярному электрофорезу с масс-спектрометрическим детектированием в ионной ловушке. В работе применяли капиллярный электрофорез и ионную ловушка для анализа алкилфосфоновых и алкил алкилфосфоновых кислот. В качестве электролита использовали 5 мМ ацетат аммония (рН 8.8). Для оценки селективности капиллярного электрофореза и возможностей масс-спектрометрического детектирования использовали смесь, состоящую из пяти алкилфосфоновых кислот и пяти алкил алкилфосфоновых кислот, содержащих изомерные соединения. Метод весьма ограничен в случае изомерных алкил

алкилфосфоновых кислот, в то время как в случае иПрМФК и ПрМФК удалось добиться разделения. Использование тандемной масс-спектрометрии привело к однозначному определению каждой изомерной соэлюирующейся алкил алкилфосфоновой кислоты, благодаря наличию в масс-спектре характеристических фрагментных ионов. Однако, в случае изомерных иПрМФК и ПрМФК требовалось полное разделение, так как их спектры идентичны. Разработанный метод был применен к анализу экстрактов из почв.

Одним из малоизученных классов соединений, присутствие которых косвенно указывает на применения, хранения, производства и переработки высокотоксичных фосфорорганических отравляющих веществ являются 2-(N,N-диалкиламино)-этансульфоновых кислоты (диалкилтаурины) – замещенные производные таурина. В отличие от таурина, 2-(N,N-диалкиламино)-этансульфоновые кислоты в природе не встречаются, а являются продуктами окислительной трансформации т.н. V-газов - фосфорорганических веществ, используемых в качестве нервно-паралитических отравляющих веществ.

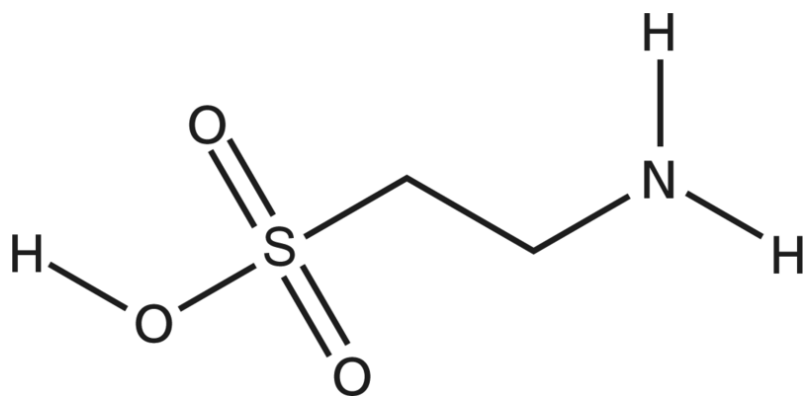


Схема (рис. 6) показывает процесс разложения ФОВ VX в окружающей среде (образующийся тиол окисляется затем в сульфокислоту):

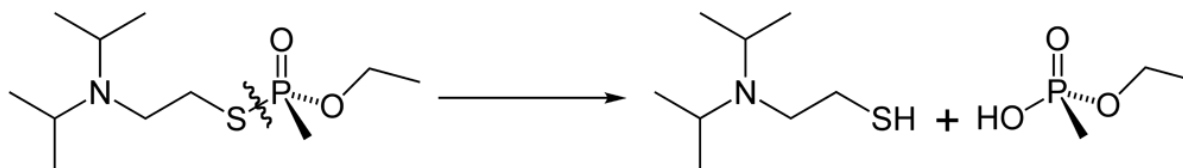


Рис. 6. Схема превращения VX в окружающей среде.

В доступной литературе не описано подходов для разделения и определения исследуемых замещенных тауринов, однако встречается множество работ посвященных таурину. Так использование метода капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ) позволяет достигать приемлемой чувствительности и селективности при определении производных таурина в объектах со сложной матрицей. К настоящему моменту существует ряд работ посвященных анализу [44-47,48] или идентификации [49] таурина, которые в основном основаны на дериватизации аминогруппы таурина различными реагентами.

В работе [45] разработана быстрая и чувствительная методика КЗЭ для анализа таурина в плазме. Разделение основано на отличии ионизации полученного производного таурина от производных других аминокислот ввиду отличий свойств сульфокислотной и карбоксильной группы. Показанный подход позволяет определять 1 мкг/мл таурина в плазме с относительным стандартным отклонением 4,5%.

Последующие работы так же основаны на реакциях дериватизации аминогруппы таурина такими реагентами как ФМОХ (9-флуоренилметил хлороформиат, [44]), ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат, [46]), НДА (нафталин-2,3-дикарбоксальдегид, [49]) и ФХА (5-фууроилхинолин-3-карбоксальдегид, [47]) с последующим спектрофотометрическим, флуоресцентным и лазерно-индуцированным флуоресцентным детектированием.

1.1.4 Жидкостная хроматография и жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Одной из первых работ, в которых применялась жидкостная хроматография для анализа алкилфосфоновых кислот, является работа Bossle [50]. Для детектирования алкилфосфоновых кислот автор использовал УФ детектор. Основным недостатком определения алкилфосфоновых кислот при помощи УФ детектора является их слабое поглощение в УФ. Поэтому для их определения требуется предварительная дериватизация. Авторы работы проводили дериватизацию в течение 1 часа при температуре 60°C с выходом более 95 %. Реакция дериватизации представлена на Рис. 7. Целью данной работы было разделить смесь трех алкилфосфоновых кислот ЭМФК, иПрМФК и ПинМФК. Хроматографическое разделение проводили на колонке Waters

Associates μ Bondapak C18 column (300 мм \times 4 мм). В качестве подвижной фазы выступала смесь ацетонитрил-вода. Подвижная фаза подавалась со скоростью 2 мл/мин. Полное разделение было достигнуто за 25 минут в режиме градиентного элюирования. Детектирование вели при длине волны 254 нм. Градуировочный график дериватизированных кислот был линейен в диапазоне 0.2-10.0 мкг/мл.

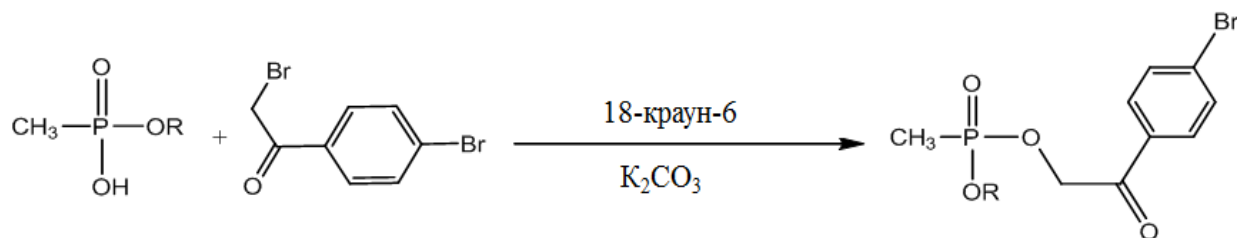


Рис. 7. Реакция дериватизации алкил алкилфосфоновых кислот.

Первое применение метода ВЭЖХ-МС для определения фосфорорганических ОВ описано в работе [51]. В данной работе было определено 13 фосфорорганических веществ с применением ион-парной хроматографии и термоспрея. Ацетат аммония и тетраалкиламмониевые соли (метил, этил и н-бутил) использовали в качестве ион-парного реагента. В работе рассматривали влияние ацетата аммония и тетраалкиламмониевых солей на хроматографическое поведение и масс-спектры фосфорорганических кислот. Хроматографическое разделение проводили на колонке с размерами 250 мм \times 5 мм, с 5 мкм сорбентом LiChrosorb C18. В качестве подвижной фазы выступала вода с ацетатом аммония и тетраалкиламмониевыми солями, а также добавками метанола для элюирования сильно удерживаемых кислот. Разделение вели в изократическом режиме со скоростью потока 1.5 мл/мин. Когда ацетат аммония добавляли постколоночно со скоростью 0.3 мл/мин, скорость потока через колонку была 1.2 мл/мин. При использовании только ацетата аммония оптимальная ионизация наблюдалась при концентрации ацетата аммония 0.1 М. Несмотря на то, что полярные кислоты имели низкие времена удерживания, удалось добиться их разделения. Для уменьшения времени удерживания фосфорорганических кислот с длинной

углеводородной цепью, таких как ПинМФК, необходимы добавки метанола. На Рис. 8 и 9 представлены хроматограммы смеси алкилфосфоновых кислот при использовании ацетата аммония в качестве ион-парного реагента.

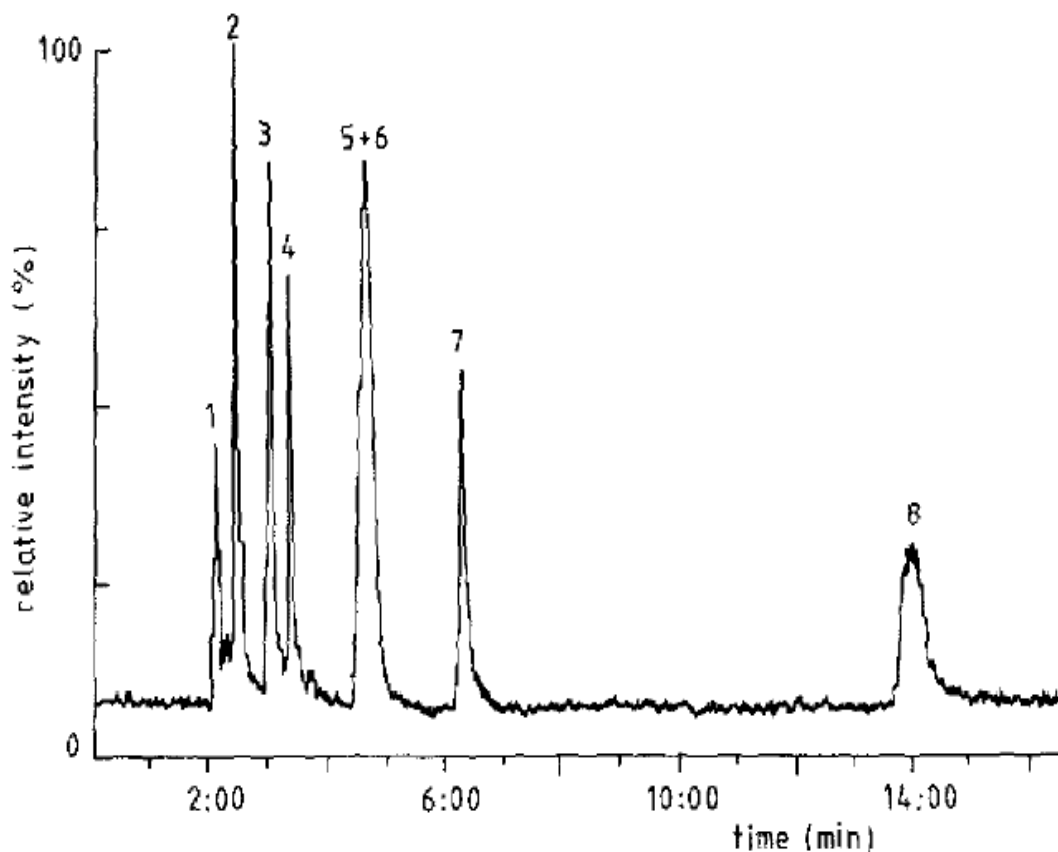


Рис. 8. Хроматограмма по выделенным ионам в варианте регистрации положительных ионов смеси фосфоновых кислот: 1- МФК, 2 – ДМФ, 3 – ЭМФК, 4 – ДМТФ, 5- ЭМТФ, 6 – иПрМФК, 7- ДЭФ, 8- ДЭТФ. Элюент – 0,1 М ацетат аммония (рН 6.8).

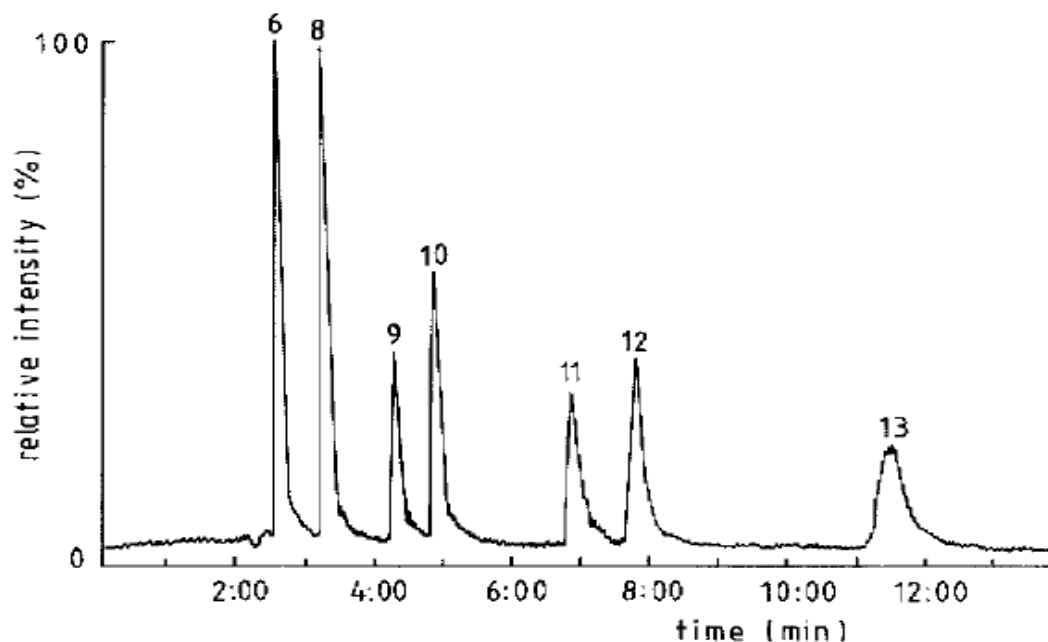


Рис. 9. Хроматограмма по выделенным ионам в варианте регистрации положительных ионов смеси фосфоновых кислот: 6- иПрМФК, 8 – ДЭТФ, 9 – ЦПМФК, 10 – ДиПрФ, 11- ЦГМФК, 12 – ДиПрТФ, 13- ПинМФК. Элюент – 0,1 М ацетат аммония – метанол 70 -30 (рН 6.8).

Главными недостатками использования ацетата аммония являлись низкие времена удерживания гидрофильных алкилфосфоновых кислот. Добавление солей тетраалкиламмония привело к увеличению времен удерживания соответствующих алкилфосфоновых кислот. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании солей тетрабутиламмония.

Масс-спектрометрическое определение проводили при помощи термоспрея. Детектирование вели в режиме регистрации положительных ионов. При использовании ацетата аммония наблюдались интенсивные сигналы аддуктных ионов $[M+NH_4]^+$ и определение вели в режиме регистрации иона $[M+NH_4]^+$. При использовании тетрабутиламмония в спектре наблюдались сигналы, соответствующие двум аддуктным ионам $[M+C]^+$ и $[(A)(C)_2]^+$ (А - анион, С - катион). Чувствительность в случае использования тетрабутиламмония падала в 50 раз за счет снижения интенсивности сигнала соответствующих ионов. Поэтому было решено использовать смесь ацетата аммония и тетрабутиламмония. Ацетат аммония добавлялся постколоночно, а через колонку пропускали раствор тетрабутиламмония с концентрацией 0.1 мМ. При данной концентрации тетрабутиламмоний сохранил свои ион-парные свойства, а в спектре наиболее интенсивным был сигнал от иона $[M+NH_4]^+$, по которому вели определение.

В дальнейшем по этой теме этими же авторами было опубликовано несколько работ [52, 53]. В работе [53] авторы демонстрируют различие масс-спектров VX, полученных в вариантах электронной ионизации, ионизации термоспреем и химической ионизации с газом-реагентом аммиаком. Было выяснено, что вид масс-спектров зависит от элюента. В связи с тем, что ионизация термоспреем является мягкой, спектры имеют мало интенсивных пиков фрагментов и, следовательно, имеют низкую ценность для целей идентификации.

Торнес [54] разработал способ идентификации алкил метилфосфоновых кислот в водных растворах методом ВЭЖХ-МС-МС в варианте ионизации термоспреем.

Использование МС-МС детектирования позволило существенно увеличить соотношение сигнал-шум и в результате предел обнаружения достиг 100 нг мл^{-1} . Для достоверной идентификации при МС-МС детектировании выбирали несколько ионных переходов и в качестве параметра идентификации использовали величину соотношения интенсивностей этих переходов в масс-спектре.

Одни из первых и основополагающих работ [55, 56] по определению продуктов гидролиза фосфорорганических ОВ методом ВЭЖХ-МС с использованием электрораспылительной ионизации провели Robin M. Black, Robert W. Read.

В первой работе [55] метод ВЭЖХ-МС с электрораспылительной ионизацией применялся для широкого одновременного скрининга 19 продуктов метаболизма различных ОВ при одном вводе образца. Разделение проводилось на смешанной обращенно-фазовой колонке с привитыми группами C_8/C_{18} с градиентным элюированием в системе вода-ацетонитрил с добавкой 0.05% трифторуксусной кислоты. Предел обнаружения в водных растворах (в отсутствии влияния матрицы реальной пробы) в режиме сканирования положительных ионов оказался в диапазоне от 10 до 400 нг/мл с пределом обнаружения для алкилметилфосфоновых кислот на уровне 50-100 нг/мл и высоким пределом обнаружения для метилфосфоновой и этилфосфоновой кислот – 400 нг/мл.

В работе [56] авторы пытались добиться более низких пределов обнаружения и провели сравнение электрораспылительной ионизации с химической при атмосферном давлении.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Nichrom RPB column (Nichrom, Theale, UK, 250 мм × 2.1 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы выступали смеси, состоящие из 0.1% муравьиной кислоты, 0.05 % трифторуксусной кислоты либо формиата аммония в воде (А) и в ацетонитриле либо метаноле (Б). Хроматографические условия разрабатывались для разделения смеси МФК, ЭФК, ЭМФК, ЭЭФК, ПрФК, иПрМФК, ЦГМФК и ПинМФК. Наилучшую чувствительность определения наблюдали при использовании 0.1% муравьиной кислоты в воде и метаноле. Проводили

градиентное элюирование: 0-5 мин. 5% Б, с 5-15 мин. 5-80% Б, 15-22 мин. 80% Б при скорости потока 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл.

Масс-спектрометрическое определение проводили при помощи электрораспылительной и химической ионизации при атмосферном давлении в варианте регистрации положительных ионов. Детектирование вели в режиме регистрации выбранных ионов. Для МФК был выбран ион с m/z 95, ЭФК – m/z 111, ЭМФК – m/z 125, ЭЭФК m/z 139, ПФК – m/z 125, ИМФК – m/z 139, циклогексил МФК – m/z 179 и m/z 181 для ПМФК.

При использовании подвижной фазы, состоящей из 0.05% трифторуксусной кислоты в воде и ацетонитриле, электрораспылительная ионизация оказалась более предпочтительной, чем химическая ионизация при атмосферном давлении. Так как интенсивности сигнала ионов, выбранных для детектирования, были в два раза выше. Таким образом, для дальнейших экспериментов с подвижной фазой, использовалась только электрораспылительная ионизация. Наиболее значительное, десятикратное, увеличение чувствительности происходило при использовании 0.1% муравьиной кислоты за счет увеличения интенсивности сигнала детектируемых ионов. В качестве второго компонента подвижной фазы, наилучшие результаты достигали при использовании метанола, так как с ним практически не образовывались аддуктные ионы, в отличие от ацетонитрила. В спектрах МФК и алкилфосфоновых кислот были зарегистрированы только аддукты с метанолом и щелочными металлами. Использование обращенно-фазовой хроматографии устраняет проблему загрязненности образцов солями, так как они не удерживаются на колонках. Но двухвалентные катионы, такие как кальций, могут сильно мешать определению алкилфосфоновых кислот, поэтому они должны быть удалены, при помощи катионообменного картриджа. При использовании 0.05 М формиата аммония детектировали отрицательные ионы. Но чувствительность также оказалась хуже, нежели в случае муравьиной кислоты.

В работе также проводили фрагментацию соответствующих алкилфосфоновых кислот, и была показана возможность их дальнейшего МС/МС определения. Для всех водных стандартов были получены пределы обнаружения < 50 нг/мл.

Авторами работы [57] впервые был представлен метод разделения продуктов гидролиза VX на набивных капиллярных колонках для жидкостной хроматографии и их дальнейшего масс-спектрометрического определения с электрораспылительной ионизацией.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax C18 SB (150 мм × 0.32 мм, 5 мкм). Элюирование проводили подвижной фазой состоящей из 0.1% трифторуксусной кислоты в воде (А) и 0.1% трифторуксусной кислоты в смеси ацетонитрил-вода (95:5) (Б). Наилучшее разделение было достигнуто при использовании градиентного элюирования. За 30 мин содержание Б менялась от 1-75%. Для снижения эффекта нулевого объема подвижная фаза подавалась со скоростью 200 мкл/мин и непосредственно перед инжектором разделялась таким образом, чтобы подвижная фаза перемещалась через колонку со скоростью 5 мкл/мин.

В образце прогидролизованного VX было обнаружено 38 соединений (Рис. 10.), две трети из которых были идентифицированы.

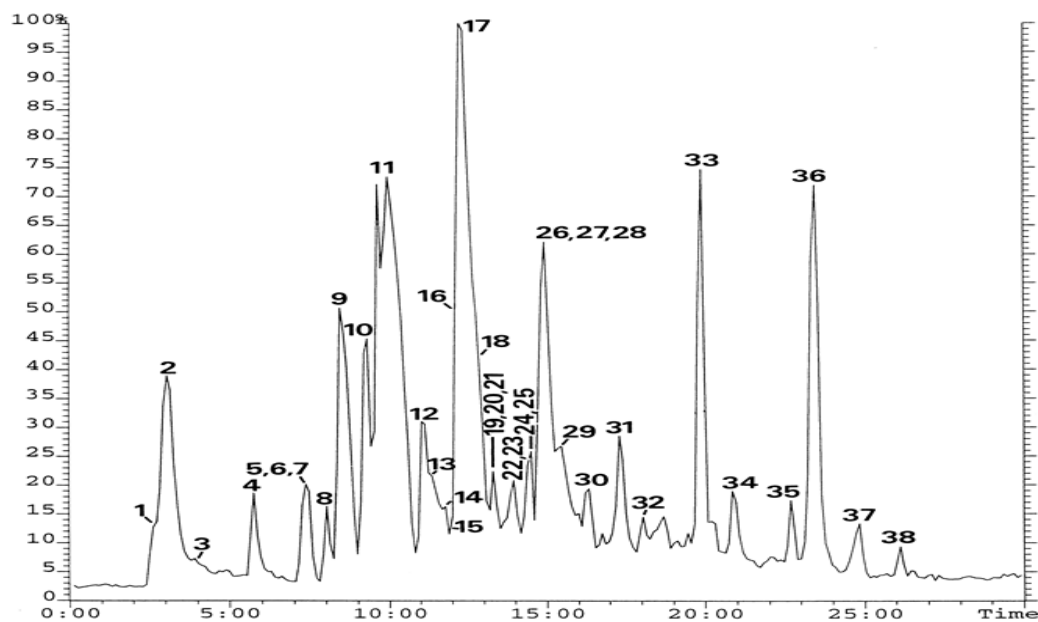


Рис. 10. Хроматограмма разложившегося образца VX по полному ионному току на капиллярной колонке Zorbax C18 SB (150 мм × 0.32 мм, 5 мкм).

Авторы работы относят к достоинствами метода тот факт, что ими было подобрано такое входное напряжение, при котором в спектре помимо ионов-предшественников появляются фрагментные ионы. Что дает дополнительную важную информацию при

идентификации структуры. Было предположено, что данный метод является привлекательной альтернативой ГХ-МС при анализе водных матриц, содержащих продукты гидролиза VX. По данной тематике авторами было выпущено множество работ [58, 59, 60, 61], в которых определялось содержание алкилфосфоновых кислот в образцах воды – [58], в образцах снега – [59], почвах – [60], а также офисах, напольных покрытиях, поверхностях стен и изделиях из бумаги – [61].

На основании обзора литературных данных по использованию метода ВЭЖХ-МС пределы обнаружения при использовании нетандемного масс-спектрометрического детектирования продуктов трансформации ФОВ в модельных водных растворах составляют от 10 до 400 нг/мл. Данные пределы обнаружения на 2-3 порядка выше, чем требуется для определения продуктов трансформации ФОВ в реальных биомедицинских пробах и природных образцах. Также при анализе объектов со сложной матрицей методом ВЭЖХ-МС не всегда удается достигнуть полного хроматографического разделения целевых и мешающих компонентов, что снижает чувствительность, достоверность и точность метода. Мягкие методы ионизации, такие как электрораспылительная и химическая ионизация при атмосферном давлении, характеризуются интенсивными пиками депротонированных/протонированных молекул, однако отсутствие фрагментации в одномерной масс-спектрометрии затрудняет установление структуры соединений. Одним из вариантов решения всех этих проблем стало использование тандемной масс-спектрометрии.

Наибольшее распространение в тандемной масс-спектрометрии получили системы трех квадруполей, масс-спектрометры на основе ионной ловушки и приборы гибридной геометрии, например квадруполь – времяпролетный масс-анализатор [62].

Первыми возможности тандемной масс-спектрометрии как в режиме детектирования положительных, так и отрицательных ионов для определения продуктов метаболизма ФОВ продемонстрировал Worrett с соавторами [63]. Для эфиров алкилметилфосфоновых кислот были получены информативные, устойчивые, хорошо интерпретируемые масс-спектры в режиме детектирования как положительных, так и отрицательных ионов. Для метилфосфоновой кислоты в режиме сканирования

положительных ионов наблюдался сложный, неустойчивый, зависящий от ряда параметров масс-спектр с существенной долей аддуктных ионов протонированного иона метилфосфоновой кислоты с ионами металлов, кислот, метанола и ацетонитрила, присутствующими в подвижной фазе (Рис. 11).

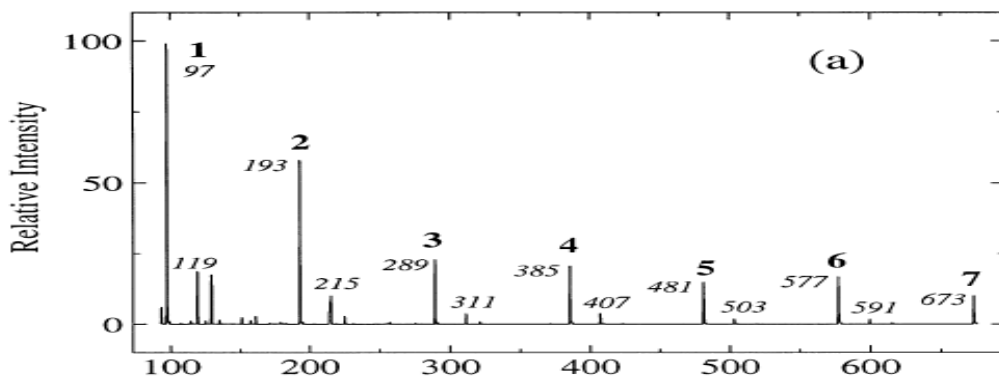


Рис. 11. Масс-спектр МФК в режиме сканирования положительных ионов.

В режиме сканирования отрицательных ионов в масс-спектре наиболее интенсивный сигнал соответствовал депротонированной молекуле метилфосфоновой кислоты.

Авторами работы [64] был разработан метод определения метаболитов фосфорорганических ОВ на низких уровнях в моче и слюне при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Целью данной работы было показать возможность определения МФК, ЭФК, иПрМФК, ЦГМФК и ПинМФК в моче и слюне напрямую, без процедуры дериватизации и с минимальной пробоподготовкой.

Пробоподготовка слюны включала в себя подкисление образцов несколькими каплями муравьиной кислоты до pH 3, центрифугирование при 2000 оборотах в течение 10 минут для осаждения белков и пропускание через 0.45 мкм фильтр. После этого образцы разливали в виалы и анализировали 100 мкл раствора. Пробоподготовку образцов мочи проводили двумя способами. Первый способ был аналогичен способу пробоподготовки слюны. Второй способ заключался в добавке к 5 мл подкисленной мочи 2 мл ацетонитрила. После этого вещества высаливали добавлением NaCl и центрифугировали для отделения белков. Затем отбирали ацетонитрильный слой для анализа.

Хроматографическое разделение проводили на колонке HIRB-150AM (150 мм × 2.1 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы выступала смесь 0.1% уксусной кислоты в воде (А) и 0.1% уксусной кислоты в метаноле (Б). Было применено градиентное элюирование для уменьшения времени удерживания кислот с длинным углеводородным радикалом. Градиентное элюирование было задано следующим образом: 0-5 мин 2% Б, 5-15 мин 2-95% Б, 15-20 мин 95% Б, 20-20.1 95-2% Б, 20.1-30 мин 2% Б.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительных ионов. Определение вели по выбранным ионным переходам. Для веществ были выбраны следующие переходы, представленные в таблице 2.

Таблица 2. Ионные переходы, используемые для детектирования

Соединение	Родительский ион	Дочерний ион
МФК	97	79, 47
ЭФК	125	97, 79
иПрМФК	139	97, 79
ЦГМФК	179	97, 79
ПинМФК	181	97, 79

На рисунках 12 и 13 представлены хроматограммы по выбранным ионным переходам в образцах слюны и мочи.

Степени извлечения в слюне для алкилфосфоновых кислот лежали в диапазоне от 95 до 211%. Для мочи в случае подкисленных алкилфосфоновых кислот степень извлечения лежала в диапазоне от 55 до 155%. В случае экстракции ацетонитрилом не удалось добиться улучшения степени извлечения для низкомолекулярных алкилфосфоновых кислот, а наоборот наблюдалось ее ухудшение. Степень извлечения возросла только в случае ПинМФК. Полученные в работе пределы обнаружения стандартных образцов представлены в Табл. 3. Так как степени извлечения высоки, то

пределы обнаружения в образцах мочи и слюны не будет сильно отличаться от представленных в Табл. 3.

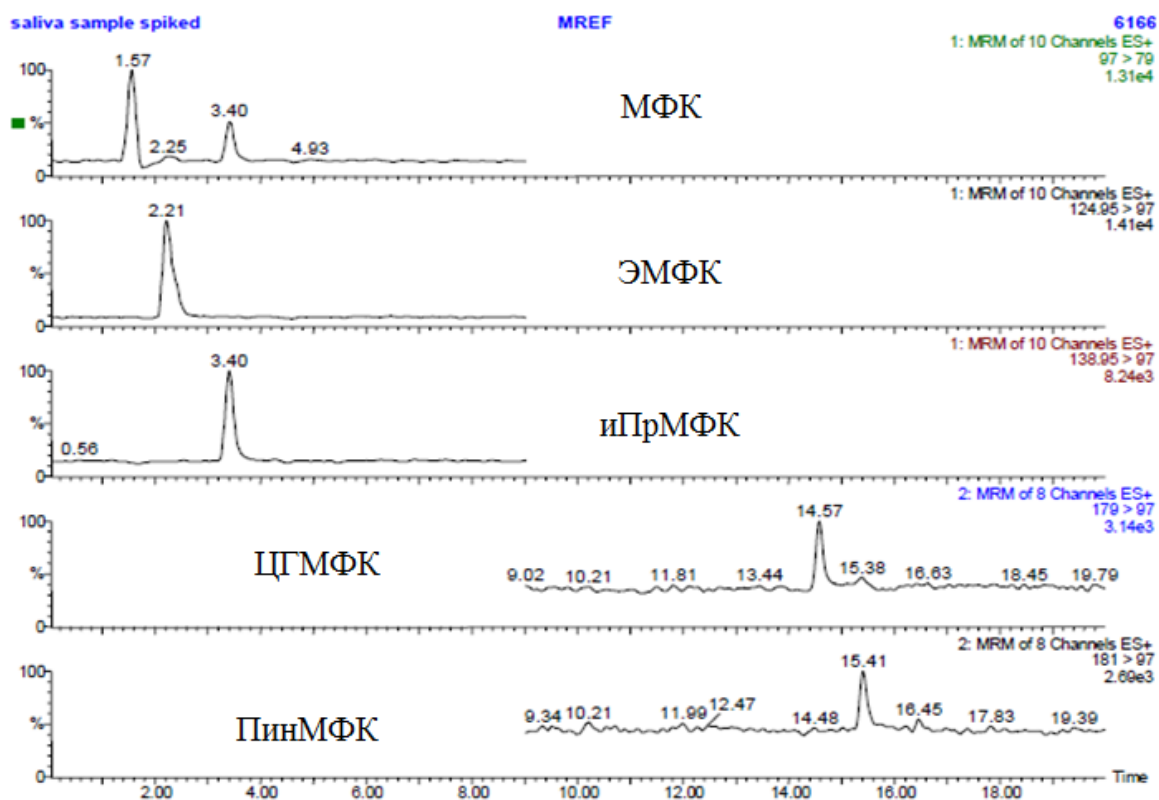


Рис. 12. Хроматограмма по выбранным ионным переходам для алкилфосфоновых кислот в слюне с добавкой 300 нг/мл МФК, 100 нг/мл ЭФК, иПрМФК, ПинМФК и 50 нг/мл ЦГМФК.

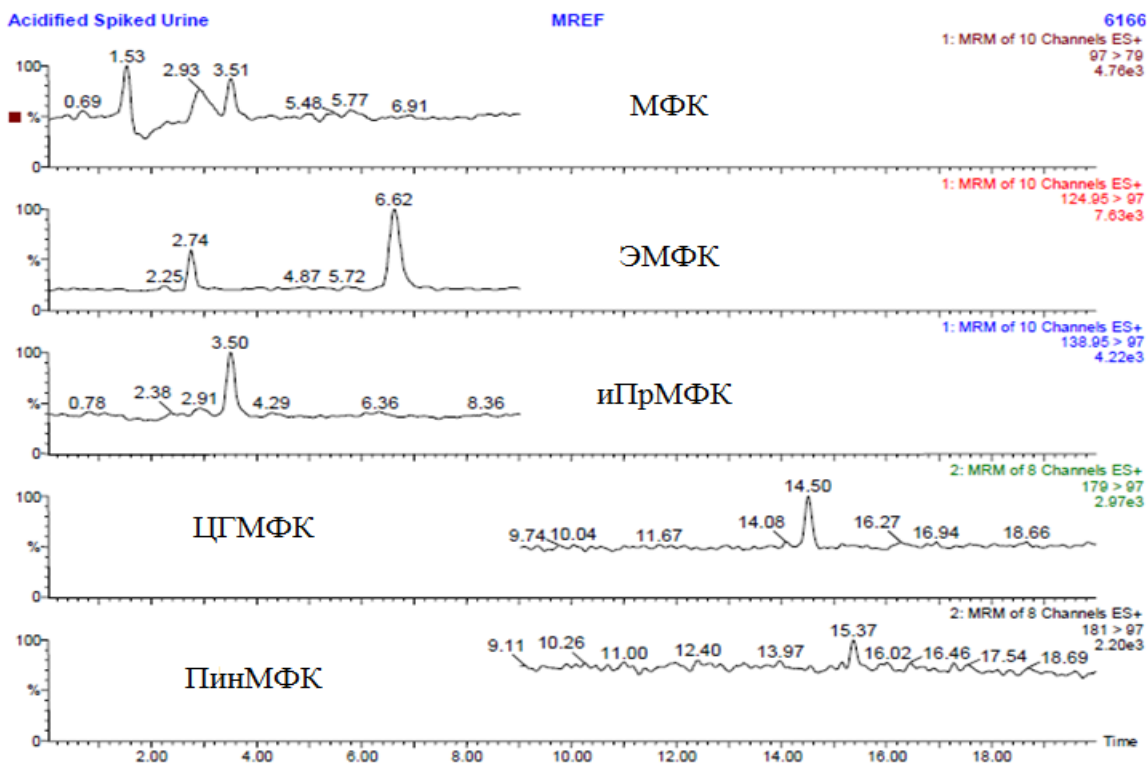


Рис. 13. Хроматограмма по выбранным ионным переходам для алкилфосфоновых кислот в моче с добавкой 150 нг/мл МФК, 50 нг/мл ЭФК, иПрМФК, ПинМФК и 25 нг/мл ЦГМФК.
Таблица 3. Пределы обнаружения стандартных образцов алкилфосфоновых кислот

Соединение	Предел обнаружения, нг/мл
МФК	50
ЭМФК	10
иПрМФК	10
ЦГМФК	10
ПинМФК	20

Впервые гидрофильная хроматография для анализа продуктов гидролиза фосфорорганических отравляющих веществ была применена в работе – [65]. Авторы разработали чувствительный метод определения метаболитов 5 фосфорорганических ОВ (VX, русского VX, зарина, зомана и циклозарина) в моче с применением изотопно-меченных внутренних стандартов.

Для снижения матричного эффекта применялась твердофазная экстракция. В первоначальных опытах был использован сильный анионообменный картридж. Но это

привело к соэлюированию с ЭМФК примесей из мочи, которые нарушали форму пика и гасили ионизацию. Это связано с тем, что разделение в анионообменном картридже основано на кислотности, и при элюировании с картриджа вместе с аналитом элюируется множество кислотных примесей, содержащихся в моче. Хорошие результаты показал картридж Strata Si-1.

Процедура пробоподготовки включала в себя добавление 6-кратного избытка ацетонитрила к 1 мл мочи, содержащей аналиты и внутренние стандарты и дальнейшее упаривание до суха в токе азота в концентрационной станции TurboVar. Далее следовало экстрагирование двумя порциями 5% воды в ацетонитриле. Объединенный раствор пропускали через картридж, установленный в автоматический манифолд для ТФЭ. Манифолд был запрограммирован на стадии активации, загрузки образца, промывки и элюирования. Аналиты элюировали 2,5 мл смеси, состоящей из 25% воды и 75 % ацетонитрила. Затем проводили упаривание до суха в токе азота и растворение в 200 мкл смеси, состоящей из 5% воды и 95% ацетонитрила по объему. Таким образом, был получен коэффициент концентрирования – 5.

Дельнейшее хроматографическое определение проводили на колонке Waters Atlantis HILIC (50 мм × 2.1 мм, 3 мкм). Подвижная фаза состояла из 86% ацетонитрила и 14% 20 мМ ацетата аммония. Элюирование проводили в изократическом режиме со скоростью 0.5 мл/мин. После элюирования всех аналитов, скорость потока увеличивали до 1 мл/мин на 2.91 минуте для удаления хорошо удерживаемых примесей. На 3.91 минуте значение потока возвращали к 0.5 мл/мин для обеспечения стабильного давления для анализа следующих образцов. На Рис. 14 представлена хроматограмма по выбранным ионным переходам синтетической мочи с концентрациями аналитов 1 нг/мл.

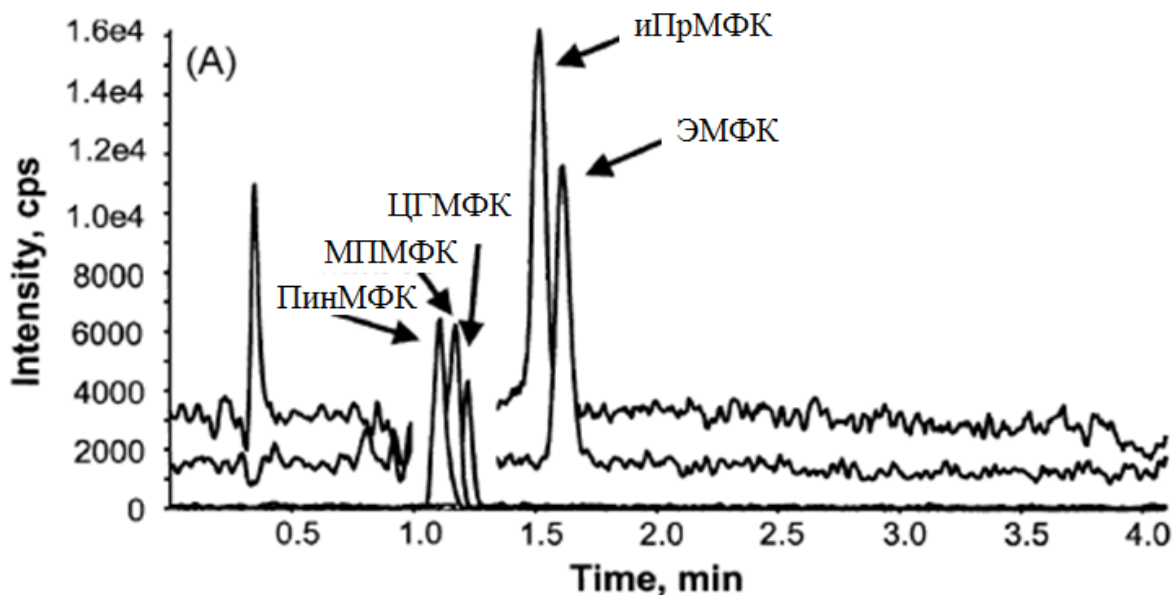


Рис. 14. Хроматограмма по выбранным ионным переходам синтетической мочи с концентрациями аналитов 1 нг/мл.

Масс-спектрометрическое определение проводили при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. Определение вели по выбранным ионным переходам. Также в работе было замечено, что чувствительность определения возрастала с ростом содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Максимальное увеличение достигалось при значениях превышающих 80%. При значениях близких к 100%, наблюдалось значительное снижение чувствительности, связанное с нестабильностью работы электрораспылительной ионизации из-за низкой концентрации акцепторов протона, необходимых для формирования анионов аналитов. В работе были получены следующие пределы обнаружения и степени извлечения, представленные в Табл. 4.

Таблица 4. Пределы обнаружения и степени извлечения

Соединение	Предел обнаружения, пг/мл	Степень извлечения, %
иПрМФК	240	59
ЭМФК	160	35
МПМФК	75	75
ПинМФК	30	89

ЦГМФК	30	80
-------	----	----

В работе [66] проводилось определение 5 фосфорорганических ОВ (VX, русского VX, зарина, зомана и циклозарина) в моче с применением изотопно-меченных внутренних стандартов. За счет уменьшения количества сорбента в картридже удалось добиться сокращения количества растворителей для стадий активации картриджа, загрузки образца, промывки картриджа и элюирования образца. Также в работе использовали две колонки для сокращения времени анализа на одну пробу и увеличения пропускной способности. Данным методом удалось достичь пределов обнаружения и степеней извлечения, схожих с предыдущей работой [65].

Разработан быстрый и точный метод определения 6 диалкилфосфатов (диметилфосфата - ДМФ, диметилтиофосфата - ДМТФ, диметилдитиофосфата - ДМДТФ, диэтилфосфата – ДЭФ, диэтилтиофосфата – ДЭТФ и диэтилдитиофосфата – ДЭДТФ) в моче, являющихся метаболитами фосфорорганических инсектицидов [67]. Определение проводили при помощи гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Данные соединения очень близки по свойствам к алкилфосфоновым кислотам.

Для очистки образцов от мешающего влияния матрицы прибегали к помощи ТФЭ. Экстракцию проводили при помощи слабого анионообменного картриджа Strata X-AW на автоматической экстракционной станции для снижения погрешности. Преимуществами использования слабых анионообменных картриджей является тот факт, что отрицательно заряженные соединения удерживаются сильнее неполярных примесей, которые на стадии промывки полностью смываются органическим растворителем. ТФЭ включала следующие процедуры: последовательную активацию 1% муравьиной кислотой в метаноле и воде, пропускание 600 мкл образца через картридж, промывку водой и метанолом для удаления примесей, элюирование 20% триэтиламиноом в ацетонитриле. После этого проводилось упаривание до суха в токе азота и растворение в 50 мкл ацетонитрила. Коэффициент концентрирования -12. Степень извлечения для всех аналитов была выше 70%.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Luna HILIC 200A (100 мм × 2 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы выступала смесь, состоящая из 93% ацетонитрила и 7% 100 мМ ацетата аммония в воде. Разделение осуществляли в изократическом режиме со скоростью потока 0,2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1 мкл. ДМФ и ДЭФ имеют те же недостатки, что и МФК, являясь очень полярными и не удерживаемыми на колонках C18 соединениями. Их разделение и увеличение времени удерживания удалось провести только при применении гидрофильной хроматографии. Хроматограмма мочи с концентрациями аналитов 100 нг/мл, демонстрирующая разделение ДМФ и ДЭФ представлена на рисунке 15.

Масс-спектрометрическое определение вели при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. Детектирование вели по выбранным ионным переходам. В работе были достигнуты следующие пределы обнаружения и степени извлечения, представленные в Табл. 5.

Авторами статьи [68] был разработан быстрый, чувствительный, надежный метод количественного определения метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в моче при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Метод также характеризуется большой пропускной способностью. В работе определяли следующие вещества: ЭМФК, иПрМФК, ПинМФК, ЦГМФК, а также применяли изотопно-меченные внутренние стандарты данных веществ.

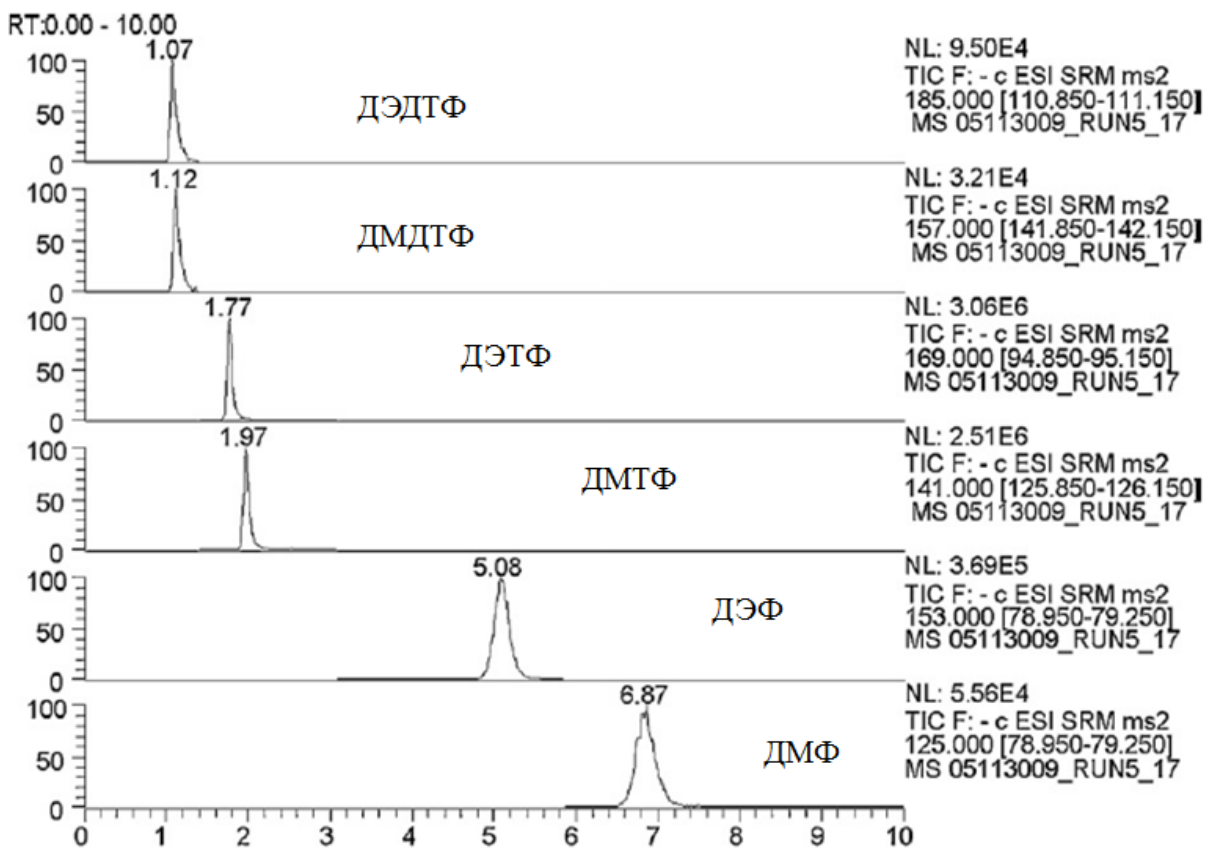


Рис. 15. Хроматограмма 100 нг/мл аналитов в моче по выбранным ионным переходам.

Таблица 5. Пределы обнаружения и степени извлечения для диалкилфосфатов

Соединение	Предел обнаружения, нг/мл	Степень извлечения, %
ДМФ	0.468	40
ДЭФ	0.044	90
ДМДФ	0.066	90
ДЭДФ	0.110	79
ДЭТДФ	1.549	50
ДМДФ	0.073	75

Для очистки от матричных компонентов применяли анионообменную твердофазную экстракцию на картридже Isolute PE-AX. К образцам мочи с аналитом и внутренними стандартами до экстракции добавляли 0.05 М уксусную кислоту. В дальнейшем стадии активации и промывки ничем не отличались от предыдущих работ. Элюировали алкилфосфоновые кислоты при помощи 5% раствора муравьиной кислоты

в метаноле. Затем проводили упаривание в токе азота до 300 мкл в аппарате TurboVar. Коэффициент концентрирования – 3.3. В автоматизированном режиме за 20 минут данным методом осуществляется ТФЭ 96 образцов, в ручном режиме за 40 минут – 12.

Для хроматографического разделения использовали колонку Xterra MS column (150 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм). Подвижная фаза состояла из двух компонентов: 0,5% муравьиная кислота в воде (А) и метанол (Б). Было применено градиентное элюирование, заданное следующим образом: 0-1.5 мин 20% Б, 1.5-2 мин 20-90% Б, 2-2.25 90-100% Б, 2.25-8,5 мин 100 % Б, 8.5-8.6 мин 100-20 % Б, 8.6-10 мин 20 % Б. Скорость потока подвижной фазы – 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы 5 мкл.

Масс-спектрометрическое определение проводили при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. Детектирование вели по выбранным ионным переходам. Область линейности градуировочной зависимости для всех алкилфосфоновых кислот лежала в диапазоне от 1 – 200 нг/мл. Предел обнаружения для всех алкилфосфоновых кислот был 0.5 нг/мл.

Katagi и соавторы [69] разработали чувствительный метод определения ЭФК, иПрМФК и ПинМФК в крови при помощи жидкостной хроматографии tandemной масс-спектрометрии в виде производного с пара-бромфенацил бромидом. В замен привычным электрораспылительной и химической ионизации при атмосферном давлении, в работе была использована ионизации быстрыми атомами. Дериватизацию алкилфосфоновых кислот проводили по схеме (рис. 16).

Хроматографическому разделению на колонке CAPCELL PAK UG C18 (150 мм × 1,5 мм) предшествовало концентрирование и очистка аналитов от примесей путем их сорбции на специальной колонке-уловителе CAPCELL PAK UG C18 (35 мм × 2 мм). Далее следовала их десорбция подвижной фазой, состоящей из 5 мМ ацетата аммония и ацетонитрила (55:45 по объему) с 0.1% раствором глицерина. Подвижная фаза подавалась со скоростью 0.1 мл/мин. При таком соотношении компонентов подвижной фазы наблюдалось хорошее разделение и приемлемые времена удерживания кислот.

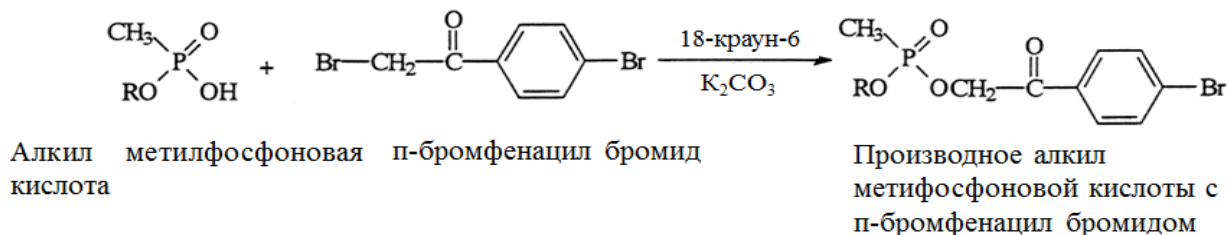


Рис. 16. Реакция дериватизации алкилфосфоновых кислот.

Масс-спектрометрическое определения проводили при помощи ионизации быстрыми атомами, как в режиме регистрации положительных ионов, так и отрицательных. В первом случае в спектре преобладали протонированные молекулы производных кислот с пара-бромфенацил бромидом. Очень часто при ионизации быстрыми атомами в режиме регистрации положительных ионов наблюдаются аддуктные ионы с щелочными металлами. В данном случае они отсутствовали, так как соли щелочных металлов были десорбированы с колонки – уловителя и не попали на основную аналитическую колонку. В режиме регистрации отрицательных ионов также наблюдались интенсивные сигналы депротонированных молекул, но их интенсивность была в 3 раза меньше по сравнению с режимом регистрации положительных ионов. Алкилфосфоновые кислоты определяли в крови и речной воде. Применяя ВЭЖХ-МС проводили скрининг, а ВЭЖХ – МС/МС подтверждение. Определение проводили в режиме регистрации выбранных ионов. Для крови и речной воды были получены следующие пределы обнаружения: ЭМФК – 1 нг/мл, иПрМФК – 0.5 нг/мл, ПинМФК – 5 нг/мл.

Криси использовал ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и химическую ионизацию при атмосферном давлении с послеклоночной дериватизацией гидроксидом триметилфениламмония для увеличения чувствительности определения ряда производных ОВ, включая МФК и S-[2-(диизопропиламино)этил] метилфосфотионовую кислоту, которые являются наименее токсичными продуктами

гидролиза VX [70]. Дериватирующий реагент добавляли непосредственно в подвижную фазу жидкостного хроматографа, и реакция дериватизации проходила в источнике ионизации. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 мм × 2.1 мм), подвижная фаза состояла из 100% водного раствора ацетата аммония с концентрацией 0.001-0.05 М. Скорость подвижной фазы составляла 0.25 мл/мин. Масс-спектрометрическое определение вели при помощи химической ионизации при атмосферном давлении в режиме регистрации положительных ионов. Предложенная методика была применена к продуктам гидролиза VX, в частности метилфосфоновой кислоте. В масс-спектре МФК после проведения реакции наблюдалось 2 сигнала, соответствующие дериватам по одной и двум ОН группам (m/z 111 и 125 соответственно). Исследовали зависимость выхода реакции дериватизации от концентрации гидроксида триметилфениламмония. При малых концентрациях дериватизация происходит не полностью ($<10^{-4}$ М), а при слишком больших ($>2 \cdot 10^{-3}$ М) сигналы соответствующих ионов полностью исчезают. Также было установлено, что присутствие катионов Na^+ и Ca^{2+} при концентрациях 200 мкг/мл ослабляет сигнал иона деривата по сравнению со стандартным образцом деривата, не содержащим катионов. Разработанный способ имеет ряд преимуществ, однако у этого подхода существуют значительные недостатки, такие как тушение ионизации, загрязнение источника ионизации реагентом для дериватизации и большая величина фонового сигнала.

В работе [71] был разработан быстрый метод определения 6 алкилфосфоновых кислот (иПрМФК, ПинМФК, ЦГМФК, ЭМФК, иБуМФК и МФК) в образцах природных вод и почве при помощи жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax C18 SB (150 мм × 2.1 мм, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из смеси 10 мМ формиата аммония в воде (А) и 10 мМ формиата аммония в метаноле (Б). Для хорошего разделения было применено градиентное элюирование. Градиент был задан следующим образом: 0-2 мин. 100% А, 2-17 мин. 100 – 30% А, 17-20 мин. 30 % А. Скорость потока подвижной фазы составила 0,2 мл/мин. Пробу вводили при помощи автосемплера, объем вводимой пробы составил

5 мкл. В работе изучали зависимость ионизации от состава подвижной фазы и концентрации буфера. Максимальная интенсивность сигналов всех алкилфосфоновых кислот получали при концентрациях формиата аммония не превышающих значение 10 мМ. Концентрация 10 мМ была выбрана из соображений лучшей формы хроматографического пика. Снижения рН подвижной фазы от 6.4 до 4 приводило к ухудшению формы пика. Объем вводимой пробы в 5 мкл давал лучшее разрешение, по сравнению с большими объемами. На Рис. 17 представлена хроматограмма, демонстрирующая разделение шести алкилфосфоновых кислот по выбранным ионам.

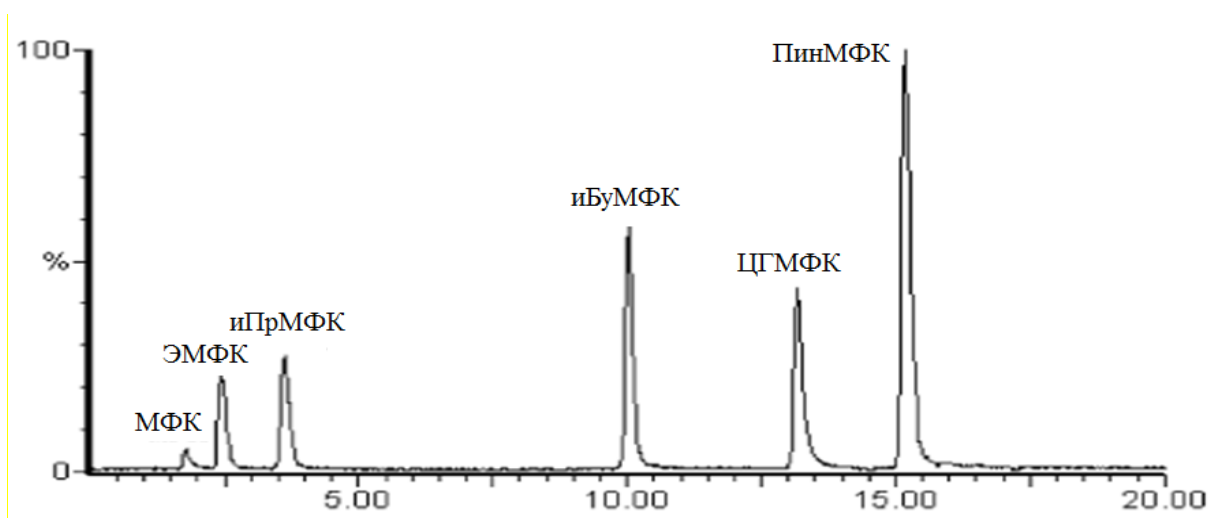


Рис. 17. Хроматограмма по выбранным ионам смеси 5 мкг/мл алкилфосфоновых кислот.

Масс-спектрометрическое определение осуществляли при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. Детектирование вели по выбранным ионам. В режиме регистрации отрицательных ионов, по сравнению с положительным режимом, наблюдались лучшие соотношения сигнал-шум и пределы обнаружения. Из-за отсутствия аддуктных ионов, режим регистрации отрицательных ионов был снова предпочтительнее положительного. Изменение входного напряжения от 15 до 40 В, оказывало влияние на чувствительность. Наиболее оптимальная чувствительность была достигнута при значении напряжения 20 В. При этом значении наблюдалась максимальная интенсивность депротонированной молекулы $[M-H]^-$. Единственный фрагментный ион с m/z 95 появляется только в спектрах ЭМФК и иПрМФК. Определение вели по

следующим ионам: m/z 95 для МФК, m/z 123 и m/z 95 для ЭМФК, m/z 137 и 95 для иПрМФК, m/z 151 для иБуМФК, m/z 177 для ЦГМФК, m/z 179 для ПинМФК. Достигнутые в работе пределы обнаружения представлены в Табл. 6.

Таблица 6. Пределы обнаружения и область линейности для алкилфосфоновых кислот

Соединение	Пределы обнаружения, нг/мл	Область линейности градуировочной зависимости, мкг/мл
МФК	1000	1-10
ЭМФК	80	0.1-20
иПрМФК	80	0.1-20
иБуМФК	50	0.1-20
ЦГМФК	50	0.1-20
ПинМФК	50	0.1-20

Также в работе проводили оценку точности, используя результаты 7 измерений каждого из 3 стандартных растворов. Концентрации стандартов соответствовали 3 уровням градуировочной зависимости: низкому – 1 мкг/мл, среднему 5 мкг/мл и высокому 10 мкг/мл. Точность измеряли путем вычисления значения относительного стандартного отклонения. Для всех аналитов относительное стандартное отклонение не превышало 8.8%.

Для получения дополнительной структурной информации проводили фрагментацию в источнике ионизации. Структурная информация была получена путем увеличения входного напряжения в диапазоне от 20-50 В. Чем больше напряжение, тем выше относительная интенсивность фрагментных ионов. При 40 В в спектре можно было получить информацию как о ионах-предшественниках, так и о фрагментных ионах. Все соединения давали одинаковые фрагментные ионы с m/z 95 и 79, соответствующие структурам $[\text{MeP}(\text{O})(\text{OH})_2\text{-H}]^-$ и $[\text{P}(\text{O})_2\text{OH-H}]^-$. Масс-спектры ионов-предшественников и фрагментных ионов представлены на Рис. 18.

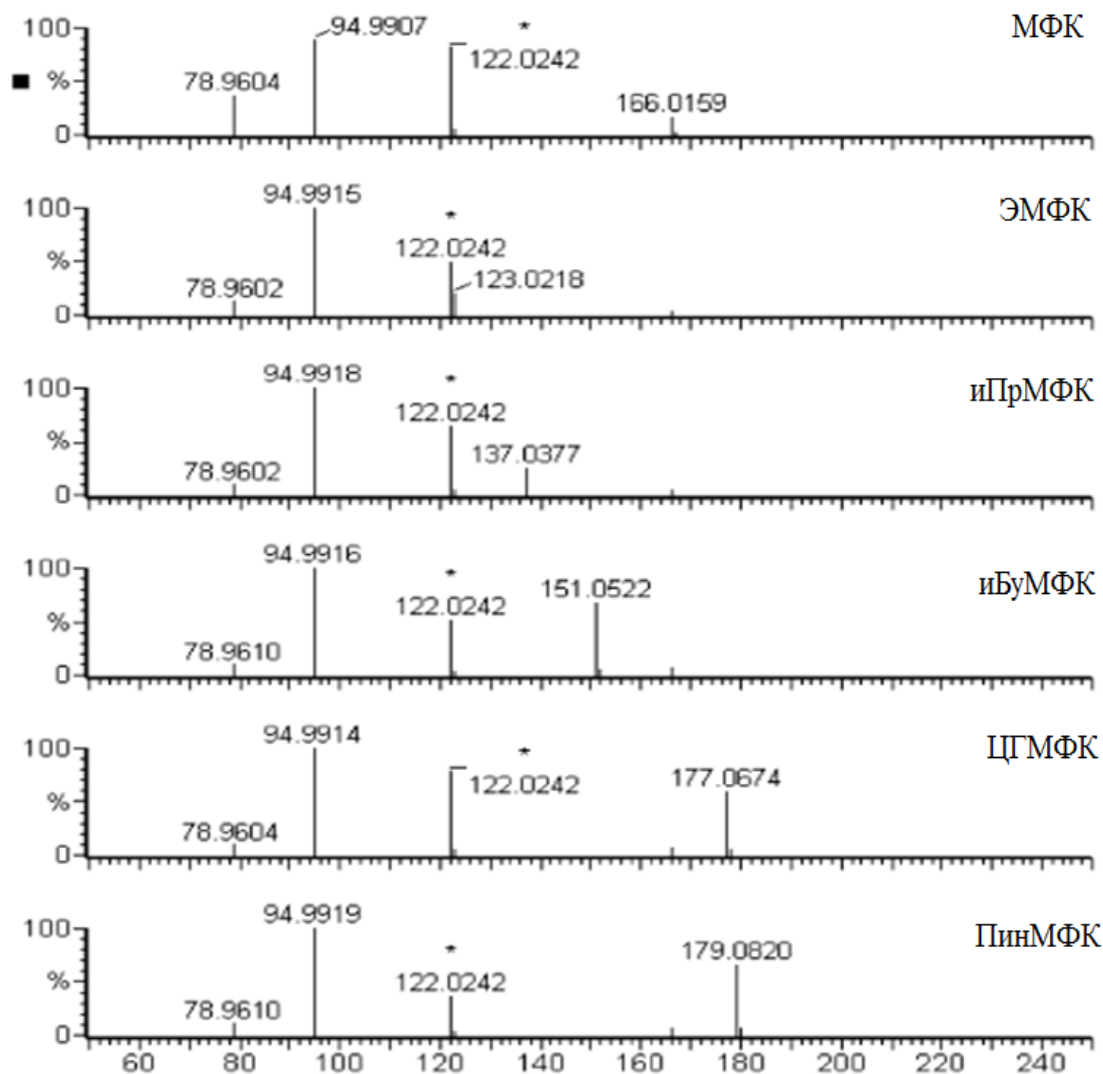


Рис. 18. Масс-спектр ионов-предшественников и фрагментных ионов метаболитов фосфорорганических ОВ, полученные при входном напряжении равном 40 В.

В образцах природных вод, предварительно загрязненных зарин, зоманом, циклозарином, VX и русским VX, по прошествии 5 дней были обнаружены все алкилфосфоновые кислоты, кроме МФК, содержание которой было ниже предела обнаружения. Из почвы, зараженной ОВ, алкилфосфоновые кислоты экстрагировали водой. Степени извлечения составили 36% для МФК, 45% для ЭМФК, 73% для ИМФК, 83% для изобутил МФК, 88% для циклогексил МФК, 91% для ПМФК.

Авторами работы [72] был предложен метод определения алкилалкилфосфоновых и алкилфосфоновых кислот при помощи ион-парной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В работе определяли

следующие кислоты: МФК, ЭФК, ПФК, иПрМФК, ПрММФК, ПеМФК, ПинМФК и ГМФК.

Хроматографическое разделение проводилось на колонке Water Spherisorb S5 ODS2 (150 мм × 2 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы выступали 0.001 М трибутиламин в воде (А) и 0.001 М трибутиламин в метаноле (Б). рН подвижной фазы доводили до нужных значений уксусной кислотой. Было применено градиентное элюирование: 0-2 мин. 0% Б, 2-15 мин. 5-40% Б и 15-30 мин. 40% Б. Скорость потока подвижной фазы – 0.3 мл/мин. Объем вводимой пробы 2 мкл. Вследствие высокой полярности фосфоновых кислот, эти соединения слабо удерживаются на обращенно-фазовых колонках. Таким образом, для того, чтобы получить удовлетворительные времена удерживания на колонках С18, создавались сильные взаимодействия между аналитами и неподвижной фазой за счет введения ион-парного реагента. В работе использовали различные ион-парные реагенты, такие как трибутиламин, триэтиламин, гидроксид тетрабутиламмония. В случае гидроксида тетрабутиламмония не было зафиксировано образования ионных пар, что объясняется стерическими препятствиями. Удовлетворительные времена удерживания были получены при использовании трибутиламина. В случае триэтиламина удерживались только алкил алкилфосфоновые кислоты. Увеличение концентрации трибутиламина с 0.001 М до 0.005 М приводило к уширению пиков и увеличению времени удерживания. Таким образом, оптимальным значением концентрации было выбрано значение 0.001 М.

Масс-спектрометрическое определение проводили при помощи электрораспылительной ионизации. Детектирование вели в режиме регистрации выбранных отрицательных ионов. Обычно алкилфосфоновые и алкил алкилфосфоновые кислоты дают интенсивные депротонированные молекулы $[M-H]^-$. Неожиданно для авторов, им удалось зафиксировать молекулярные ион-радикалы при использовании трибутиламина в качестве ион-парного реагента. Авторы предполагают, что это связано либо с химическим восстановлением, вызванным особенностью подвижной фазы, либо с электрохимическим восстановлением, протекающим в игле источника ионизации. Переход протона возможен как из протонированного

трибутиламина, так и из растворителей. Был применен подход, под названием Doehlert design, целью которого был подбор оптимальных условий, для увеличения интенсивности сигнала молекулярного ион-радикала фосфоновых кислот. В рамках этого подхода, подбирали оптимальные значения потока обдувающего газа, рН подвижной фазы и напряжения на игле. В результате данного подхода были выбраны оптимальные значения этих параметров: поток обдувающего газа – 32, напряжение на игле – 6.2 кВ, рН подвижной фазы – 6.8.

Метод был применен к анализу образцов почвы. Пределы обнаружения полученные данным методом для алкил алкилфосфоновых кислот – 0.5 мкг/мл и 10 мкг/мл для алкилфосфоновых кислот.

Опубликована работа [73], в которой определяли продукты гидролиза ФОВ в крови: иПрМФК, иБуМФК и ПинМФК при помощи ВЭЖХ-МС/МС.

Для снижения мешающего влияния матрицы была применена твердофазная экстракция. В работе исследовались 4 картриджа: Strata C18E, Strata SDB-L, Strata SAX и Strata Screen A. Наилучшие степени извлечения, более 60% для всех аналитов, были достигнуты на картридже Strata SDB-L.

Хроматографическое разделение проводили на двух колонках Kromasil C18 и Synergi Hydro-RP. На первой колонке наблюдалось сильное размывание пика для иПрМФК, чего не наблюдалось в случае второй колонки. Таким образом, Synergi Hydro-RP была выбрана для дальнейших исследований. В качестве подвижной фазы выступали растворы 0,1% муравьиной кислоты в воде (А) и метаноле (Б).

Масс-спектрометрически кислоты определяли при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. Определение осуществляли в режиме регистрации выбранных ионов. В работе были получены следующие пределы обнаружения: для иПрМФК – 4 нг/мл, иБуМФК – 1 нг/мл, ПинМФК – 0,6 нг/мл. Данная методика была успешно применена к образцам крови крыс, получивших внутривенно ФОВ в дозах соответствующих $\frac{1}{2}$ LD₅₀.

В других работах [74, 75, 76] описаны подходы, позволяющие проводить обнаружение продуктов трансформации нервно-паралитических ОВ методами ВЭЖХ-

МС-МС в воде – [74, 75] и еде – [76]. Пределы обнаружения, полученные в данных работах для алкилфосфоновых кислот 0.5-10 нг/мл. На основании обобщения данных литературных источников по пределам обнаружения метилфосфоновой кислоты и алкилметилфосфоновых кислот методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС составлена сводная Табл. 7.

В литературе представлено значительное число работ, посвященных идентификации и определению основных маркеров и продуктов разложения ФОВ (алкилметилфосфоновых кислот). Применение хроматографических методов при определении таких соединений является весьма распространенным и оправданным. Отмечено, что хроматографические методы обладают значительными преимуществами перед методами спектроскопии, благодаря сочетанию разделения и определения компонентов пробы. Использование методов хромато-масс-спектрометрии позволяет улучшить характеристики определения, однако метод ГХ-МС не является достаточно универсальным для идентификации и определения всех возможных продуктов трансформации ФОВ, поскольку обладает существенными ограничениями по летучести и термостабильности определяемых веществ. Так, например, газохроматографическое определение алкилтауринов требует чрезвычайно сложной и ресурсоемкой процедуры пробоподготовки. При этом отдельные процедуры пробоподготовки весьма продолжительны (несколько часов), а ряд операций (смыв остатков аналита, дериватизация) приводят к появлению неконтролируемых погрешностей при количественном определении. В связи с этим, чрезвычайно перспективным представляется использование прямых (не требующих длительной и сложной пробоподготовки) методов анализа, среди которых наибольший интерес вызывают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС) и метод капиллярного электрофореза (КЭ). К тому же ОЗХО ежегодно ужесточает требования, предъявляемые к методикам идентификации маркеров ФОВ, чтобы исключить ложные результаты анализов.

Табл. 7. Пределы обнаружения для МФК, полученные методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС-МС

Соединение	Предел обнаружения нг/мл [литературный источник]	Метод
Метилфосфоновая кислота	400 / [40] 100 / [43, 44] 50 / [49] 1000 / [56] 10000 / [57]	ВЭЖХ-ХИАД-МС микроВЭЖХ-ЭРИ-МС ВЭЖХ-ЭРИ-МС-МС ВЭЖХ-ЭРИ-МС ИП-ВЭЖХ-ЭРИ-МС-МС
Изопропиловый эфир метилфосфоновой кислоты	50-100 / [22] < 50 / [23] 10-100 / [25,26] 300 / [34] 10 / [31] 5-20 / [32] 1-4 / [33] 3 / [35] 2.5 / [36]	ВЭЖХ-ХИАД-МС ВЭЖХ- ХИАД-МС микроВЭЖХ- ЭРИ-МС ВЭЖХ-МС ВЭЖХ-МС-МС ВЭЖХ- МС-МС μВЭЖХ-ЭРИ-МС- МС ГХ-МС-МС ГХ-МС-МС
Изобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты	50-100 / [22] < 50 / [23] 10-100 / [25,26] 5-20 / [32]	ВЭЖХ-ХИАД-МС ВЭЖХ- ХИАД-МС μВЭЖХ-ЭРИ- МС ВЭЖХ-МС-МС
Пинаколиловый эфир метилфосфоновой кислоты	50-100 / [22] < 50 / [23] 10-100 / [25,26] 100 / [34] 20 / [31] 5-20 / [32] 3 / [35] 5 / [36]	ВЭЖХ-ХИАД-МС ВЭЖХ- ХИАД-МС μВЭЖХ-ЭРИ- МС ВЭЖХ-МС ВЭЖХ-МС-МС ВЭЖХ- МС-МС ГХ-МС-МС ГХ-МС-МС

Таким образом, на сегодняшний день разработка подходов к идентификации и

определению следовых количеств основных маркеров ФОВ (на уровне 500 пг/мл) является актуальной и крайне важной задачей. Использование метода ВЭЖХ-МС(-МС) позволит проводить прямое одновременное экспрессное определение основных продуктов трансформации нервно-паралитических ОВ в объектах любой сложности с высокой чувствительностью и высокой достоверностью.

1.2 Методы обнаружения и определения сернистых и азотистых ипритом

Данная группа отравляющих веществ включает в себя бис(2-хлорэтил) сульфид (иприт), бис(2-хлорэтилтио) сульфид (сесквииприт), бис[(2-хлорэтилтио)этил] эфир, а также азотистые иприты бис(2-хлорэтил)-метиламин (HN-1), бис(2-хлорэтил)-метиламин (HN-2) и трис(2-хлорэтил)-амин (HN-3). На рис.1 показаны пути гидролиза двух соединений, относящихся к классу ипритных ОВ. Основным продуктом трансформации иприта является полярное, среднелетучее соединение- тиодигликоль, представляющее большой интерес при подтверждении факта присутствия иприта на фоне других ОВ и примесей, которые содержатся в боеприпасах (так, в боеприпасах ипритного химического оружия содержится 50-80 % иприта, остальная часть относится к аналогам иприта с более длинными углеродными цепями) [77].

1.2.1 Газовая хроматография

ГХ является наиболее широко используемым методом обнаружения ОВ, относящихся к классу ипритов, так как они летучи и удобны для селективного и чувствительного детектирования. Большинство ГХ методов, разработанных в 1970-х и 1980-х, представлены в обзоре Виткевича [78], и до сих пор используются как при скрининге, так для определения ОВ.

1.2.2 Газовая хроматография - масс-спектрометрия

Разнообразные газохроматографические детекторы ГХ находят применение для качественного и количественного анализа ипритов и продуктов их превращений при этом, МС(-МС) детектирования в вариантах ЭРИ и ХИАД применяется при необходимости однозначной идентификации. Первые работы опубликованы в 1980-х и были посвящены определению иприта и его производных в почвах [77] и водных

объектах [78]. В 1990-1995 годах количество публикаций по определению ипритов и родственных им веществ методом ГХ-МС резко увеличилось, что объясняется случаями боевого применения иприта в ходе Иран-иракского конфликта (1980-1988). Вилс [79] описал процедуру определения ипритов и родственных ОВ кожно-нарывного действия в образцах резины и красок с добавками дизельного топлива и уайт-спирита. ОВ кожно-нарывного действия извлекали методом экстракции дихлорметаном или использовали метод динамического парофазного анализа. Блэк [80] изучал реальные объекты после инцидентов с применением ОВ. Например, эти образцы отбирались в курдских деревнях на севере Ирака вблизи с границами с Турцией и Ираном и включали в себе пробы почв, частей боеприпасов и овечьей шерсти. В результате исследований методом ГХ-МС в варианте парофазного отбора пробы в сочетании с экстракцией различными растворителями и термической десорбцией удалось подтвердить присутствие в пробах иприта и 21 родственных ему соединений.

В работе [51] использовали метод ГХ-МС при определении следовых количеств иприта для оценки эффективности дезактивации иприта этаноламином. Процедура пробоподготовки включает в себя добавление 0.5 г КСl к 1.5 мл реакционной смеси, перемешивание, двойную экстракцию гексаном. Объем вводимой пробы экстракта составил 2 мкл, при этом предел обнаружения достигает 30 нг/г в режиме регистрации выделенных ионов с m/z 109, 111, 158 и 160. Описанный выше метод АТД-ГХ-МС применяли для определения иприта в пробах воздуха во время арбитражного анализа проб, загрязненных ОВ [29]. В модельном эксперименте, создается воронка, соответствующая своими размерами взрыву боеприпаса с ипритом. В ходе процедуры отбора пробы проводили прокачивание воздуха через трубку с сорбентом TenaxTA (в течение 15 мин со скоростью 1 л мин⁻¹) на высоте 0.1 м и на расстоянии 5 м с подветренной стороны кратера этой воронки, которая подверглась загрязнению ипритом. Далее трубки опечатали и доставили в лабораторию для последующего анализа. Определение иприта проводили методом АТД-ГХ-МС в варианте регистрации положительных ионов в диапазоне m/z 40-550.

Несмотря на высокую растворимость тиодигликоля в воде и заметную летучесть, разработаны многочисленные ГХ-МС подходы для идентификации и количественного анализа этого соединения [78, 81]. В работе [82] авторами рассмотрены проблемы, которые возникают при извлечении тиодигликоля из сточных и подземных вод при использовании метода ГХ-МС. Использование жидкостно-жидкостной экстракции с последующим перерастворением в дихлорметане не приводит к удовлетворительным результатам. Использование твердофазной экстракции (ТФЭ) с последовательным применением картриджей с сорбентом С18, позволяющим удалить нелетучие компоненты, и с сорбентом Amersorb 572, на котором происходит сорбция тиодигликоля, с последующим элюированием тиодигликоля с сорбента дихлорметаном, с последующим испарением досуха и дериватизацией N-метил-N-(третбутилдиметилсилил)трифторацетоамидом позволяет добиться приемлемых результатов. При масс-спектрометрическом детектировании авторы использовали регистрацию выделенных характеристических ионов $[M]^+$, $[M-CH_3]^+$ и $[M-(CH_3)_3C]^+$. Средняя степень извлечения тиодигликоля составила 23 %, что показывает явные недостатки выбранного способа экстракции. Однако, результаты извлечения оказались воспроизводимыми, и предел обнаружения составил 10 нг мл^{-1} . Применение ТФМЭ (на картриджах Carboxen) с последующей дериватизацией ТБДМС в методе ГХ-МС описано при определении тиодигликоля [29]. Предел обнаружения в данном способе определения тиодигликоля составил 200 нг в 1 мл деионизованной воды.

1.2.3 Жидкостная хроматография

Продукты разложения сернистых ипритов тиодигликоль, тиодигликоль сульфид и тиодигликоль сульфоксид являются полярными, растворимыми в воде соединениями. Поэтому наиболее очевидным подходом при выборе способа их разделении является использование методов жидкостной хроматографии. Однако, выбор способа их детектирования затруднен тем, что эти соединения не содержат в своем составе хромофорных и флуоресцентных групп. В этом случае метод ЖХ-МС представляется

наиболее методически правильным подходом для изучения продуктов разложения ипритов.

1.2.4 Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия

Сочетание жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии является важным методом при определении и идентификации продуктов трансформации ипритов. В качестве режима ионизации часто используют ЭРИ, однако в этом варианте иприт плохо ионизируется, поэтому определение иприта и продуктов его трансформации при их совместном присутствии в варианте ЖХ-МС-ЭРИ невозможно. В работах ряда научных групп описаны способы определения продуктов разложения иприта при использовании в качестве источников ионизации термоспрея [83,84], ХИАД [55] и ЭРИ [63]. В работе [55] Рид и Блэк предложили способ идентификации тиодигликоля, тиодигликоля сульфоксида, тиодигликоль сульфона и этиламина, как продуктов гидролиза азотистого иприта, методом ЖХ-МС с использованием электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительных ионов. В ходе исследования детектирование проводили в режиме регистрации выбранных ионов с m/z 105 ($[M+H-N_2O]^+$) и 123 ($[M+H]^+$) при определении тиодигликоля, m/z 139 ($[M+H]^+$) при детектировании тиодигликоль сульфоксида, m/z 155 ($[M+H]^+$) и m/z 172 ($[M+NH_4]^+$) при определении тиодигликоль сульфона, m/z 120 при определении N-метилдиэтанолamina, m/z 134 при обнаружении N-этилдиэтанолamina, m/z 150 при определении триэтанолamina, m/z 146 при идентификации N,N-(диизопропил)-аминоэтанола. Пределы обнаружения для всех определяемых веществ составили менее 0.01 мкг/мл. С использованием данного подхода проведена идентификация тиодигликоля и тиодигликоль сульфоксида в водных экстрактах почв в рамках межлабораторных исследований согласно КЗХО. Дагостино и др. использовали метод микроЖХ-МС-ЭРИ при идентификации основных продуктов гидролиза иприта, сесквииприта и бис[(2-хлорэтилтио)этил] эфира [85]. В ходе исследования удалось детектировать тиодигликоль и 10 родственных диолов с более длинными углеродными цепями, при этом пределы обнаружения этих соединений составили 2 нг/мл. В работе

описана процедура регистрации масс-хроматограмм по полному ионному току в широком диапазоне варьирования напряжения в камере ионизации, что позволило выбрать оптимальные условия при формировании молекулярных ионов (которые характеризовали молекулярные массы определяемых соединений) и ионов при фрагментации (которые позволили установить функциональные группы, присутствующие в соединении). Установленные диолы с высокой молекулярной массой не удалось обнаружить с использованием метода ГХ-МС, описанного в предыдущей работе по исследованию этих производных, что подчеркивает важность подходов ЖХ. В работах [86,87] представлен подход микроЖХ-МС-ЭРИ при определении продуктов разложения сернистых ипритов с использованием большого объема ввода пробы и способ, который позволяет существенно уменьшить ширину пиков. В этих работах авторами получены масс-спектры тиодигликоля (идентичен спектрам, описанным в ранних работах [55,63,85]) и продуктов гидролиза с длинными углеродными цепями, в частности, исследованы масс-спектры бис(2-гидроксиэтилтио)алканов и их окисленных производных. На спектре бис(2-гидроксиэтилтио)этана, одного из основных продуктов гидролиза сесквииприта, присутствуют молекулярные ионы с m/z 205 ($[M+Na]^+$) и 183 ($[M+H]^+$), и ионы, образующиеся в результате фрагментации, с m/z 165 ($[M+H-H_2O]^+$), m/z 137 ($[M+H-C_2H_5OH]^+$) и m/z 105 ($[M+H-HSC_2H_4OH]^+$, основной пик), что соответствует результатам предыдущего исследования [85]. Интересное наблюдение сделано при добавлении к определяемым соединениям большого количества спиртов (использовали для достижения эффекта сжатия пиков) – происходило их окисление. В результате происходило образование сульфоксидов, которые идентифицировали методом МС-ЭРИ и МС-МС-ЭРИ.

В работе [88] изучены два биомаркера иприта, которые образуются в результате метаболизма иприта под действием фермента β -лиазы. Авторы работы использовали метод ультра ВЭЖХ-МС-МС в варианте электрораспылительной ионизации при изучении 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана (МСМТЭСЭ). В ходе исследований образцов человеческой мочи, искусственно загрязненных СБМСЭ и МСМТЭСЭ, удалось достичь

пределы обнаружения 4 нг/мл для указанных соединений.

К другому типу стабильных продуктов разложения иприта относятся сульфониевые ионы, которые образуются в результате внутримолекулярных реакций замещения. Такие соединения, в частности, ион 1-(2-хлорэтил)-1,4-дитиана, образуются при хранении жидкого иприта, при этом происходит образование осадка, который оседает на дне контейнера для хранения. Метод ЖХ-МС-ЭРИ успешно применен при прямом детектировании сульфониевых ионов, которые образуются в результате гидролиза при хранении иприта [89]. В этой работе описан подход обнаружения шести синтезированных родственных иприту циклических и открытых сульфониевых ионов с концентрацией 0.01 М, при этом наблюдалась небольшая фрагментация молекул в ходе детектирования. Образец осадка из емкости для хранения иприта растворяли в метаноле и анализировали методом ЖХ-МС-ЭРИ, при этом масс-спектры образца и стандартного раствора иона 1-(2-хлорэтил)-1,4-дитиана схожи. На спектре стандарта наблюдали основной пик с m/z 183 и пик иона с m/z 185 (возникновение которых объясняется наличием двух изотопов хлора). Подтверждение правильности идентификации проводили методом МС-МС, исследуя ионы-продукты, которые образуются при фрагментации иона с m/z 183 (рис. 19). При исследовании образца осадка методом ГХ-МС не удалось обнаружить сульфониевых ионов, так как эти соединения подвергаются термическому разложению с образованием нейтральных продуктов. Таким образом, классический метод ГХ-МС не дает полной картины состава такого рода образцов, однако с другой стороны, при использовании метода ЖХ-МС могут возникнуть проблемы из-за неполного извлечения присутствующих в пробе соединений при применении методов экстракции (как правило, происходит извлечения малых олигомеров). В работе [89] также исследовали образование сульфониевых ионов в результате гидролиза иприта в присутствии тиодигликоля методом ЖХ-МС-ЭРИ и, поэтому, данный подход может играть важную роль при мониторинге продуктов разложения иприта.

Анализ аминоспиртов, которые являются основными продуктами распада азотистых ипритов, представляет сложную задачу, так как они имеют высокую

полярность, низкую летучесть и разлагаются при высокой температуре. Вариант ионообменной ЖХ-МС(-МС) представляет подходящий способ определения некоторых аминспиртов, включая метилдиэтаноламин (МДЭА) и триэтаноламин (ТЭА), которые являются продуктами разложения HN-1 и HN-3, соответственно, в пробах болотной воды, подвергшейся воздействию газов ОВ [90]. Авторами разработан подход, позволяющий детектировать и идентифицировать все исследованные соединения, основываясь на временах удерживания, совпадения молекулярных ионов $[M]^+$ при детектировании в режиме МС и ионов-продуктов $[M-H_2O]^+$, образующихся в результате фрагментации ионов $[M]^+$ в варианте МС-МС, при этом пределы обнаружения составили 20 нг/мл.

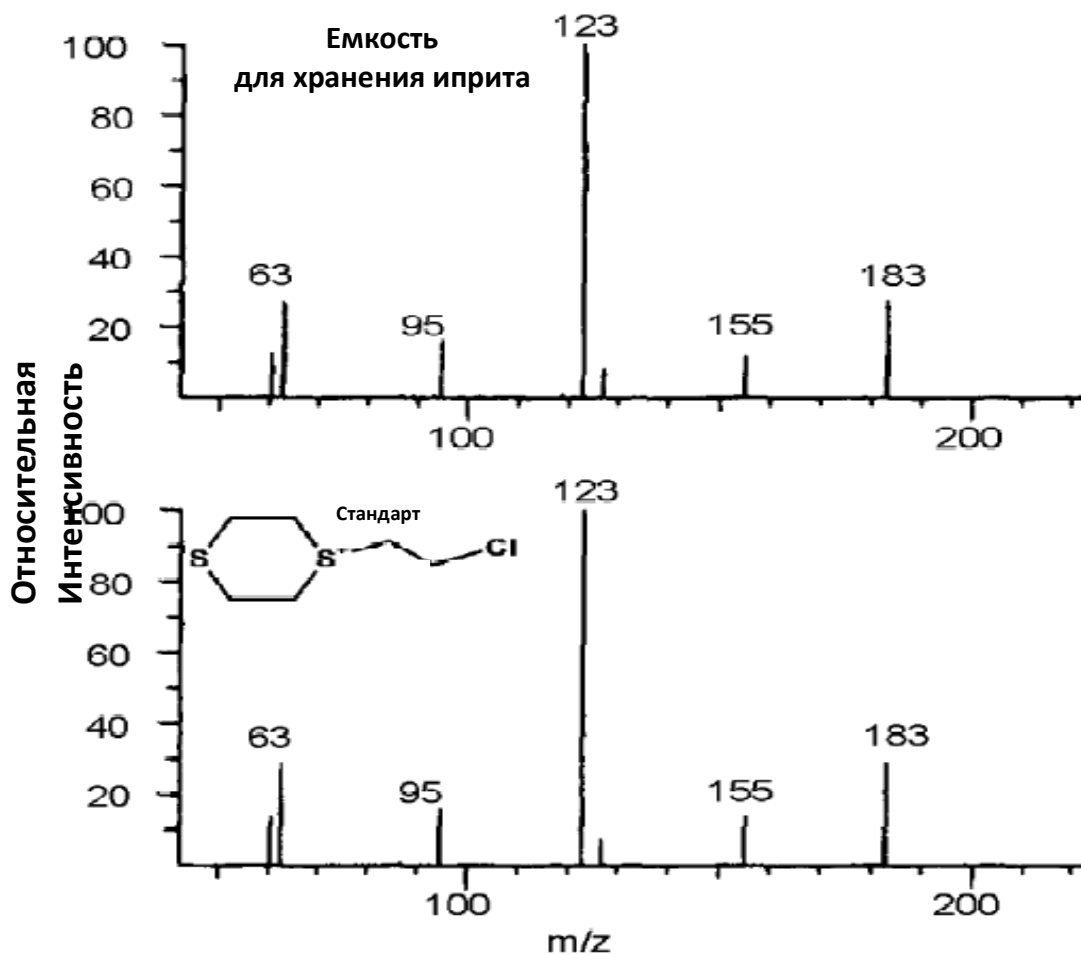


Рис. 19. МС-МС-ЭРИ масс-спектры ионов-продуктов иона с m/z 183, присутствующего в образце осадка из емкости для хранения иприта (верхняя хроматограмма) и 0.01 М стандартного раствора иона 1-(2-хлорэтил)-1,4-дитиана (нижняя хроматограмма) [63].

1.2.5 Методы определения тиодигликолиевой кислоты

Иприт является отравляющим веществом кожно-нарывного воздействия, которое мало растворяется в воде и гидролизуется в щелочной среде. Тиодигликоль (ТДГ) является стабильным, хорошо растворимым в воде, продуктом гидролиза иприта в почве. ТДГ накапливается и остается в природе в течение длительного периода времени [91,92]. Грамотрицательная бактерия, *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *xylosoxydans*, превращает ТДГ в тиодигликолиевую кислоту (ТДГК) [93,94]. Аллен и др. показали, когда тестировали площадку на наличие загрязнения ипритом, что важно проверить ее не только на наличие иприта и ТДГ, но и на ТДГК [95]. В моче уровень ТДГК является чувствительным индикатором воздействия на организм человека физиологически активными или токсичных веществ и газов [96]. Мономер винилхлорида (МВХ) является предшественником широко используемого пластика - поливинилхлорида (ПВХ) [97]. Благодаря его полярным свойствам, ТДГК выводится с мочой. Мониторинг уровня ТДГК в моче имеет большое значение, главным образом, внутри и снаружи фабрик по производству ПВХ с большими концентрациями МВХ в воздухе. Риск воздействия МФХ связан с его канцерогенными свойствами [98,99]. Концентрация ТДГК в моче может превышать 400 мг л^{-1} для работников, подвергающихся воздействию канцерогенных органических растворителей, применяемых в производстве полимеров загрязняющих воздух парами МВХ, окисью этилена, дихлор- и дибромэтаном или хлоралкил эфирами [96,100]. Для определения ТДГК в моче применяли изотахафорез [101], капиллярный электрофорез и вольтамперометрические методы [96]. В работе [96] перед вольтамперометрическим определением ТДГК образцы мочи пропускали через колонку, заполненную микрогранулами порошка ПВХ. Для определения ТДГК в моче также применяли методы газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием [102, 103, 104] и масс-спектрометрическим детектированием [105]. Использование этих методов требует кропотливой пробоподготовки, включающей в себя дериватизацию диазометаном [106] или N-

триметилсилилдиэтиламино в пиридине [102]. Затем диметиловый эфир ТДКГ может быть определен газохроматографически с масс-спектрометрическим детектированием в режиме регистрации выбранных ионов (m/z 146.12). Чтобы получить точные измерения следует использовать в качестве внутреннего стандарта либо *o*-фталевою кислоту [102] либо изотопно-меченную ТДГК [107]. В литературе не было упомянуто работ по ВЭЖХ-МС определению ТДГК в воде, почве или моче. Тем не менее, чтобы оценить процесс потребления ТДГ, как единственного источника углерода, аэробными бактериями использовали метод ВЭЖХ-УФ [92]. При использовании колонки SEPARON SGX C18 (3.3×150 мм, 5 мкм) и 3 мМ фосфорной кислоты в деионизированной воде в качестве подвижной фазы (скорость потока 1 мл / мин) времена удерживания пиков ТДГ и ТДГК составили 2.24 и 1.54 мин, соответственно. Некоторые исследователи использовали ЖХ и ГХ методы для анализа ТДГК в пробах окружающей среды [94, 95, 108]. Ли и др. [94] использовали ВЭЖХ с УФ детектированием для изучения биокаталитической трансформации ТДГК из ТДГ. В работе [95] изучали распределение ТДГК в образцах окружающей среды с помощью анализа периодических суспензий твердого раствора. Авторы изучали концентрацию ТДГК в водной фазе при помощи метода ВЭЖХ-УФ. В данной работе пределом обнаружений (ПО) составил 500 нг мл^{-1} . Виджая Сарадхи и др. [108] разработали процедуру экстракции, основанную на методе ион-парной ТФЭ для определения ТДГК в водных образцах. Обнаружение и определение были проведены с использованием системы ГХ-МС в режиме электронной ионизации (ЭИ). Достигнут предел на уровне 20 нг/мл

В литературе описано большое количество продуктов трансформации иприта в объектах окружающей среды и биологических жидкостях – от тиодигликоля (образуется в результате гидролиза иприта) до сложных биомаркеров, которые получают в ходе ферментного разложения иприта под действием β -лиазы (СБМСЭ, СБАЦЭ и т.д.). Большинство из этих соединений являются средне- и сильнополярными нелетучими веществами, определение которых методами ГХ осложнено

необходимостью трудоемкой процедуры дериватизации. В связи с этим методы прямой ВЭЖХ-МС(-МС) являются наиболее подходящими для разработки и апробации экспрессных и высокочувствительных подходов для идентификации и определения маркеров, которые образуются после попадания иприта в живые организмы и объекты окружающей среды.

1.3 Методы обнаружения и определения мышьяксодержащих ОВ

В ходе разработок боевых отравляющих веществ синтезирован ряд мышьяк – содержащих ОВ. Хлорвиниларсины (люизиты) представляют из себя сложную смесь веществ, которая содержит и цис- и транс- изомеры. Люизит – 1 (2 – хлорвинилдихлорарсин, Л-1) относится к классу кожно-нарывных ОВ; он вступает в реакции с некоторыми активными центрами ферментов. Люизит-2 (бис-(β-хлорвинил)хлорарсин, Л-2) и люизит-3 (трис-(хлорвинил)хлорарсина, Л-3) также являются токсичными веществами, но в меньшей степени нежели Л-1.

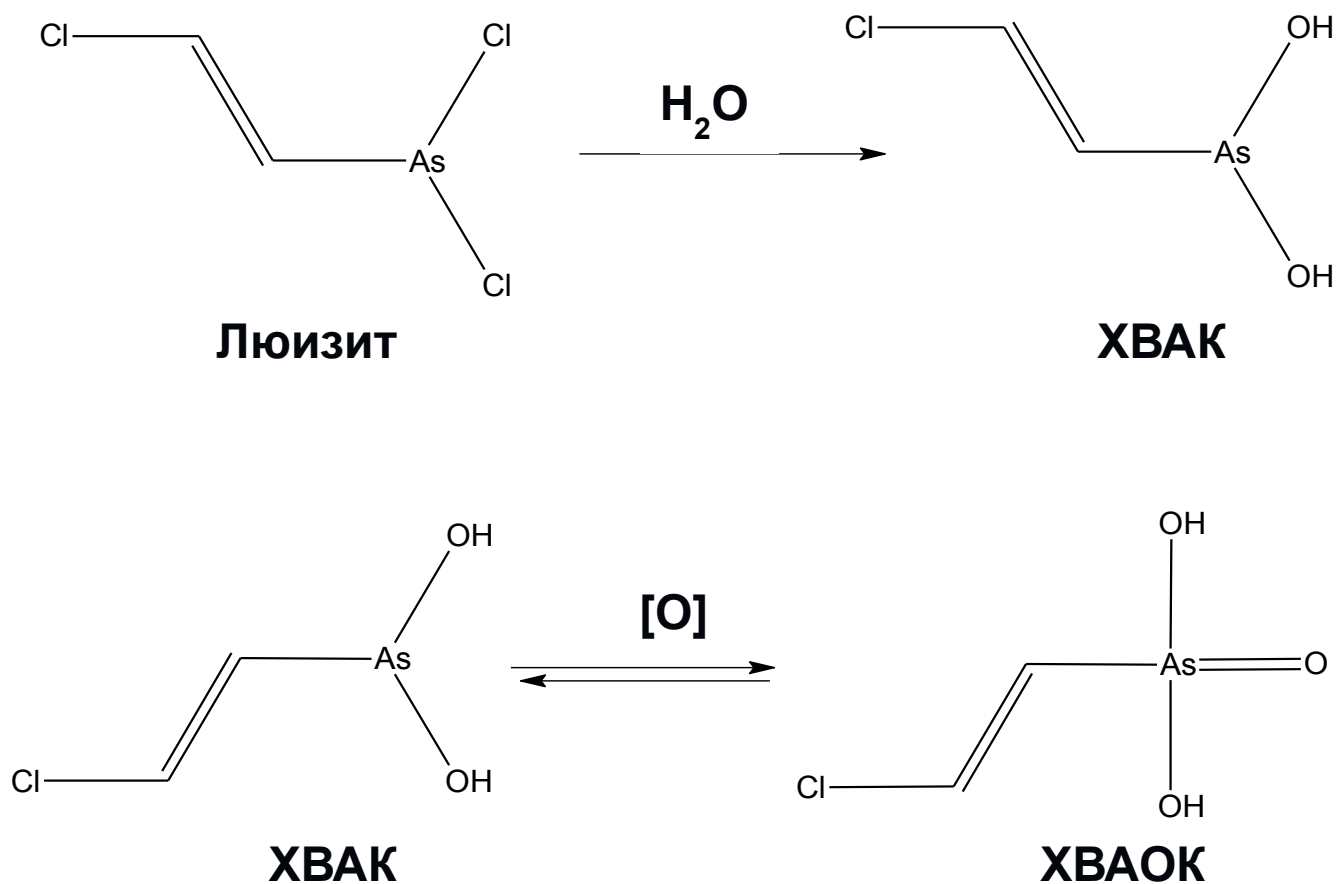


Рис. 20. Схема трансформации люизита.

На рис. 20 представлена схема гидролиза Л-1 с образованием 2-хлорвиниларсонистой кислоты (ХВАК) (быстрая стадия) с последующим медленным окислением в оксид люизита (ХВАО) и, в дальнейшем, с полимеризацией ХВАО и образованием 2-хлорвиниларсоновой кислоты (ХВАОК).

Вместе с люизитами, в качестве ОВ предложены фениларсиновые соединения: дифениларсин хлорид (ДФАХ), дифениларсин цианид (ДФАЦ) и дигидрофенарсазинхлорид (Адамсит), которые являются одними из наиболее важных веществ, относящимися к этой группе мышьяксодержащих ОВ.

1.3.1 Газовая хроматография и газовая хромато – масс-спектрометрия

Люизит быстро гидролизуеться в присутствии следов воды с образованием малолетучих ХВАК и ХВАО, поэтому предварительная дериватизация является важной процедурой при анализе малых количеств этих маркеров (на уровне 10 нг/мл). Исследовательскими группами предложен ряд дериватирующих агентов, большинство из которых содержат серу, и включают в себя алкил тиолы, различные алкиловые эфиры тиогликолевой кислоты [109] и алкил дитиолы [110]. На рисунке 21 представлен ГХ-МС-ЭИ масс-спектр люизита-1, полученный после обработки соответствующим органическим раствором дериватирующего агента 2,3-димеркаптотолуолом (ДМТЛ), в результате происходит превращение люизита-1 в производное люизит-димеркаптотолуол, которое легко подвергается анализу методом ГХ [111]. Спектр содержит молекулярные ионы с m/z 290 и 292 (соответствуют изотопному расщеплению $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ в соотношении 3:1) и основной пик с m/z 229, соответствующий иону $[\text{M}-\text{CH}=\text{CHCl}]^+$. При использовании ГХ-МС-ХИ с газом-реагентом изобутаном на масс-спектре наблюдаются соответствующие сигналы $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 291 и 293, в то время как это производное также наблюдается на хроматограмме при анализе смеси методом газовой хроматографии с пламенно-фотометрическим детектированием (ГХ-ПФД) в режиме детектирования серосодержащих соединений. Состек и Алдстад разработали быстрый и удобный метод ТФМЭ-ГХ-МС при

определении ХВАК с использованием в качестве дериватирующих агентов алкил дитиолов, таких как 1,2- этандитиол (ЭДТ) и 1,3- пропандитиол (ПДТ), с образованием летучих и стабильных производных [112].

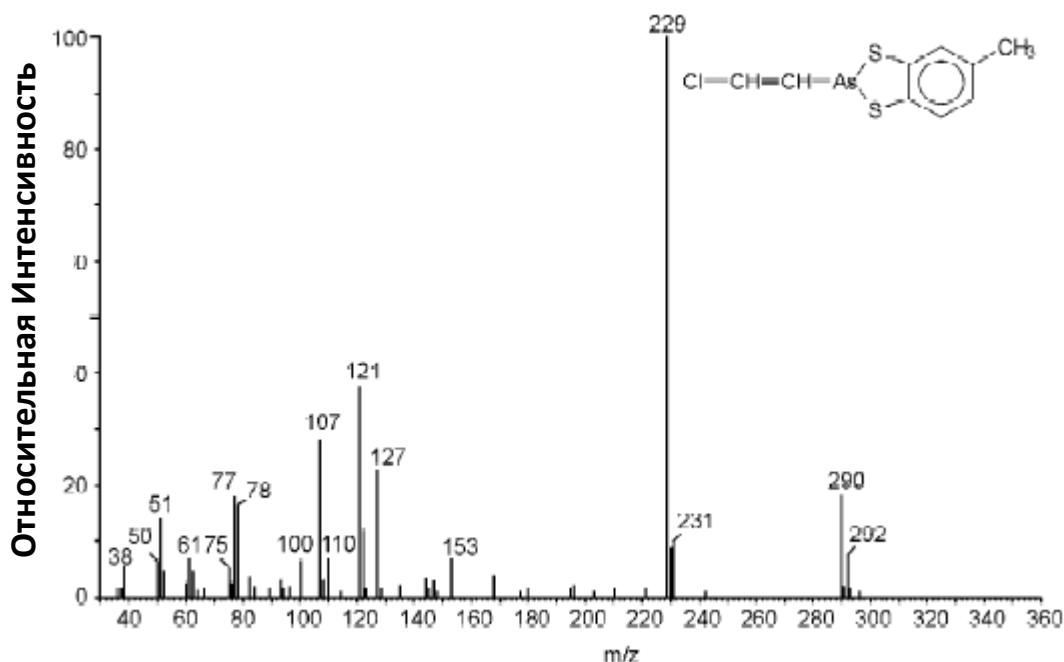


Рис. 21. ГХ-МС-ЭИ масс-спектр производного люизит-1-ДМТЛ в растворе органического растворителя. Кварцевая капиллярная колонка (50 м x 0.32 мм), покрытая CPSil8CB; газ-носитель – гелий при скорости расхода 1.5 мл/мин. Температура ионного источника 180 °С. Энергия электронов 70 эВ. Диапазон сканирования масс 20-500 m/z. Время одного цикла записи масс-спектра 1 с. Программа термостатирования колонки: от 120 °С (постоянно в течение первых 5 мин) до 270 °С при скорости нагрева 6 °С мин⁻¹. [67].

Согласно этому подходу, дериватизацию проводят в подкисленном растворе, а после завершения реакции раствор помещают в трубку для ТФМЭ (с поли(диметилсилоксаном)) на 10 мин до достижения устойчивого равновесия. После процедуры десорбции при 250 °С в течение 5 мин проводят анализ полученного образца методом ГХ-МС. На масс-спектрах ХВАК-ЭДТ и ХВАК-ПДТ присутствуют интенсивные молекулярные ионы с m/z 228 и 242, соответственно, тогда как потеря хлорвинильной группы приводит к образованию ионов с m/z 167 (ХВАК-ЭДТ) и 181 (ХВАК-ПДТ). Предел обнаружения составил 1 нг/мл, более чем в 100 раз выше, по сравнению с традиционными методами жидкостной экстракции.

Томкинс и др. оптимизировали процедуру для количественного определения ХВАО в почвах [113]. ХВАО, количество которого в образце является суммой содержания ХВАО, ХВАК и извлеченной полимерной формы ХВАО, экстрагировали и одновременно дериватизировали из 2 г почвы, имеющей $pH \geq 7$, с использованием 10 мл 0.66 % раствора (масс. %) аскорбиновой кислоты, содержащего 100 мклл^{-1} ПДТ. Далее, проводили извлечение полученного производного ХВАО-ПДТ методом ТФМЭ в течение 20 мин, с последующей десорбцией и количественным определением методами ГХ-ПФД (в варианте регистрации серосодержащих соединений) и ГХ-МС. Пределы обнаружения составили 0.1 – 0.5 мг/г в почве, с величиной степени извлечения 60 %.

В работе [114] с использованием методов ГХ-МС и ГХ-ПФД (в режиме регистрации серосодержащих соединений) разработан способ определения Л-1 и Л-2 в образцах, содержащих углеводороды, с применением реакции дериватизации с различными алифатическими тиолами. Показано, что производные Л-1 и Л-2 могут быть получены и надежно идентифицированы при взаимодействии с тиолами с длинной цепи от C2 до C8 и C12, соответственно. В рамках разработанного подхода возможно проводить идентификацию Л-1 и Л-2 в присутствии углеводородов n-C9 – n-C30. Пределы обнаружения составили менее 1 мкгмл^{-1} . В ходе межлабораторных исследований организации ОЗХО, используя данный метод, удалось провести идентификацию Л-1 в пробе, содержащей додекан, при этом на стадии дериватизации использовали пропантиол и бутантиол.

В работе [109] наряду с определением Л-2 и Л-3 описаны способы обнаружения других мышьяк – содержащих соединений, ДФАХ и ДФАЦ, методом ГХ с электрон-захватным детектором (ЭЗД) в вариантах использования дериватизации с алкилтиолами и дитиолами, и без стадии дериватизации [115-117]. Метод газовой хроматографии в варианте атомно-эмиссионного детектирования (ГХ-АЭД) (в режиме элементного анализа мышьяка и хлора) также пригоден для определения мышьяк – содержащих ОВ. В работе [118] описан способ ГХ-АЭД при анализе отходов из контейнеров, используемых для хранения ОВ, при этом процедуру экстракции проводили раствором гексан-хлороформ (1:1, об.). На хроматограмме зафиксировали несколько пиков в

режиме регистрации мышьяка и хлора и, в итоге, идентифицировали люизит-1, три изомера люизита-3 и 2 изомера димерной формы люизита-3 методом ГХ-МС. ГХ-АЭД анализ емкостей для хранения иприта показал наличие в них следовых количеств мышьяк-содержащего соединения, при этом время удерживание этого соединения соответствовало ДФАХ; идентичность этого соединения доказана методом ГХ-МС [119]. Высокую селективность определения мышьяк-содержащих ОВ и продуктов их трансформации можно добиться, используя метод ГХ-ППФД (пульсирующее пламенно-фотометрическое детектирование) в варианте регистрации мышьяк-содержащих веществ, который может иметь высокую практическую ценность при анализе такого типа ОВ [120].

1.3.2 Жидкостная хроматография и жидкостная хромато-масс-спектрометрия

Использование метода ЖХ-МС в качестве замены ГХ-МС при анализе люизитов сопряжено с рядом проблем, основная из которых - эффективность ионизации мышьяк-содержащих ОВ в вариантах ХИАД и ЭРИ. В связи с этим опубликовано небольшое число статей, посвященных определению производных люизитов методом ЖХ-МС. Если использовать ХИАД в варианте регистрации отрицательных ионов при высоких концентрациях определяемых веществ, на масс-хроматограмме водного раствора оксида мышьяка (III) наблюдаются ионы с m/z 107 и 123, однако чувствительность определения низкая. Использование ХИАД и ЭРИ при регистрации отрицательных ионов приводит к образованию ионов с m/z 305 ($[\text{As}_3\text{O}_5]^-$), 321 ($[\text{As}_3\text{O}_6]^-$), 412 ($[\text{As}_4\text{O}_7]^-$) и, возможно, большого числа кластеров, но также при большой концентрации исследуемого вещества. Для увеличения чувствительности анализа, в работе [70] использовали пост-колоночную дериватизацию с 2-меркаптопиридином при определении ХВАК и оксида мышьяка (III) методом ЖХ-МС-ХИАД. ХВАК преимущественно взаимодействует с одним ионом 2-меркаптопиридина ($[\text{Cl}-\text{CH}=\text{CH}-\text{As}-\text{S}=\text{C}_5\text{H}_4\text{N}]^+$), при этом на масс-спектре присутствуют протонированные молекулы $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 246 и 248. При изменении условий эксперимента возможно проведение

реакции взаимодействия ХВАК с двумя ионами 2-меркаптопиридина и на масс-спектре в этом случае наблюдается молекулярный ион $[M+H]^+$ с m/z 357.

Применение метода ЖХ-МС с индуктивно связанной плазмой позволяет проводить чувствительное определение продуктов разложения люизитов в объектах окружающей среды в виде суммарного содержания As(III) и As(V) (пределы обнаружения менее 0.1 нг мл^{-1}), однако мало подходит для идентификации продуктов разложения [121]. Фениларсиновые соединения, такие как трифениларсины и Адамсит, которые невозможно определять методом ГХ-ЭЗД (см. выше) могут быть легко проанализированы методом ЖХ с диодно-матричным детектором в варианте градиентного элюирования на сорбентах C18 и CN [115].

Пределы обнаружения находились в диапазоне $0.25 - 7.5 \text{ мг/мл}$. Обнаружить различие между As (III) и As(V), например, в случаях трифениларсина и фениларсоновой кислоты, возможно только в варианте использования ЖХ. Однако, существует несколько проблем при анализе, ДФАХ и ДФАЦ быстро взаимодействуют с водой в подвижной фазе, при этом происходит формирование дифениларсин гидроксида и на хроматограмме наблюдается только один пик. Кроме того, некоторые соединения имеют времена удерживания близкие к мертвому времени на обоих типах сорбентов (например, фениларсонистая кислота), поэтому времена удерживания невоспроизводимы (например, в случае трифениларсин оксида на сорбенте C18) или же соединения элюируются одновременно (Адамсит и дифенил гидроксид на колонке с сорбентом CN). В связи с этим выбор метода разделения зависит от аналитической задачи, которая должна быть решена.

В общедоступной литературе представлены результаты изучения метаболизма основного компонента боевого отравляющего вещества люизита - 2 - хлорвинилдихлорарсина, который приводит к образованию ряда сильнополярных соединений мышьяка (ХВАО, ХВАК, ХВАОК и т.д.). Данные соединения характеризуются низкой реакционной способностью при попытках использования реакций дериватизации в вариантах ГХ и ВЭЖХ. Надежные результаты при

определении этих веществ удается получать лишь при использовании метода ЖХ в сочетании с индукционно связанной плазмой, который малодоступен и требует наличия дорогостоящего оборудования. В литературе не описано ни одного способа прямого определения ХВАК и ХВАОК в варианте ВЭЖХ-МС(-МС), однако этот способ разделения является перспективным и селективным методом анализа полярных соединений, который позволяет проводить определение данного класса веществ, без использования реакций дериватизации.

1.4 Методы обнаружения и определения других ОБ

Вместе с классами соединений, описанных выше, разработан ряд веществ, которые также производились в качестве ОБ. К таким соединениям относится ВZ, который может быть обнаружен методом ГХ-МС, однако лучшие результаты при его определении достигаются при использовании процедуры дериватизации его гидроксильной группы [122]. В работе [123] описан способ определения ВZ в загрязненных почвах методом ЖХ-МС-ХИАД с пределом обнаружения 10 мг мл⁻¹. На масс-спектре при этом присутствует протогнированная молекула $[M+H]^+$ с m/z 338, при этом фрагментации молекулярного иона почти не наблюдается. В работах Блэка и Рида [55] описана процедура скрининга с использованием метода ЖХ-МС-ХИАД для подтверждения факта присутствия основных продуктов разложения ВZ, бензойной кислоты и 3-куиниклидинола. Оптимальные результаты при исследовании этих соединений получены в варианте ХИАД в режиме регистрации отрицательных и положительных ионов, соответственно, при этом пределы обнаружения составили менее 0.01 мг/мл в варианте регистрации выделенных ионов с m/z 128 ($[M+H]^+$) при определении 3-куиниклидинола, с m/z 227 ($[M-H]^-$) и 183 ($[M-CO_2H]^-$) при детектировании бензойной кислоты. Последовательное использование процедуры ТФМЭ и дериватизации ТБДМС в варианте ГХ-МС описано в работе [29] при определении бензойной кислоты. Данная процедура наиболее приемлема для этого соединения, потому что в этом случае экстракция происходит в равновесных условиях с высокой степенью извлечения и приемлемыми значениями относительного

стандартного отклонения (не более 10 %). Предел обнаружения составил 1 нг/мл в режиме регистрации полного ионного тока при исследованиях загрязненной деионизованной воды.

Отравляющие вещества раздражающего действия, в частности слезоточивые газы и аэрозоли, которые применяются при борьбе с беспорядками и обеспечивают временную потерю трудоспособности за счет раздражения кожи и слизистой оболочки глаз, приводят к затруднению дыхания и т.д., являются довольно летучими соединениями. В связи с этим предпочтителен метод ГХ-МС при их анализе [17, 124-126]. Дагостино и Провост использовали метод ГХ-МС-МС-ЭИ при идентификации ОВ раздражающего действия, хлорбензальмалонодинитрила (CS), 2-хлороацетофенона (CN), дибензоксазепина (CR) и 1-метоксициклогептатриена (CH) [127]. Селективность разработанного подхода оценена при идентификации СН в выхлопных газах дизельных двигателей, которые содержат большое количество сложных углеводородов. В режиме регистрации полного ионного тока не удалось наблюдать пик СН на хроматограмме при загрязнении 5 нг/мл, при этом в ходе пробоподготовки использовали экстракцию дихлорметаном на аппарате Соксклета. Использование режима регистрации выбранных ионных переходов в методе ГХ-МС-МС m/z 122 (M^+) \rightarrow m/z 107 ($[M-CH_3]^+$) и m/z 122 (M^+) \rightarrow m/z 92 ($[M-CH_2O]^+$) привело к увеличению селективности определения, и предел обнаружения составил 0.5 мг мл^{-1} для данного типа пробы.

1.5 Использование реакций дериватизации

Существует несколько обзорных работ, посвященных дериватирующим агентам, используемых в хроматографии, например работы авторов Блау и Халкета [128], и Тагуши [129].

1.5.1 Газовая хроматография

Необходимость в применении реакций дериватизации возникает при определении полярных продуктов трансформации ОВ методом ГХ. Такие вещества имеют низкую летучесть, могут быть термически нестабильны или иметь такие хроматографические свойства, которые приводят к уширению пиков на хроматограммах, что существенно

уменьшает пределы обнаружения. Ярким примером является определение алкил метилфосфоновых кислот и тиодигликоля, которые являются продуктами разложения нервно-паралитических отравляющих веществ и иприта, соответственно. В некоторых случаях дериватизация применяется для улучшения хроматографических свойств менее летучих веществ, например, диизопропиламиноэтиловый, О-этиловый эфир метилтиофосфоновой кислоты (VX) и хинуклидил-3-бензилата (BZ).

Реакции дериватизации также применяются для снижения химической активности и / или летучести ОВ. Большинство ОВ обладают свойствами средних электрофилов. Прямое хроматографическое определение таких ОВ (например, люизита) осложнено из-за взаимодействия с сорбентом колонки или с любым другим компонентом, обладающим нуклеофильными свойствами. Некоторые ОВ (или вещества, относящиеся к классу токсичных, указанные в Приложение Химических веществ КЗХО) являются газами при обычной температуре и обладают свойствами сильных электрофилов; примером таких газов является фосген и перфторизобутилен. Применение реакции дериватизации при анализе таких веществ, тем самым увеличивая реакционную способность и летучесть, достигается улучшение характеристики хроматографического разделения этих компонентов.

Реакции дериватизации используются для увеличения чувствительности и селективности при детектировании компонентов ОВ. Использование реакций дериватизации с реагентами, содержащими тиоловые группы, при обнаружении люизита позволяет добиться высокой селективности при использовании пламенно-фотометрического детектирования (ПФД) в варианте детектирования серосодержащих соединений. Перевод фосфоновых кислот и тиодигликоля в перфторированные производные позволяет существенно увеличить чувствительность определения данных ОВ при использовании масс-спектрометрического детектирования в варианте химической ионизации при регистрации отрицательно заряженных ионов.

Хотя применение реакций дериватизации также используется для улучшения хроматографических параметров при разделении энантиомеров, существует альтернативный подход, заключающийся в разделении изомеров на хиральных

неподвижных фазах, которые в основном используются при определении энантиомеров нервно-паралитических ОВ [130].

1.5.2 Жидкостная хроматография

Применение жидкостной хроматографии при анализе ОВ и, в частности, продуктов их трансформации обусловлено необходимостью избежать процедуры дериватизации, которая существенно увеличивает время пробоподготовки. Однако, использование реакций дериватизации позволяет изменить свойства определяемого компонента и увеличить отклик детектора при детектировании ОВ в вариантах УФ детектирования, масс-спектрометрического детектирования и т.д.

1.5.3 Недостатки дериватизации

Стадия дериватизации может являться основным источником ошибок при проведении количественного анализа. Основными недостатками, возникающими в ходе процедуры дериватизации, является поступление в хроматографическую систему мешающих компонентов из матрицы пробы и возникновение матричного эффекта за счет взаимодействия дериватирующего агента с другими компонентами пробы, также возможно подавление реакции дериватизации. Во многих случаях процедура дериватизации предполагает извлечение целевого компонента из водного раствора, путем упаривания и перерастворения в другом растворителе. Присутствующие следы воды в реакционной смеси могут взаимодействовать как с дериватирующим реагентом, так и с определяемым веществом. Кроме этого, могут происходить потери вещества при испарении, если анализируемое вещество, например, тиодигликоль, летуче. Для каждого метода дериватизации должны быть разработаны процедуры выделения целевого компонента и очистки пробы от мешающих компонентов. В работе Куйтунен и др. рассмотрены процедуры пробоподготовки, применяемые при использовании реакций дериватизации [131]. Иногда идентификация ОВ или продуктов их трансформации без стадии дериватизации по спектрофотометрическим характеристикам является более надежной, чем в случае использования производных ОВ, для установления факта присутствия ОВ в пробе. Это наблюдается, например, при

использовании метилирования в ходе процедуры дериватизации, и для некоторых производных фосгена.

Аналізу следовых количеств ОВ, их предшественников и продуктов их трансформации уделяется достаточно большое внимание в современной научной литературе. Это внимание обусловлено неоднократными сообщениями о возможном использовании ОВ в террористических и военных целях. К тому же, попадание ОВ в объекты окружающей среды в результате разлива или случайных происшествий на складах хранения ОВ вызывает большое опасение на сегодняшний день. К тому же, после принятия положений КЗХО в 1997 году, согласно которому страны обязаны уничтожить все запасы ОВ, произошло увеличение исследований по данной тематике в рамках разработки аналитических методов анализа. Так как ОВ и продукты их разложения имеют различные химические и физические свойства, например отличия в летучести и полярности, и, как правило, не содержат хромофорных групп, и к тому же при исследованиях часто приходится сталкиваться с задачами обнаружения и идентификации производных ОВ в различных по своему составу образцах (топливах, биологических жидкостях, почвах и т.д.), что приводит к необходимости разработки комплекса методик, которые должны быть направлены на исследование процедур пробоподготовки, аналитического разделения и выбора оптимальных способов детектирования при определении ОВ и их производных. Более того, в зависимости от поставленной задачи, например, при расследовании возможного факта применения ОВ в результате террористической атаки, при мониторинге продуктов разложения после очистки складских помещений, на которых хранили ОВ, необходимо ставить задачу об однозначной идентификации, при этом количественное определение является второстепенной целью исследования. При идентификации и подтверждении часто используют вариант МС и МС-МС детектирования в вариантах ГХ и ЖХ [111, 132-148], которые представляют собой наиболее перспективные и надежные методы идентификации из-за высокой чувствительности и селективности определения следовых количеств маркеров ОВ (на уровне 500 пг/мл и ниже) и широко используются

в практике контроля производства, хранения и применения ОВ. Наконец, стоит отметить, что результаты исследований, опубликованные в литературе и данные анализов, инициированных ОЗХО, наглядно демонстрируют прогресс в развитии масс-спектрометрических способов анализа в этой области задач и оказывается большое внимание, для того чтобы исключить ложные результаты при обработке полученных данных.

2. Оборудование, материалы, техника эксперимента

2.1 Оборудование и материалы

В работе использовали следующее аналитическое оборудование:

- Система ВЭЖХ-МС, состоящая из квадрупольного масс-спектрометрического детектора LCMS-2010A (Shimadzu, Япония), оснащенного двумя источниками ионизации: источником химической ионизации при атмосферном давлении и источником электрораспылительной ионизации; ВЭЖХ насоса LC-10 ADvp, работающего в режиме градиентного элюирования со смещением по низкому давлению; спектрофотометрического детектора UV-10 Avp; системного контроллера SCL-10 Avp; дегазатора подвижной фазы DGU-14A и крана-дозатора 7725i(Rheodyne, USA)

- Система капиллярного электрофореза «Капель-105М» («Люмэкс», Россия).

- Система ВЭЖХ-МС Varian 1200 с тандемным масс-спектрометрическим детектором оснащенный двумя источниками ионизации – электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении, градиентного насоса, дегазатора подвижной фазы, термостата колонок и крана-дозатора Reodine с объёмом петли 20 мкл.

- Система ВЭЖХ-МС-МС, состоящая из гибридного тандемного масс-спектрометрического детектора Qtrap 3200 (ABSciex, Канада), оснащенного двумя источниками ионизации: источником химической ионизации при атмосферном давлении и источником электрораспылительной ионизации; и жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Dionex, США).

- Жидкостный хроматограф Agilent 1100 с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС) состоящий из квадрупольного масс-селективного детектора с источником ионизации –ЭРИ, ВЭЖХ насоса, позволяющего работать в режиме градиента высокого давления, дегазатора подвижной фазы, термостата колонок и автосемплера.

- Жидкостный хроматограф Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МСⁿ), состоящий из масс-селективного детектора Bruker amaZon типа ионная

ловушка с источником ионизации – ЭРИ, ВЭЖХ насоса, позволяющего работать в режиме градиента высокого давления, дегазатора подвижной фазы, термостата колонок и термостатируемого автосемплера.

Колонки для ВЭЖХ:

Kromasil C 18 (250x2 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм SynergiPolar (250x2 мм), диаметр зерна сорбента 4 мкм (Льюмэкс, Россия)

AcclaimC18 (250 × 2 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США)

Sinergipolar (150x2 мм), диаметр зерн асорбента 4 мкм(Phenomenex, США)

ZorbaxStableBondC-18E (150x2 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Agilent, США).

Luna HILIC (250 × 4,6), диаметр зерна сорбента 5 мкм(Phenomenex, (США).

Капилляры для КЗЭ:

Капилляры кварцевый с поливиниловым покрытием внутренним диаметром 50 и 75 мкм.

Для увеличения срока службы хроматографических колонок использовали универсальные предколонок для ВЭЖХ SecurityGuard (Phenomenex, США).

Регистрацию хроматограмм проводили с помощью программных пакетов: LCMSSolution (Shimadzu, Япония), Эльфоран/Elforun (Россия), «Varian», Analyst 1.5.1 (ABSciex, Канада), AgilentTechnologies.

Для измерения pH использовали ионметр «SartoriusPB-11» (Sartorius, Германия).

Для ручного ввода пробы использовали стеклянный хроматографический шприц Agilent объемом 100 мкл (AgilentTechnologies, США).

Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более ± 5% (LABMATE, Польша) и одноразовые носики необходимых объемов.

Для перемешивания растворов применяли ультразвуковую ванну «Branson 2210 E-DTC» фирмы «Bransonic», США. Пробы центрифугировали с помощью центрифуги модели 203 фирмы Sigma, Германия.

Взвешивание точных навесок проводили на весах ExplorerPro (OhausCorporation, США). Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi,

Латвия). Для упаривания использовали роторный испаритель с автоматизированной вакуумной станцией (Buchi, Швейцария).

В работе использовали органические растворители: ацетонитрил (HPLC-MSgrade) и метанол (HPLC-MSgrade).

В работе использовали следующие стандартные образцы изопропил метилфосфоновой кислоты, пинаколил метилфосфоновой кислоты, изобутил метилфосфоновой кислоты, этил метилфосфоновой кислоты с массовой долей основного вещества не менее 98% (предоставлены ООО «НПФ Люмэкс-Защита»); стандартные образцы 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетил-цистеинил)-этана], 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана с массовой долей основного вещества не менее 98% (предоставлены ООО «НПФ Люмэкс-Защита»); стандартные образцы хлорвиниларсонистой кислоты и хлорвиниларсоновой кислота с массовой долей основного вещества не менее 98% (предоставлены ООО «НПФ Люмэкс-Защита»); 2-(N,N-диметиламино)-этансульфоновая кислота, 2-(N,N-диэтиламино)-этансульфоновая кислота, 2-(N,N-дипропиламино)-этансульфоновая кислота, 2-(N,N-диизопропиламино)-этансульфоновая кислота, синтезированные согласно стандартным операционным процедурам ООО «НПФ Люмэкс-Защита» из соответствующих диалкиламиноспиртов (структуру и чистоту веществ подтверждали масс-спектрометрически); другие реактивы: кислота соляная (ч.д.а., Химмед, Россия), ацетат аммония (Roth, Германия), кислота уксусная (ч.д.а., Химмед, Россия), раствор аммиака (х.ч., Химмед, Россия), кислота муравьиная (х.ч., Химмед, Россия), , кислота серная (ч.д.а., Химмед, Россия), гидроксид натрия (х.ч., Химмед, Россия), сорбат калия (х.ч., Химмед, Россия), кислота сульфосалициловая (х.ч., Химмед, Россия).

В ходе процедуры пробоподготовки применяли твердофазную экстракцию с использованием концентрирующих патронов Strata SDB-L (Phenomenex, США), StrataSAX (Phenomenex, США), Strata Screen A (Phenomenex, США), StrataC 18E (Phenomenex).

Подвижные фазы и рабочие растворы готовили растворением необходимых навесок в дистиллированной воде в день проведения анализа.

2.2 Техника эксперимента

Схема эксперимента по определению диалкилтауринов методом капиллярного зонного электрофореза.

Исследуемые образцы вод фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей. Вносили исследуемые вещества, используя их концентрированные растворы. Полученные образцы центрифугировали 5 мин при 16000 об./мин для удаления растворенных газов и анализировали методом КЗЭ-УФ.

Программа кондиционирования капилляра. Гидродинамическая промывка: 1. – деионированная вода – 0-2 мин; 2. – 1 М раствор NaOH – 2-4 мин; 3. – деионированная вода – 4-7 мин; рабочий буферный раствор ведущего электролита – 7-12 мин.

Условия определения диалкилтауринов методом КЗЭ-УФ. Разделение пробы проводили в анодном режиме при напряжении + 25 кВ, температура капилляра 20 °С (водяное охлаждение капилляра). Ввод пробы – гидродинамический в течение 5 с под давлением 25 мбар. В качестве рабочего буферного раствора ведущего электролита при анализе использовали 20 мМ раствор тетрабората натрия с рН 9,45 (рН довели 1 М раствором NaOH). Длина волны детектирования – 200 нм.

Схема эксперимента по определению продуктов трансформации фосфорорганических отравляющих веществ в биосредах методом ВЭЖХ-МС

Пробоподготовка. Из 1-2 мл цельной крови выделяли плазму. С целью депротеинизации в центрифужную пробирку вместимостью 1.5-2 мл переносили полученную пробу и добавляли 1 мл 30 мМ раствора сульфата цинка после чего обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Затем центрифугировали 12 мин при 8000 об мин⁻¹. После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость, подкисляли 2 каплями водного раствора соляной кислоты (1:1) и пропускали ее через кондиционированный сорбционный картридж StrataSDB-L с расходом 1-3 капли с⁻¹. Затем промывали картридж 3 мл дистиллированной воды и высушивали от остатков

воды в слабом вакууме в течение 5-10 мин. Элюировали 5 мл метанола. При этом соблюдали расход 1-3 капли с^{-1} . Элюат упаривали досуха на роторном испарителе при давлении 20-30 мм.рт.ст и температуре 35-40°C. Сухой остаток растворяли в 0.3 мл воды с добавкой 10% (об.) метанола.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выделенных отрицательных ионов, соответствующих фосфоновым кислотам: с m/z 137 при определении О-изопропилметилфосфоновой кислоты, 151 при определении О-пинаколилметилфосфоновой кислоты, 179 при определении О-изобутилметилфосфоновой кислоты. Температура переходного капилляра составляла 300°C, напряжение на распыляющем капилляре – 2000 В, поток газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 0.2 л мин^{-1} . Разделение пробы проводили в режиме градиентного элюирования, скорость потока составляла 0.2-0.3 мл мин^{-1} . Подвижная фаза А – 0.1% (об.) НСООН в воде, подвижная фаза В – 0.1% (об.) НСООН в метаноле. Программа градиентного элюирования: 0–2 мин: 100 % А, 2–15 мин: 0-100 % В, 15–20 мин: 100 % В, 20–30 мин: 100-0 % В, 30–35 мин: 100 % А. Объем вводимой пробы составлял 0.05 мл.

Схема эксперимента по определению продуктов трансформации фосфорорганических отравляющих веществ в биосредах методом ВЭЖХ-МС-МС

Пробоподготовка. Отбирали 1 мл мочи, затем центрифугировали 12 мин при 16000 $\text{об}\cdot\text{мин}^{-1}$. После центрифугирования отбирали жидкость, подщелачивали двумя каплями водного раствора аммиака (1:1) до рН 8-9 и пропускали ее через откондиционированный картридж для твердофазной экстракции StrataSDB-L с расходом 1-3 капли $\cdot\text{с}^{-1}$. Элюат собирали и исследовали хромато-масс-спектрометрически.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выделенных ионных переходов соответствующих фосфоновых кислот. Температура

переходного капилляра составляла 350°C, 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.

Схема экспериментов по экспрессному определению МФК в природных водах

Пробоподготовка. Исследуемые образцы вод фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей. Вносили исследуемые вещества, используя их концентрированные растворы. Полученные образцы центрифугировали 5 мин при 16000 об./мин для удаления растворенных газов и анализировали методом ВЭЖМХ-МС/МС.

Условия ВЭЖХ-МС/МС определения. Хроматографическое разделение проводили на колонке Acclaim RSLC (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 0.5% муравьиная кислота в воде и (Б) ацетонитрил. Хроматограммы получали в режиме изократического элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин. Содержание Б (5%) в подвижной фазе было постоянным в течение 2.5 мин. Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выбранных ионных реакций: m/z 95→79 (определение), m/z 95→63 (качественное подтверждение). Температура газа-распылителя 350 °С, газа периферийного слоя 400 °С, напряжение на распыляющем капилляре – 4500 В, скорость потока газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 10 л/мин, давление газа периферийного слоя 11 л/мин.

Схема экспериментов по определению МФК при помощи дериватизации с ПБФБ в условиях гидрофильной хроматографии.

Пробоподготовка. Исследуемые образцы вод фильтровали через мембранный пористый

фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей. Вносили исследуемые вещества, используя их концентрированные растворы. Полученные образцы упаривали в ротационном испарителе до объема менее 100 мкл. Доводили до объема 1 мл ацетонитрилом. Колбу с раствором помещали в УЗ ванну на 5 минут. Раствор переносили в полипропиленовые пробирки на 1.5 мл и проводили реакцию дериватизации с ПБФБ.

Дериватизация. К 1 мл раствора добавляли 20 мкл раствора 18-краун-6 (20 мг/мл), 20 мкл раствора K_2CO_3 (20 мг/мл) и 100 мкл раствора ПБФБ (10 мг/мл). Раствор встряхивали и помещали в термостат. Реакцию проводили при 80 °С в течение 30 минут

Условия ВЭЖХ-МС/МС определения. Хроматографическое разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Agilent, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 10 мМ ацетат аммония в воде и (Б) ацетонитрил. Хроматограммы получали в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин (Табл. 8). Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Таблица 8. Программа градиентного элюирования

Время, мин	Содержание ацетонитрила, %
0	90
5	90
6	10
10	10
10.5	90
15	90

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выбранных ионных реакций: m/z 293→265 (определение), m/z 291→263, m/z 293→215, m/z 291→213 (качественное подтверждение). Температура переходного капилляра составляла 350°С, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в

источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi.

Схема экспериментов по определению МФК и АМФК при помощи дериватизации с ПБФБ в условиях гидрофильной хроматографии.

Пробоподготовка. К исследуемым образцам грунто-пылевой смеси добавляли 10 мл деионизированной воды и помещали в УЗ ванну на 10 минут. Полученный раствор фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей и переносили в стеклянную колбу. Десять миллилитров раствора упаривали на ротационном испарителе при пониженном давлении до объема менее 100 мкл. Доводили до объема 1 мл ацетонитрилом. Колбу с раствором помещали в УЗ ванну на 5 минут. Раствор переносили в полипропиленовые пробирки на 1.5 мл и проводили реакцию дериватизации с ПБФБ.

Дериватизация. К 1 мл раствора добавляли 20 мкл раствора 18-краун-6 (20 мг/мл), 20 мкл раствора K_2CO_3 (20 мг/мл) и 100 мкл раствора ПБФБ (10 мг/мл). Раствор встряхивали и помещали в термостат. Реакцию проводили при 80 °С в течение 30 минут

Условия ВЭЖХ-МС/МС определения. Хроматографическое разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Agilent, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 10 мМ ацетат аммония в воде и (Б) ацетонитрил. Хроматограммы получали в режиме градиентного элюирования при скорости потока 1.5 мл/мин (Табл. 9). Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выбранных ионных реакций, соответствующих фосфоновым кислотам (Табл. 10). Температура переходного капилляра составляла 350°С, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi.

Таблица 9. Программа градиентного элюирования

Время, мин	Содержание ацетонитрила, %
0	93
1,5	93
7	80
7,5	10
8,5	10
8,6	93
13,6	93

Таблица 10. Ионные переходы для алкилметилфосфоновых кислот: m/z депротонированной молекулы → m/z иона-продукта

Параметр	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Основной MRM-переход	293→265	123→95	137→95	151→95	179→95
Дополнительный MRM-пер	291→263	123→79	137→79	151→79	179→79
	293→215				
	291→213				

Схема экспериментов по определению ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС методом ВЭЖХ-МС/МС

Пробоподготовка. Исследуемые образцы вод фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей. Вносили исследуемые вещества используя их концентрированные растворы. Полученные образцы центрифугировали 5 мин при 16000 об./мин для удаления растворенных газов и анализировали в выбранных условиях ВЭЖХ-МС/МС.

Условия хроматомасс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника ионов с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выбранных ионных реакций положительных ионов: m/z 212 → m/z 100 при определении ДЭМФ, m/z 240 → m/z 128 при определении ДПМФ, m/z 265 → m/z 192 при определении ДЭАС, m/z 321 → m/z 128 при определении ДПАС. В качестве выбранных ионных переходов, которые использовали для надежного обнаружения

исследуемых производных ФОВ использовали: m/z 212 \rightarrow m/z 134 для достоверного обнаружения ДЭМФ, m/z 240 \rightarrow m/z 162 для достоверного обнаружения ДПМФ, m/z 265 \rightarrow m/z 132 для достоверного обнаружения ДЭАС, m/z 321 \rightarrow m/z 160 для достоверного обнаружения ДПАС. Температура переходного капилляра составляла 300 °С (при определении ДЭАС и ДПАС) и 350 °С (при определении ДПМФ и ДЭМФ), напряжение на распыляющем капилляре 4500 В (при определении ДЭАС и ДПАС) и 5500 В (при определении ДПМФ и ДЭМФ), давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 414 кРа. Разделение пробы проводили в режиме градиентного элюирования, скорость потока составляла 0.7 мл мин⁻¹. Подвижная фаза А – 0.5% (об.) НСООН в воде, подвижная фаза В – ацетонитрил. Программа градиентного элюирования: 0–1 мин: 95 % А, 1–4 мин: 5-100 % В, 4–6 мин: 100 % В, 6–10 мин: 95 % А. Объем вводимой пробы составлял 0.02 мл.

Схема экспериментов по определению ХВАК и ХВАОК методом КЗЭ

Растворы стандартов. По точным навескам сухих веществ были приготовлены концентрированные (1000-1060 мг/л) растворы индивидуальных компонентов анализируемой смеси –2-хлорвиниларсоновой и 2-хлорвиниларсонистой кислот. В качестве растворителя использовали деионизованную воду. Полученные растворы хранили в герметичных стеклянных виалах с тефлоновой крышкой при –20°С. Рабочие растворы индивидуальных компонентов и их смеси готовили из концентрированных растворов путем разбавления в день проведения эксперимента.

Пробоподготовка. Исследуемые образцы вод фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей. Вносили исследуемые вещества, используя их концентрированные растворы. Полученные образцы центрифугировали 5 мин при 16000 об./мин для удаления растворенных газов и анализировали методом КЗЭ.

Условия КЗЭ определения. В качестве начальных условий для разделения и детектирования компонентов анализируемой смеси были выбраны следующие условия определения слабых органических кислот, частично описанные в литературе [14]:

боратный буферный раствор с концентрацией 30 мМ (измеренный рН 8.8 – 8.9), длина волны - 200 нм, рабочее напряжение - 20 кВ (анодный режим), температура капилляра - 20°C, ввод пробы – гидродинамический 180 мбар×с (6 секунд при давлении 30 мбар).

Схема эксперимента по определению хлорвиниларсонистой и хлорвиниларсоновой кислот в биосредах методом ВЭЖХ-МС-МС

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 рН 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 хромато-масс-спектрометрически.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выделенных ионных переходов соответствующих хлорвиниларсонистой и хлорвиниларсоновой 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 0.4 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: 0–2 мин: 10% В, 2–9 мин: 10–60%В, 9–11 мин: 60–10% В, 11–12 мин: 10% В. Объем вводимой пробы составлял 0.02 мл.

Схема эксперимента по определению 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетил-цистеинил)-этана] в биосредах методом ВЭЖХ-МС-МС

Пробоподготовка образцов крови. К пробе 1 мл крови добавляли 0.5 мл 10 % раствора соляной кислоты и вносили СБАЦЭ, используя концентрированный раствор 1000 мкг мл⁻¹. Полученную смесь центрифугировали 10 мин при 8000 об·мин⁻¹. После центрифугирования отбирали надосадочную жидкость и пропускали ее через

откондиционированный картридж для твердофазной экстракции StrataC18-E с расходом 1-3 капли·с⁻¹. Элюат собирали и исследовали хромато-масс- спектрометрически.

Пробоподготовка образцов мочи. Отбирали 1.5 мл мочи, затем центрифугировали 12 мин при 16000 об·мин⁻¹. После центрифугирования отбирали жидкость (предварительно доводили рН до 2.5 уксусной кислотой), пропускали ее через откондиционированный картридж для твердофазной экстракции Strata C18-E с расходом 1-3 капли·с⁻¹. Элюат собирали и исследовали хромато-масс-спектрометрически.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием системы ВЭЖХ-МС-МС Varian (USA) в режиме регистрации выделенных ионных переходов соответствующих СБАЦЭ. Температура переходного капилляра составляла 350°С, напряжение на распыляющем капилляре +2000 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 15 psi. Разделение пробы проводили в режиме градиентного элюирования, скорость потока составляла 0.3 мл·мин⁻¹. Подвижная фаза А – 20 мМ раствор ацетата аммония в воде, подвижная фаза В – ацетонитрил. Программа градиентного элюирования: 0–5 мин: 2% В, 5–6 мин: 2–20% В, 6–8 мин: 20–90% В. Объем вводимой пробы составлял 0.02 мл.

Схема эксперимента по определению 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана в биосредах методом ВЭЖХ-МС-МС

Пробоподготовка. Отбирали 1 мл мочи, затем центрифугировали 12 мин при 16000 об·мин⁻¹. После центрифугирования отбирали жидкость, подкисляли раствором уксусной кислоты (1:1) до рН 2.5 и пропускали ее через откондиционированный картридж для твердофазной экстракции Strata SDB-L с расходом 1-3 капли·с⁻¹. Элюат собирали и исследовали хромато-масс- спектрометрически.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выделенных ионных переходов соответствующих исследуемым веществам. Температура переходного капилляра составляла 350°С, напряжение на

распыляющем капилляре – +5500 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, 8–8.3мин: 100–2% В. Объем вводимой пробы составлял 0.02 мл.

В ходе разработки и апробации всех подходов проводилось по три параллельных измерения. Полученные данные обрабатывались статистически.

Схема экспериментов по экспрессному определению ТДГК в природных водах и моче.

Пробоподготовка. Пробы мочи (0.2 мл) разбавляли 0.8 мл деионизованной воды и переносили в стеклянные пробирки для ввода в ВЭЖХ-МС/МС систему. Пробы природной воды центрифугировали в течение 1 мин при 14000 об/мин и пропускали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 20 мкм для устранения механических примесей. Далее пробу переносили в стеклянные пробирки для ввода в ВЭЖХ-МС/МС систему.

Условия ВЭЖХ-МС/МС определения. Хроматографическое разделение проводили на колонке Acclaim RSLC (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 0.1% муравьиная кислота в воде и (Б) ацетонитрил. Хроматограммы получали в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин (Табл. 11). Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Таблица 11. Программа градиентного элюирования.

Время, мин	Содержание ацетонитрила Б, %
0	2
2	2
6	95
7	95
7.2	2
10.2	2

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выбранных ионных реакций: m/z 149→105 (определение), m/z 149→61 (качественное подтверждение). Температура переходного капилляра составляла 350°C, напряжение на распыляющем капилляре – 4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi.

Оценка предела обнаружения

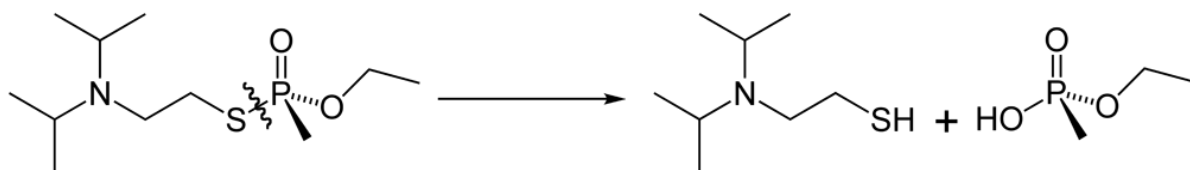
Предел обнаружения всех разработанных способов находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика 3:1).

3. Разработка способов обнаружения и определения продуктов трансформации нервно-паралитических ОВ

3.1 Разработка способа определения продуктов окисления V-газов методом капиллярного зонного электрофореза

Присутствие 2-(диалкиламино)-этансульфоновых кислот (N,N-диалкилзамещенных тауринов) в водной среде является косвенным доказательством применения, а также – в случае аварийного поступления в окружающую среду – хранения, производства и переработки ФОВ нервно-паралитического действия.

ФОВ класса V-газов представляют собой малолетучие высокотоксичные соединения с высокой температурой кипения и относительно высокой стойкостью. С химической точки зрения, это в основном представители класса S-диалкиламиноэтиловых, O-алкиловых эфиров алкилфосфоновой кислоты (VX, VR (P-33), VG и, предлагавшиеся в виде перспективных, VE, VM и VS). При попадании в окружающую среду и при воздействии на животных и человека данные соединения постепенно разлагаются с образованием соответствующих 2-(диалкиламино)-этансульфоновых кислот и эфиров алкилфосфоновой кислоты, которые намного стабильнее исходных соединений. Данные соединения специфичны и не встречаются в природе, поэтому они могут служить маркерами, сигнализирующими о факте применения V-газов. Следующая схема показывает процесс разложения ФОВ VX в окружающей среде (образующийся тиол окисляется затем в сульфокислоту):



Исследуемые в работе вещества – диметилтаурин (ДМТ), 2-(диэтиламино)-этансульфоновая кислота (диэтилтаурина, ДЭТ), 2-(дипропиламино)-этансульфоновая кислота (дипропилтаурина, ДПТ) и 2-(диизопропиламино)-этансульфоновая кислота (диизопропилтаурина, ДИТ) представляют собой органические вещества амфотерной природы и проявляют свойства слабых органических кислот (по сульфогруппе) и

слабых оснований (за счет протонирования атома азота). Главное и существенное отличие исследуемых соединений от таурина состоит в том, что аминогруппа в структуре алкилтауринов не способна вступать в реакции, характерные для аминов и аминокислот (реакции с кетонами, галоген ангидридами и т.д.) и проявляет свойства третичного амина. Этот факт сильно ограничивает область доступных для определения исследуемых соединений аналитических методов и подходов.

В доступной литературе не описано подходов для разделения и определения исследуемых замещенных тауринов, однако встречается множество работ посвященных таурину. Описание использования методов ВЭЖХ и ионной хроматографии позволяют выбрать начальные условия для хроматографического разделения замещенных тауринов с их последующим масс-спектрометрическим детектированием. В качестве таких предварительных условий целесообразно рассматривать обращено-фазовую хроматографическую систему, в которой теоретически должно достигаться селективное разделение тауринов с алкильными радикалами различной длины.

На данном этапе работы исследовали поведение диалкилтауринов методом капиллярного зонного электрофореза для создания подхода, позволяющего проводить скрининг данных продуктов окисления V-газов в объектах окружающей среды. В выбранном методе определения основным параметром, влияющим на разделение компонентов, является электрофоретическая подвижность иона, которая зависит от двух факторов – заряда и ионного радиуса. Исследуемые вещества представляют собой слабые органические кислоты, поэтому в щелочной среде они существуют практически полностью в виде анионов (за счет депротонирования сульфогруппы). Существенное различие в ионных радиусах для исследуемых веществ обусловлено тем, что алкильные радикалы в молекулах существенно отличаются по длине. Можно предположить, что этих отличий в размерах окажется достаточно, чтобы обеспечить исследуемым веществам существенно различающуюся электрофоретическую подвижность и селективное разделение методом КЗЭ. Таким образом, для достижения необходимых параметров разделения (эффективности и селективности) необходимо варьировать состав ведущего электролита, напряжение и диаметр капилляра.

Для детектирования веществ в методе капиллярного электрофореза чаще всего проводят измерение оптической плотности зоны пробы на выходе из капилляра (имеется в виду выход из участка капилляра, где происходит разделение пробы, который определяется т.н. эффективной длиной капилляра). Для детектирования чаще всего используют характеристичные длины волн, отличающиеся максимальным поглощением определяемого вещества (прямое спектрофотометрическое детектирование). Метод прямого детектирования более прост и универсален в реализации, поэтому в настоящей работе изучена возможность именно этого варианта детектирования.

В качестве начальных условий для разделения и детектирования компонентов анализируемой смеси были выбраны следующие условия, частично описанные в литературе для определения таурина [146]: боратный буферный раствор с концентрацией 20 мМ (измеренный рН 8,8 – 8,9), длина волны 200 нм, рабочее напряжение +25 кВ, температура капилляра 20°C, ввод пробы 125 мбар×с (5 секунд при давлении 25 мбар). В качестве рабочего капилляра из соображений более высокой чувствительности был выбран немодифицированный капилляр внутренним диаметром (ID) 75 мкм с эффективной длиной 50,5 см (общая длина 60 см). Электрофореграмма, полученная в указанных условиях, представлена на рисунке 22.

Для соотнесения пиков компонентов смеси были проанализированы растворы индивидуальных компонентов. На рисунке 23 представлено наложение электрофореграмм индивидуальных компонентов, и приводится для сравнения электрофореграмма модельной смеси. Из представленных электрофореграмм видно, что время миграции 2-(диалкиламино)-этансульфоновых кислот зависит от того какой радикал находится у атома азота: при увеличении числа атомов углерода снижается электрофоретическая подвижность соответствующих анионов, что хорошо согласуется с используемыми теоретическими представлениями о механизме разделения диалкилтауринов. Таким образом, время миграции уменьшается с ростом и разветвленностью углеродной цепочки радикала: наибольшее время миграции соответствует 2-(диметиламино)-этансульфоновой кислоте, а наименьшее - 2-

(диизопропиламино)-этансульфоновой кислоте. Выбранные для разделения компонентов условия позволяют проводить успешное и селективное разделение пробы.

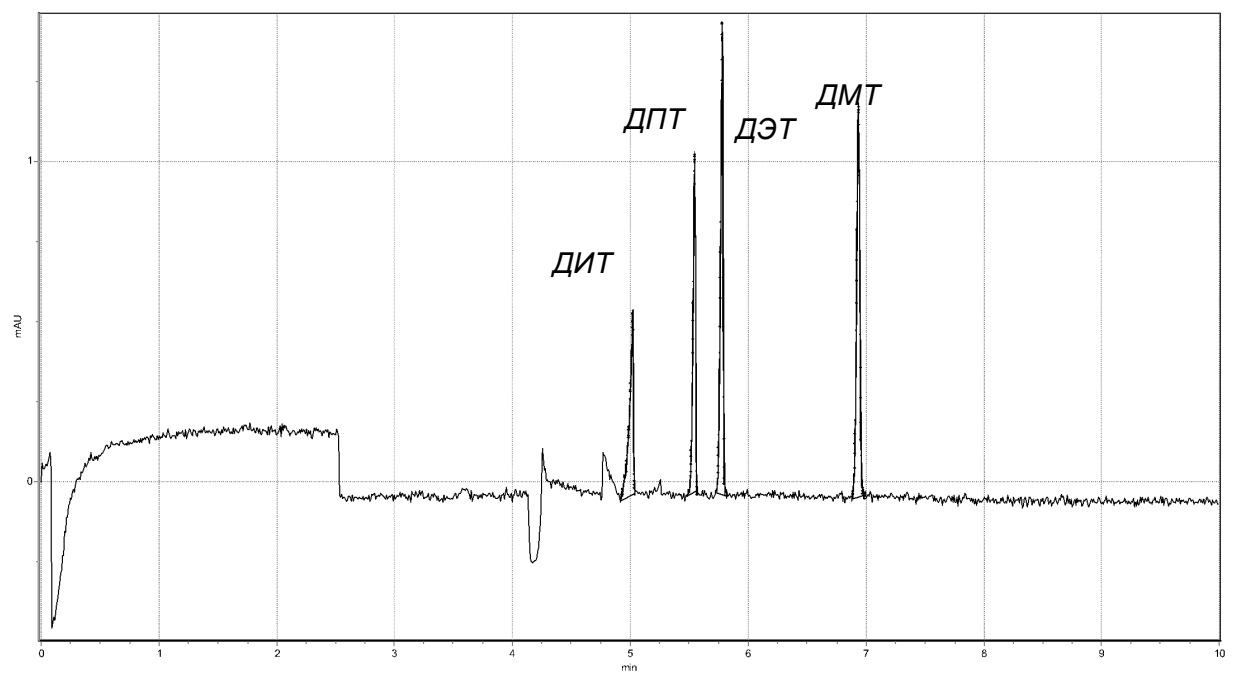


Рис. 22. Электрофореграмма смеси четырех производных таурина. Концентрация компонентов в смеси 100 мг/л. Ввод пробы 125 мбар×с, буфер боратный 20 мМ (рН 8,85), капилляр ID = 75 мкм, $L_{эфф}/L_{общ} = 50,5/60$ см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 200 нм, температура 20°C.

Таблица 12. Характеристики разделения исследуемых соединений в выбранных условиях анализа методом КЗЭ

Вещество (по порядку выхода пика)	Время миграции, мин	Эффективность, тыс. теоретических тарелок	Разрешение, $R_{n, n+1}$
ДИТ	5,02	174	4,9
ДПТ	5,54	363	2,5
ДЭТ	5,78	296	11
ДМТ	6,94	332	—

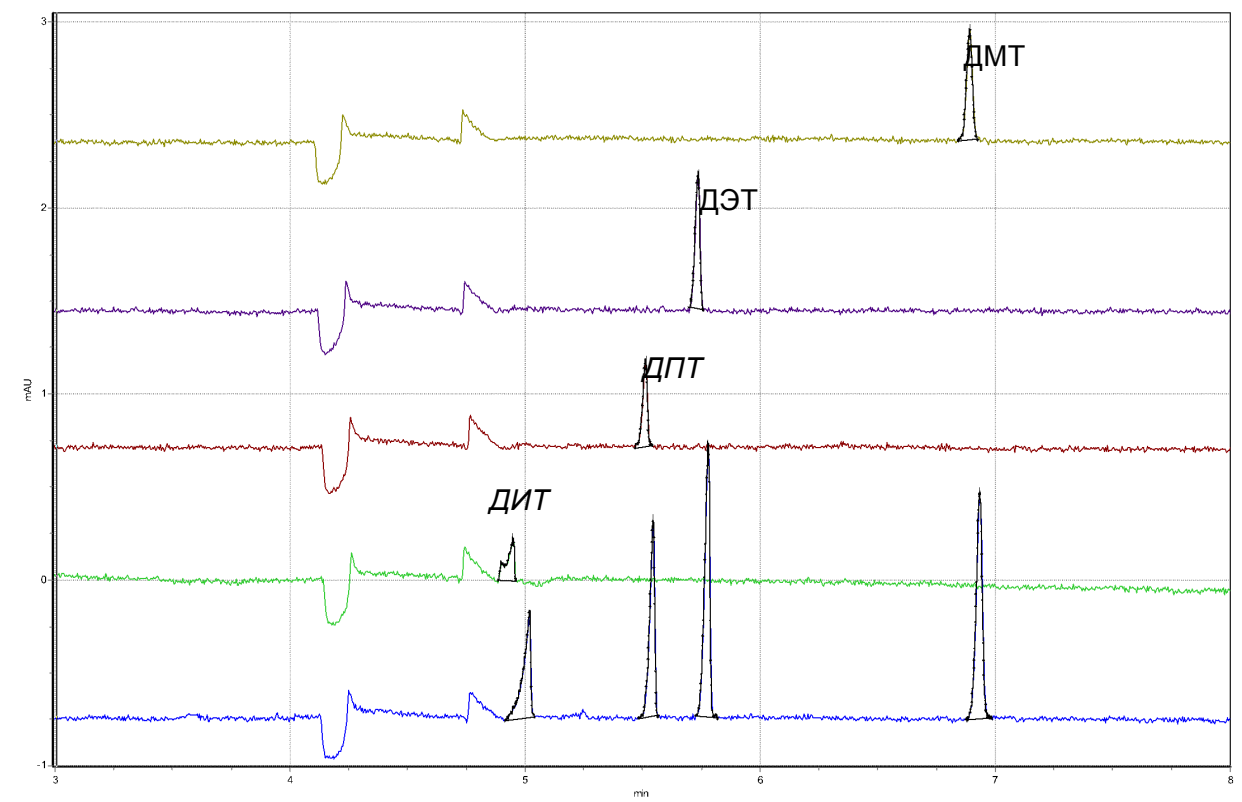


Рис. 23. Наложение электрофореграмм индивидуальных компонентов ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ.

Из представленного рисунка видно, что все четыре компонента анализируемой смеси полностью разделяются между собой с разрешением от 2,5 до 11, при эффективности от 175 до 360 тыс. теоретических тарелок (табл. 12).

При проведении прямого спектрофотометрического детектирования измеряют оптическую плотность раствора выходящего из капилляра. Для достижения максимальной чувствительности обычно используют длину волны, соответствующую максимуму поглощения исследуемых веществ или находящуюся вблизи этого максимума. Также при выборе длины волны необходимо учитывать величину фонового сигнала и уровень шума, которые обычно определяются поглощением компонентов ведущего электролита при заданной длине волны.

Для выбора оптимальных условий прямого детектирования и построения спектров поглощения определяемых компонентов был снят ряд электрофореграмм четырехкомпонентной смеси сульфокислот в диапазоне длин волн от 190 до 235 нм с шагом 5 нм. Полученные электрофореграммы и спектры поглощения представлены на рисунках 24-25.

Из представленных рисунков видно, что максимумы поглощения исследуемых веществ находятся в коротковолновой (дальней) области ультрафиолетового спектра за минимальной границей рабочего диапазона прибора (190 нм). Таким образом, оптимальные результаты достигаются при использовании длины волны 200 нм (которая применялась в дальнейшей работе для прямого детектирования). Следует отметить, что описанный в литературе способ определения незамещенного таурина также основан на измерении оптической плотности при 200 нм.

Важно отметить, что правильный подход к выбору длины волны имеет наибольшее значение в случае 2-(диизопропиламино)-этансульфоновой кислоты, которая поглощает несколько слабее, чем остальные сульфокислоты в анализируемой смеси.

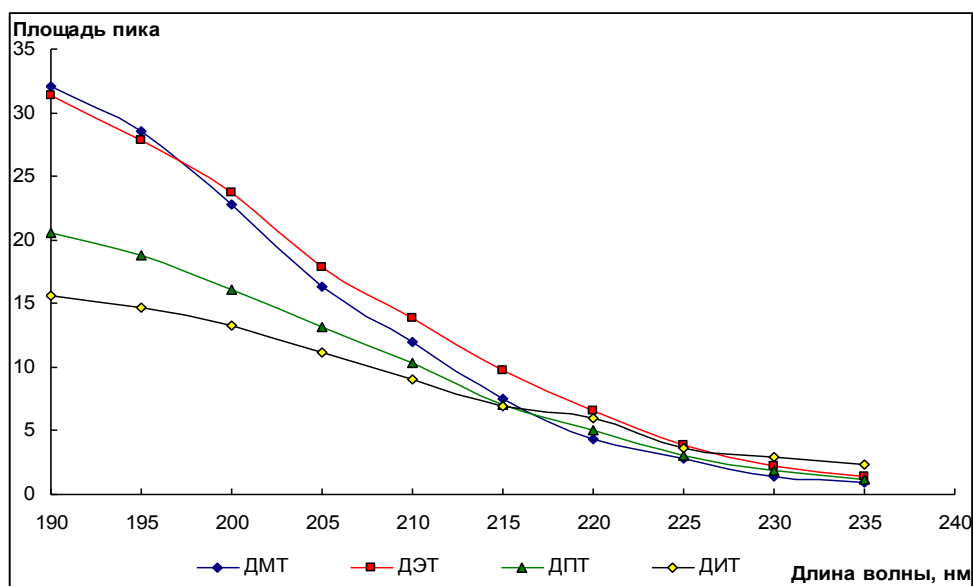


Рис. 24. Электронные спектры поглощения 2-(диалкиламино)-этансульфоновых кислот в диапазоне 190-235 нм с шагом 5 нм.

ДЭТ

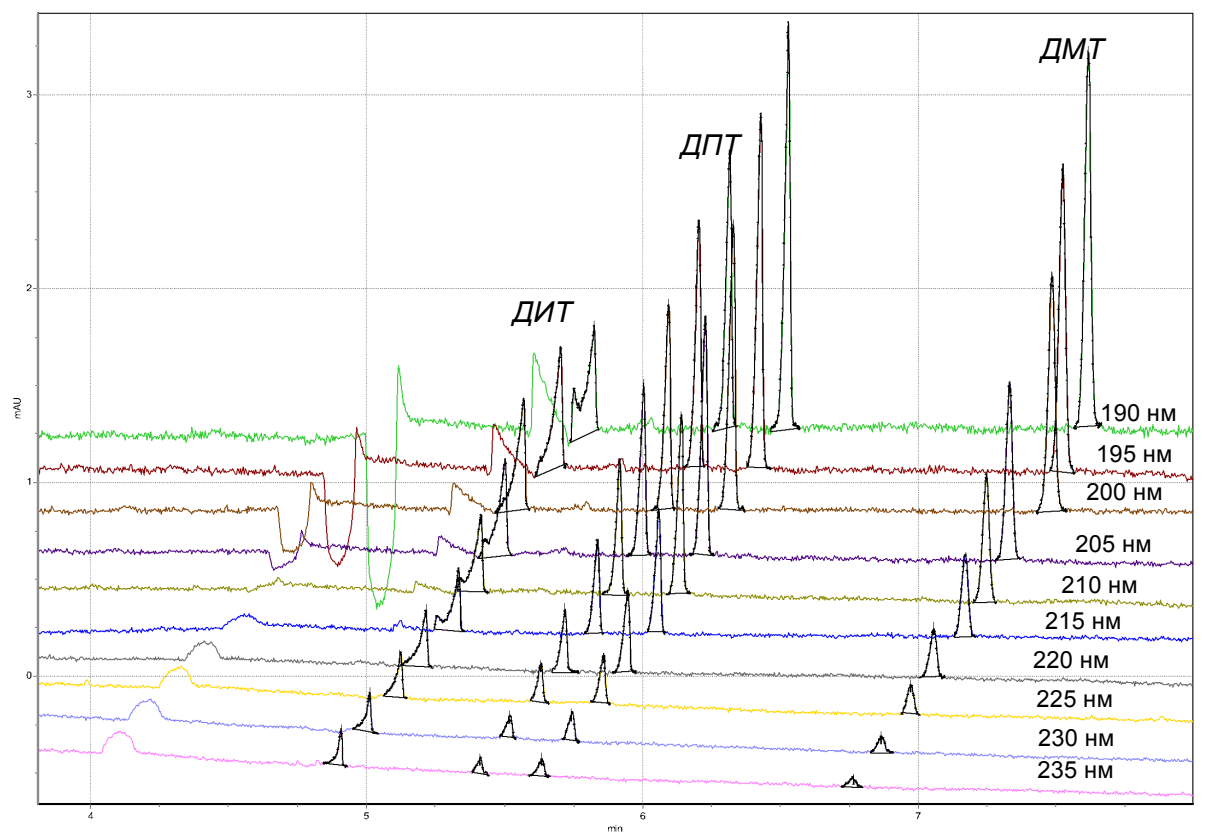


Рис. 25. Наложение электрофореграмм, полученных при различных длинах волн, в одном масштабе. Концентрация компонентов в смеси 100 мг/л. Ввод пробы 125 мбар×с, буфер боратный 20 мМ (рН 8,85), капилляр ID = 75 мкм, $L_{эф}/L_{общ} = 50,5/60$ см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 190-235 нм, температура 20°C.

3.1.3 Влияние напряжения, концентрации и рН рабочего буферного раствора

Напряжение, прикладываемое к капилляру для достижения разделения компонентов пробы, является важным фактором, влияющим на получаемый результат. Повышение напряжения приводит к ускорению электроосмотического потока и увеличению собственной скорости дрейфа ионов определяемых веществ, что позволяет проводить экспрессный анализ, однако значительное увеличение прикладываемого напряжения может приводить к перегреву капилляра, протеканию в нем электролиза, приводящего к образованию пузырьков газа внутри капилляра, что существенно снижает стабильность работы всей системы.

Влияние напряжения, подаваемого на электроды во время анализа, на картину разделения представлено на рисунке 26.

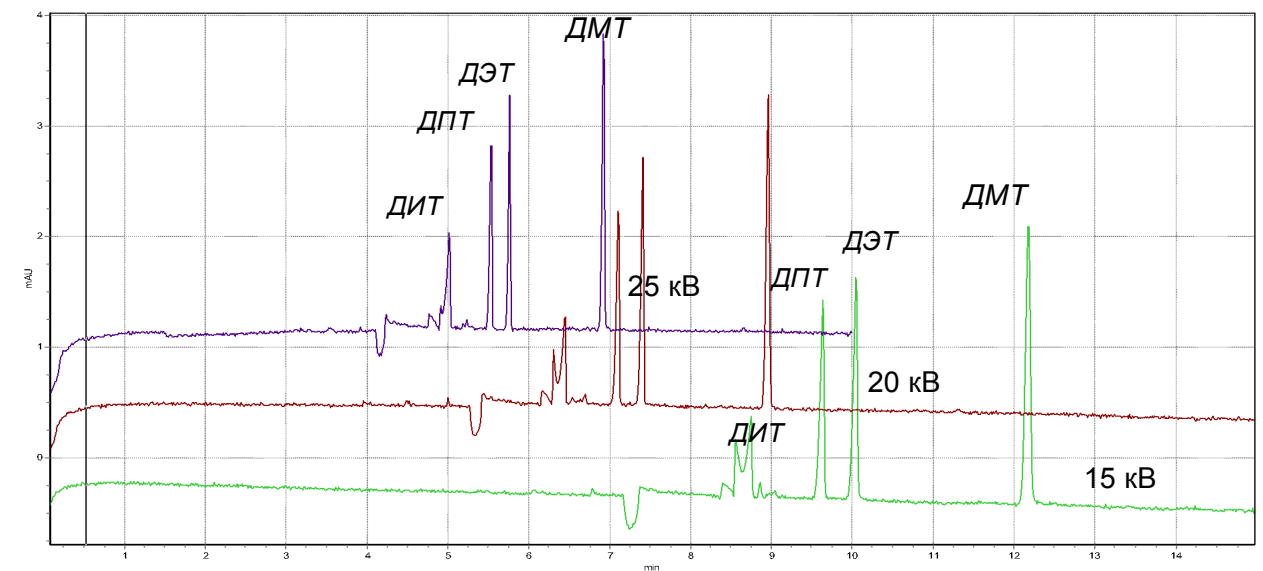


Рис. 26. Наложение электрофореграмм, полученных при разном напряжении на электродах, в одном масштабе. Концентрация компонентов в смеси 250 мг/л. Ввод пробы 125 мбар×с, буфер боратный 20 мМ (рН 8,85), капилляр ID = 75 мкм, $L_{эф}/L_{общ} = 50,5/60$ см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 200 нм, температура 20°C.

Как видно из рис. 26, уменьшение напряжения практически не влияет на селективность разделения. Стоит отметить также возрастающее искажение пика 2-(диизопропиламино)-этансульфоновой кислоты при уменьшении напряжения. Таким образом, экспериментально показано, что оптимальным напряжением для разделения диалкилтауринов методом КЗЭ является 25 кВ.

Концентрация буферного раствора в ведущем электролите может оказывать существенное влияние на селективность разделения пробы. В работе изучали влияние концентрации буфера на картину разделения (рис. 27).

Как видно из представленных электрофореграмм, концентрация боратного буфера практически не влияет на разрешение пиков, однако с увеличением концентрации происходит изменение порядка выхода мешающего системного пика и пика 2-(диизопропиламино)-этансульфоновой кислоты, при концентрации 30 мМ они накладываются друг на друга, а при концентрации 40 мМ выходят в обратном порядке.

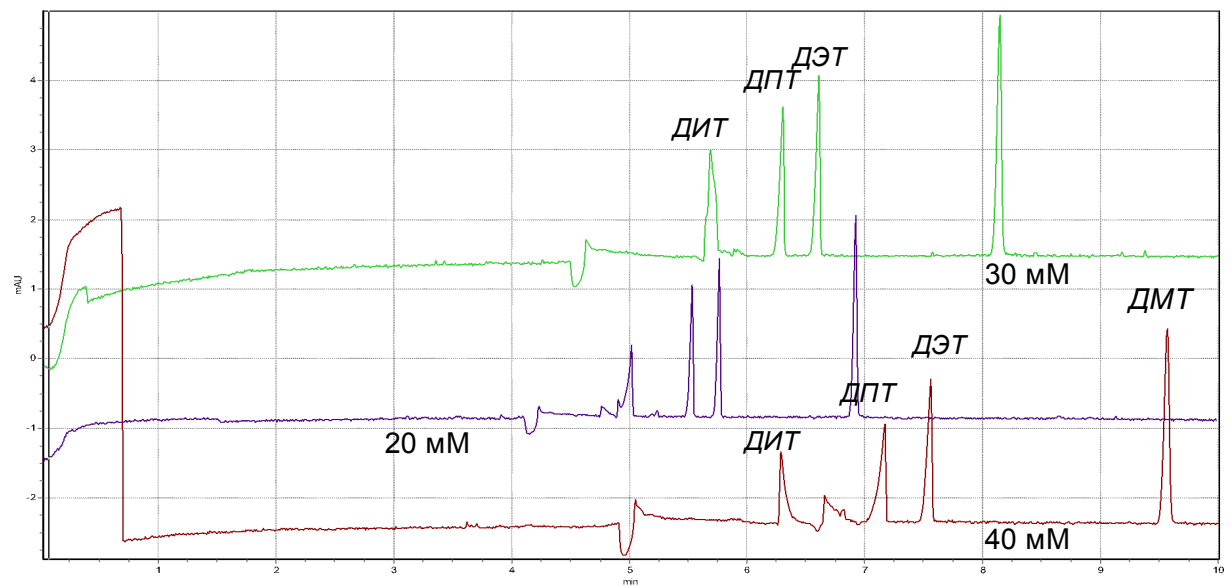


Рис. 27. Наложение электрофореграмм, полученных при различных концентрациях боратного буфера, в одном масштабе. Концентрация компонентов в смеси 250 мг/л.. Ввод пробы 125 мбар×с, буфер боратный (рН 8,85), капилляр ID = 75 мкм, $L_{эфф}/L_{общ} = 50,5/60$ см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 200 нм, температура 20°C.

Картина разделения в последнем случае лучше, чем при концентрации 20 мМ, однако значительно возрастает время анализа и достигается достаточно большой капиллярный ток, а кроме того искажению может подвергаться пик 2-(дипропиламино)-этансульфоновой кислоты.

На электрофоретическое разделение компонентов большое влияние оказывает рН рабочего буфера. Такое влияние связано с тем, что исследуемые вещества представляют собой слабые органические кислоты, поэтому при различных значения рН может меняться доля эффективно ионизированной (депротонированной) формы вещества

Для изучения зависимости картины разделения от рН рабочего буфера исходный 20 мМ боратный буфер доводили до рН 8 ортофосфорной кислотой и до рН 9,45 и 10 5 М раствором NaOH. Зависимость картины разделения и тока в капилляре от влияния рН рабочего буфера показано на рисунке 28.

Как видно из представленных электрофореграмм, рН рабочего буфера в значительной степени влияет на картину разделения, изменяя время миграции и разрешение пиков, что согласуется с амфотерной природой исследуемых соединений. Наилучшая картина разделения получена при рН рабочего буфера 9,45, такой рабочий

буфер использовали в дальнейшей работе (характеристики разделения представлены в табл. 13). Рабочий буфер с рН 8,0 показал неудовлетворительные результаты, поэтому от подкисления рабочего буфера в дальнейшем отказались.

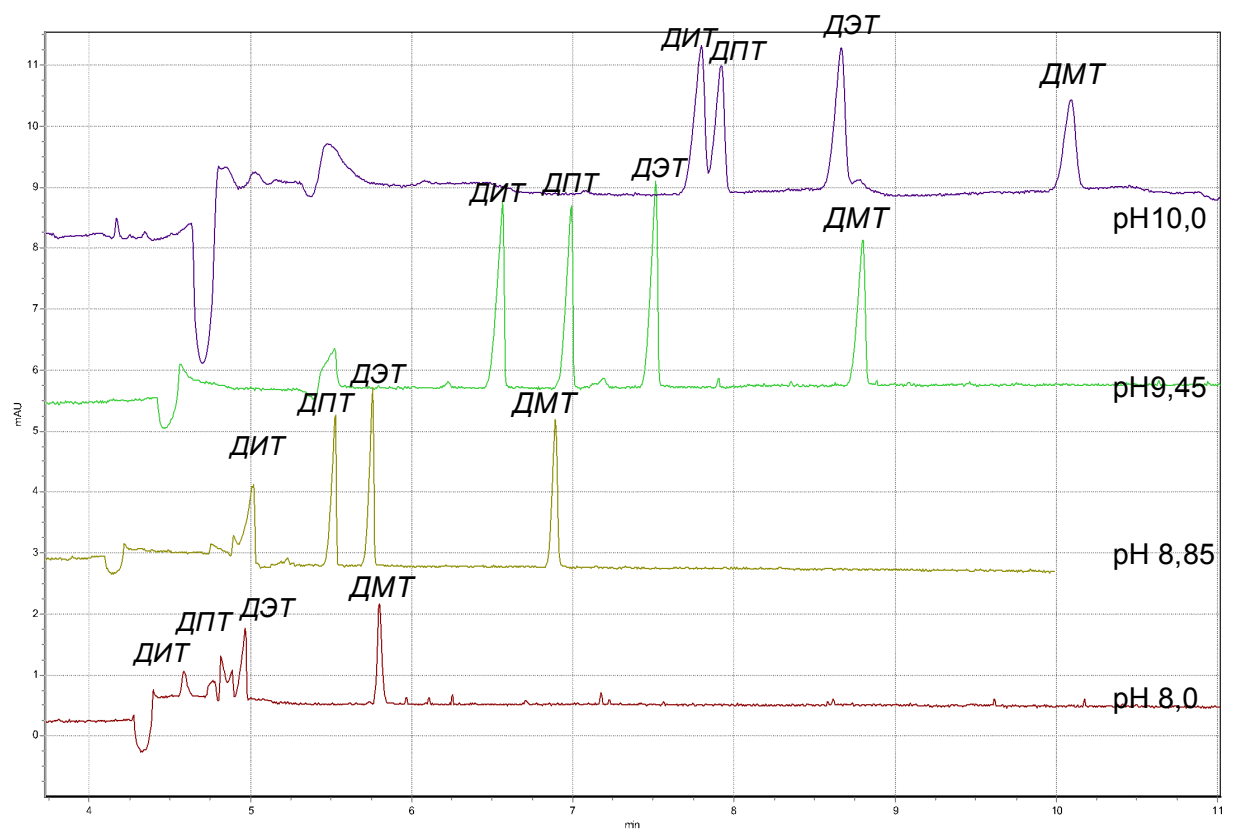


Рис. 28. Наложение электрофореграмм, полученных при различных значениях рН 20 мМ боратного буфера, в одном масштабе. Концентрация компонентов в смеси 250 мг/л. Ввод пробы 125 мбар×с, капилляр ID = 75 мкм, $L_{эфф}/L_{общ} = 50,5/60$ см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 200 нм, температура 20°C.

Таблица 13. Характеристики разделения исследуемой смеси диалкилтауринов при оптимальных условиях в варианте КЗЭ

Вещество (по порядку выхода пика)	Время миграции, мин	Эффективность, тыс. теор. тарелок	Разрешение, $R_{n, n+1}$
ДИТ	6,44	207	4,9
ДПТ	6,93	240	4,9
ДЭТ	7,44	250	10,8
ДМТ	8,81	212	—

В выбранных условиях разделения диалкилтауринов построены градуировочные зависимости для компонентов анализируемой смеси в диапазоне концентраций 5–250 мкг/мл, рассчитаны пределы обнаружения и метрологические характеристики анализа (табл. 14). Стоит отметить, что в ходе межлабораторных испытаний ОЗХО направляет в лаборатории для анализа реальные образцы вод с содержанием данных маркеров на уровне 10 мг/л и выше.

Таблица 14. Метрологические характеристики определения ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ методом КЗЭ-УФ

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

Из таблицы 14 видно, что предложенный подход характеризуется необходимой чувствительностью, хорошими метрологическими характеристиками и экспрессностью при определении диалкилтауринов.

Предложенный подход опробован при анализе растворов смесей определяемых веществ в реальных пробах воды (проверка правильности подхода методом введено – найдено, табл. 15). В таблице 16 представлены данные по химическому составу использованных при апробации подхода вод. Пример полученных электрофореграмм представлен на рисунке 29. В качестве объектов для исследования выбирали образцы воды, существенно отличающиеся по ключевым параметрам, характеризующим химический состав, – концентрациям металлов, анионов, органических веществ и другим показателям (табл.16).

Как видно из представленных результатов мешающее влияние матрицы в шести исследованных реальных образцах вод практически не сказывается на определении компонентов на уровне содержания 5 мг/л и выше. Таким образом, определению диалкилтауринов не мешает присутствие неорганических анионов, металлов,

повышенные значения жесткости, мутности и цветности, а также значительное валовое содержание органических веществ (определяется величиной перманганатной окисляемости).

Таблица 15. Проверка правильности разработанного подхода методом «введено-найдено»

Проба воды	Введено в смеси, мг/л	Найдено, мг/л			
		ДИТ	ДПТ	ДЭТ	ДМТ
Водопровод	10	10,0±0,8	9,9±0,7	10,2±0,8	10,1±0,9
Колодец	10	9,9±0,6	9,9±0,8	9,6±0,8	9,6±1,0
Скважина	10	10,0±0,6	9,7±0,6	9,8±0,7	9,5±1,0
Снег	10	9,7±0,8	9,4±0,9	9,8±0,9	10,3±0,8
Снег с АЗС	10	9,4±0,7	9,5±0,8	10,1±0,6	10,3±0,9
Речная вода	10	10,3±0,8	10,1±0,6	9,9±0,8	10,1±0,9

Таблица 16. Некоторые показатели химического состава образцов природных вод, выбранных для проведения исследований

Параметр	Вода из скважины	Речная вода	Колодезная вода	Снег	Снег с АЗС	Водопроводная
Цветность в градусах	9	15	11	5	5	2
Мутность, ЕМФ, мг/л	2	9	7	10	12	0
Водородный показатель (рН)	7,00	7,47	7,03	7,35	7,14	7,34
Общая жесткость, мг/л /мг.-экв/л	/4,6	/5,0	/9,4	/2,5	/1,9	/6,0
Хлориды (Сl), мг/л	3,1	40,0	27,7	0,5	0,9	9,2
Сульфаты, мг/л	7,2	11,6	40,4	6,5	5,5	13,0
Марганец, мг/л	0,009	0,005	0,27	0,010	0,10	0,002
Фториды, мг/л	1,3	0,4	0,5	1,4	0,3	0,6
Железо общ., мг/л	0,08	0,03	0,85	1,30	2,14	0,01
Медь, мкг/л	40	≥10	≥10	≥10	≥10	≥10
Окисляемость перманганатная, мгО ₂ /л	0,4	4,8	2,4	0,3	9,9	1,3
Нитраты, мг/л	3,1	28,6	4,0	1,2	<0,05	12,0

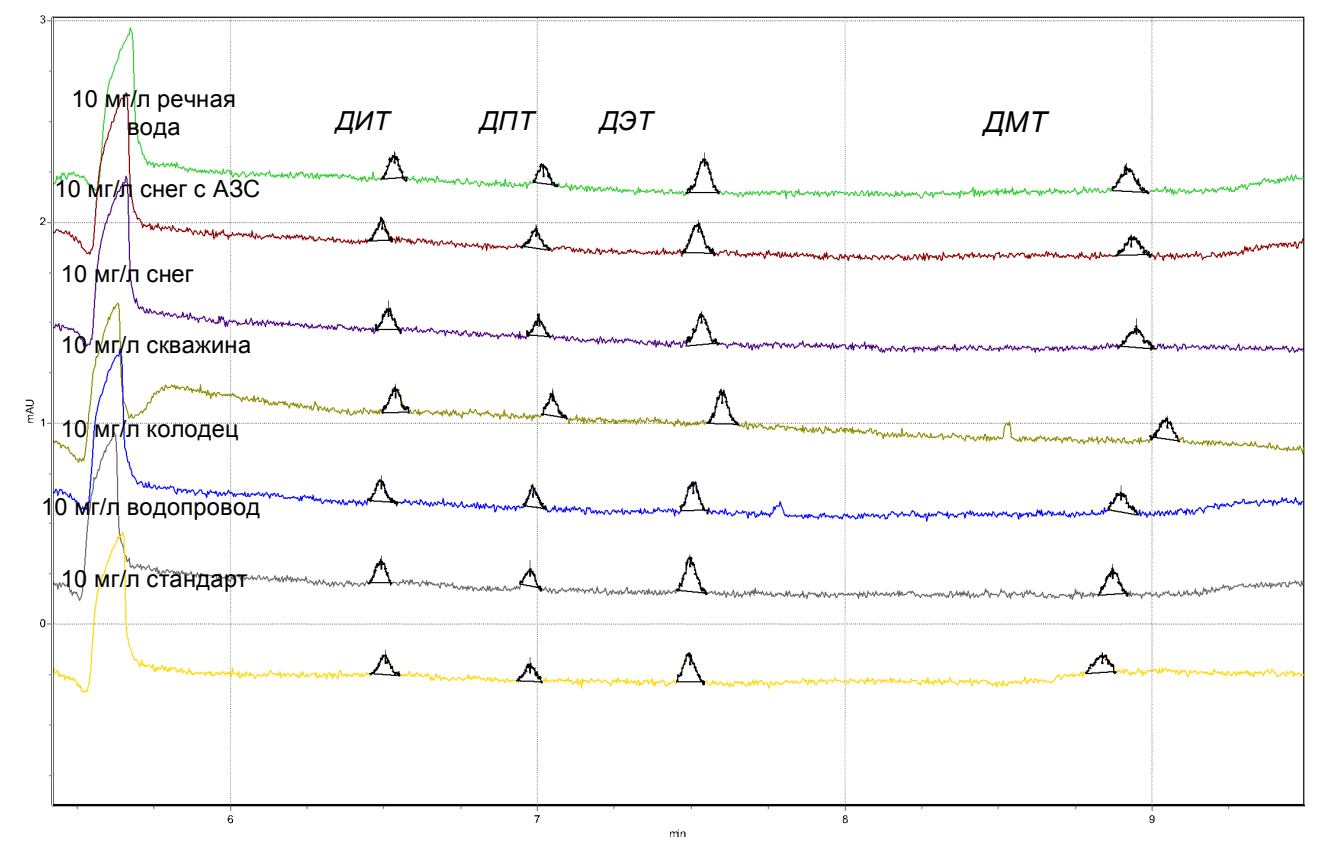


Рис. 29. Наложение электрофореграмм, полученных при использовании различных реальных образцов вод в качестве матрицы, в одном масштабе. Ввод пробы 125 мбар×с, буфер боратный 20 мМ (рН 9,45), капилляр ID = 75 мкм, $L_{эфф}/L_{общ} = 50,5/60$ см, напряжение +25 кВ (анодный вариант), длина волны 200 нм, температура 20°C.

Для апробации разработанного способа готовились модельные пробы с различным содержанием целевых веществ в различных водных объектах. Обнаружение считалось достоверным при условии превышения отношения сигнал/шум значения 3:1 для характеристичных пиков соединений, отклонении времени миграции от стандартного не более 15% и отклонения нормированного времени миграции на время миграции электроосмотического потока не более 7%. Результаты проведенных анализов представлены в таблице 17.

Таблица 17. Результаты апробации способа определения диалкилтауринов методом КЗЭ-УФ на модельных пробах

№ проб ы	Описание пробы	Содержание внесенных маркеров ОВ, мг/мл	Результаты обнаружения
1	Дистиллированная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены
2	Вода из скважины	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены
3	Речная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены
4	Колодезная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены
5	снег	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены
6	Снег с АЗС	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены
7	Водопроводная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 5 каждого	Достоверно обнаружены

3.2 Разработка способа определения продуктов окисления V-газов методом ВЭЖХ-МС

Применение масс-спектрометрического детектора позволяет заметно упростить схему анализа и добиться приемлемых характеристик определения. Универсальность данного типа детектирования позволяет отказаться от использования процедуры дериватизации. Высокая чувствительность и высочайшая селективность метода также способствуют упрощению анализа реальных объектов благодаря существенному упрощению процедуры пробоподготовки.

Разработка способа определения диалкилтауринов методом ВЭЖХ-МС является важной задачей, решение которой позволит создать арбитражный подход обнаружения

исследуемых соединений на низком уровне содержаний (нг/мл) и включает в себя два основных этапа: выбор оптимальных условий масс-спектрометрического детектирования и оптимизацию условий хроматографического разделения пробы. Кроме того, при разработке подхода необходимо провести оценку метрологических характеристик предложенного подхода и оценить мешающее влияние матрицы пробы.

Для достижения высокой чувствительности масс-спектрометрического детектирования необходимо выбрать оптимальный источник ионизации, его полярность и выбрать характеристичные ионы, в дальнейшем используемые для детектирования определяемых веществ в режиме регистрации выделенных ионов.

Диалкилтаурины проявляют свойства органических оснований, легко протонируются в слабокислой среде, образуя положительно заряженные ионы, а также могут образовывать отрицательно заряженные ионы за счет проявления кислотных свойств.

Для выбора типа и полярности источника ионизации сравнивали интенсивности откликов детектора при исследовании стандартных растворов диалкилтауринов (концентрация компонентов 1 мкг/мл). Для сравнения отношений сигнал/шум, достигаемых при использовании разных вариантов ионизации и полярности использовали типичные параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем. При использовании данных настроек масс-анализатора и варьируя тип источника и полярность регистрируемых ионов (использовали электрораспылительную ионизацию (ЭРИ) и химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД)), максимальное соотношение сигнал/шум (т.е. максимальная чувствительность) достигается при использовании ХИАД в варианте регистрации положительных ионов, что, по-видимому, связано с наличием атомов азота в структуре диалкилтауринов, которые способны легко протонироваться.

Для выбора характеристичных ионов для детектирования диалкилтауринов изучали масс-спектры, получаемые в условиях ХИАД (+) (рис. 30 - 33) и выбирали пики ионов для детектирования, которые имеют наибольшую интенсивность. В спектрах всех диалкилтауринов наиболее интенсивны сигналы протонированных молекул, для

ДМТ и ДЭТ фрагментация незначительна (на спектре присутствуют молекулярные ионы с m/z 154 и 182 соответственно), а в случае ДПТ и ДИТ в масс-спектрах присутствуют ионы-продукты, образующиеся при отщеплении сульфогруппы (с m/z 128 для обоих изомеров). Масс-спектры ДПТ и ДИТ, являющихся изомерами, крайне схожи. В таблице 18 представлены выбранные характеристичные ионы для каждого вещества.

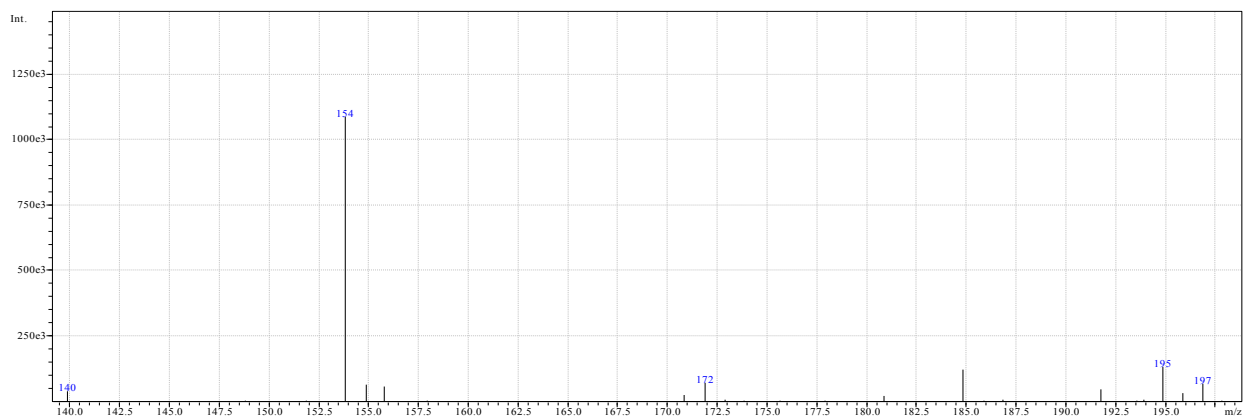


Рис. 30. Масс-спектр ДМТ (ХИАД (+)).

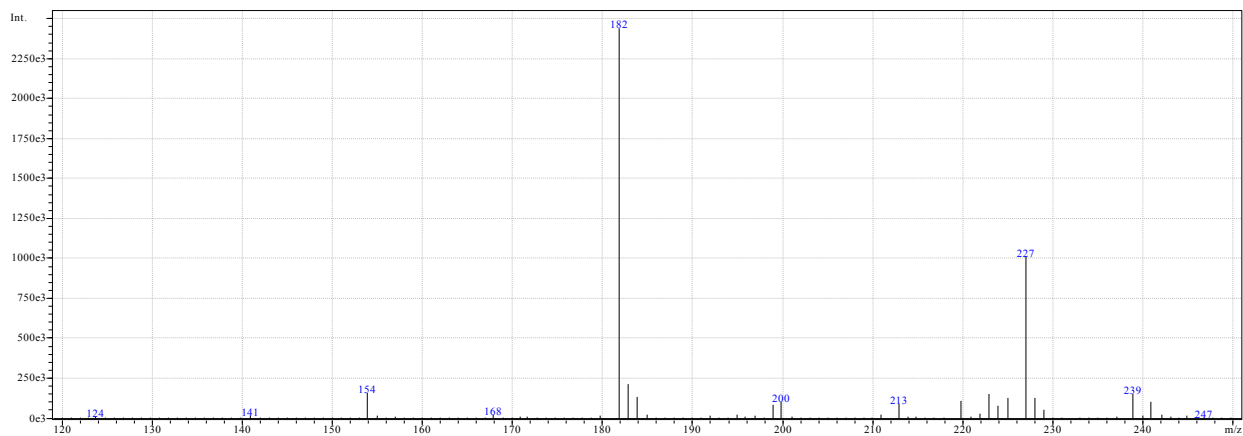


Рис. 31. Масс-спектр ДЭТ (ХИАД (+)).

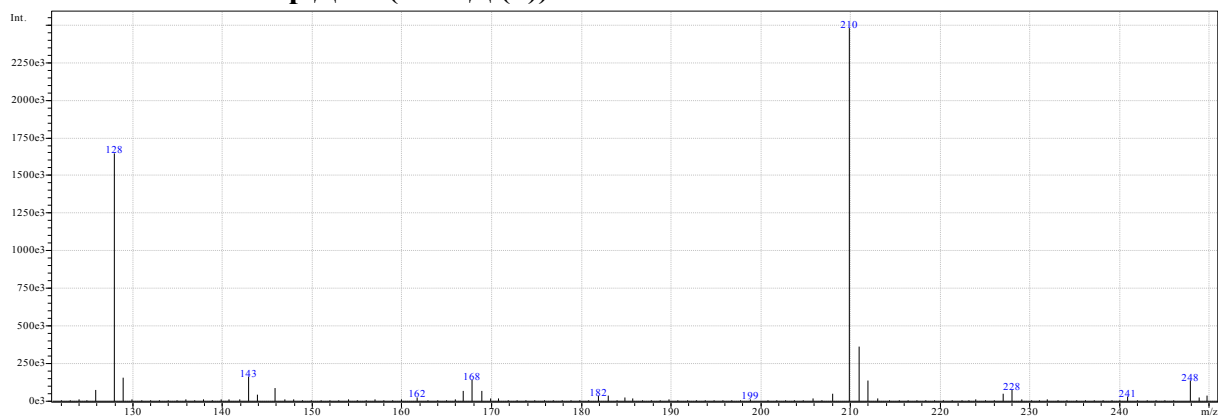


Рис. 32. Масс-спектр ДПТ (ХИАД (+)).

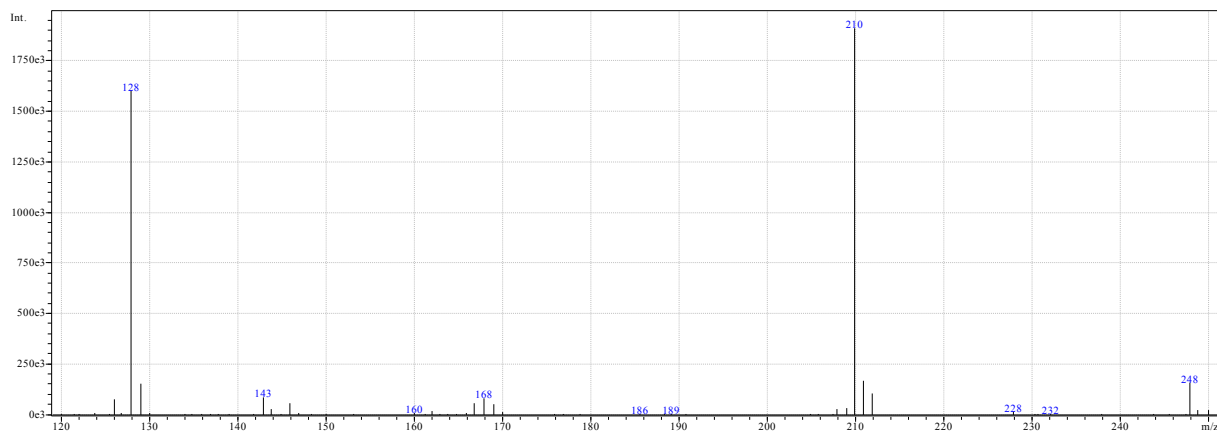


Рис. 33. Масс-спектр ДИТ (ХИАД (+)).

Таблица 18. Выбранные ионы для детектирования диалкилтауринов

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

При использовании ХИАД необходимо учитывать такие факторы как рН подвижной фазы и природу органического растворителя, выступающего в качестве реагента для ионизации. Для достижения оптимальной чувствительности детектирования изучали влияние рН на интенсивность сигнала по характеристичному иону и влияние природы органического растворителя, а также оптимизировали настройки масс-спектрометра. Показано, что для всех изученных веществ хороший отклик детектора достигается при использовании кислых подвижных фаз - величина аналитического сигнала выходит на плато в интервале рН 2.0 – 5.5 (рис. 34), что, по-видимому, связано с увеличением доли протонированных ионов в кислой области рН. Оптимизированные настройки масс-спектрометра приведены в таблице 19. В дальнейшей работе использовали найденные в настоящем разделе параметры работы масс-спектрометрического детектора.

Таблица 19. Параметры масс-спектрометра при определении ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ

Температура газа-осушителя	(450,0±1,0) °С;
Скорость подачи газа-осушителя	4 дм ³ /мин;
Скорость подачи газа-распылителя	2,5 дм ³ /мин;
Напряжение источника ионизации	4500 В;
Способ ионизации	Химическая ионизация при атмосферном давлении ;
Полярность регистрируемых ионов	Положительные;
pH подвижной фазы	5.4
Детектирование	Режим регистрации выбранных ионов (SIM)

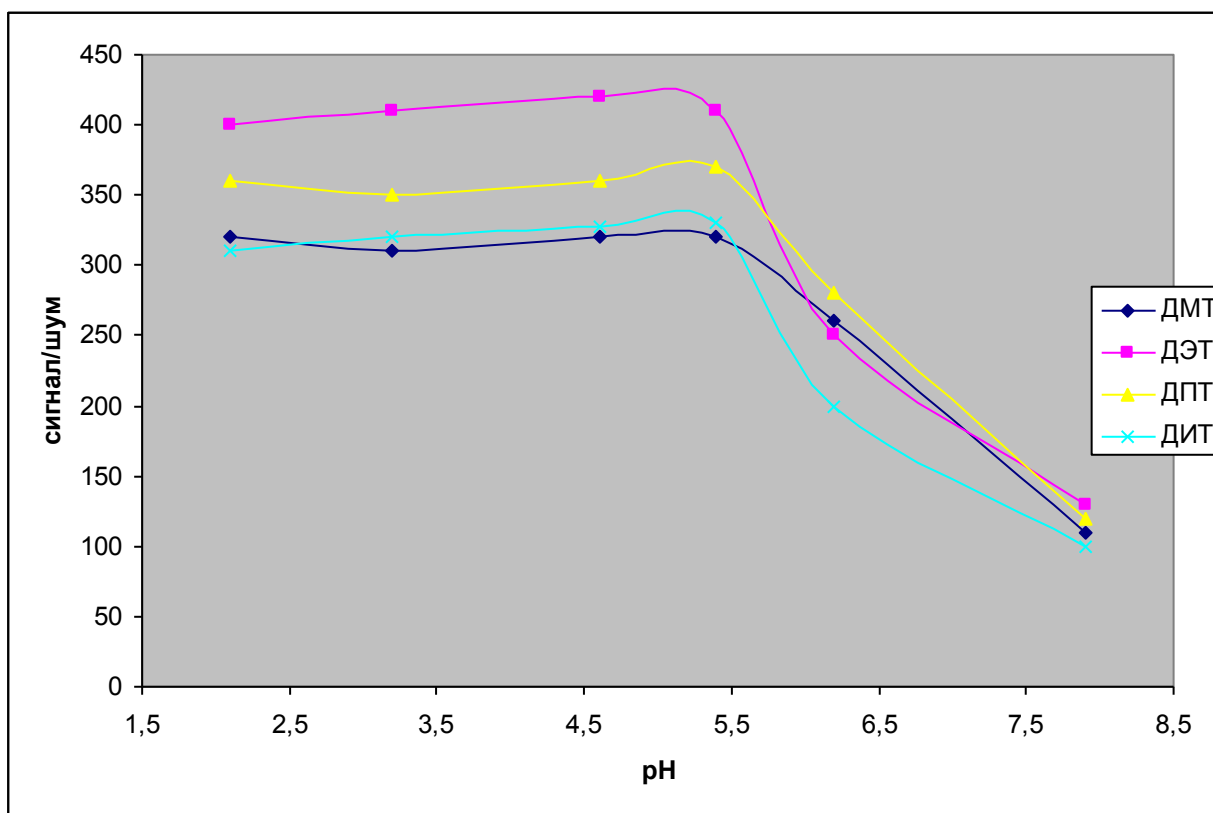


Рис. 34. Влияние pH подвижной фазы на отклик масс-спектрометрического детектора.

В методе ВЭЖХ-МС назначение хроматографической системы и требования, предъявляемые к ней, несколько отличаются от таковых в традиционных вариантах ВЭЖХ. В отличие от традиционных универсальных детекторов, характеризующихся низкой селективностью, масс-спектрометр позволяет регистрировать строго

специфический параметр каждого определяемого соединения - набор отношений m/z образующихся ионов. При работе в режиме SIM, для большинства соединений, не дающих ионов с одинаковыми отношениями m/z , не возникает необходимости полного хроматографического разделения. Однако, в случае разработки способа определения алкилтауринов возникает проблема - дипропил- и диизопропилтаурины являются изомерами, неразличимыми масс-спектрометрически, поэтому для достоверной идентификации каждого из них необходимо выбрать такие условия хроматографического разделения, которые позволяют успешно разделять эти два вещества. Кроме того, полное разделение остальных определяемых веществ не является в данном случае лишним, поскольку достижение полного разделения всех 4-х интересующих нас веществ позволяет повысить достоверность идентификации. При подборе подвижной фазы для ВЭЖХ-МС необходимо учитывать, что для подвижной фазы можно применять только летучие компоненты.

Благодаря наличию гидрофобных свойств, алкилтаурины могут быть успешно разделены в условиях обращено фазовой ВЭЖХ. Для разделения полярных органических веществ с невысокой гидрофобностью хорошо подходят эндкепированные колонки, например Zorbax Stable Bond C-18E, которую использовали в настоящей работе. Ранее показано, что для оптимального сечения ионизации необходимо использовать подвижные фазы, значение рН которых находится в интервале 2.0 – 5.5. Однако, для того чтобы диалкилтаурины удерживались на обращенно-фазовых колонках необходимо использовать такую величину рН при которой диалкилтаурины существуют преимущественно в незаряженной форме. Данному критерию отвечает значение рН 5,4 при котором достигается приемлемая эффективность ионизации исследуемых веществ.

При использовании буферного раствора с рН 5,4 достигаются приемлемые значения хроматографических параметров (коэффициенты емкости находятся в диапазоне 2-7), удерживание происходит преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий, достигается высокая селективность разделения. Таким образом, использование аммонийно-ацетатного буферного раствора с рН 5,4, хорошо

совместимого с масс-спектрометром, позволяет успешно реализовывать хроматографическое разделение.

Для достижения оптимальных параметров хроматографического разделения варьировали программу градиентного элюирования. Экспериментально выбранная программа элюирования представлена в таблице 20. На рисунке 35 представлена хроматограмма смеси диалкилтауринов, полученная при использовании разработанной программы элюирования. В таблице 21 представлены хроматографические параметры диалкилтауринов, достигаемые при использовании оптимизированной программы градиентного элюирования. Очевидно, что использование предложенной программы обеспечивает полное разделение смеси с необходимой эффективностью за приемлемое время.

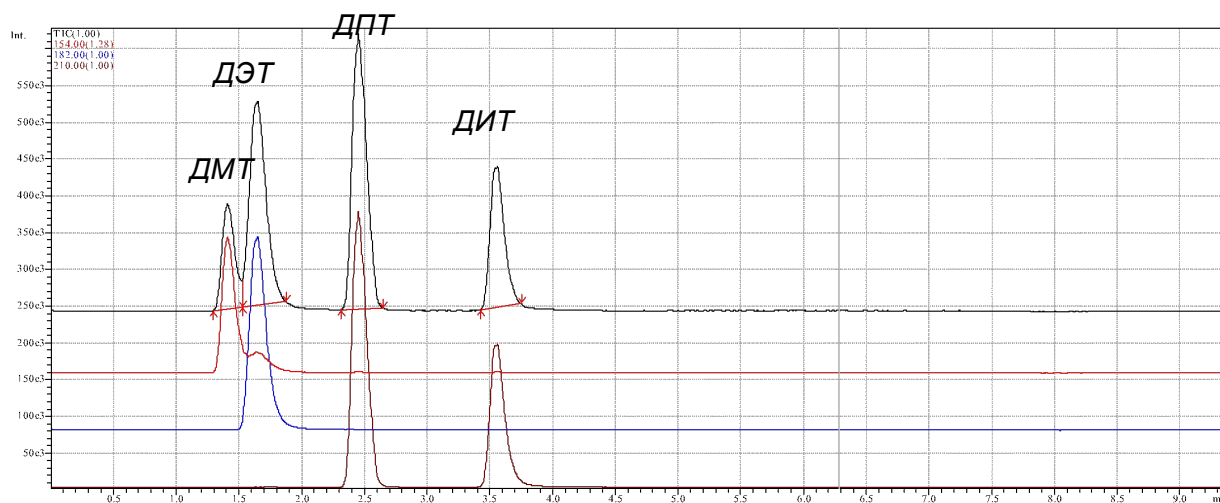


Рис. 35. Хроматограмма смеси 0.5 мкг/мл диалкилтауринов при оптимальных условиях хроматографического разделения. Колонка Zorbax Stable Bond C-18E. Подвижная фаза: А - 20 мМ ацетата аммония (рН 5,4), В - ацетонитрил. Программа градиентного элюирования приведена в таблице 11.

Таблица 20. Программа градиентного элюирования при разделении ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ

Время, мин	% В	Скорость подачи подвижной фазы, мл/мин
0-5	5	0,45
5-7	5-50	0,45
7-8	50	0,45
8-10	5	0.5

Таблица 21. Параметры хроматографического разделения в оптимизированных условиях при определении ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ

Вещество	Время удерживания, мин	Разрешение, $R_{n, n+1}$	Эффективность, ТТ/м
ДМТ	1,5	1,4	35000
ДЭТ	1,8	2	40000
ДПТ	2.5	2,5	50000
ДИТ	3.6	-	50000

В выбранных оптимальных условиях определения ДМТ, ДЭТ, ДПТ и ДИТ получены хроматограммы, построены градуировочные зависимости для компонентов анализируемой смеси в диапазоне концентраций 0,05– 10 мкг/мл, рассчитаны пределы обнаружения и метрологические характеристики определения (табл. 22). Предложенный подход характеризуется высокой чувствительностью, хорошими метрологическими характеристиками и экспрессностью определения.

Таблица 22. Метрологические характеристики разработанного подхода определения диалкилтауринов методом ВЭЖХ-МС

Вещество	Уравнение градуировочного графика	r^2	Предел обнаружения, мг/л	Диапазон определяемых концентраций, мкг/г	S_r , %
ДМТ	$S = 4,1 \times 10^5 \times C$	0,99	0,015	0,05– 10	11
ДЭТ	$S = 5,1 \times 10^5 \times C$	0,99	0,015	0,05– 10	12
ДПТ	$S = 5,4 \times 10^5 \times C$	0,99	0,025	0,05– 10	14
ДИТ	$S = 3.9 \times 10^5 \times C$	0,99	0,025	0,05– 10	12

Предложенный подход опробован при анализе растворов смесей анализируемых веществ в реальных пробах воды (проверка правильности подхода методом введено – найдено, табл. 23). В таблице 24 представлены данные по химическому составу использованных при апробации способа вод. Полученные хроматограммы совершенно идентичны - мешающее влияние отсутствует. Пример хроматограммы представлен на рисунке 36. В качестве объектов для исследования выбирали образцы воды, существенно отличающиеся по ключевым параметрам, характеризующим химический

состав – концентрациям металлов, анионов, органических веществ и другим показателям (таблица 23).

Как видно из представленных результатов, мешающее влияние матрицы в шести исследованных реальных образцах вод полностью отсутствует при определении компонентов на уровне содержания 0,05 мг/л и выше. Таким образом, определению диалкилтауринов не мешает присутствие неорганических анионов, металлов, повышенные значения жесткости, мутности и цветности, а также значительное валовое содержание органических веществ (определяется величиной перманганатной окисляемости).

Таблица 23. Проверка правильности разработанного подхода методом «введено-найдено»

Проба воды	Введено в смеси, мг/л	Найдено, мг/л			
		ДИТ	ДПТ	ДЭТ	ДМТ
Водопровод	0,10	0,10±0,02	0,08±0,02	0,12±0,02	0,10±0,01
Колодец	0,10	0,09±0,02	0,10±0,03	0,09±0,02	0,11±0,02
Скважина	0,10	0,10±0,03	0,09±0,02	0,11±0,01	0,10±0,02
Снег	0,10	0,10±0,01	0,09±0,02	0,13±0,03	0,10±0,01
Снег с АЗС	0,10	0,08±0,02	0,11±0,02	0,10±0,02	0,09±0,02
Речная вода	0,10	0,08±0,02	0,08±0,03	0,10±0,03	0,08±0,02

**Таблица 24. Некоторые показатели химического состава образцов природных вод,
выбранных для проведения исследований**

Параметр	Вода из скважины	Речная вода	Колодезная вода	Снег	Снег с АЗС	Водопродная
Цветность в градусах	9	15	11	5	5	2
Мутность, ЕМФ, мг/л	2	9	7	10	12	0
Водородный показатель (рН)	7,00	7,47	7,03	7,35	7,14	7,34
Общая жесткость, мг/л /мг.-экв/л	/4,6	/5,0	/9,4	/2,5	/1,9	/6,0
Хлориды (Cl), мг/л	3,1	40,0	27,7	0,5	0,9	9,2
Сульфаты, мг/л	7,2	11,6	40,4	6,5	5,5	13,0
Марганец, мг/л	0,009	0,005	0,27	0,010	0,10	0,002
Фториды, мг/л	1,3	0,4	0,5	1,4	0,3	0,6
Железо общ., мг/л	0,08	0,03	0,85	1,30	2,14	0,01
Медь, мкг/л	40	≥10	≥10	≥10	≥10	≥10
Окисляемость перманганатная, мгО ₂ /л	0,4	4,8	2,4	0,3	9,9	1,3
Нитраты, мг/л	3,1	28,6	4,0	1,2	<0,05	12,0

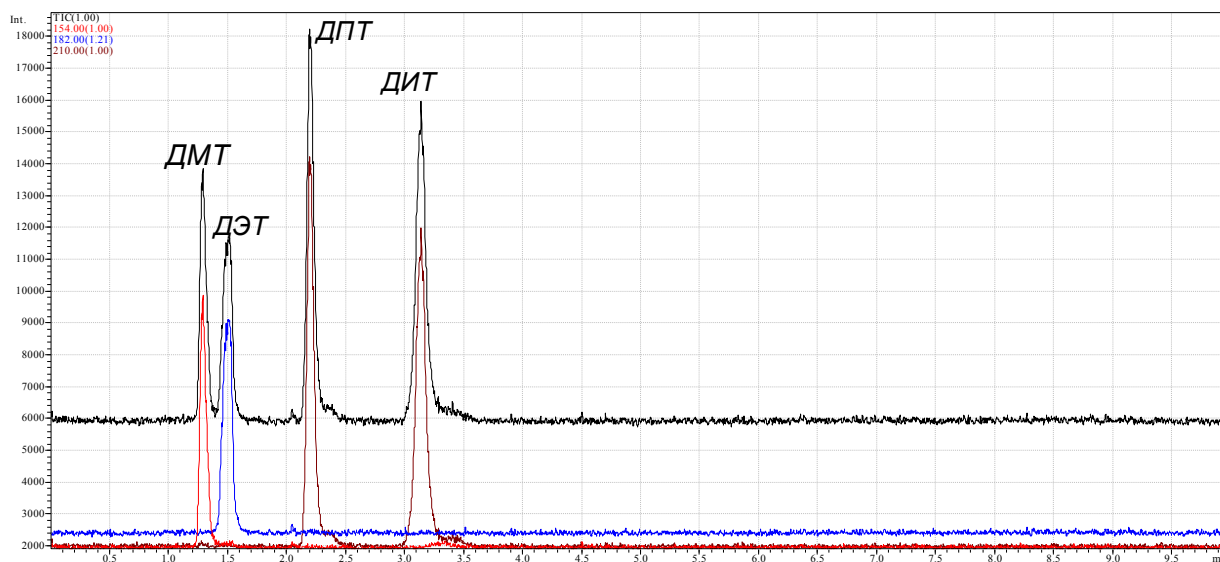


Рис. 36. Хроматограмма образца речной воды с добавкой смеси диалкилтауринов. Концентрация веществ 0.1 мкг/мл.

Для апробации разработанного способа определения продуктов окисления V-газов методом ВЭЖХ-МС готовились модельные пробы с различным содержанием целевых веществ в различных водных объектах. Обнаружение считалось достоверным при условии превышения отношения сигнал/шум значения 3:1 для характеристичных пиков соединений, отклонении времени удерживания от стандартного не более 10% при использовании режима детектирования по выделенным характеристичным ионам. Результаты проведенных анализов представлены в таблице 25.

Таким образом, результаты апробации в полной мере подтверждают работоспособность разработанной хромато-масс-спектрометрического способа определения продуктов окисления V-газов диалкилтауринов.

В ходе проведенной работы впервые разработаны способы определения продуктов окисления фосфорорганических отравляющих веществ 2-(N,N-диметиламино)-этансульфоновой кислоты, 2-(N,N-диэтиламино)-этансульфоновой кислоты, 2-(N,N-дипропиламино)-этансульфоновой кислоты, 2-(N,N-диизопропиламино)-этансульфоновой кислоты методами капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Показано, что предложенные подходы могут быть успешно использованы для обнаружения и

идентификации указанных веществ в водах различных типов - природных, водопроводных, речных, снегах.

Таблица 25. Результаты апробации способа определения диалкилтауринов методом ВЭЖХ-МС на модельных пробах воды

№ пробы	Описание пробы	Содержание внесенных маркеров ОВ, мг/мл	Результаты обнаружения
1	Дистиллированная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены
2	Вода из скважины	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены
3	Речная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены
4	Колодезная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены
5	снег	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены
6	Снег с АЗС	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены
7	Водопроводная вода	ДМТ, ДЭТ, ДПТ, ДИТ по 0,05 каждого	Достоверно обнаружены

3.3 Разработка процедуры обнаружения продуктов трансформации фосфорорганических отравляющих веществ в биосредах методом ВЭЖХ-МС

В литературе представлено значительное число работ, посвященных обнаружению и определению основных маркеров и продуктов разложения ФОВ зарина, зомана, VXи RVX (О-изопропилметилфосфоновой кислоты (иПрМФК), О-пинаколилметилфосфоновой кислоты (ПинМФК), О-этилметилфосфоновой кислоты (ЭМФК) и О-изобутилметилфосфоновой кислоты (иБутМФК), соответственно)). Применение хроматографических методов для обнаружения и определения таких соединений является весьма распространенным и оправданным. ОЗХО ежегодно ужесточает требования, предъявляемые к методикам идентификации маркеров ФОВ в сложных биологических матрицах, дабы исключить ложные результаты обнаружения. На сегодняшний день разработка подходов идентификации и определения следовых количеств основных маркеров ФОВ является актуальной и крайне важной задачей.

Использование метода ВЭЖХ-МС(-МС) позволит проводить прямое одновременное экспрессное определение основных продуктов трансформации нервно-паралитических ОВ в объектах любой сложности с высокой чувствительностью и высочайшей достоверностью. На данном этапе работы проводилась разработка подхода, позволяющего проводить обнаружение и определение трех продуктов трансформации ФОВ – иПрМФК, ПинМФК и иБутМФК в биологических пробах с использованием высокочувствительного и селективного метода ВЭЖХ-МС.

В качестве одномерного масс-спектрометрического детектора, позволяющего работать в режиме ВЭЖХ-МС выбран доступный нам прибор фирмы «Agilent technologies» (США оснащенный квадрупольным масс-анализатором. Данный прибор отличается повышенной чувствительностью, благодаря применению в нем новой системы ионной оптики. Использованный в работе прибор оснащен источником электрораспылительной ионизации.

Оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования проводили в режиме прямого ввода, непосредственно вводя растворы стандартов алкилметилфосфонатов в источник ионизации прибора, минуя хроматографическую колонку. В качестве подвижной фазы для прямого ввода использовали 0,1% (об.) раствор муравьиной кислоты в воде. Скорость подачи подвижной фазы – 0,2 мл/мин. Для работы применяли водные растворы стандартов с концентрацией 5 мкг/мл. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл.

Из литературных данных известно [32-34], что наиболее эффективное масс-спектрометрическое детектирование основных маркеров ФОВ зарина, зомана и RVX может быть достигнуто с использованием регистрации отрицательных ионов, поэтому для разработки условий детектирования применяли только отрицательную ионизацию.

Первым этапом проведения оптимизации условий работы масс-спектрометрического детектора было получение масс-спектров стандартов определяемых соединений. Для масс-спектров исследуемых соединений характерны интенсивные пики анионов, соответствующие потере кислого протона молекулой алкилметилфосфоновой кислоты. Кроме того, в масс-спектре полученных соединений

присутствуют малоинтенсивные пики, отвечающие фрагментному иону - аниону метилфосфоновой кислоты. Таким образом, для достижения максимальной чувствительности определения иБутМФК, иПрМФк и ПинМФК в качестве ионов для селективного масс-спектрометрического детектирования в режиме регистрации выделенных ионов выбраны:

для иПрМФК - 95, 137;

для иБутМФк - 95, 151;

для ПинМФК - 95, 179.

Использование для селективного ионного детектирования аналитов двух ионов для каждого вещества позволяет резко увеличить достоверность обнаружения веществ в пробе, особенно при определении малых количеств определяемых компонентов.

На втором этапе работы подбирали оптимальное значение напряжения внутрикврупольного фрагментора. Использование данной опции при правильном выборе значения рабочего напряжения прибора позволяет добиться стабильной фрагментации аналитов, что способствует повышению надежности обнаружения, а также избавиться от аддуктных ионов с компонентами подвижной фазы, генерируя при этом дополнительное число молекулярных ионов.

Оптимальным рабочим напряжением фрагментора является напряжение равное 140 В. Использование данного значения позволяет увеличить чувствительность детектирования на 20 % по сравнению со стандартным значением 70 В.

Третьим варьированным параметром работы масс-спектрометрического детектора было напряжение электрического поля в камере источника ионизации. Поскольку определяемые соединения являются достаточно сильными органическими кислотами ($pK \sim 2-3$), небольшое снижение напряжения в камере источника ионизации не приводит к падению интенсивности аналитического сигнала, однако резко снижает возможности ионизации примесных компонентов, что положительно сказывается на уровне шума, особенно при анализе реальных биологических проб. Снижение напряжения источника ионизации до 2000 В (минимальное напряжение при котором наблюдалось стабильное генерирование ионов) против стандартных 3500В, позволило

снизить уровень шума базовой линии для стандартных растворов на 20%, а для реальных экстрактов более чем на 70%, при этом интенсивность сигнала определяемых компонентов осталась на прежнем уровне, что позволило заметно увеличить чувствительность метода.

В таблице 26 представлены оптимальные настройки масс-анализатора при детектировании иБутМФК, иПрМФк и ПинМФК.

Таблица 26. Оптимальные значения параметров настройки масс-детектора при определении иБутМФК, иПрМФк и ПинМФК в режиме регистрации выбранных реакций

Параметр	Оптимальное значение
Напряжение фрагментора	140 В
Напряжение источника ионизации	2000 В
Скорость подачи газа-распылителя	3 дм ³ /мин;

Для разработки высокоэффективной хроматографической системы решено использовать градиентное элюирование, использование которого позволяет уменьшить размытие пиков, увеличивая в процессе разделения элюирующую силу подвижной фазы, добиваясь высокоэффективного разделения компонентов пробы за короткое время.

Кроме использования режима градиентного элюирования при разработке новой разделяющей системы опробованы два других подхода, позволяющие увеличить эффективность разделения – использование капиллярных колонок и использование новых сорбентов с гидрофильным эндкеппингом.

Использование обращенно-фазовых колонок с внутренним диаметром 1 мм в ряде случаев позволяет сильно снизить внутриколоночное размывание пиков за счет снижения мертвого объема системы и тем самым получить узкие, а поэтому значительно более высокие пики на хроматограммах. К недостаткам колонок подобного типа относится низкая ёмкость колонки связанная с малым количеством неподвижной фазы в колонке. Для работы в данных условиях выбрана колонка Kromasil C 18 размером 250*1 мм.

Для разделения высокополярных веществ перспективны предложенные в последнее время новые фазы, содержащие полярные фрагменты на поверхности сорбента. На таких сорбентах полярность фазы увеличивается, что приводит к увеличению удерживания полярных соединений. Кроме того возможны специфические взаимодействия между полярными фрагментами и разделяемыми компонентами, что также приводит к увеличению удерживания полярных веществ и увеличению эффективности разделения. В отличие от классических сорбентов, подобные неподвижные фазы обладают отличной эффективностью и селективностью для разделения сильнополярных веществ, к которым относятся эфиры метилфосфоновой кислоты. Для работы в данных условиях выбрана колонка Synergi Hydro-RP размерами 150*2,1 мм.

В процессе разработки оптимальных условий хроматографического разделения сравнивали эффективность хроматографического разделения (число теоретических тарелок на колонку для каждого эфира метилфосфоновой кислоты) для каждой из двух используемых колонок при использовании различных программ градиентного элюирования, разных температур термостатирования колонок и при использовании в качестве компонентов подвижной фазы растворов с различными значениями pH. Критерием выбора оптимальной хроматографической системы являлось достижение максимальной эффективности и минимальной ширины пиков на полувисоте. Кроме того, сравнивали стабильности и воспроизводимости времен удерживания для двух типов использованных сорбентов.

В качестве проб, на которых отработывались условия хроматографического разделения, использовали стандартные водные растворы, содержащие по 200 нг/мл иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК.

В таблице 27 приведены программы градиентного элюирования использованные при разделении иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК на колонке Kromasil C18 250*1 мм. В качестве растворителя А использовали 0,1% (об.) раствор муравьиной кислоты в воде (pH 3), в качестве растворителя В применяли 0,1% (об) раствор муравьиной кислоты в метаноле.

В таблице 28 приведены параметры хроматографического разделения алкилметилфосфоновых кислот при использовании данных программ градиентного элюирования и колонки Kromasil C18 250*1 мм.

Таблица 27. Программы градиентного элюирования, использованные при разделении иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК на колонке KromasilC18 250*1 мм

Параметр	Описание
объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.08 мл/мин;
Программа градиента №1	0 – 2 мин – 0 % В, 2- 15 мин – 0%-100% В, 15-20 мин- 100 % В, 20- 30 мин – 100%-0% В, 30- 35 мин –0% В
Программа градиента №2	0 – 3 мин – 1 % В, 3- 12.5 мин – 1%-100% В, 12.5-21 мин- 100 % В, 21- 30 мин – 100%-1% В, 30- 35 мин –1% В

Таблица 28. Параметры хроматографического разделения эфиров метилфосфоновых кислот на колонке KromasilC18 250*1 мм в режимах градиентного элюирования

Вещество	Время удерживания, мин	Симметрия пика	Эффективность разделения, ТТ/колонку
Программа градиента № 1			
иПрМФК	8.38	0.622	400
иБутМФК	21.14	0.381	19300
ПинМФК	25.121	0.318	38500
Программа градиента № 2			
иПрМФК	10.729	0.743	700
иБутМФК	21.788	0.369	16200
ПинМФК	24.313	0.293	24300

На рисунке 37 представлены хроматограммы стандартных растворов эфиров метилфосфоновых кислот, полученные с использованием указанных режимов элюирования.

Из представленных данных видно, что использование колонки KromasilC 18250*1мм позволяет добиться необходимого значения разрешения при разделении иБутМФК, иПрМФК и ПинМФК, с приемлемыми значениями эффективности разделения для иБутМФК и ПинМФК. Однако использование данной хроматографической системы для определения иПрМФК неэффективно, поскольку пик данного вещества характеризуется сильным размытием, которое не может быть устранено даже применением резко восходящего градиента элюирующей силы подвижной фазы (программа градиента №2), что приводит к малой высоте пика. Причиной такого различия эффективностей хроматографического разделения в ряду эфиров метилфосфоновых кислот является значительно меньшая гидрофобность молекулы иПрМФК, включающей слаборазветвленный радикал изопропил, по сравнению с молекулами двух других определяемых компонентов, содержащих сильноразветвленные радикалы. Варьирование значения температуры термостатирования колонки также не позволило получить заметное увеличение эффективности для иПрМФК. Таким образом, фаза KromasilC 18 не очень хорошо подходит для определения всех трех соединений, маркеров применения ФОВ, однако в варианте градиентного элюирования с использованием капиллярной колонки может быть применена для определения иБутМФК и ПинМФК.

В таблице 29 приведены программы градиентного элюирования, использованные для колонки SynergiHydro-RP, 150*2,1 мм. В программах градиентного элюирования 1, 2 и 3 в качестве растворителя А использовали 0,1% (об.) раствор муравьиной кислоты в воде (рН 3), в качестве растворителя В применяли 0,1% (об.) раствор муравьиной кислоты в метаноле.

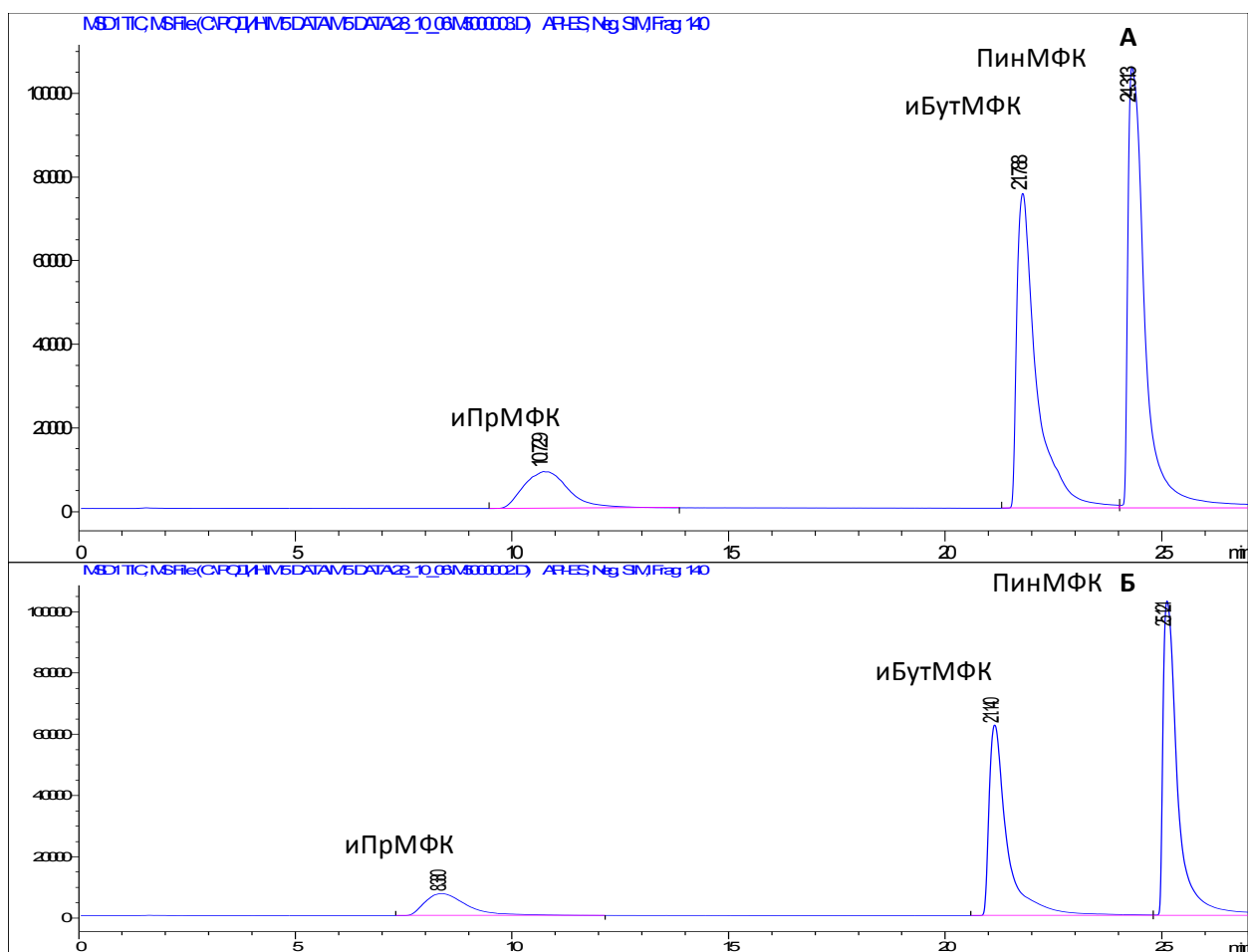


Рис. 37. Хроматограммы по полному ионному току стандартных растворов алкилметилфосфоновых кислот (200 нг/мл), колонка KromasilC 18250*1мм. Элюирование градиентное. (А – программа градиента № 1, Б - программа градиента № 2). Детектирование масс-спектрометрическое в режиме регистрации выделенных ионов.

В таблице 30 приведены параметры хроматографического разделения алкилметилфосфоновых кислот при использовании данных программ градиентного элюирования и колонки Synergi Hydro-RP, 150*2,1 мм. На рисунке 38 представлены хроматограммы стандартных растворов эфиров метилфосфоновых кислот полученные с использованием указанных режимов элюирования.

Из представленных данных видно, что только использование программы градиентного элюирования № 3 позволяет добиться высокой эффективности хроматографической системы для иПрМФК, получая при этом высокие значения высоких эффективностей хроматографического разделения также и для иБутМФК и ПинМФК.

Таблица 29. Программы градиентного элюирования, использованные при разделении иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК на колонке SynergiHydro-RP, 150*2,1 мм

Параметр	Описание
объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.2 мл/мин;
Программа градиента №1	0 – 5 мин – 5 % В, 5- 120 мин – 5%-100% В, 20-30 мин- 5 % В
Программа градиента №2	0 – 2 мин – 2 % В, 2- 15 мин – 2%-100% В, 15-20 мин- 100 % В, 20- 30 мин – 2% В
Программа градиента №3	0 – 2 мин – 5 % В, 2- 15 мин – 5%-100% В, 15-20 мин- 100 % В, 20- 30 мин – 100%-5% В, 30- 35 мин –5% В

Таблица 30. Параметры хроматографического разделения эфиров метилфосфоновых кислот на колонке SynergiHydro-RP, 150*2,1 мм в режимах градиентного элюирования

Вещество	Время удерживания, мин	Симметрия пика	Эффективность разделения, ТТ/колонку
Программа градиента № 1			
иПрМФК	4,126	0,413	5453
иБутМФК	12,419	0,196	5251
ПинМФК	18,159	0,265	72912
Программа градиента № 2			
иПрМФК	9,98	0,301	12703
иБутМФК	14,50	0,292	46111
ПинМФК	18,00	0,385	114307
Программа градиента № 3			
иПрМФК	15,76	0,301	50000
иБутМФК	21,05	0,617	190000
ПинМФК	22,28	0,548	200000

Использование данной программы не обеспечивает полного разделения двух последних соединений, однако работа с масс-спектрометрическим детектором в режиме детектирования по выделенным ионам позволяет поодиночке детектировать даже полностью не разделенные пики. Использование других схем не позволяет избавиться от сильного колоночного размывания пика данного соединения, что приводит к меньшей по сравнению с другими маркерами ФОВ интенсивности аналитического сигнала (высоты пика).

Применение программы градиентного элюирования № 3 и колонки SynergiHydro-
RP, 150*2,1 мм признано наиболее эффективным и использовалось при проведении определения продуктов трансформации ФОВ в образцах плазмы крови. В дальнейшем именно данная хроматографическая система использовалась при разработке процедур пробоподготовки и апробации способа обнаружения и определения иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК на реальных пробах биоматериала.

Обнаружение и определение сверхмалых количеств физиологически активных веществ в биологических объектах является одной из наиболее сложных задач, успешно решаемых современной аналитической химией. При анализе биологических образцов возникает проблема чрезвычайно сильного проявления матричного эффекта. Он проявляется в снижении чувствительности определения за счёт ухудшения соотношений сигнал/шум, а также за счет снижения эффективности детектирования. Наблюдается меньшая стабильность времени удерживания определяемых веществ вследствие перегрузки хроматографической колонки сопутствующими компонентами пробы, содержание которых в биопробах всегда высокое, значительно более сильное размывание хроматографических пиков, по сравнению с анализом объектов с простой матрицей. Часто слабые пики определяемых соединений, имеющих низкие концентрации, маскируются интенсивными пиками эндогенных соединений пробы. В некоторых случаях влияние матричного эффекта проявляется настолько сильно, что затрудняет или даже делает невозможным, проведение определения с необходимой чувствительностью.

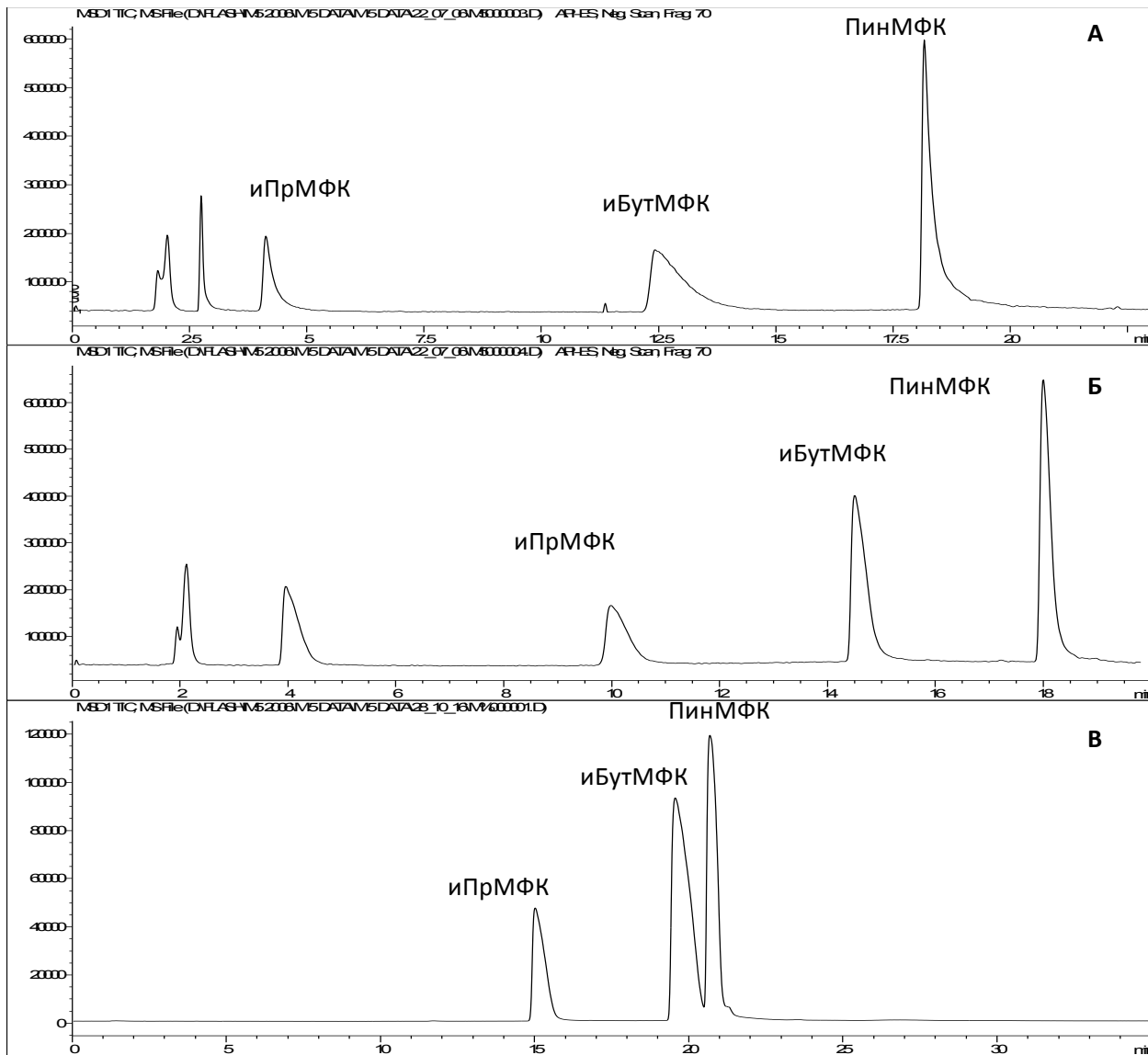


Рис. 38. Хроматограммы по полному ионному току стандартных растворов алкилметилфосфоновых кислот (200 нг/мл), колонка SynergiHydro-RP, 150*2,1 мм. Элюирование градиентное. (А(рис. 25) – программа градиента № 1, Б (рис. 26) - программа градиента № 2, В (рис. 27) – программа градиента № 3). Детектирование масс-спектрометрическое в режиме регистрации выделенных ионов.

Возможны два подхода к снижению влияния матричного эффекта. Первый – это использования максимально селективного метода анализа, в нашем случае это применение масс-спектрометрического детектирования и использование градиентного режима элюирования. Однако, при анализе биологических объектов невозможно добиться полного удаления мешающего влияния матрицы используя только высокую селективность метода. Наиболее эффективный способ борьбы с нежелательным матричным эффектом - это проведение селективной процедуры пробоподготовки. На

этой стадии анализа удается заметно снизить содержания мешающих компонентов матрицы, а также удается одновременно провести групповое концентрирование интересующих нас компонентов.

В настоящее время наиболее эффективной техникой проведения пробоподготовки при анализе биопроб признана твердофазная экстракция (ТФЭ). Данный метод характеризуется высокой технологичностью и удобством. Кроме того, в настоящее время на рынке аналитического оборудования представлены многочисленные сорбенты, обладающие замечательными характеристиками. Для достижения необходимой чувствительности определения необходимо разработать процедуру ТФЭ, которая характеризуется эффективным удалением мешающих компонентов пробы и высокими степенями извлечения определяемых соединений.

Для решения поставленной задачи исследовали поведение иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК на картриджах для ТФЭ Strata нового поколения, производимых компанией Phenomenex (США). Данные картриджи характеризуются высоким качеством сорбента и набивки, малым диаметром зерна и высокой сорбционной емкостью. Учитывая специфику определяемых веществ (значительная гидрофобность (за счет крупных углеводородных радикалов), высокая полярность, выраженные свойства кислоты), выбраны картриджи, содержащие сорбенты четырех разных типов – сорбент на основе гидрофобизированного силикагеля с привитыми додецильными группами и эндкепингом Strata C 18E, сорбент на основе сополимера стирола и дивинилбензола Strata SDB-L, анионообменный сорбент на основе четвертичных аммонийных оснований Strata SAX и картридж смешанного типа StrataScreenA, содержащий анионообменный сорбент и обращенно-фазовый сорбент.

При проведении пробоподготовки плазмы в первую очередь необходимо отделить содержащиеся в ней в больших количествах белки. Эта процедура является хорошо отработанной в практике современной аналитической химии. Для депротеинизации (удаления белков) плазмы используются различные реагенты: водные растворы трихлоруксусной кислоты и сульфата цинка, метанол и ацетонитрил. Каждый из этих реактивов производит осаждение белков по определенному механизму, поэтому

структура образующихся коагулированных белков и степень их извлечения различаются. При оптимизации данной стадии следует учитывать такие факторы как плотность образующегося осадка (насколько легко происходит отделение надосадочной жидкости), потеря анализа при коагуляции белков (какая часть жидкой фазы осажается при агрегации белковых молекул), эффективность удаления белков из анализируемой пробы. Кроме того, важно использовать такой депротенизирующий реагент, который не будет осуществлять элюирование определяемых компонентов с концентрирующего картриджа при проведении ТФЭ.

Поскольку определяемые вещества являются кислотами, важным фактором при проведении процедуры ТФЭ является рН раствора используемого при нанесении пробы на концентрирующий картридж.

Для разработки процедуры ТФЭ использовали человеческую плазму, полученную от разных доноров. При этом плазму от нескольких человек смешивали и делили на равные части, достаточные для проведения одного определения. В каждую порцию плазмы вносили добавку смеси стандартов основных исследуемых маркеров ФОВ зарина, зомана и RVX в количествах, необходимых для создания содержания данных соединений на уровне 200 нг/мл плазмы. В качестве контрольного раствора использовали водный раствор стандартов с концентрацией 200 нг/мл каждого соединения. Основным фактором, использованным для выбора оптимальной процедуры ТФЭ, являлись получаемые по данной схеме величины степеней извлечения для определяемых веществ. Ниже приведены опробованные схемы проведения процедуры ТФЭ.

Схемы подготовки картриджей к анализу. Картриджи Strata SDB-L и Strata C18E последовательно промывали 5 мл метанола и 10 мл воды. После промывки картриджи подсушивали в течение минуты на вакуумном манифолде.

Картриджи Strata SAX и Strata Screen A последовательно промывали 5 мл метанола и 10 мл воды. Далее через картриджи пропускали 3 мл водного раствора фторида натрия (0,1М) и снова промывали 10 мл воды. После промывки картриджи подсушивали в течение минуты на вакуумном манифолде.

Из представленных данных видно, что использование картриджей с анионообменным и смешанным анионообменным обращенно-фазовым (Strata SAX и ScreenA соответственно) сорбентом позволяет добиться невысоких степеней извлечения (менее 50 %) для всех определяемых соединений.

Схема пробоподготовки плазмы. Отбирали 700 мкл плазмы, добавляли 1500 мкл водного раствора сульфата цинка (30мМ), тщательно перемешивали и подвергали центрифугированию в течение 10 минут при 18000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость отбирали, доводили рН до 2 добавлением 2 капель соляной кислоты (1:1) и пропускали через предварительно подготовленный картридж Strata(в ходе исследований изучали четыре типа картриджа: Strata SDB-L, Strata C 18, Strata SAX и Strata ScreenA). Картридж промывали 3 мл воды. Элюирование удержанных компонентов проводили 5 мл метанола. Элюат упаривали на роторном испарителе при 20 мм. рт.ст и 50°C. Остаток перерастворяли в 0,3 мл воды и анализировали хромато-масс-спектрометрически.

В таблице 31 представлены сравнительные данные по значениям степеней извлечения определяемых веществ, достигаемые с использованием различных схем пробоподготовки.

Использование картриджей с обращенно-фазовым сорбентом на основе гидрофобизированного силикагеля (StrataC 18E) характеризуется высокими степенями извлечения для сильно гидрофобного компонента ПинМФК и крайне низким значением степени извлечения для иПрМФК, которая характеризуется минимальной гидрофобностью в ряду определяемых соединений. Использование картриджа Strata SDB-L позволяет достигать высоких степеней извлечения (более 50 %), что обусловило выбор схемы пробоподготовки с использованием данного типа картриджей как оптимального для проведения ТФЭ на стадии пробоподготовки плазмы (табл. 31).

Схемы пробоподготовки с использованием Strata C 18E и StrataSDB-L позволяют эффективно удалять мешающие компоненты плазмы. Хроматограммы, полученные с использованием данных схем пробоподготовки, характеризуются чистой и устойчивой базовой линией и стабильными временами удерживания. Использование картриджей с

сорбентами ионообменной природы не позволяет устранить сильное мешающее влияние матрицы пробы, которая проявляется в нестабильности базовой линии и наличии многочисленных мешающих пиков на хроматограммах. Вследствие перегрузки колонки компонентами пробы наблюдается сильное изменение времен удерживания для определяемых веществ.

Таблица 31. Сравнение степеней извлечения алкилметилфосфоновых кислот из плазмы, искусственно загрязненной иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК, с использованием картриджей для ТФЭ различного типа.

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

С использованием предложенных схем масс-спектрометрического детектирования, хроматографического разделения и пробоподготовки определены значения пределов обнаружения иПрМФК, иБутМФК и ПинМФК в плазме человека. Для этого известные количества каждого из маркеров ФОВ вносили в плазму. Туда же добавляли соответствующие внутренние стандарты и полученную искусственно зараженную плазму с известными содержаниями аналитов подвергали анализу, применяя оптимальные параметры работы хромато-масс-спектрометра и пробоподготовки. Используя в качестве критерия достоверного обнаружения отношения сигнал/шум = 5 для пика каждого из соединений, установлены пределы обнаружения в пробах плазмы крови для каждого из определяемых соединений (для иПрМФК – 4 нг/мл, для иБутМФК – 1 нг/мл, для ПинМФК – 0.6/мл) (рис. 39).

Разработаны рекомендации по подготовке биопроб (кровь) и определены оптимальные условия количественного определения, позволяющие достоверно проводить ВЭЖХ-МС определение на наличие продуктов трансформации ФОВ (О-изопропилметилфосфоновой кислоты (предел обнаружения – 1 нг/мл), О-пинаколилметилфосфоновой кислоты (предел обнаружения – 0.6 нг/мл) и О-изобутилметилфосфоновой кислоты (предел обнаружения – 4 нг/мл)).

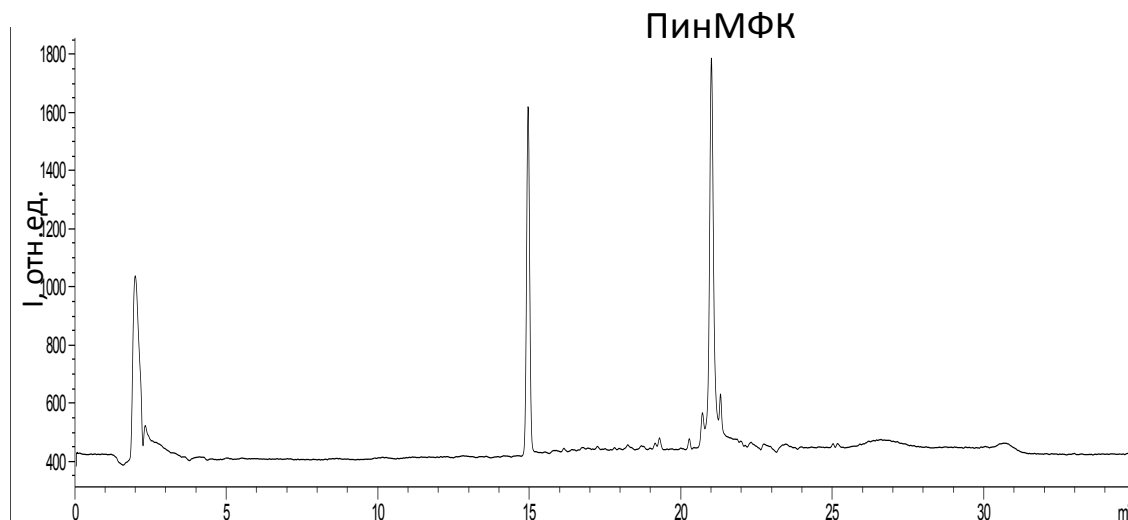


Рис. 39. Хроматограмма образца крысиной мочи, искусственно загрязненная 10 нг/мл ПинМФК. Режим регистрации выбранных ионов.

Для апробации разработанного способа определения алкиловых эфиров метилфосфоновой кислоты проанализировали образцы плазмы крови крыс, получавших внутривенно различные ФОВ в количестве, соответствующем $\frac{1}{2}$ LD₅₀ для крысы, отобранные у выживших крыс через различные промежутки времени после инъекции ФВ. Апробация разработанного подхода проводилась на пробах *in vivo*, проанализированных методом ВЭЖХ-МС. Анализ всех проб плазмы проводили строго в соответствии с текстом разработанного подхода определения. Для проведения более надежного обнаружения в образец добавляли изотопно-меченные аналоги соответствующих алкилметилфосфоновых кислот (содержащие по три атома дейтерия у метилной группе при атоме фосфора). Результаты анализа методом ВЭЖХ-МС по каждой из проб приведены в таблицах 32-33 и на рисунках 40-45 (на нижних хроматограммах представлены хроматограммы стандартных водных растворов соответствующих алкилметилфосфоновых кислот).

Таким образом, присутствие соответствующего маркера ФОВ достоверно установлено во всех пробах. Определение маркеров ФОВ удалось провести во всех пробах, кроме пробы 48 часовой плазмы крысы, получавшей RVX.

Таблица 32. Описание биопроб, используемых при апробации способа определения алкиловых эфиров метилфосфоновой кислоты методом ВЭЖХ-МС

Номер пробы	Тип ФОВ	Время, прошедшее между инъекцией ОВ и отбором пробы
А-1	Зарин	1 час
А-2	Зоман	1 час
А-3	RVX	1 час
А-4	Зарин	6 часов
А-5	Зоман	6 часов
А-6	RVX	6 часов
А-7	Зарин	24 часа
А-8	Зоман	24 часа
А-9	RVX	24 часа
А-10	Зарин	48 часов
А-11	Зоман	48 часов
А-12	RVX	48 часов

Таблица 33. Результаты ВЭЖХ-МС анализа проб *in vivo* при определении продуктов трансформации зарина, зомана и RVX

Номер пробы	Маркер ФОВ	Концентрация маркера в пробе, нг/мл
А-1	иПрМФК	13±2
А-2	ПинМФК	13±4
А-3	иБутМФК	5±1
А-4	иПрМФК	8±1
А-5	ПинМФК	7.5±0.8
А-6	иБутМФК	2.3±0.5
А-7	иПрМФК	5.6±0.5
А-8	ПинМФК	3.2±0.3
А-9	иБутМФК	1.3±0.1
А-10	иПрМФК	4.4±0.7
А-11	ПинМФК	1.9±0.2
А-12	иБутМФК	~ 1.0*

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

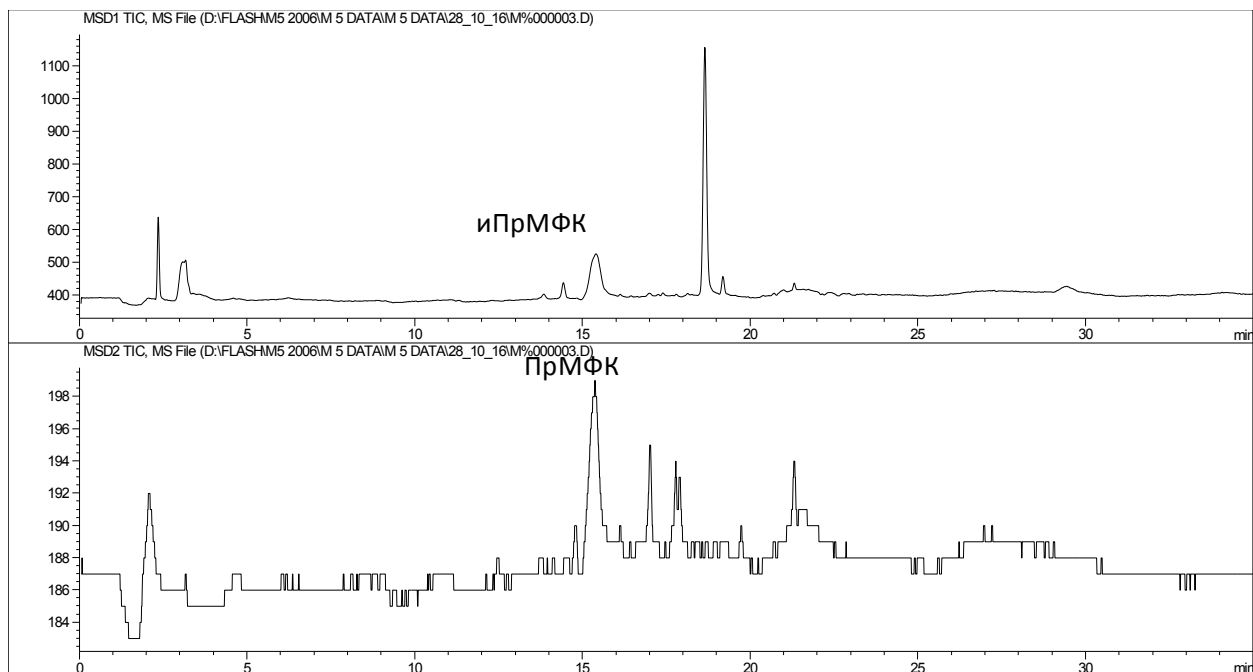


Рис.40. Хроматограмма образца плазмы крысы, получившей $\frac{1}{2}$ LD₅₀ зарина, отобранной через 1 час после инъекции. Верхняя хроматограмма – режим детектирования выбранных ионов иПрМФК, нижняя хроматограмма – хроматограмма, полученная при детектировании выбранных ионов изотопно-меченной иПрМФК (использовали как внутренний стандарт).

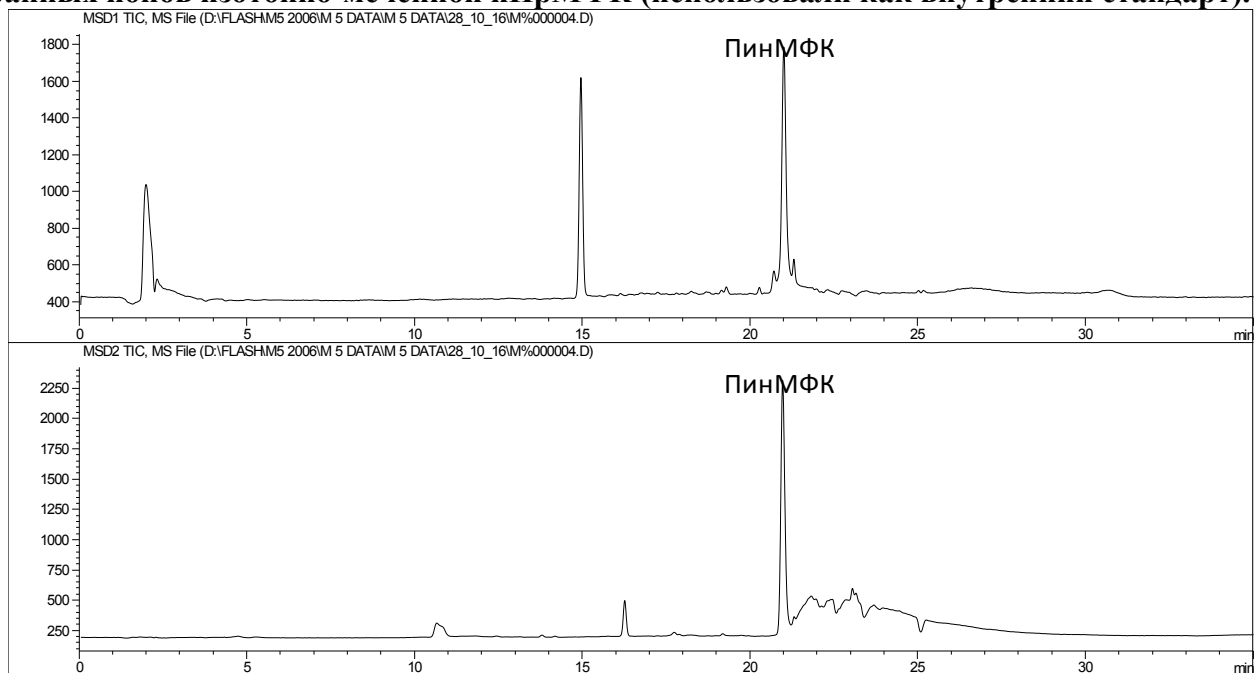


Рис.41. Хроматограмма образца плазмы крысы, получившей $\frac{1}{2}$ LD₅₀ зомана, отобранной через 1 час после инъекции. Верхняя хроматограмма – режим детектирования выбранных ионов ПинМФК, нижняя хроматограмма – хроматограмма, полученная при детектировании выбранных ионов изотопно-меченной ПинМФК (использовали как внутренний стандарт).

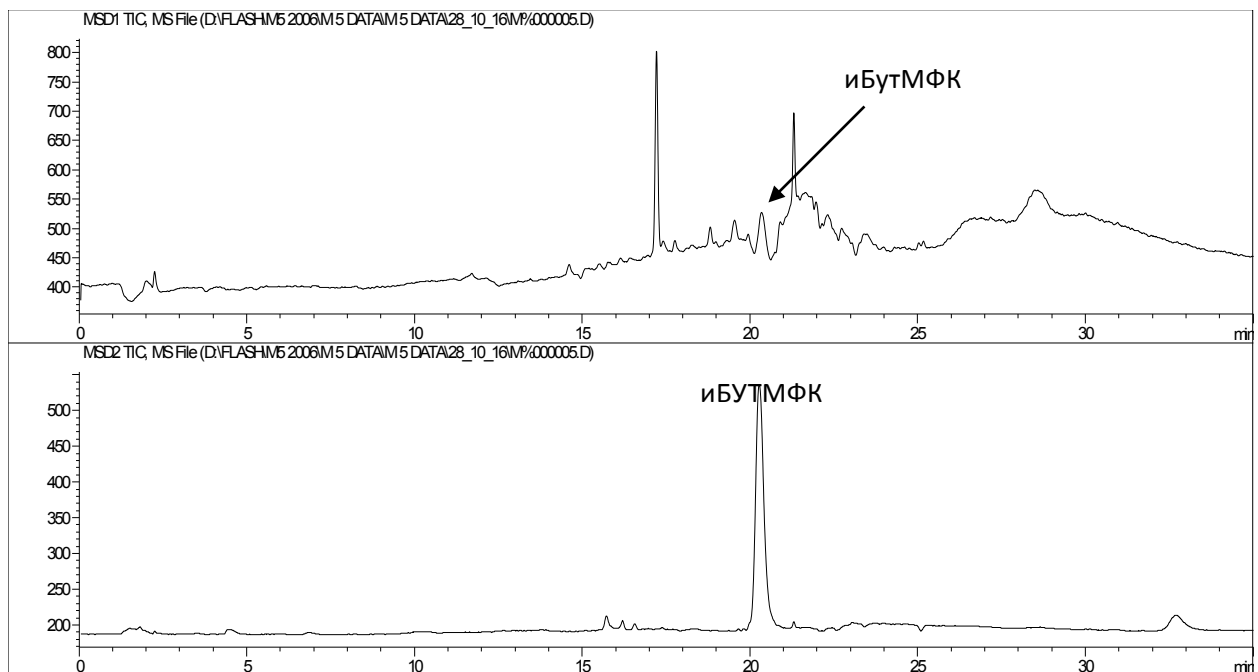


Рис.42. Хроматограмма образца плазмы крысы, получившей $\frac{1}{2}$ LD₅₀ RVX, отобранной через 1 час после инъекции. Верхняя хроматограмма – режим детектирования выбранных ионов иБутМФК, нижняя хроматограмма – хроматограмма, полученная при детектировании выбранных ионов изотопно-меченной иБутМФК (использовали как внутренний стандарт).

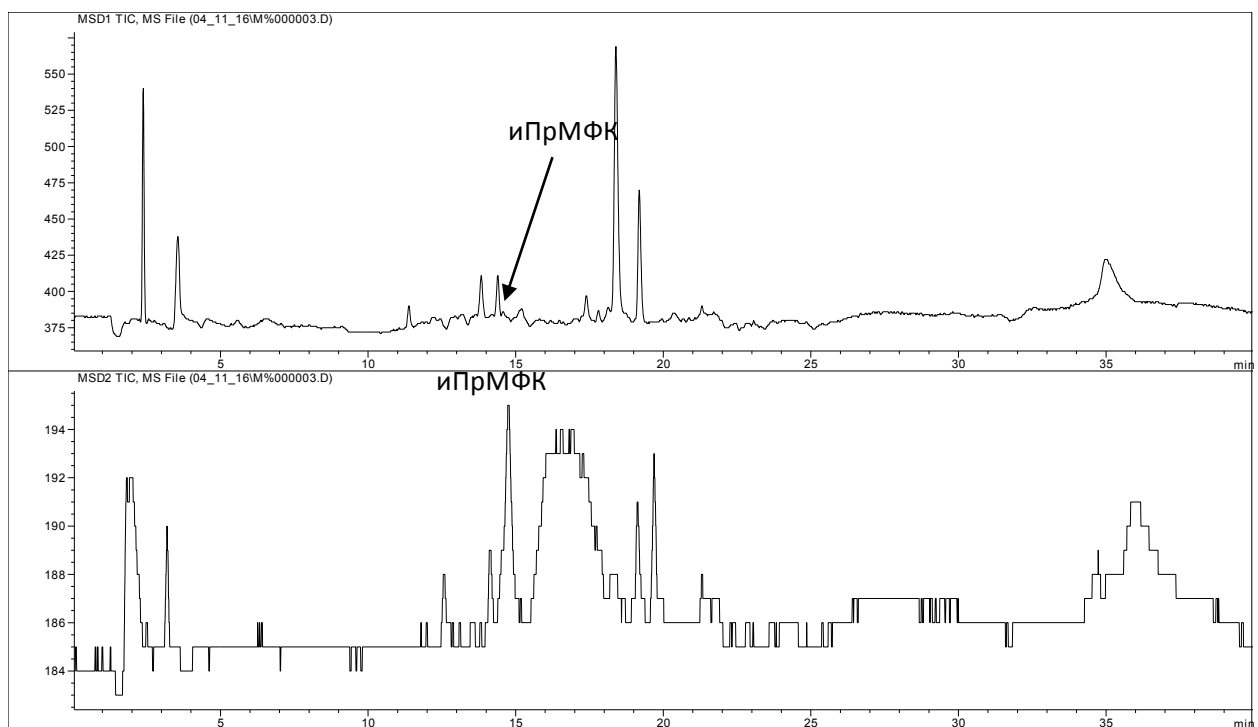


Рис.43. Хроматограмма образца плазмы крысы получившей $\frac{1}{2}$ LD₅₀ зарина, отобранной через 24 часа после инъекции. Верхняя хроматограмма – режим детектирования выбранных ионов иПрМФК, нижняя хроматограмма – хроматограмма, полученная при детектировании выбранных ионов изотопно-меченной иПрМФК (использовали как внутренний стандарт).

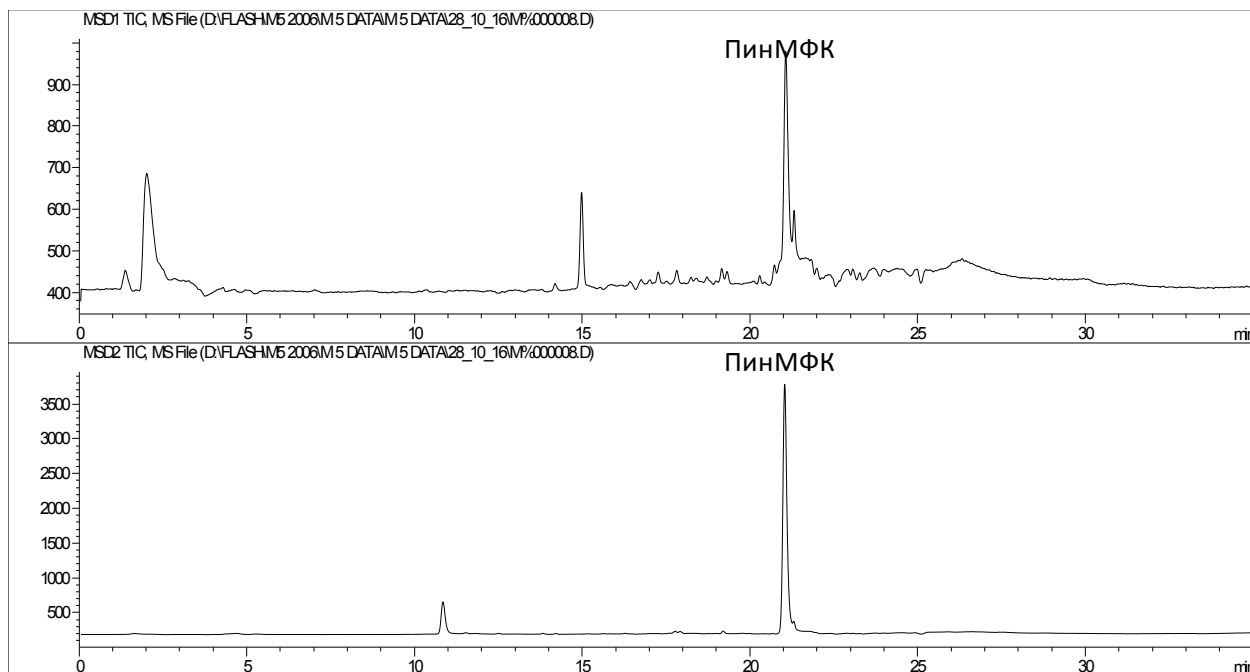


Рис.44. Хроматограмма образца плазмы крысы получившей $\frac{1}{2}$ LD₅₀ зомана, отобранной через 24 часа после инъекции. Верхняя хроматограмма – режим детектирования выбранных ионов ПинМФК, нижняя хроматограмма – хроматограмма, полученная при детектировании выбранных ионов изотопно-меченной ПинМФК (использовали как внутренний стандарт).

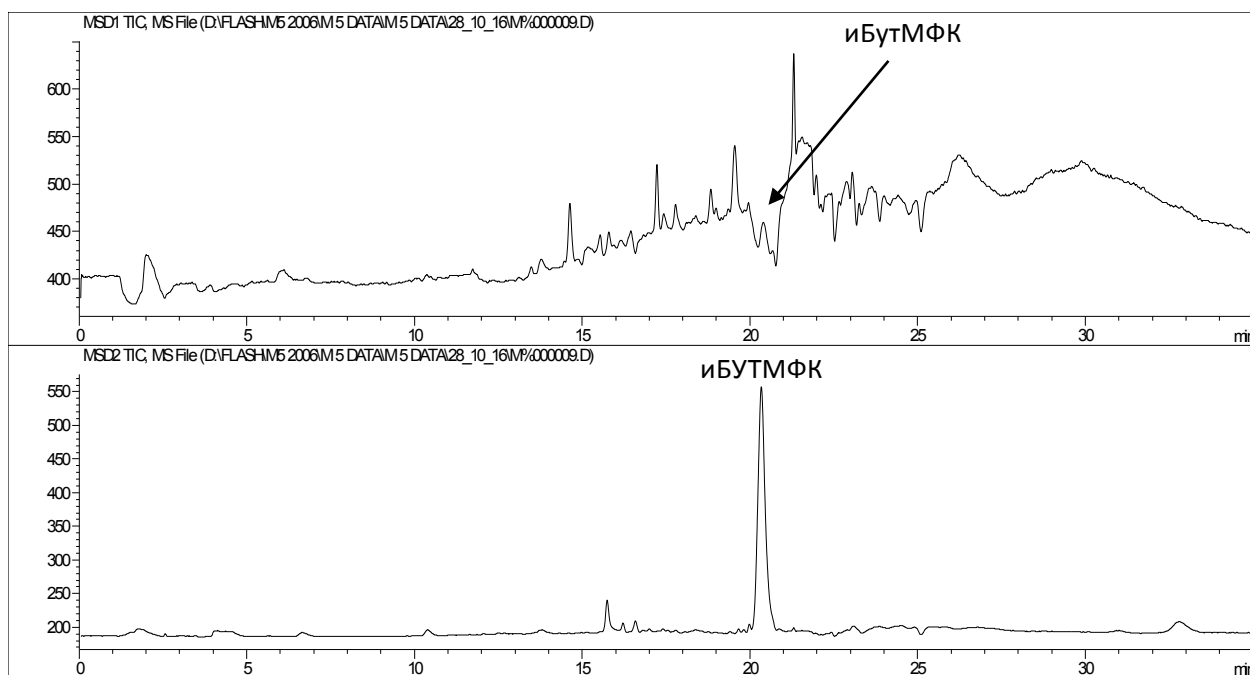


Рис.45. Хроматограмма образца плазмы крысы получившей $\frac{1}{2}$ LD₅₀ RVX, отобранной через 24 часа после инъекции. Верхняя хроматограмма – режим детектирования выбранных ионов иБутМФК, нижняя хроматограмма – хроматограмма, полученная при детектировании выбранных ионов изотопно-меченной иБутМФК (использовали как внутренний стандарт).

По полученным данным построены кривые токсикокинетики продуктов трансформации ФОВ для крыс (рис. 46).

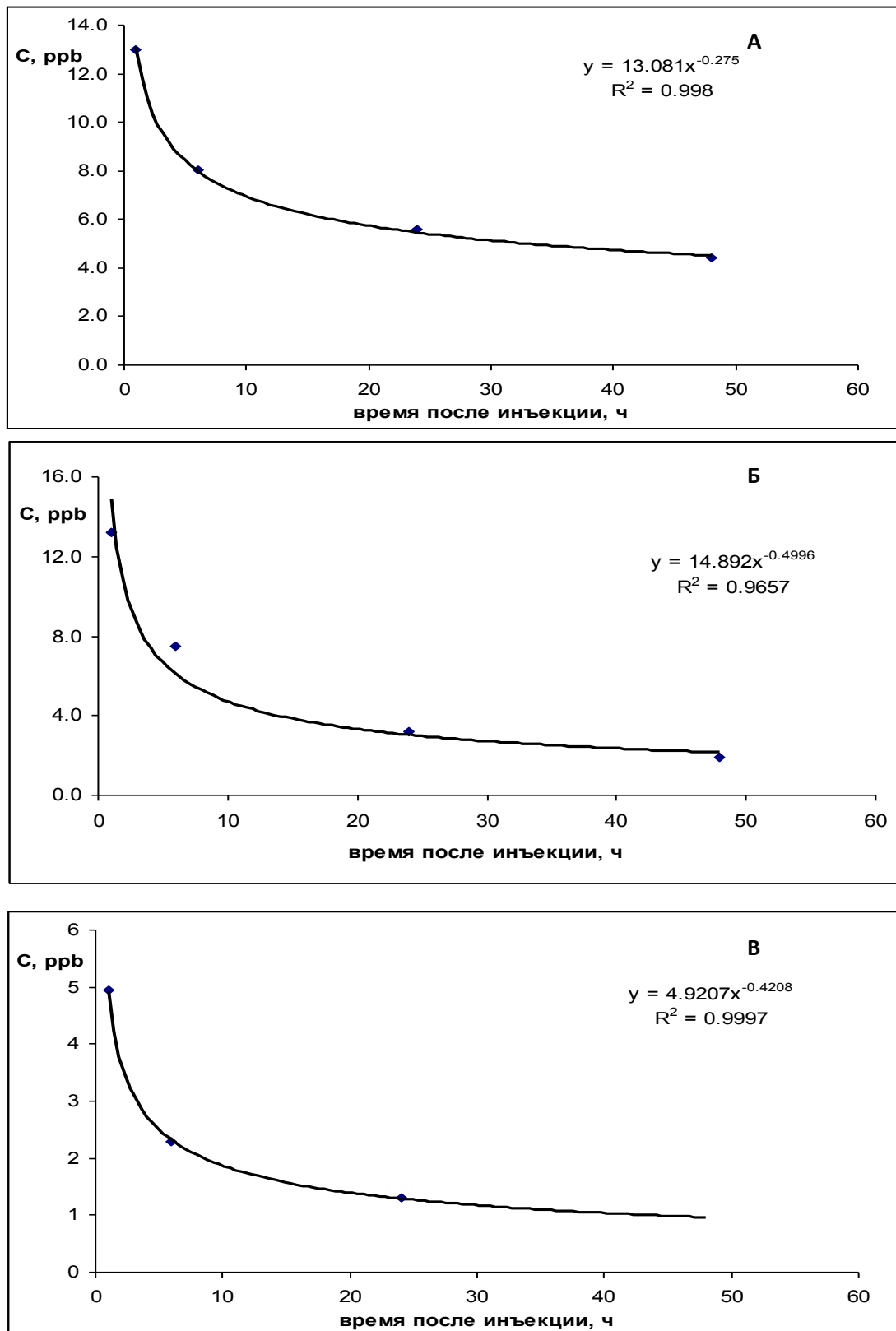


Рис.46. Токсикокинетические кривые продуктов трансформации ФОВ для крыс (А – иПрМФК, Б – иБутМФК, В – ПинМФК).

Аппроксимация полученных данных степенной функцией характеризуется высокими значениями коэффициентов корреляции. Таким образом, предложенный подход характеризуется высокой чувствительностью и позволяет проводить определение маркеров ФОВ в плазме вплоть до двух суток после отравления несмертельными ($1/2 LD_{50}$) дозами нервно-паралитических отравляющих вещества, стоящих на вооружении российской армии – зарином зоманом и российским VX (RVX). Кроме того, данный способ может быть успешно использован для установления типа ОВ, воздействию которого подвергся пострадавший.

3.4 Разработка подхода одновременного определения характеристичных продуктов трансформации ФОВ ультраВЭЖХ-МС-МС

В последние годы особое внимание исследователей привлекает метод ультра-ВЭЖХ-МС-МС который дает возможность проводить селективный многокомпонентный анализ сложных биологических объектов, добиваясь быстрого (хроматографический анализ длится несколько минут) и эффективного (до 10^5 ТТ/м) разделения компонентов. ОЗХО ежегодно ужесточает требования, предъявляемые к способам обнаружения маркеров ФОВ, чтобы исключить ложные результаты анализов, в связи с этим на следующем этапе работы задача была связана с разработкой высокочувствительного экспрессного способа комплексного ультраВЭЖХ-МС-МС обнаружения наличия характеристичных продуктов трансформации зарина, зомана, VX и RVX (О-изопропилметилфосфоновой кислоты (иПрМФК), О-пинаколилметилфосфоновой кислоты (ПинМФК), О-этилметилфосфоновой кислоты (ЭМФК) и О-изобутилметилфосфоновой кислоты (иБутМФК) соответственно) в сложных биологических объектах, например в моче.

Для разработки подхода к определению иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК методом ВЭЖХ-МС-МС необходимо провести оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования, подобрать подходящие условия хроматографического разделения (обеспечивающие экспрессное и эффективное разделение исследуемых соединений), оценить метрологические характеристики (предел обнаружения, диапазон линейности градуировочного графика) и провести

апробацию разработанного способа на примере анализа образцов человеческой мочи, искусственно загрязненных данными продуктами трансформации ФОВ.

Работа выполнялась с использованием тандемного гибридного масс-спектрометра QTrap 3200 ABSciex (Канада), оснащенного двумя источниками ионизации – Turbo Spraytm (электрораспылительная ионизация) и HeatedNebulizertm (химическая ионизация при атмосферном давлении).

Процедура оптимизации масс-спектрометрического детектирования на данном типе оборудования в общем случае включает в себя выбор оптимального значения потенциала декластеризации (DP) на нулевом квадруполе масс-спектрометрического детектора. На следующем этапе работы подбирается величина входного потенциала (EP), соответствующая максимальной интенсивности сигнала исследуемого иона. Далее определяются подходящие для детектирования ионные переходы и для каждого из них исследуется оптимальное значение энергии фрагментации в камере соударения во втором квадруполе масс-детектора.

На стадии проведения оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования проводили установление влияния параметров, отвечающих за настройки работы квадруполей в масс-детекторе (потенциал декластеризации, входной потенциал на нулевом квадруполе масс-анализатора, энергия фрагментации и др.) и выбор оптимальных пар ионных переходов для масс-спектрометрического детектирования иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК;

Работу проводили в режиме прямого ввода с использованием шприцевого насоса (использовали водно-ацетонитрильные растворы иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК с концентрацией 1 мкг/мл). На рисунках 47 - 50 представлены масс-спектры растворов иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, на которых присутствуют депротонированные молекулы иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК с m/z 137, 179, 123 и 151 соответственно (режим регистрации отрицательных ионов). Наблюдается образование депротонированных молекул за счет кислотных групп иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, которые обладают кислотными свойствами.

Критерием выбора оптимальных значений потенциала декластеризации на нулевом квадруполе масс-спектрометрического детектора является максимальная интенсивность пика депротонированных молекул в масс-спектре. Для этого изучали зависимость величины сигнала молекулярных ионов иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК от величины потенциала.

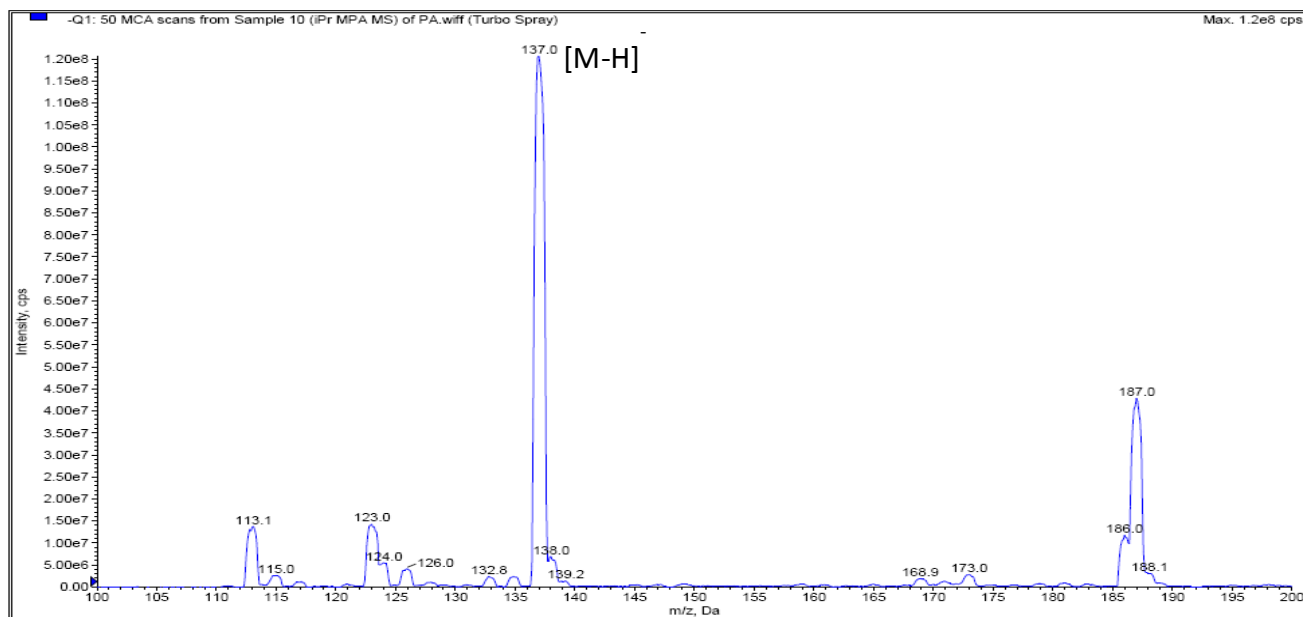


Рис. 47. Масс-спектр иПрМФК. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

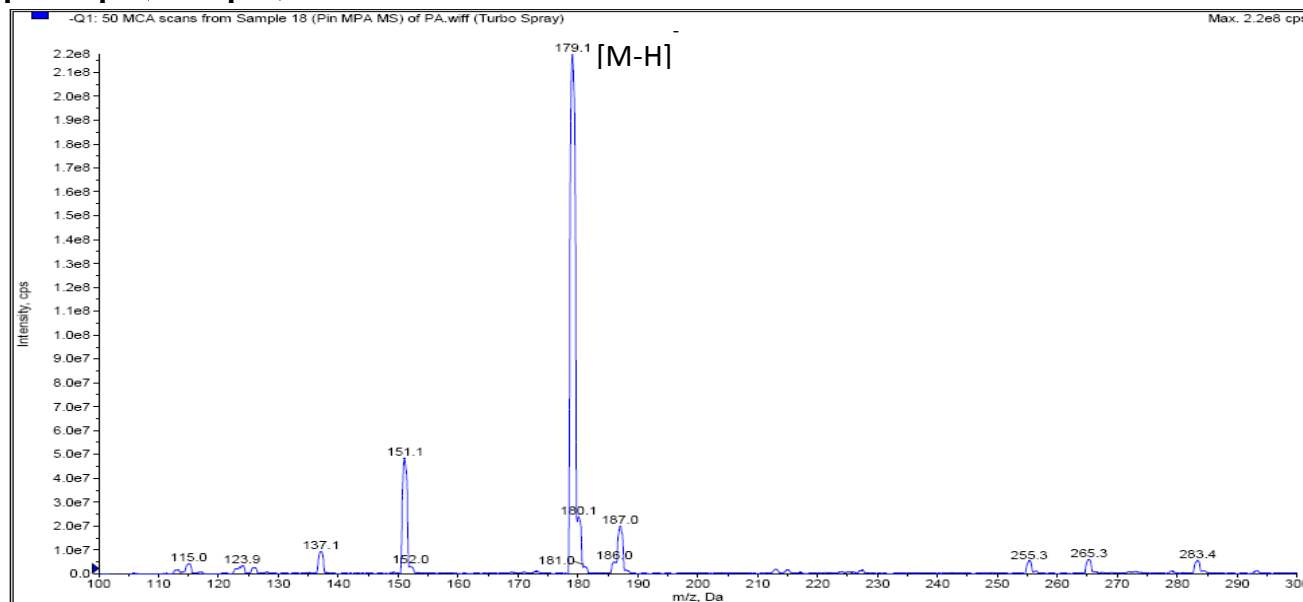


Рис. 48. Масс-спектр ПинМФК. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

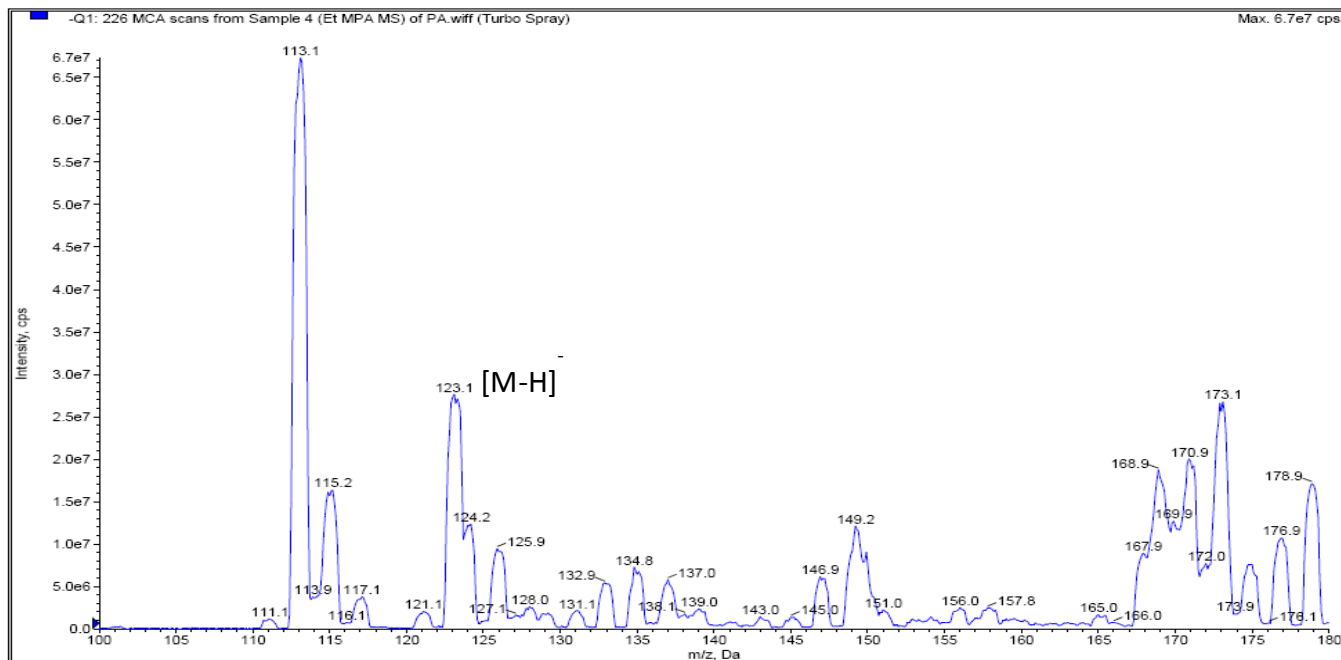


Рис. 49. Масс-спектр ЭМФК. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

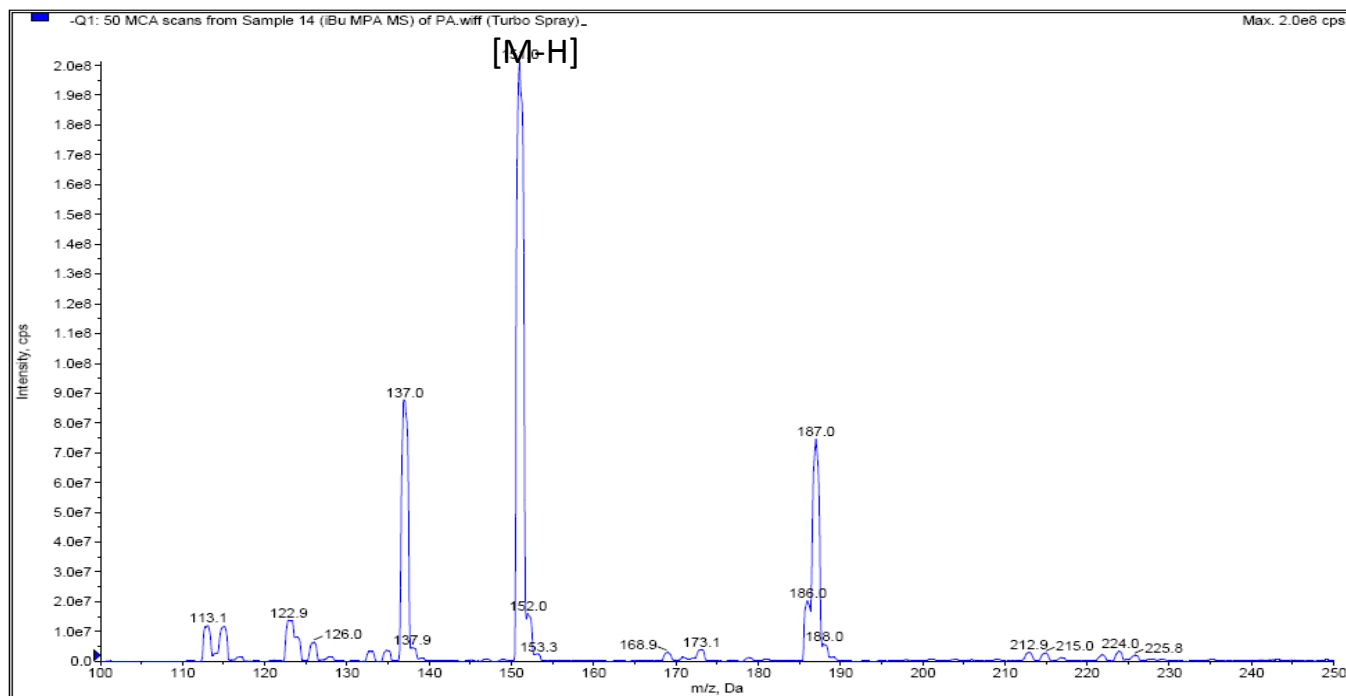


Рис. 50. Масс-спектр иБуТМФК. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

При детектировании иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБуТМФК в режиме использования электрораспылительной ионизации в варианте регистрации

отрицательных ионов необходимо использовать потенциалы декластеризации -31 В, -50 В, -40 В и -42 В соответственно.

Следующим этапом оптимизации масс-спектрометрического детектирования иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК является выбор характеристичных ионных переходов. Для этого проводили исследование влияния энергии фрагментации в камере соударения масс-спектрометра на характер спектра ионов-продуктов, образующихся при распаде молекулярных ионов иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК и интенсивность пиков образующихся ионов-продуктов. На рисунках 51 - 54 представлены масс-спектры ионов-продуктов иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, полученные в режиме регистрации отрицательных ионов в варианте электрораспылительной ионизации, при этом использовали оптимизированные параметры работы селективного масс-анализатора. Наиболее интенсивными ионными переходами оказались m/z 137 \rightarrow 95, m/z 137 \rightarrow 79 при определении иПрМФК, m/z 179 \rightarrow 95, m/z 179 \rightarrow 79 при определении ПинМФК, m/z 123 \rightarrow 95, m/z 123 \rightarrow 79 при определении ЭМФК и m/z 151 \rightarrow 95, m/z 151 \rightarrow 79 при определении иБутМФК. Фрагментация иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК идет с образованием иона метилфосфоновой кислоты с m/z 95 (брутто-формула $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3\text{P}$) и иона-продукта с m/z 79 (брутто-формула $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2\text{P}$).

Таким образом, для получения максимального аналитического сигнала при детектировании иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в выбранном варианте источника ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов необходимо использовать следующие параметры работы масс-спектрометра (табл. 33).

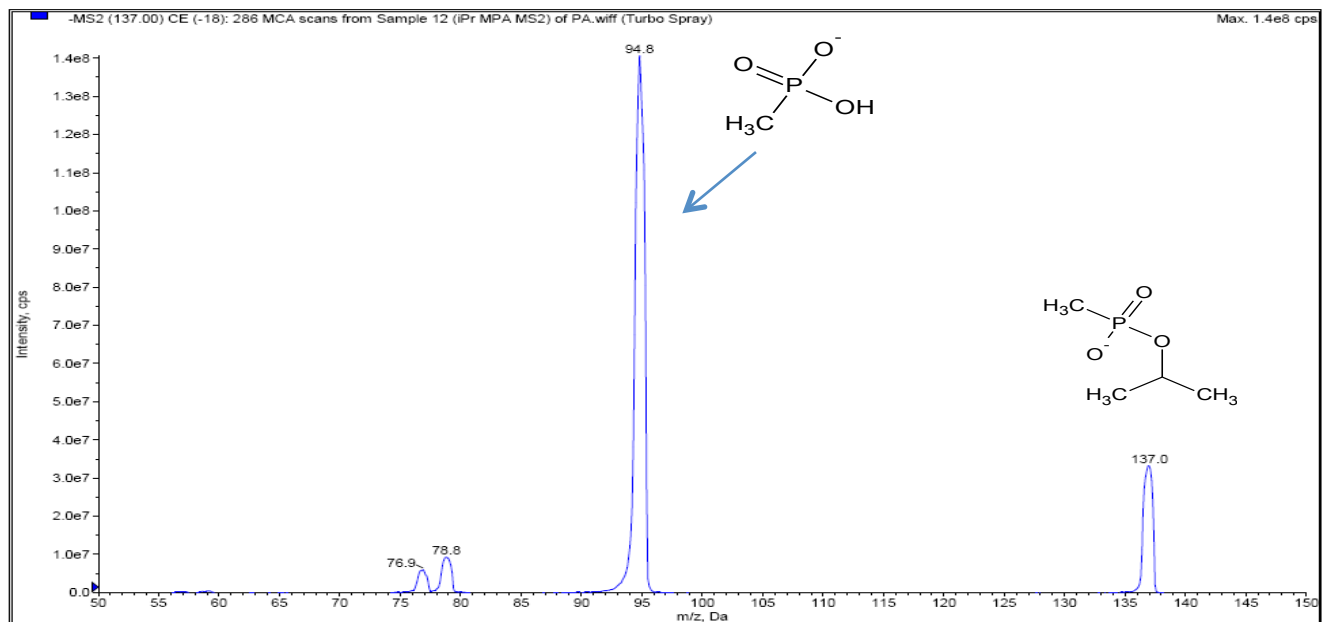


Рис. 51. Спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы иПрМФК с $m/z=137$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

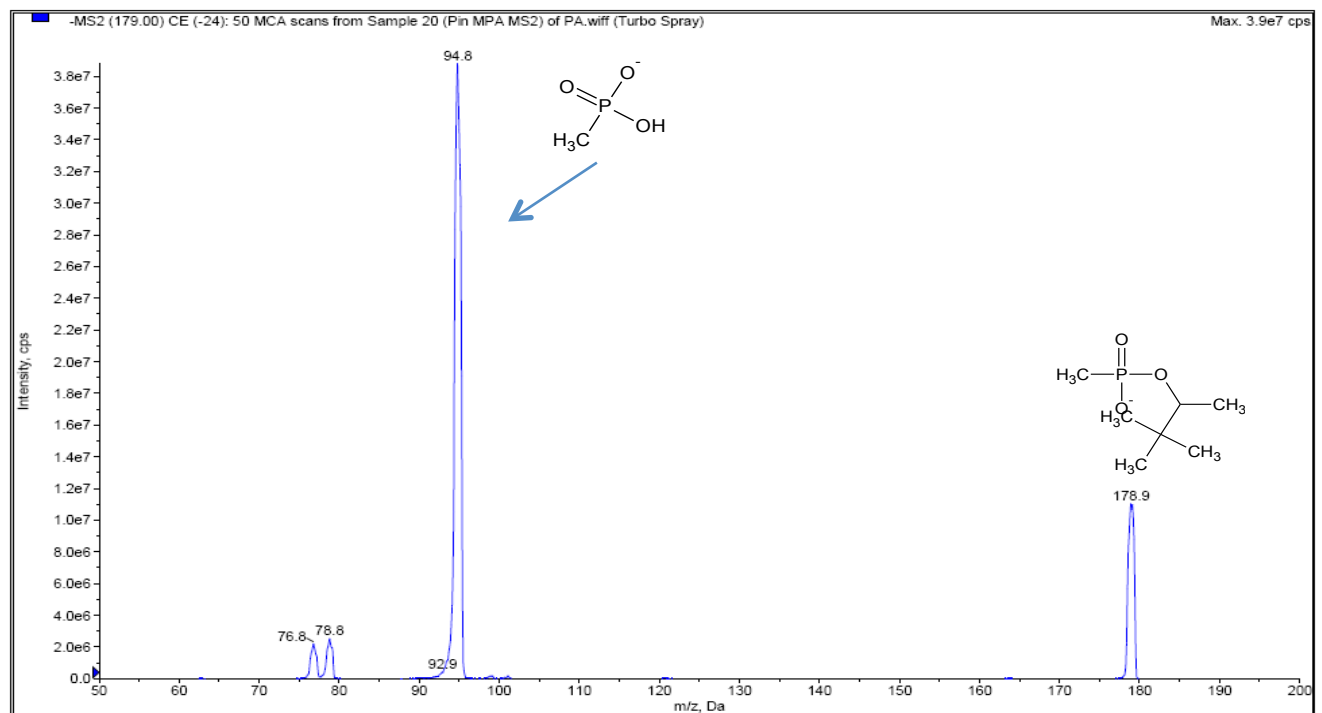


Рис. 52. Спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы ПинМФК с $m/z=179$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

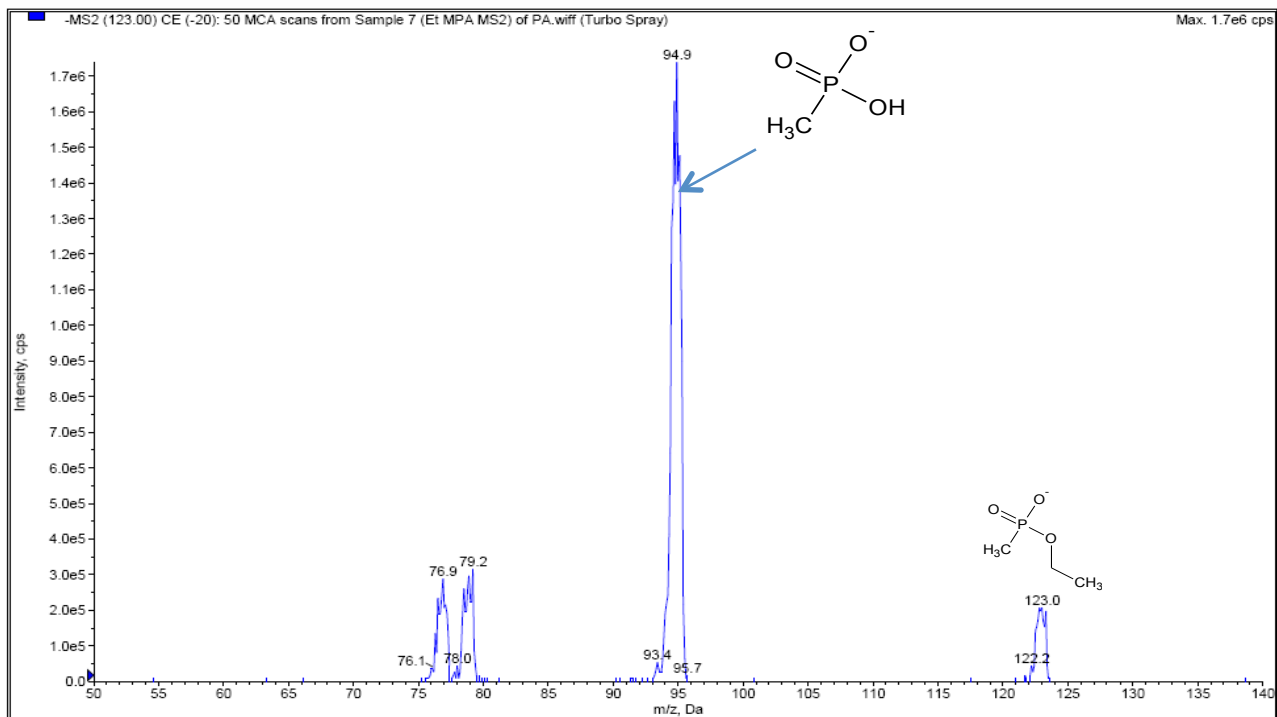


Рис. 53. Спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы ЭМФК с $m/z=123$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

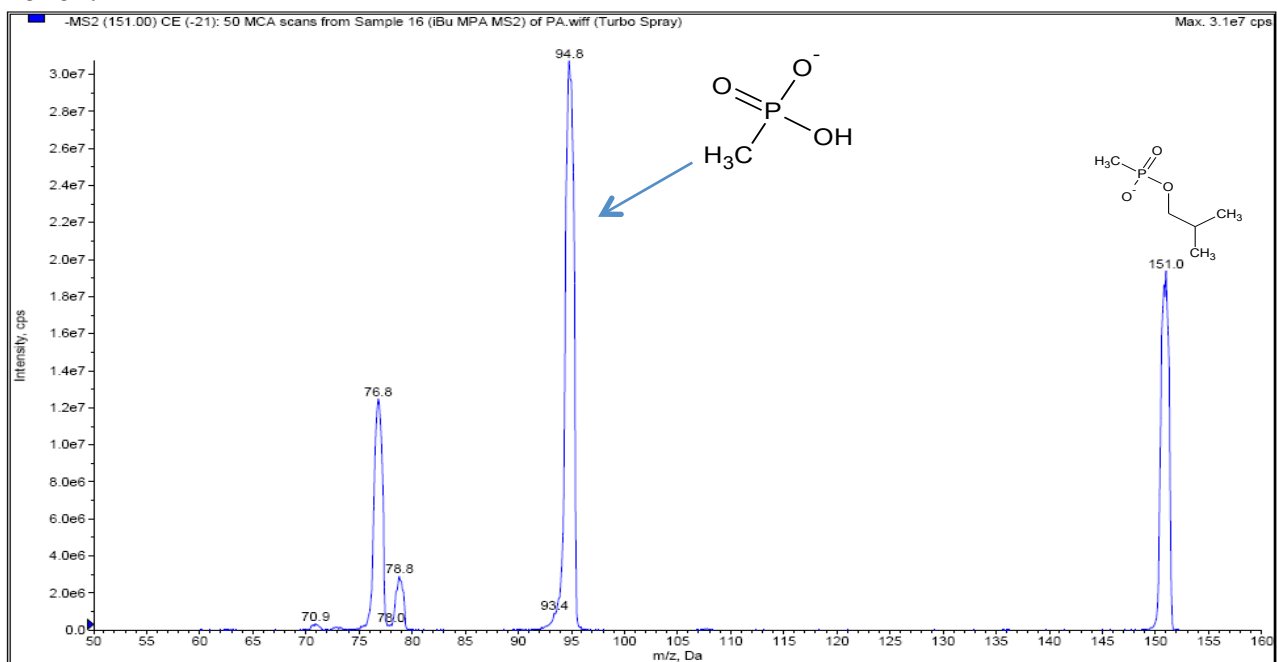


Рис. 54. Спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы иБутМФКс $m/z=151$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

Таблица 33 Условия детектирования иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов

Параметр	Описание
Полярность регистрируемых ионов	Отрицательные
Напряжение источника ионизации	-4.5 кВ
Температура источника ионизации	300 °С
Давление газа-завесы	15 PSI
Давление газа-распылителя	30 PSI
Режим регистрации	Регистрация выбранных реакций (MRM)
Напряжение на фрагменторе	-31 В (иПрМФК); -50 В (ПинМФК); -40 В (ЭМФК); -42 В (иБутМФК)
Напряжение в ячейке соударения	-17 В (иПрМФК); -21 В (ПинМФК); -20 В (ЭМФК); -22 В (иБутМФК)
MRM № 1,m/z	137→95 (иПрМФЛ); 179→95 (ПинМФК) 123→95 (ЭМФК); 151→95 (иБутМФК)
MRM № 2,m/z	137→79 (иПрМФЛ); 179→79 (ПинМФК) 123→79 (ЭМФК); 151→79 (иБутМФК)

В ходе разработки способа разделения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК использовали так называемый метод ультраВЭЖХ (работа при давлении в системе более 500 атм.), который позволяет существенно сократить время анализа и добиться высоких значений эффективности разделения.

В качестве неподвижной фазы при одновременном разделении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в варианте ультраВЭЖХ использовали обращено-фазовый сорбент AcclaimRSLC, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 2.2 мкм, фирмы «Thermo». В связи с тем, что иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК являются достаточно сильными кислотами, чтобы

уменьшить степень размывания пиков и подавить диссоциацию кислот в качестве подвижных фаз использовали 0.5 % водный раствор муравьиной кислоты и 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. При хроматографическом определении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК использовали программу градиентного элюирования (табл. 34), в условиях которой коэффициенты емкости (k) иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК составили 3.9, 5.6, 2.0 и 4.7 соответственно и являются приемлемыми для метода хроматографического анализа. В таблице 35 представлены параметры хроматографического разделения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.

Таблица 34. Условия хроматографического разделения при определении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. Подвижная фаза А – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле

объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.45 мл/мин;
Программа градиентного элюирования	0.00 – 1.5 мин – 2 % В, 1.51- 8.00 мин – 2%-100% В, 8.01-8.30 мин- 100 % - 2 % В

На рисунке 51 представлена хроматограмма стандартного водного раствора, содержащего иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, полученная при использовании выбранных условиях хромато-масс-спектрометрического определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.

Таблица 35. Хроматографические параметры при определении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. При расчетах использовали величину мертвого времени равного 0.60 мин

Параметр	ЭМФК	иПрМФК	ПинМФК	иБутМФК
Время удерживания, мин	2.0	3.9	5.6	4.7
Коэффициент емкости	1.8	4.6	7.0	5.7
Эффективность, ТТ/метр	41000	165000	150000	104000

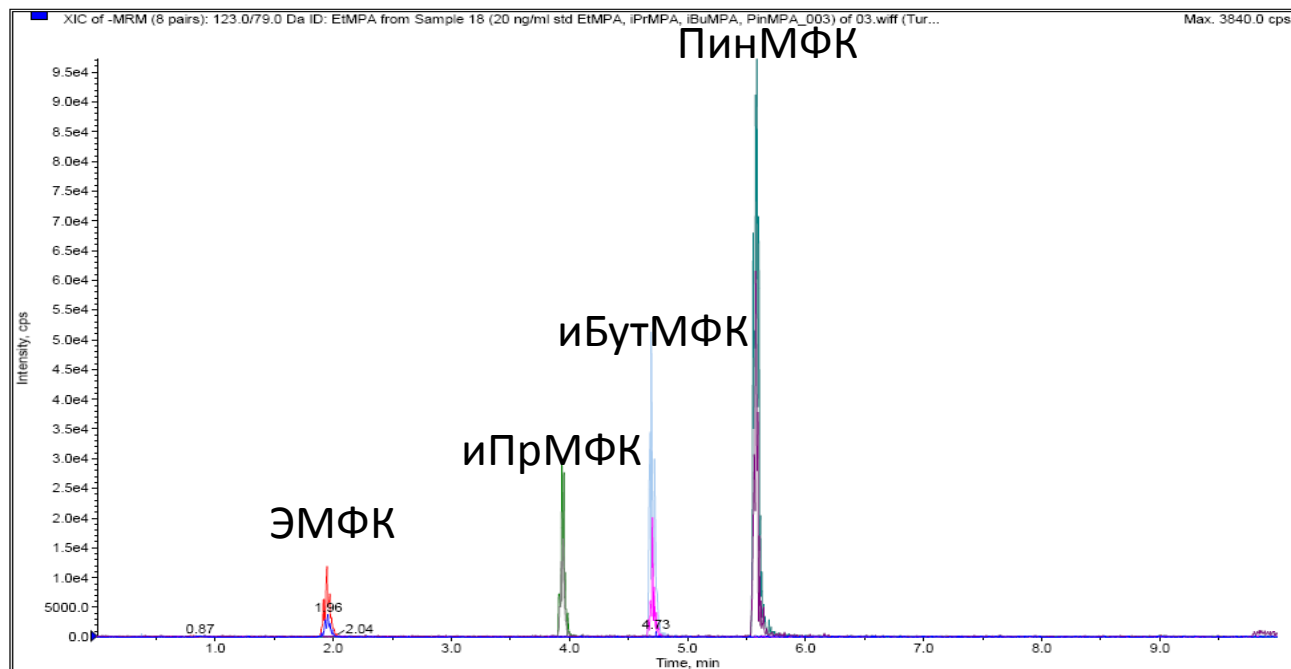


Рис. 51. Хроматограмма водного раствора содержащего по 20 нг/мл иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК.

В качестве процедуры пробоподготовки мочи использовали очистку исследуемых образцов на картриджах. Для этого образец мочи подщелачивали раствором аммиака до pH 8-9, чтобы перевести иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в анионы, которые плохо удерживаются на сорбентах картриджей, и, далее, пропускали пробу через картридж.

На этапе оптимизации процедуры пробоподготовки исследовали влияние типа сорбента картриджа на пропускание иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК Э. В ходе работы провели очистку образцов мочи на двух типах картриджей: Strata C (смешанный сорбент с лигандами C8 и катионно-обменными группами) и Strata SDB-L (сорбент сополимера стирола и дивинилбензола). Критерием выбора оптимального картриджа является максимальное пропускание иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК через сорбент картриджа. Расчет величины пропускания проводили согласно формуле:

$$\text{Пропускание, \%} = (S_{\text{после прохождения через картридж}} / S_{\text{в пробе до процедуры пробоподготовки}}) * 100\%$$

На рисунке 52 представлена хроматограмма модельного образца человеческой мочи, искусственно загрязненная иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, после стадии пропускания через картридж.

В таблице 36 представлены результаты расчета пропускания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК через два типа картриджей, используемых в ходе процедуры пробоподготовки. Расчет величины пропускания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК проводили относительно содержания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в стандартном водном растворе до процедуры пробоподготовки. Видно, что наилучшие результаты удается добиться при использовании картриджа Strata SDB-L, для которого удается добиться величин пропускания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК более 85%.

В таблице 37 представлены метрологические характеристики разработанного подхода определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в образцах человеческой мочи, искусственно загрязненных иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. Предел обнаружения разработанного способа находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика 3:1).

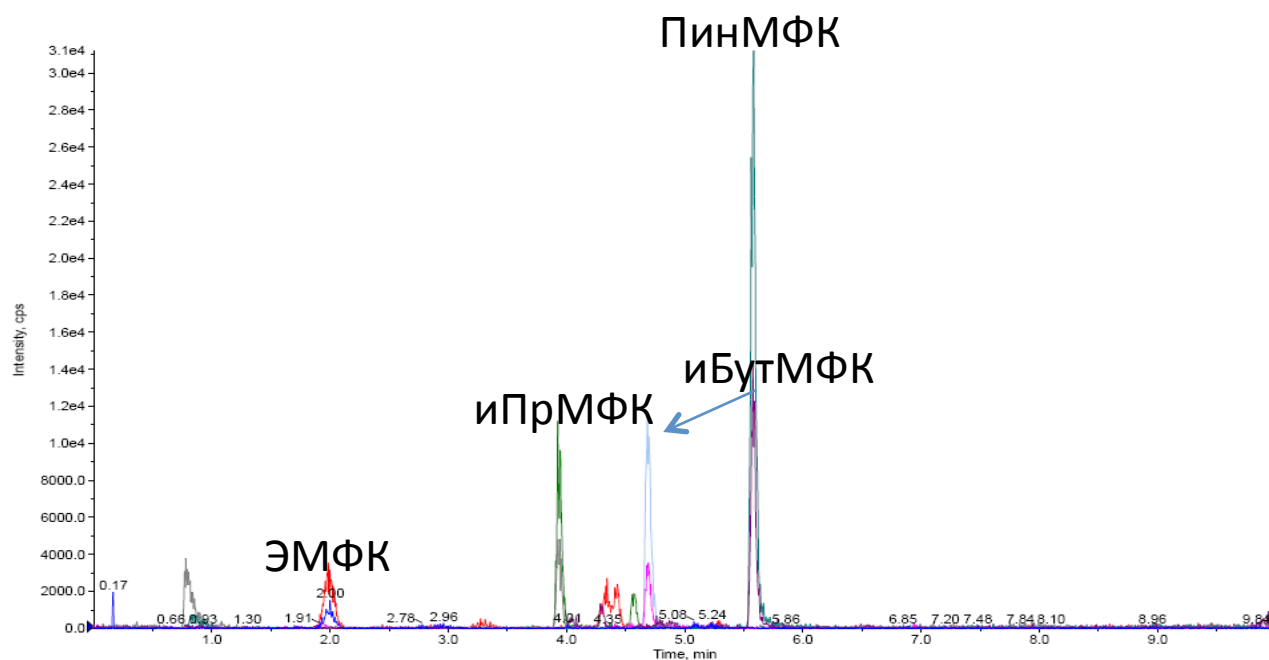


Рис. 52. Хроматограмма модельного образца человеческой мочи, искусственно загрязненной по 5 нг/мл иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК, полученная после процедуры пробоподготовки.

Таблица 36. Расчет пропускания иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК через картриджи StrataC и StrataSDB-L в ходе процедуры пробоподготовки (P=0.95, n=3)

	Strata C	Strata SDB-L
Пропускание $\epsilon_{\text{иПрМФК}}$, %	71±9	89±6
Пропускание ПинМФК , %	82±9	92±4
Пропускание ЭМФК , %	65±5	84±4
Пропускание иБутМФК , %	78±8	92±5

Таблица 37. Метрологические характеристики разработанного подхода определения продуктов трансформации ФОВ иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в модельных образцах человеческой мочи

Параметр	ЭМФК	иПрМФК	ПинМФК	иБутМФК
Уравнение градуировочной зависимости у- площадь хроматографического пика (отн. ед.) С-концентрация определяемого вещества, (нг мл ⁻¹)	$y=47 \times C$	$y=60 \times C$	$y=300 \times C$	$y=93 \times C$
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

Для проведения экспериментальной оценки применимости разработанной хромато-масс-спектрометрического подхода одновременного определения иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в образцах биоматериалов, анализировали модельные образцы человеческой мочи, искусственно загрязненных иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. Апробация разработанного подхода проходила в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО и заключалась в обнаружении иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК в зашифрованных пробах человеческой мочи.

Пробы готовили и анализировали согласно разработанной процедуре пробоподготовки. Для повышения достоверности проводимых исследований также анализировали холостые образцы – пробы человеческой мочи, не содержащие иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. В таблице 38 приведены описания и результаты исследования проб, представленных ОЗХО. На рисунках 53-58 представлены хроматограммы человеческой мочи, не загрязненной данными продуктами разложения ФОВ, и образцов в которых удалось обнаружить иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. Полученные данные полностью подтверждены независимым ГХ-МС-МС анализом с применением реакции дериватизации с гептафторбутирилимидазолом, который проводился в сторонней аккредитованной лаборатории.

Таблица 38. Результаты анализа биопроб человеческой мочи в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО на содержание в иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК

Шифр пробы	Наличие ЭМФК	Наличие иБутМФК	Наличие иПрМФК	Наличие ПинМФК
A-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
B-LC-3	Достоверно обнаружено (на уровне 20 нг/мл)	Не обнаружено	Не обнаружено	Достоверно обнаружено (на уровне 20 нг/мл)
C-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено	Достоверно обнаружено (на уровне 6 нг/мл)	Не обнаружено
D-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено	Достоверно обнаружено (на уровне 5 нг/мл)	Достоверно обнаружено (на уровне 5 нг/мл)
E-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

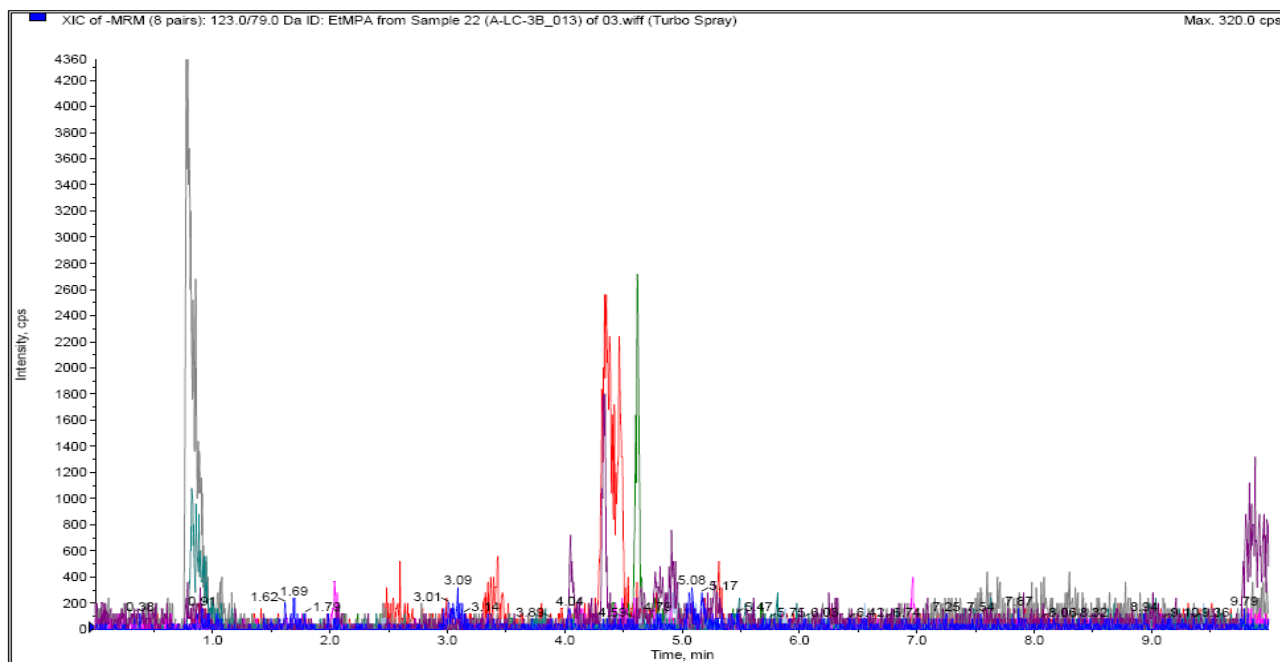


Рис. 53. Хроматограмма образца человеческой мочи, не содержащего иПрМФК, ПинМФК, ЭМФК и иБутМФК. Режим регистрации выбранных реакций для четырех определяемых алкил метилфосфоновых кислот.

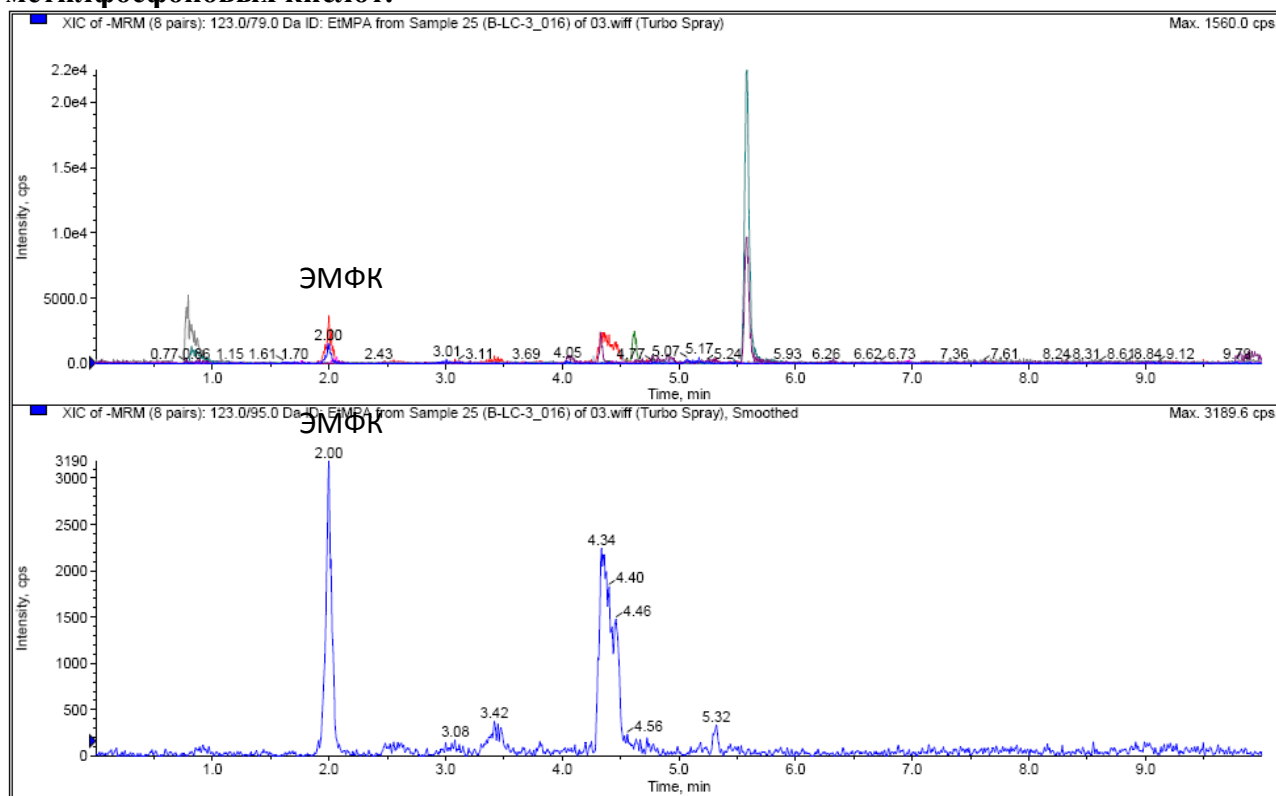


Рис. 54. Хроматограмма образца «B-LC-3», полученная при регистрации ЭМФК. Верхняя хроматограмма – режим регистрации выбранных реакции для четырех определяемых алкил метилфосфоновых кислот. Нижняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции для ЭМФК 123 → 95.

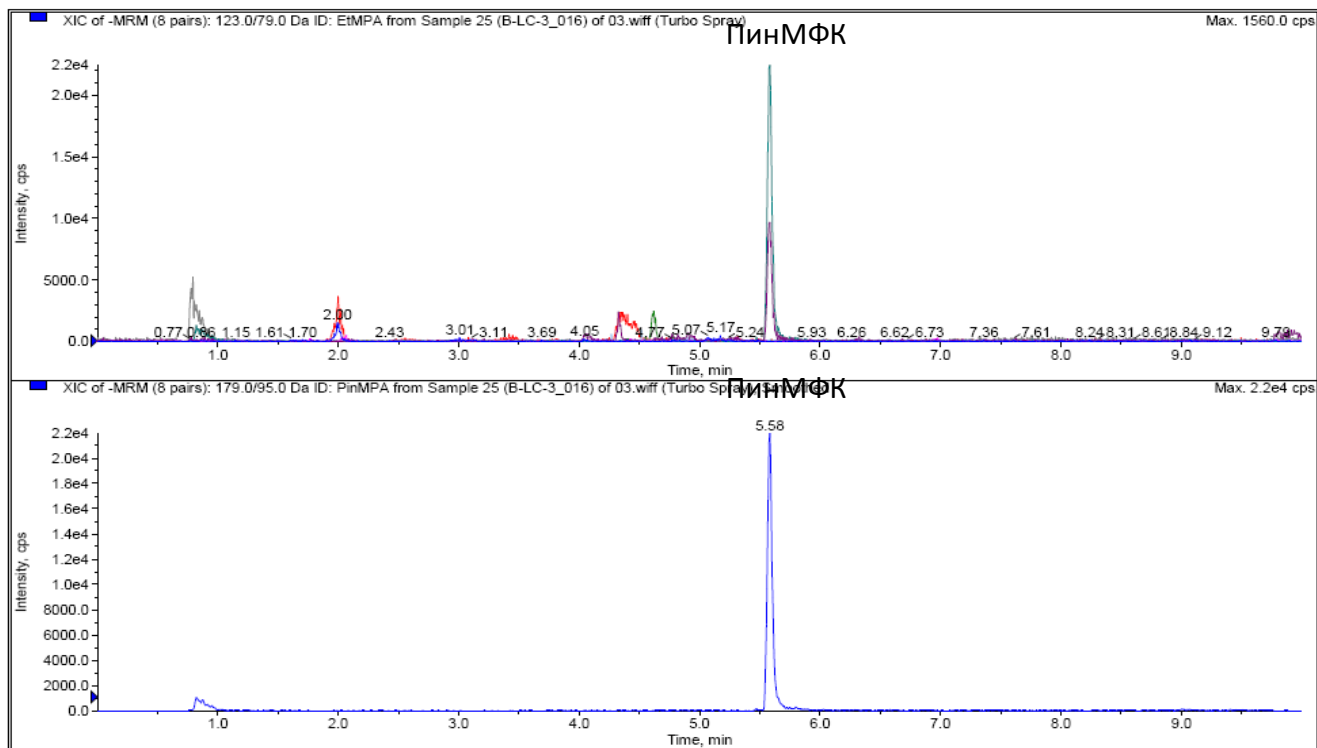


Рис. 55. Хроматограмма образца «B-LC-3», полученная при регистрации ПинМФК. Верхняя хроматограмма – режим регистрации выбранных реакции для четырех определяемых алкил метилфосфоновых кислот. Нижняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции для ПинМФК 179 → 95.

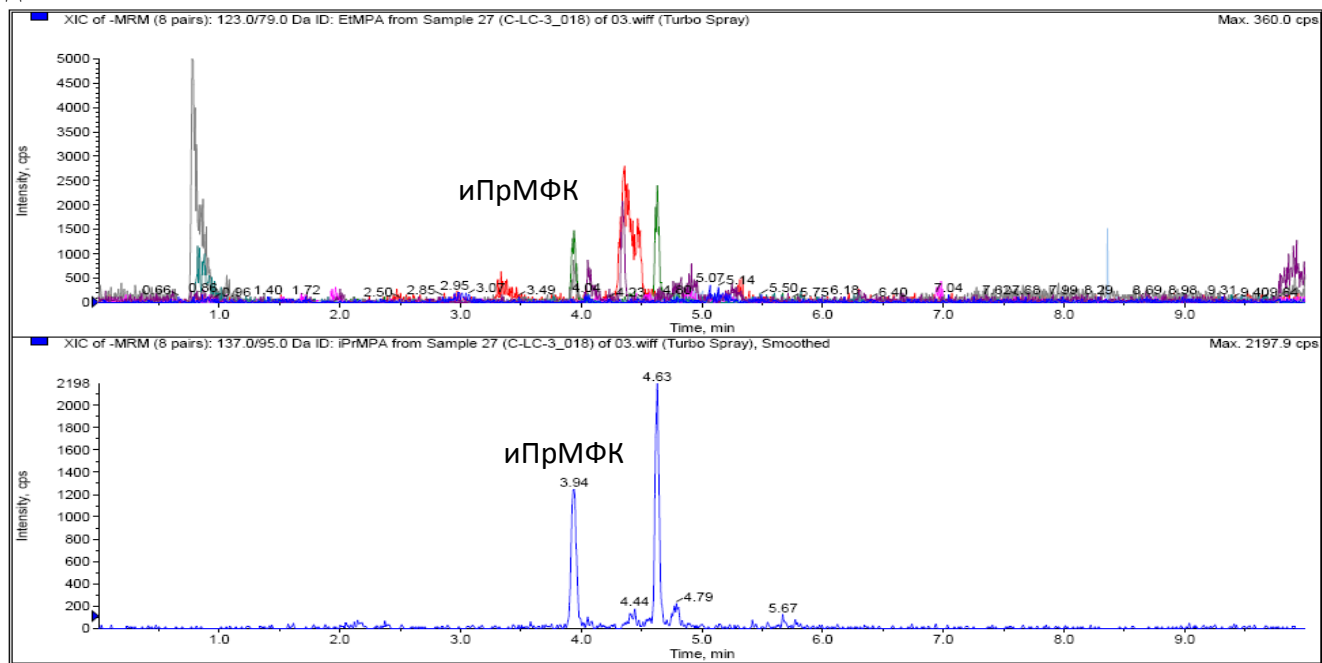


Рис. 56. Хроматограмма образца «C-LC-3», полученная при регистрации иПрМФК. Верхняя хроматограмма – режим регистрации выбранных реакции для четырех определяемых алкил метилфосфоновых кислот. Нижняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции для иПрМФК 137 → 95.

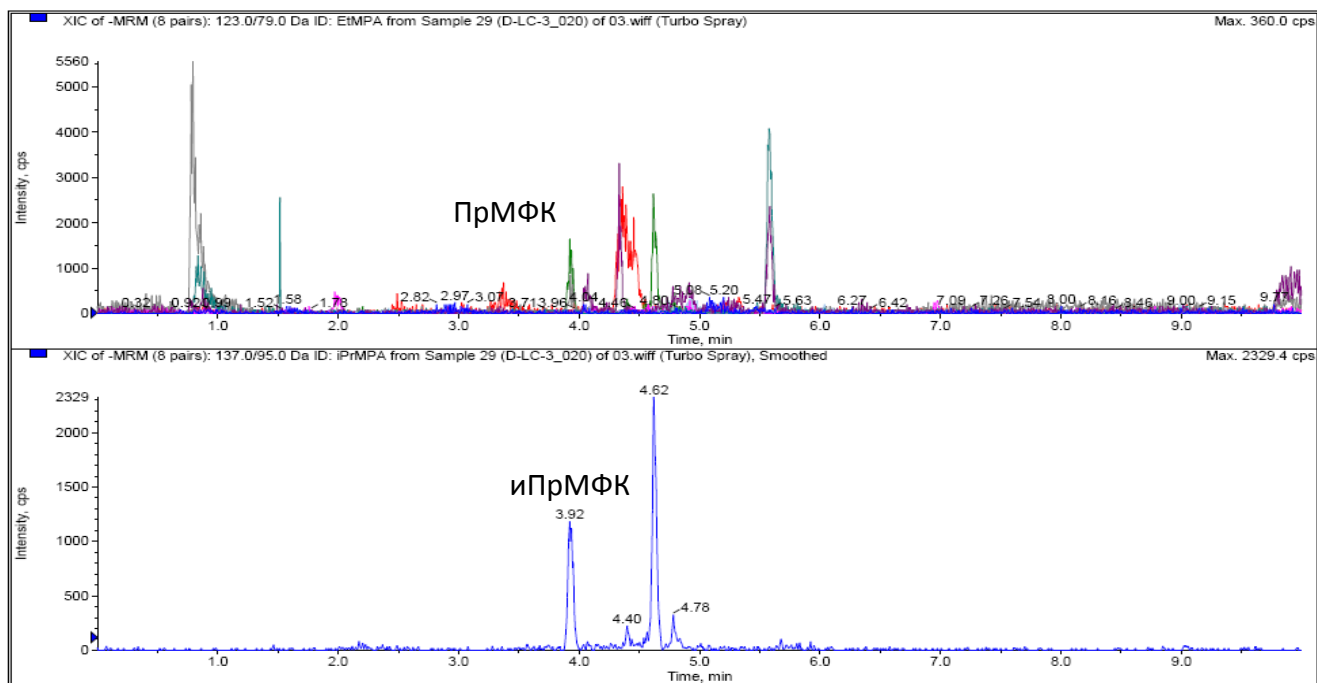


Рис. 57. Хроматограмма образца «D-LC-3», полученная при регистрации иПрМФК. Верхняя хроматограмма – режим регистрации выбранных реакции для четырех определяемых алкил метилфосфоновых кислот. Нижняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции для иПрМФК 137 → 95.

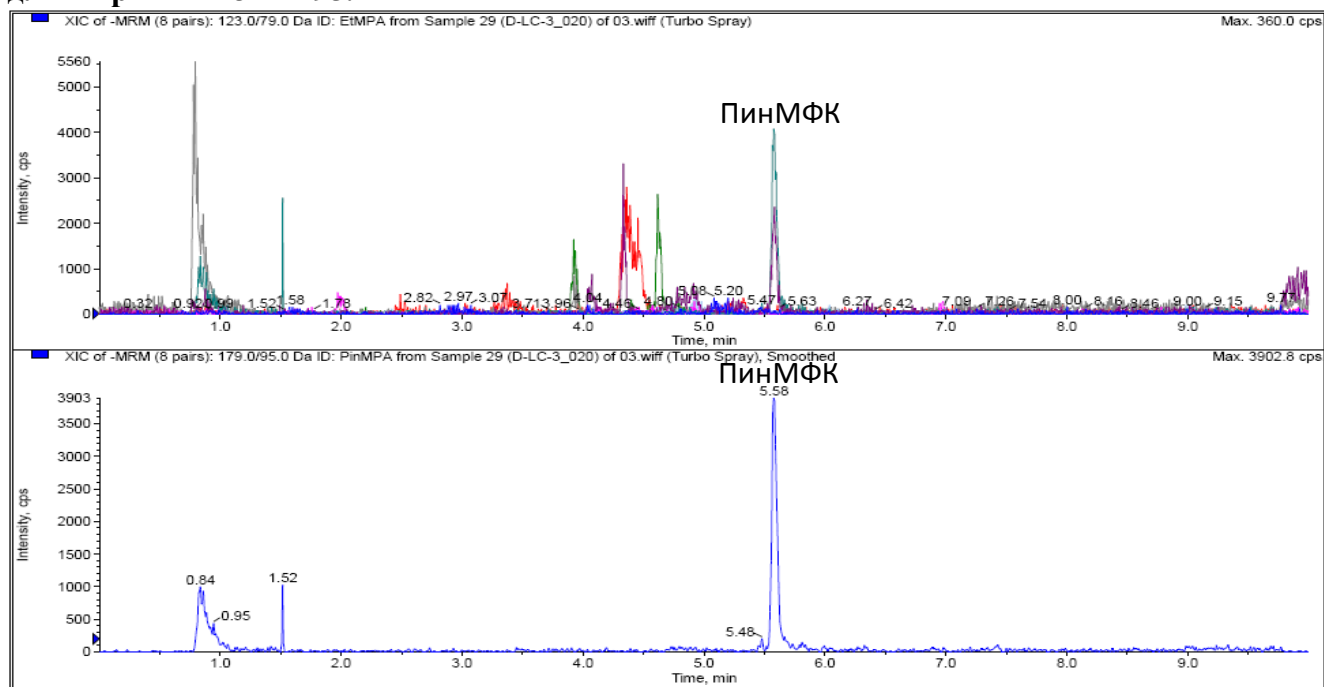


Рис. 58. Хроматограмма образца «D-LC-3», полученная при регистрации ПинМФК. Верхняя хроматограмма – режим регистрации выбранных реакции для четырех определяемых алкил метилфосфоновых кислот. Нижняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции для ПинМФК 179 → 95.

3.5. Экспрессное определение МФК в природных водах

Из обзора литературных данных можно сделать вывод о том, что оптимальным методом определения МФК в природных водах является ВЭЖХ-МС/МС. Авторы работ получали наилучшие результаты, применяя электрораспылительную ионизацию в варианте регистрации отрицательных ионов [50, 59, 61, 62, 65-67]. Также из литературных данных можно заключить о популярности прямых, не требующих длительных стадий пробоподготовки методов определения алкилфосфоновых кислот. Поэтому был разработан способ прямого определения МФК с применением системы, состоящей из жидкостного хроматографа и тандемного масс-спектрометра.

Для МФК были получены спектры ионов-предшественников и фрагментных ионов. После обработки этих спектров выбирали характеристические ионы, по которым проводили масс-спектрометрическое детектирование. На Рис. 59 представлен масс-спектр, полученный в режиме сканирования отрицательных ионов и спектр фрагментных ионов, полученных из депротонированной молекулы МФК.

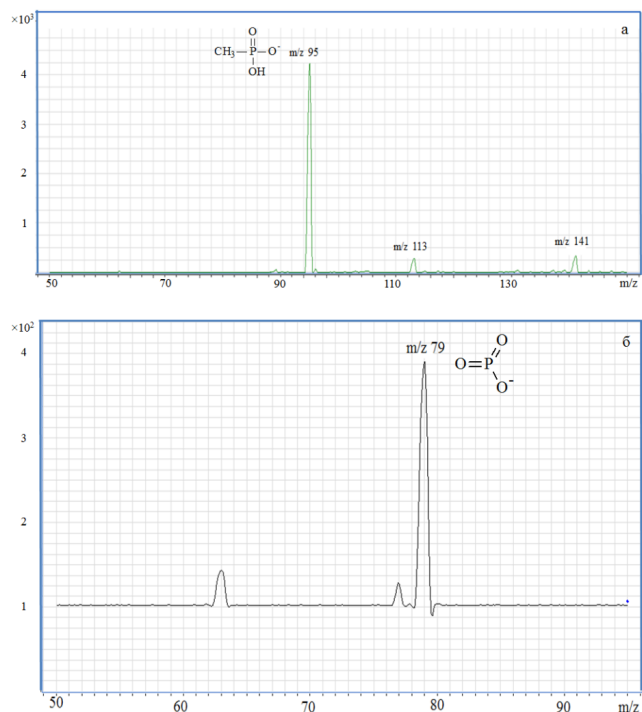


Рис. 59. а) масс-спектр электрораспыления МФК б) спектр фрагментных ионов депротонированной молекулы МФК $[M-H]^-$ с m/z 95.

Исходя из информации, полученной из масс-спектров, для определения нами был выбран ионный переход $95 \rightarrow 79$, а для качественного подтверждения $95 \rightarrow 63$.

Для выбора наиболее подходящего состава подвижной фазы в качестве первого компонента использовали водные растворы 0.5% муравьиной кислоты, 5 мМ ацетата аммония и их смеси с уксусной кислотой и гидроксидом аммония. В качестве второго компонента подвижной фазы использовали ацетонитрил. Получали зависимость интенсивности сигнала депротонированной молекулы от рН подвижной фазы. На Рис. 50 представлена зависимость интенсивности сигнала иона с m/z 95 от рН подвижной фазы.

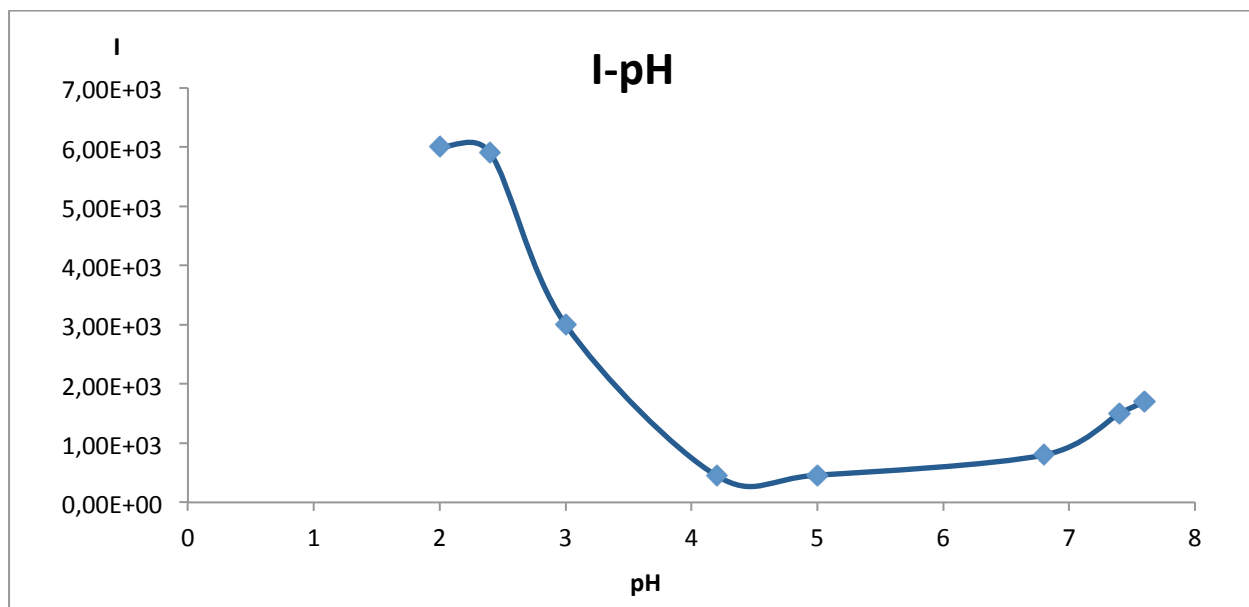


Рис. 60. Зависимости интенсивности сигнала иона $[M-H]^-$ с соотношением m/z 95 от значений рН подвижной фазы.

Из Рис. 60 можно сделать вывод, что наибольшая интенсивность сигнала иона депротонированной молекулы МФК достигается при значении рН 2,4. Данному значению рН соответствует рН 0,5% раствора муравьиной кислоты в воде. Таким образом, наиболее подходящей подвижной фазой являлся раствор, состоящий из 0,5% муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила в соотношении 95:5 по объему.

На следующей стадии работы проводили оптимизацию масс-спектрометрических параметров, таких как потенциал на входе в масс-анализатор (Fragmentor) и энергия соударений (CE). При помощи варьирования этих параметров получали максимальную интенсивность сигнала ионов с m/z 95 и 79, тем самым повышая чувствительность определения. Из полученных зависимостей было выяснено, что наиболее подходящие значения, при которых наблюдается максимальная интенсивность сигнала ионов с m/z

95, 79 и 63 для потенциала на входе в масс-анализатор – 50 В, а для энергии соударений – 20 и –25 В.

Оптимизировали параметры масс-спектрометра. Изменение скорости потока газа-распылителя от 8 до 10 л/мин и температуры газа-распылителя от 200 до 350 °С привело к десятикратному увеличению сигнала, соответствующего ионному переходу 95→79 и 95→63.

Влияние скорости потока и температуры газа-распылителя на аналитический сигнал представлено на Рис. 61.

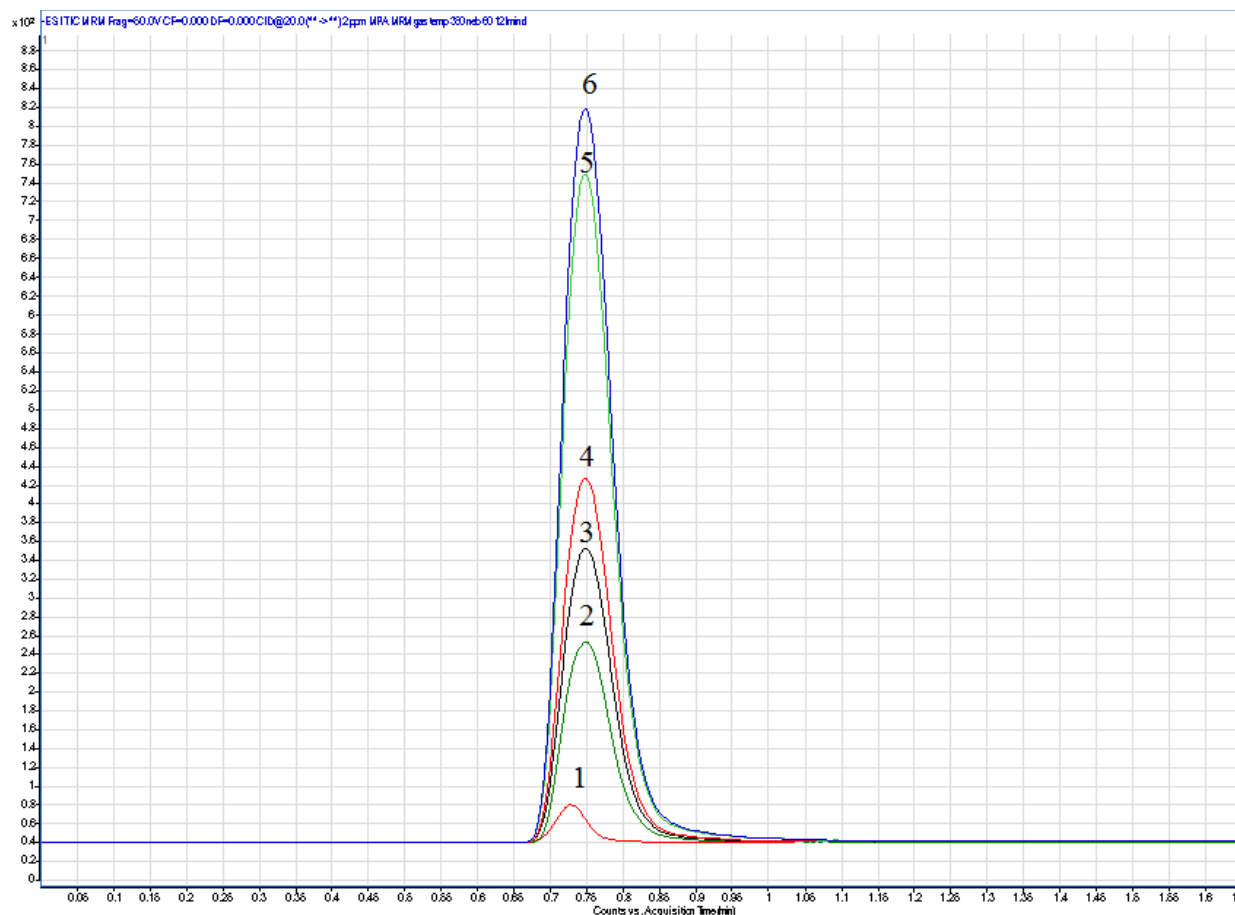


Рис. 61. Хроматограммы МФК по ионному переходу 95→79 при различных параметрах скорости потока газа-распылителя (V_{Γ}) и температуре газа-распылителя (T_{Γ}): 1 – V_{Γ} 8 л/мин, T_{Γ} 200 °С; 2 – V_{Γ} 10 л/мин, T_{Γ} 200 °С, 3 - V_{Γ} 10 л/мин, T_{Γ} 250 °С, 4 - V_{Γ} 10 л/мин, T_{Γ} 300 °С, 5 – V_{Γ} 10 л/мин, T_{Γ} 350 °С, 6 - V_{Γ} 11 л/мин, T_{Γ} 350 °С.

В дальнейшем все хроматограммы получали при параметрах, представленных в Табл. 39.

Таблица 39. Выбранные условия измерений

Скорость потока газа-распылителя, л/мин	10
Скорость потока газа периферийного слоя, л/мин	11
Температура газа-распылителя, °С	350
Температура обдувочного газа, °С	400

Разработанный подход применяли к образцу природных вод (характеристики природной воды, представлены в Табл. 40).

Таблица 40. Химический состав образцов вод

Параметр	Природная вода	Вода из скважины	Водопроводная вода
Цветность в градусах	9	0	1.5
Мутность, ЕМФ, мг/л	2	0.6	0.4
Водородный показатель (рН)	7.00	7.25	7.05
Общая жесткость мг-экв/л	4.6	4.9	6.18
Хлориды, мг/л	3.1	15.1	1.39
Сульфаты, мг/л	7.2	23.0	9.24
Марганец, мг/л	0.009	0.054	0.028
Фториды, мг/л	1.3	0.07	0.49
Железо общ., мг/л	0.08	0.06	0.18
Медь, мкг/л	40	29.8	1.22
Нитраты, мг/л	3.1	4.5	15

Правильность разработанного подхода определяли методом «введено-найдено» (Табл. 41).

Таблица 41. Проверка правильности, разработанного подхода методом «введено-найдено»

(n=3, p=0,95)

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

На Рис. 62 представлена хроматограмма образца природных вод с добавкой 100 нг/мл МФК, полученная в оптимизированных хроматографических и масс-спектрометрических условиях.

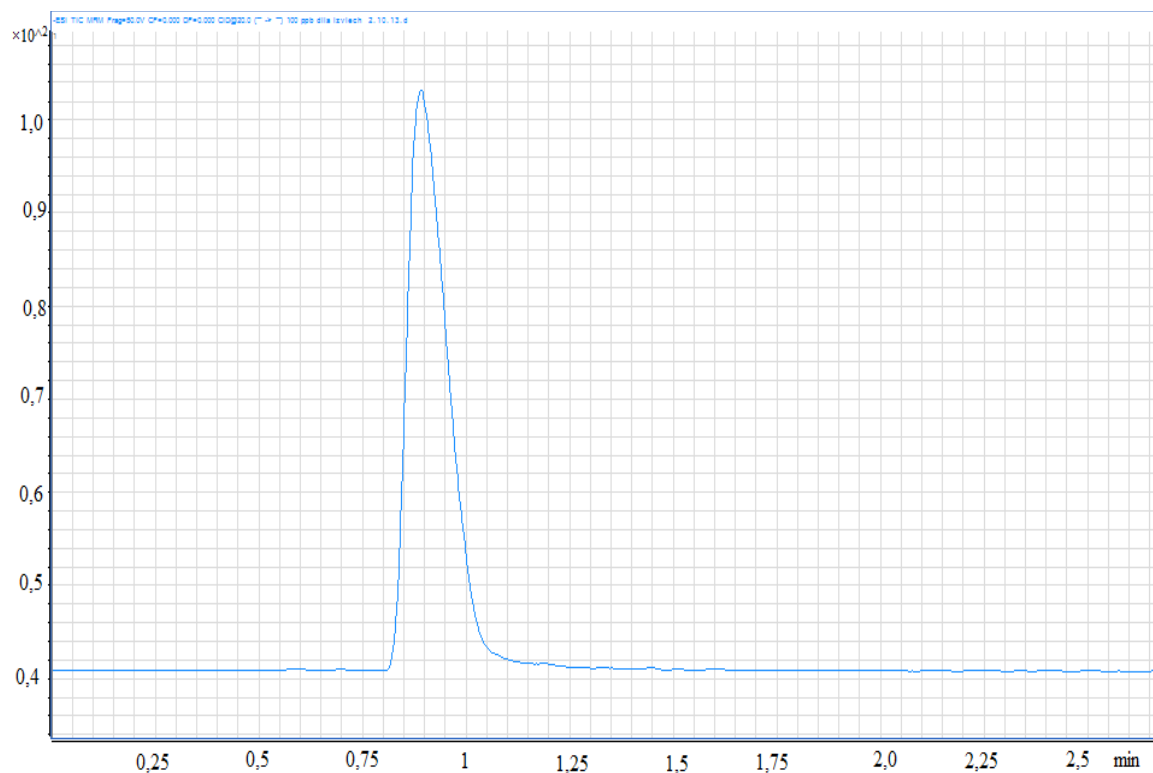


Рис. 62. Хроматограмма по ионному переходу 95→79 природной воды с добавкой 100 нг/мл раствора МФК. Колонка – Acclaim RSLC (150 мм × 2,1 мм, 2,2 мкм). Подвижная фаза – 0,5% муравьиная кислота в воде – ацетонитрил (95:5 по объему). Изократический режим. Скорость потока – 0.4 мл/мин.

В Табл. 42 представлены характеристики прямого ВЭЖХ-МС/МС определения МФК.

Таблица 42. Характеристики прямого ВЭЖХ-МС-МС определения МФК в природной воде

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

3.6. Определение МФК в виде производного с п-бромфенацил бромидом в природных водах

Для дериватизации МФК применяли следующие реагенты, представленные на Рис. 63.

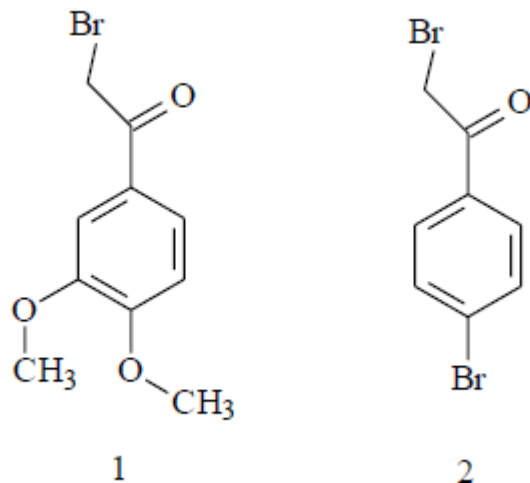
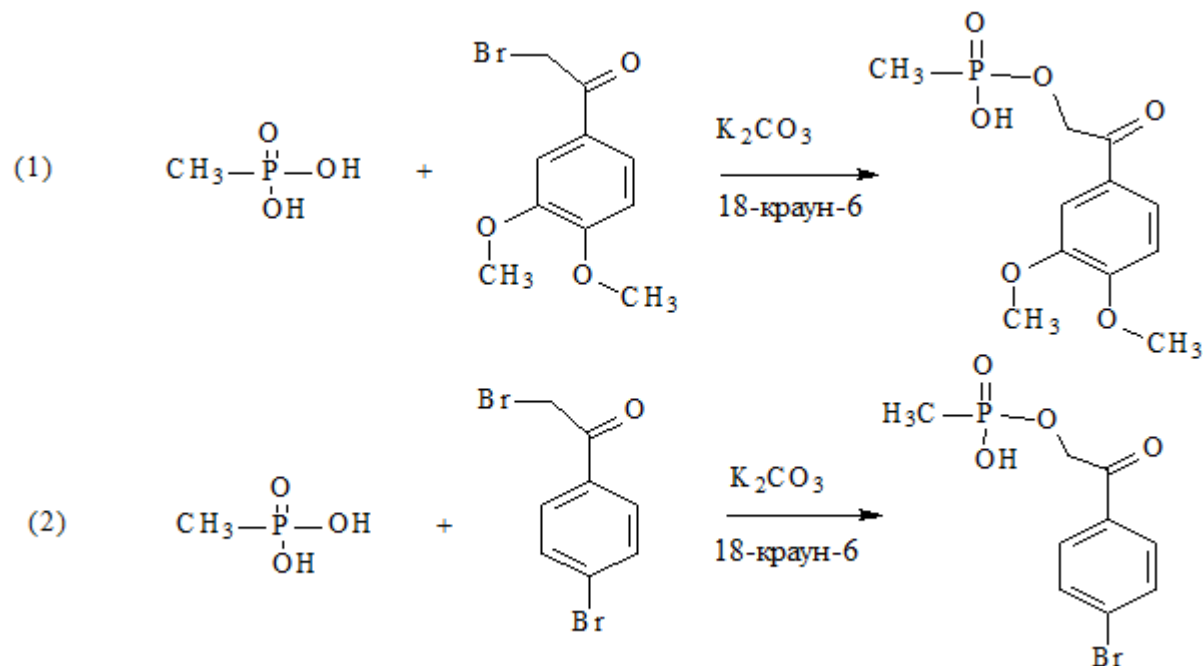


Рис. 63. Структурные формулы дериватирующих реагентов. 1 – 4,5 - диметоксифенацил бромид, 2 – п-бромфенацил бромид.

Данные дериватирующие реагенты использовали с целью увеличения чувствительности определения МФК за счет образования производного с большей молекулярной массой.

Реакцию МФК с данными реагентами проводили согласно схеме:



Добавки 18-краун-6 и K_2CO_3 увеличивают скорость реакции и выход целевого продукта. Реакцию проводили при температуре 80 °С в течение 30 минут.

Используя систему прямого ввода в масс-спектрометр, получали масс-спектры электрораспылительной ионизации образующихся производных в варианте регистрации отрицательных ионов. (Рис. 64, 65).

Так как дериват в своем составе содержит бром, то в масс-спектре должно наблюдаться изотопное расщепление из-за наличия двух природных изотопов брома ^{79}Br и ^{81}Br . Поэтому в масс-спектре (Рис. 64) присутствуют сигналы, соответствующие двум ионам с m/z 293 и 291. Также в спектре не наблюдается сигнал соответствующий иону с m/z 95, что свидетельствует о завершенности и полноте протекания реакции. Образующееся после дериватизации с 3,4-диметоксифенацил бромидом соединение имеет молекулярную массу 274 а.е.м. В спектре, представленном на Рис. 65, наблюдается сигнал, соответствующий депротонированной молекуле с соотношением массы к заряду 273 и отсутствует сигнал, соответствующий иону с m/z 95, что также свидетельствует о полноте и завершенности протекания реакции. Однако интенсивность сигнала депротонированной молекулы, образующейся из производного с *p*-бромфенацил бромидом, в 2 раза превышает интенсивность сигнала депротонированной молекулы второго производного. Таким образом, дальнейшие эксперименты проводили с *p*-бромфенацил бромидом.

Получали фрагментные ионы, образующиеся в ячейке соударений из ионов с m/z 293 и 291 (Рис. 66).

Для определения нами были выбраны следующие ионные переходы: 293→265, 293→215, 291→263, 291→213. Подбирали оптимальные значения потенциала на входе в масс-анализатор и энергии соударений, при которых наблюдалась максимальная интенсивность сигналов с соотношениями массы к заряду 293, 291, 265, 263, 215 и 213. Оптимальные значениями потенциала на входе в масс-анализатор – 90 В, а энергии соударений – 5 В.

Проводили исследование зависимости выхода реакции от содержания воды в 1 мл ацетонитрильного раствора МФК (Рис. 67)

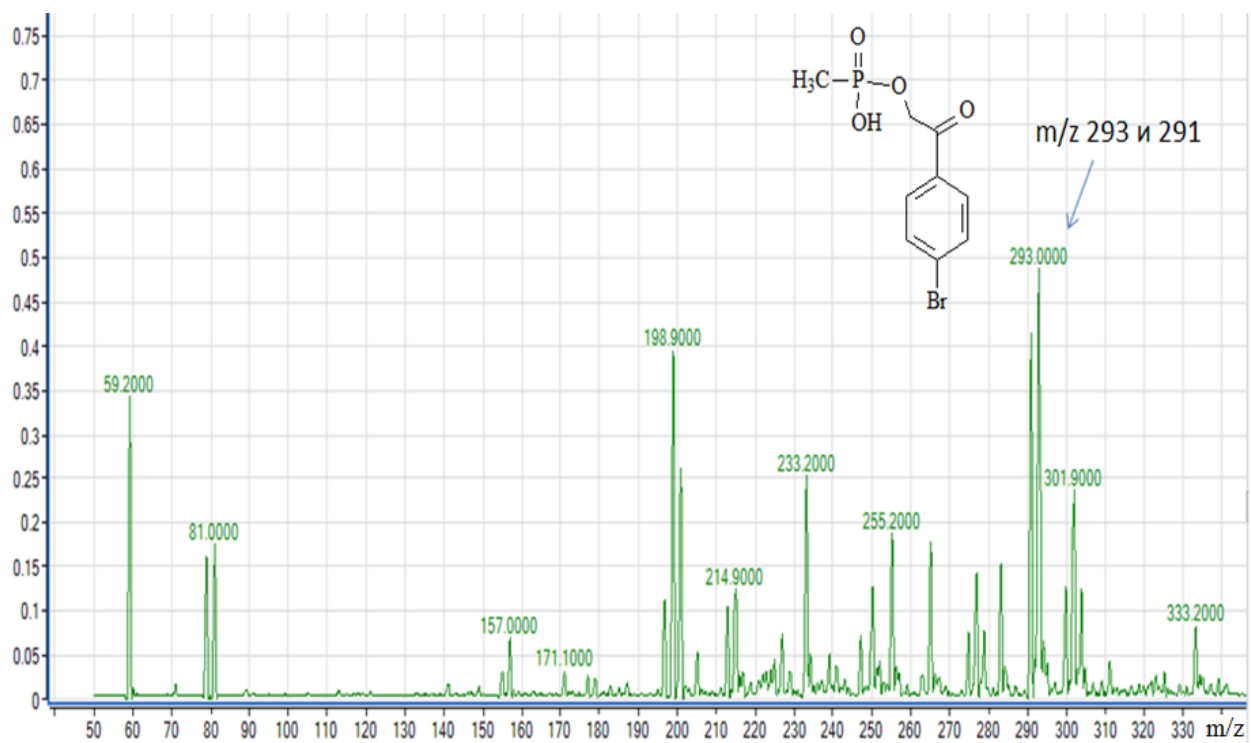


Рис. 64. Масс-спектр смеси продуктов дериватизации МФК с п-бромфенацил бромидом.

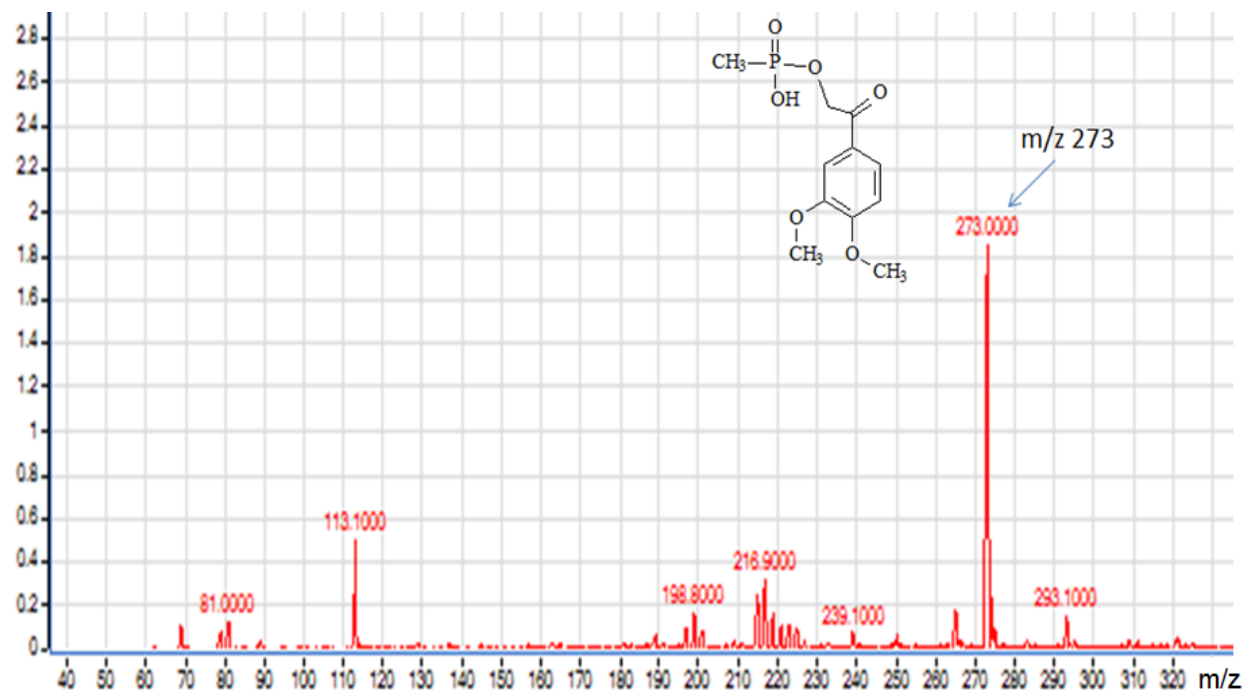


Рис. 65. Масс-спектр смеси продуктов дериватизации МФК с 3,4- диметоксифенацил бромидом.

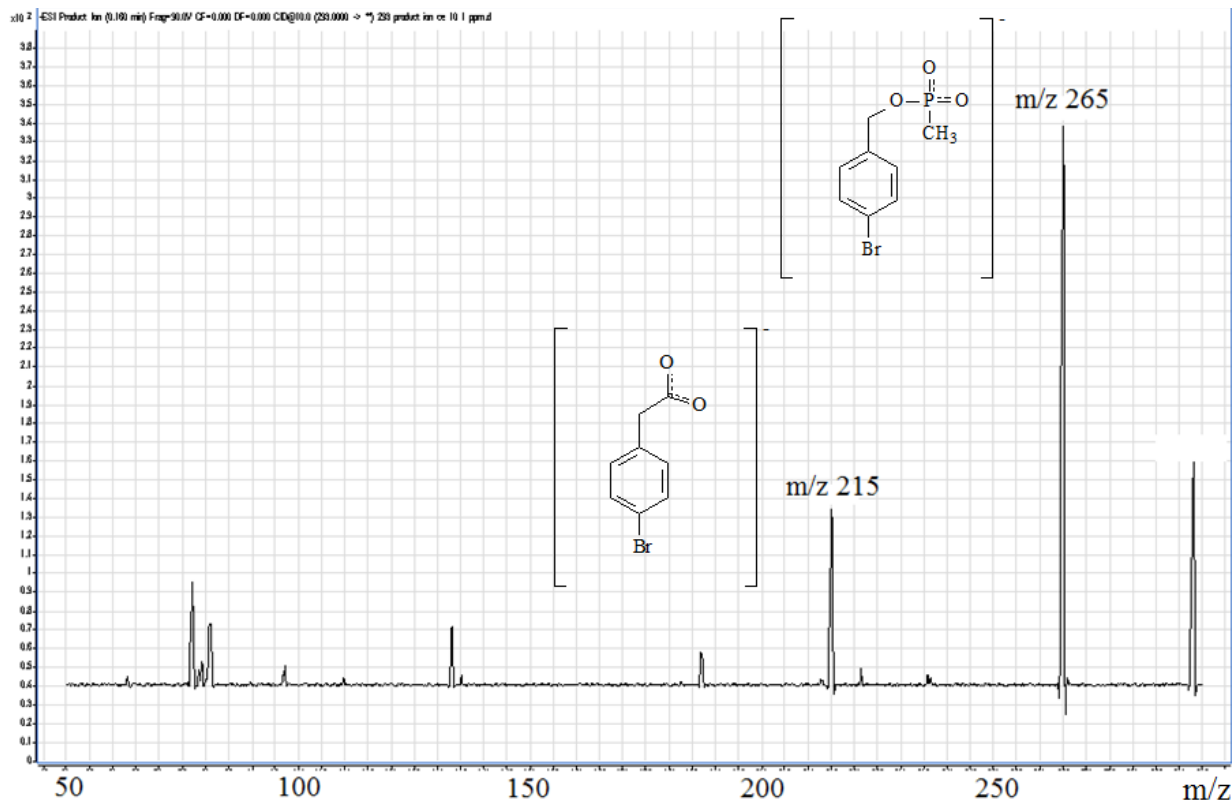


Рис. 66. Спектр фрагментных ионов депротонированной молекулы производного МФК [М-Н]- с m/z 293.

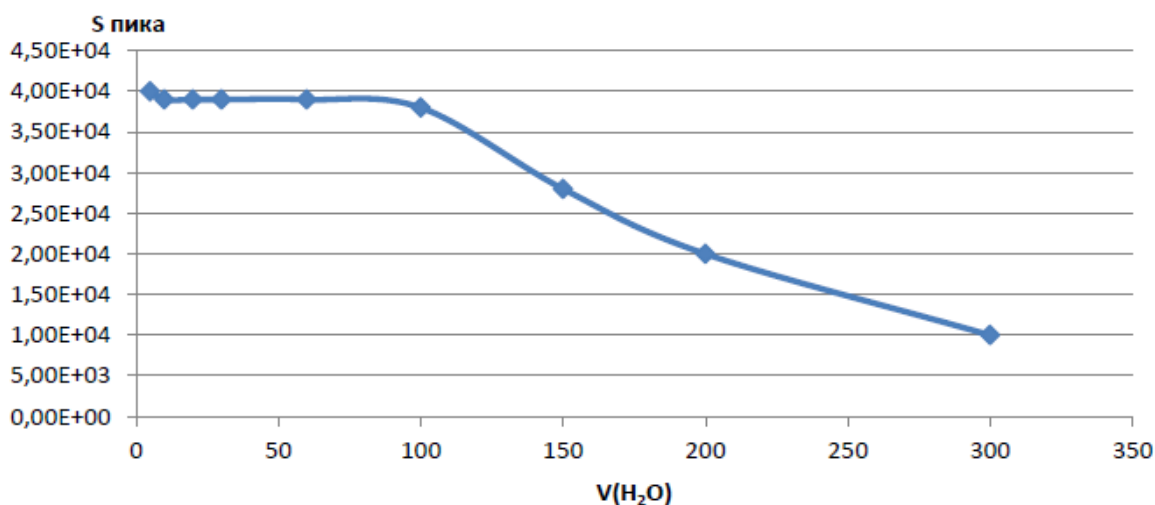


Рис. 67. Зависимость площади пика деривата от содержания воды.

Из рисунка видно, что добавки до 100 мкл воды не влияет на выход реакции, а при добавлении 200 мкл воды выход реакции резко падает и площадь пика уменьшается в 2 раза. Таким образом проводить реакцию дериватизации следует при содержании воды, не превышающем 100 мкл.

Определение МФК методом гидрофильной хроматографии. Для увеличения времени удерживания МФК применяли гидрофильную хроматографию. Хроматографическое разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали растворы 0.5% муравьиной кислоты и ацетонитрила, 5 мМ ацетата аммония и ацетонитрила. Использовали изократический и градиентный режимы элюирования. Рабочие стандартные образцы готовили при помощи разбавления стандартного образца МФК с концентрацией 1 мг/мл ацетонитрилом и водой. Наилучшая форма хроматографического пика и чувствительность определения была достигнута при использовании в качестве подвижной фазы ацетата аммония и ацетонитрила. Выбирали оптимальную концентрацию ацетатно-аммонийного буферного раствора для получения лучшей формы хроматографического пика деривата. Концентрацию ацетата аммония варьировали в диапазоне от 5 до 20 мМ. При увеличении концентрации ацетата аммония менялась ширина и форма хроматографического пика. На Рис. 68 представлена зависимость числа теоретических тарелок (эффективности) от концентрации ацетата аммония.

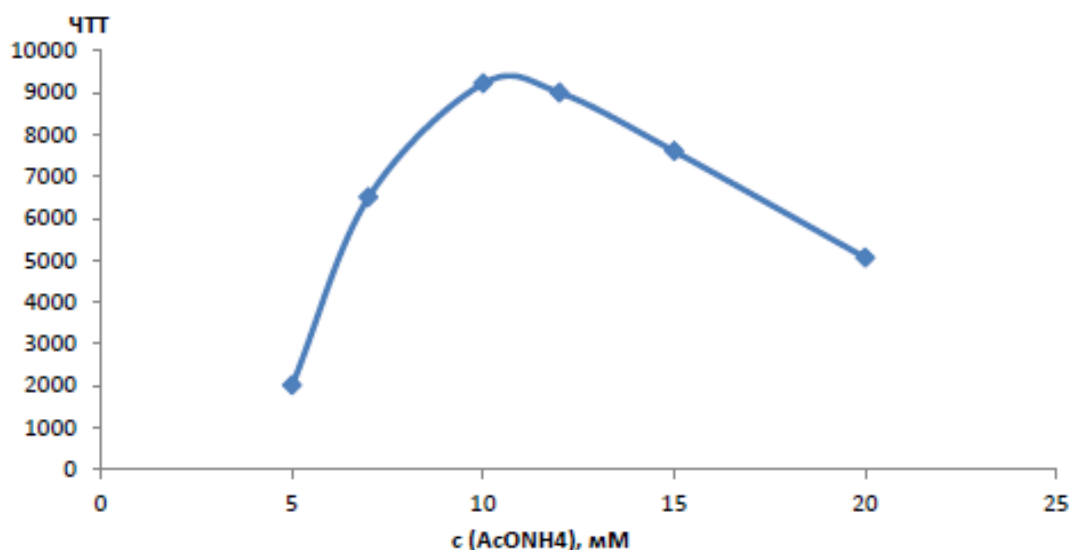


Рис. 68. Зависимость числа теоретических тарелок (эффективности) от концентрации ацетата аммония.

Наилучшую форму и наименьшую ширину хроматографического пика получали при концентрации ацетата аммония равной 10 мМ. Разделение проводили в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин.

Время удерживания производного МФК при данной скорости потока – 6 ± 0.5 мин (Рис. 69). Масс-спектрометрическое детектирование проводили по выбранным ионным переходам.

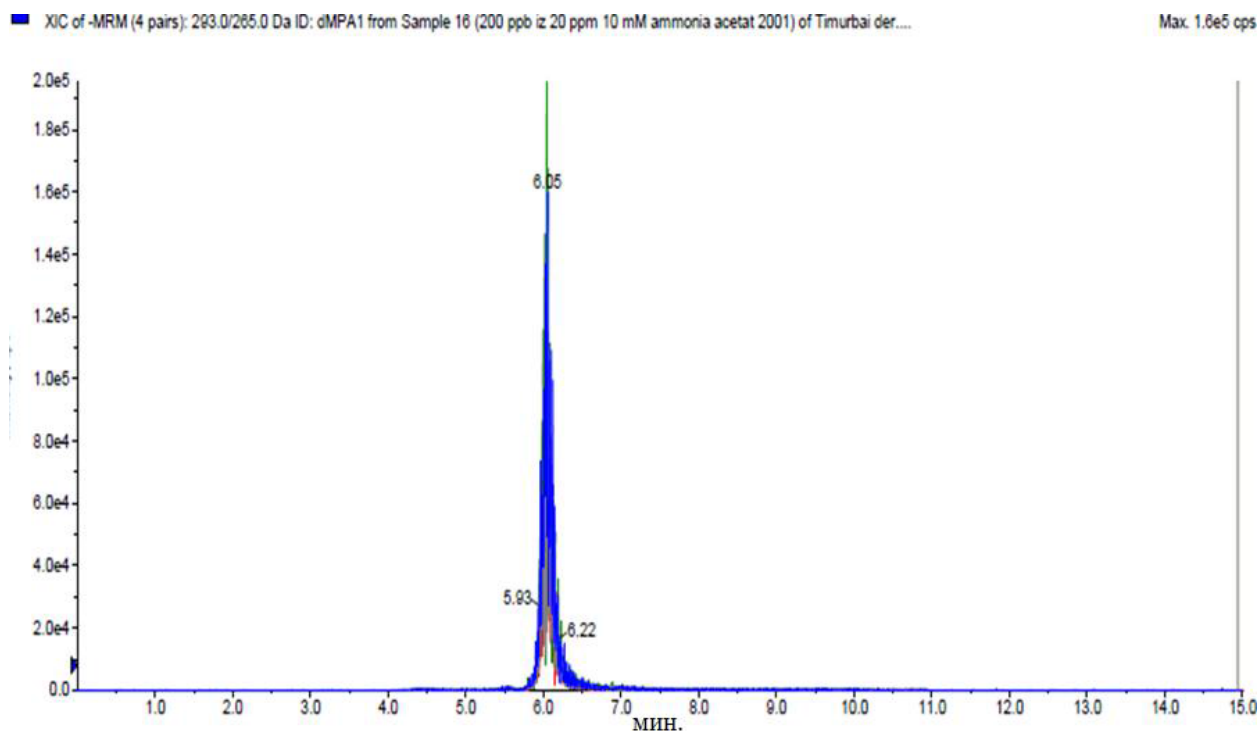


Рис. 69. Хроматограмма 200 нг/мл производного МФК по выбранным ионным переходам. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4.6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза – 10 мМ ацетат аммония – ацетонитрил. Программа градиентного элюирования представлена в таблице 12. Скорость потока – 0.4 мл/мин.

Данный хроматографический пик соответствует деривату, так как в масс-спектре присутствуют наиболее интенсивные сигналы ионов с соотношением m/z 293 и 291, соответствующие депротонированным молекулам производного МФК.

Применение дериватизирующего реагента привело к увеличению более чем на порядок чувствительности определения МФК в виде производного, по сравнению с определением МФК без дериватизации.

Подбор условий и выбор способа пробоподготовки. Затруднением при определении МФК в виде производного является невозможность проведения реакции дериватизации в водной среде. Для анализа образцов природных вод необходимы

упаривание водной матрицы и смена растворителя на ацетонитрил. Упаривание проводили двумя методами: первый – азеотропная отгонка при атмосферном давлении, второй – отгонка при пониженном давлении на ротационном испарителе.

Вода и ацетонитрил образуют азеотропную смесь при 83.7% ацетонитрила и 26.3% воды. Данная азеотропная смесь имеет температуру кипения 76.5 °С. К 1 мл стандартных образцов МФК с концентрацией 200 нг/мл добавляли 5.5 и 6.5 мл ацетонитрила. Полученный раствор переносили в 5 полипропиленовых пробирок на 1.5 мл и упаривали досуха в термостате при температуре 85 °С. Образцы, к которым был добавлен пятикратный избыток ацетонитрила, не упарились досуха по прошествии 1.5 часов. Это связано с испарением ацетонитрила до достижения температуры кипения азеотропной смеси. В результате этого образовывался раствор с соотношением компонентов не азеотропного состава. При добавлении 6.5 мл происходило полное испарение смеси в течение часа. Таким образом, дальнейшие эксперименты проводили с добавлением 6.5 мл ацетонитрила. К пяти пробиркам после упаривания досуха было добавлено по 40 мкл ацетонитрила. Растворы подвергали ультразвуковому экстрагированию в течение 5 минут. Затем 5 растворов объединяли в один. Конечный объем составил 200 мкл (ожидаемый коэффициент концентрирования 5). К 200 мкл ацетонитрильного раствора МФК добавляли 20 мкл раствора п-бромфенацил бромида с концентрацией 10 мкг/мл, 20 мкл 18-краун-6 эфира с концентрацией 4 мкг/мл и 10 мкл раствора K_2CO_3 с концентрацией 4 мкг/мл. Реакцию проводили согласно схеме, представленной на Рис. 6. Далее регистрировали хроматограммы полученного производного. Коэффициент концентрирования оценивали путем сравнения площади пика образца после упаривания и дериватизации с площадью пика деривата, полученного из стандартного образца МФК с концентрацией 1 мкг/мл, растворенного в ацетонитриле. Коэффициент концентрирования оказался ниже 0,5. Таким образом, в процессе упаривания и концентрирования данным методом было потеряно более 90% МФК. Для улучшения коэффициента концентрирования, после упаривания до суха, к пяти пробиркам вместо 40 мкл ацетонитрила добавляли по 5 мкл воды и 35 мкл ацетонитрила. Коэффициент концентрирования оценивали путем сравнения площади пика деривата, полученного

после упаривания с площадью пика деривата, полученного из стандартного образца МФК с концентрацией 1 мкг/мл, растворенного в 25 мкл воды и 175 мкл ацетонитрила. Был получен коэффициент концентрирования равный 2, а потери МФК составили 60%.

Были выбраны условия упаривания на ротационном испарителе. В круглодонную колбу на 10 мл порциями по 2 мл добавляли 10 мл водных стандартных растворов МФК с концентрацией 20 нг/мл. На насосе, создающем пониженное давление, выставляли минимальное значение 15 мбар. На термостате, обогревающем колбу, выставляли 35 °С для минимизации возможных потерь при более высокой температуре. Так как в предыдущих экспериментах было выяснено, что содержание воды не должно превышать 100 мкл, то упаривание проводили до объема, не превышающего 100 мкл. Доводили ацетонитрилом до объема 1 мл (ожидаемый коэффициент концентрирования 10) и колбу помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. Далее проводили реакцию дериватизации согласно схеме, представленной на рисунке 26. В процессе упаривания данным способом в каплеуловителе конденсировались капли жидкости и давление в системе не снижалось до установленного значения 15 мбар, а держалось на уровне 40 мбар. В результате этого происходили большие потери МФК (97%) и был получен коэффициент концентрирования равный 0.3. Коэффициент концентрирования оценивали при помощи сравнения площади пика деривата, полученного после упаривания и площади пика деривата, полученного из стандартного образца МФК с концентрацией 200 нг/мл, добавленного в колбу после упаривания воды без МФК. Во избежание накопления капель жидкости в каплеуловителе был применен подход, включающий в себя обогрев каплеуловителя до и во время упаривания. Применение данного подхода привело к снижению давления в системе до установленного значения 15 мбар и в каплеуловителе не наблюдалось накопление капель жидкости. В результате это привело к существенному увеличению коэффициента концентрирования, который составил 9 (коэффициент концентрирования рассчитывали аналогично). Потери МФК данным методом упаривания и концентрирования всего 10%. Наиболее оптимальным для упаривания был выбран объем равный 10 мл. При выборе данного значения рассматривали две противоположно действующие тенденции. При увеличении объема

образца увеличивается время, требуемое для упаривания. При уменьшении объема образца, с учетом коэффициента концентрирования, снижается предел обнаружения. При объеме образца равному 10 мл удается достичь снижения пределов обнаружения при приемлемом времени упаривания.

Таким образом, исходя из значения коэффициента концентрирования и количества потерь МФК, наилучшим был выбран способ упаривания при пониженном давлении на ротационном испарителе с обогреванием каплеуловителя.

Валидация методики. Готовили растворы МФК различной концентрации в 70 мкл воды и 930 мкл ацетонитрила. Растворы МФК подвергали реакции дериватизации с п-бромфенацил бромидом и получали линейную область градуировочного графика. В качестве предела количественного определения выбирали концентрацию раствора кислоты, для которой соотношение сигнал/шум (или сигнал холостой пробы) составляло не менее 10:1. В качестве предела обнаружения выбирали концентрацию раствора кислот, для которой соотношение сигнал/шум (или сигнал холостой пробы) составляло не менее 3:1. Хроматограмма с концентрацией МФК на уровне предела обнаружения представлена на Рис. 70.

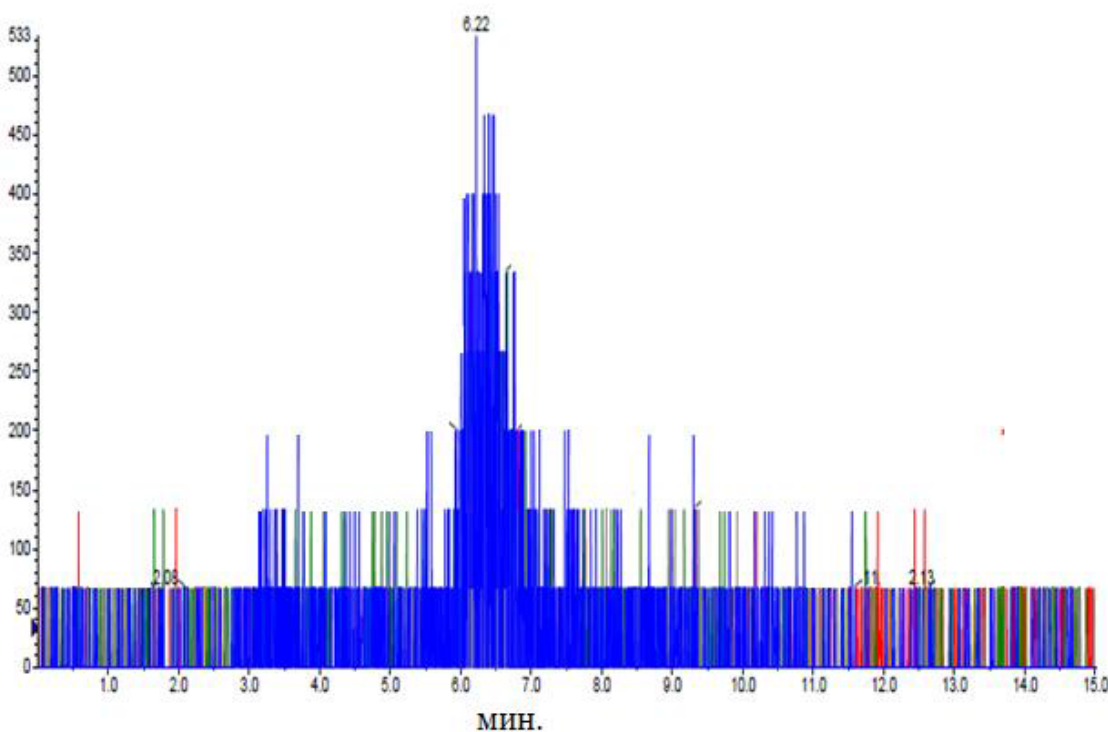


Рис. 70. Хроматограмма 0.9 нг/мл деривата МФК.

Характеристики ВЭЖХ-МС/МС определения МФК в виде производного, представлены в Табл. 42.

Таблица 42. Характеристики определения МФК в виде производного (n=3, p=0.95)

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

Получали данные по воспроизводимости реакции дериватизации на двух уровнях концентраций МФК - 3 нг/мл и 60 нг/мл. Данные концентрации получали при помощи разбавления более концентрированных водных растворов МФК раствором, состоящим из 70 мкл воды и 930 мкл ацетонитрила. На каждом уровне концентрации получали 5 значений площади деривата в течение дня. Результаты представлены в Табл. 43.

Таблица 43. Относительное стандартное отклонение для полноты протекания реакции дериватизации для двух уровней концентрации (n=5, p=0.95)

Уровни концентрации, нг/мл	sr, %
3	5.8
60	5.69

Из Табл. 43 видно, что реакция характеризуется хорошей воспроизводимостью (относительное стандартное отклонение не превышает 6%). Также было выяснено, что продукт дериватизации остается стабильным в течение 2 дней. На Рис. 71 представлена зависимость площади пика деривата от времени.

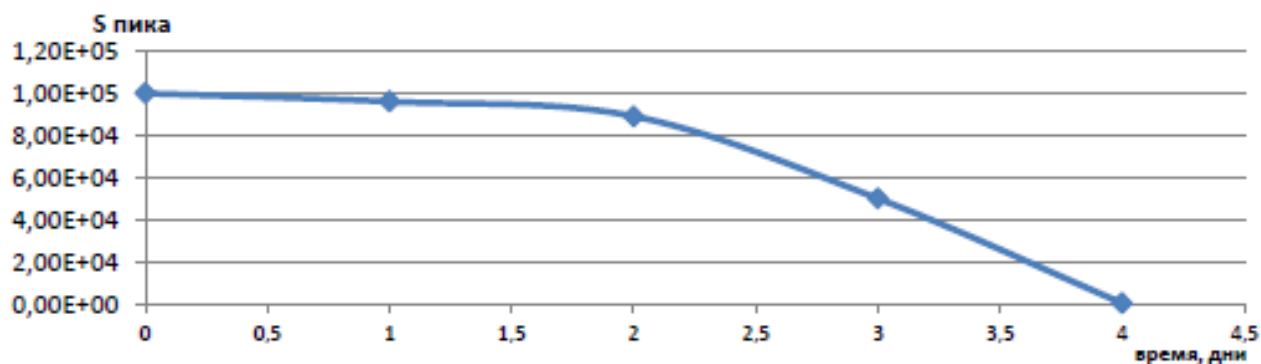


Рис. 71. Зависимость площади пика деривата МФК с концентрацией 20 нг/мл от времени.

Получали точное значение коэффициента концентрирования (процент потерь МФК) на двух уровнях концентраций – 0.4 нг/мл и 6 нг/мл. Процент потерь МФК определяется как отношение практического коэффициента концентрирования к ожидаемому, умноженное на 100%. Проводили две серии опытов. В первой серии опытов упаривали 10 мл водных растворов МФК с соответствующими концентрациями до объема менее 100 мкл. Доводили до объема 1 мл ацетонитрилом, подвергали воздействию ультразвукового поля и проводили реакцию дериватизации с п-бромфенацил бромидом. Во второй серии опытов упаривали 10 мл воды, не содержащей МФК до объема менее 100 мкл. Доводили до 1 мл ацетонитрильными раствором МФК так, чтобы в 1 мл концентрация МФК равнялась 4 нг/мл и 60 нг/мл. Подвергали воздействию ультразвукового поля и проводили реакцию дериватизации с п-бромфенацил бромидом. Коэффициент концентрирования получали при помощи сравнения площади пика деривата, полученного после первой серии опытов, с площадью пика деривата, полученного после второй серии опытов. Количественные характеристики определения коэффициента концентрирования (процент потерь МФК) представлены в Табл. 44.

Таблица 44. Значения коэффициента концентрирования и процента потерь МФК на двух уровнях концентрации МФК в воде (n=3, p=0.95)

Концентрация МФК в воде, нг/мл	Коэффициент концентрирования	Доля потерь МФК, %
0,4	9±0.5	10±5
6	9±0.5	10±5

Матричный эффект исследовали при помощи метода «введено-найденно». Для этого через все стадии пробоподготовки пропускали три образца различных природных вод с добавками МФК на двух уровнях концентраций – 0.4 нг/мл и 6 нг/мл, а также стандартные водные образцы МФК с концентрациями 0.4 нг/мл и 6 нг/мл. Далее сконцентрированные растворы природных вод с добавками МФК и стандартные водные образцы МФК подвергали реакции дериватизации с п-бромфенацил бромидом. Концентрацию МФК в природных водах определяли при помощи метода внешнего стандарта. Результаты определения матричного эффекта представлены в Табл. 45.

Таблица 45. Определение матричного эффекта (n=3, p=0.95)

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

Как видно из Табл. 45 введенные и найденные концентрации совпадают, что свидетельствует о том, что матрица не оказывает мешающего влияния на ионизацию, выход реакции дериватизации и коэффициент концентрирования.

С учетом коэффициента концентрирования предел обнаружения данной методики определения МФК в природных водах в виде производного с применением гидрофильной хроматографии равен 100 пг/мл. Предел обнаружения разработанного способа находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика 3:1).

Разработанная методика характеризуется хорошей воспроизводимостью реакции дериватизации, высоким коэффициентом концентрирования или низким процентом потерь МФК, высокой чувствительностью и приемлемым временем удерживания деривата.

3.7. Совместное определение МФК и АМФК в грунто-пылевой смеси методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

Целью работы было определение МФК и АМФК в грунтово-пылевой смеси - более сложной по составу матрице, чем природная вода, поэтому важными задачами являлись подбор:

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

При попытках проведения дериватизации АМФК было обнаружено, что при данных условиях (Экспериментальная часть) АМФК в отличие от МФК не подвергаются дериватизации. Это объясняется их более высокими значениями константы кислотности (рКа 3.3 против 2.12) и недостаточным высоким рН среды. Отсутствие реакции дериватизации АМФК в отличии от МФК позволило разработать высокочувствительную методику совместного определения МФК и АМФК в условиях гидрофильной хроматографии.

Для выполнения поставленных задач, первым делом, выбирали наиболее подходящие условия масс-спектрометрического детектирования.

Подбор масс-спектрометрических параметров детектирования алкил метилфосфоновых кислот. Для АМФК через шприцевой насос получали масс-спектры электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов. На Рис. 72 представлен масс-спектр иБуМФК.

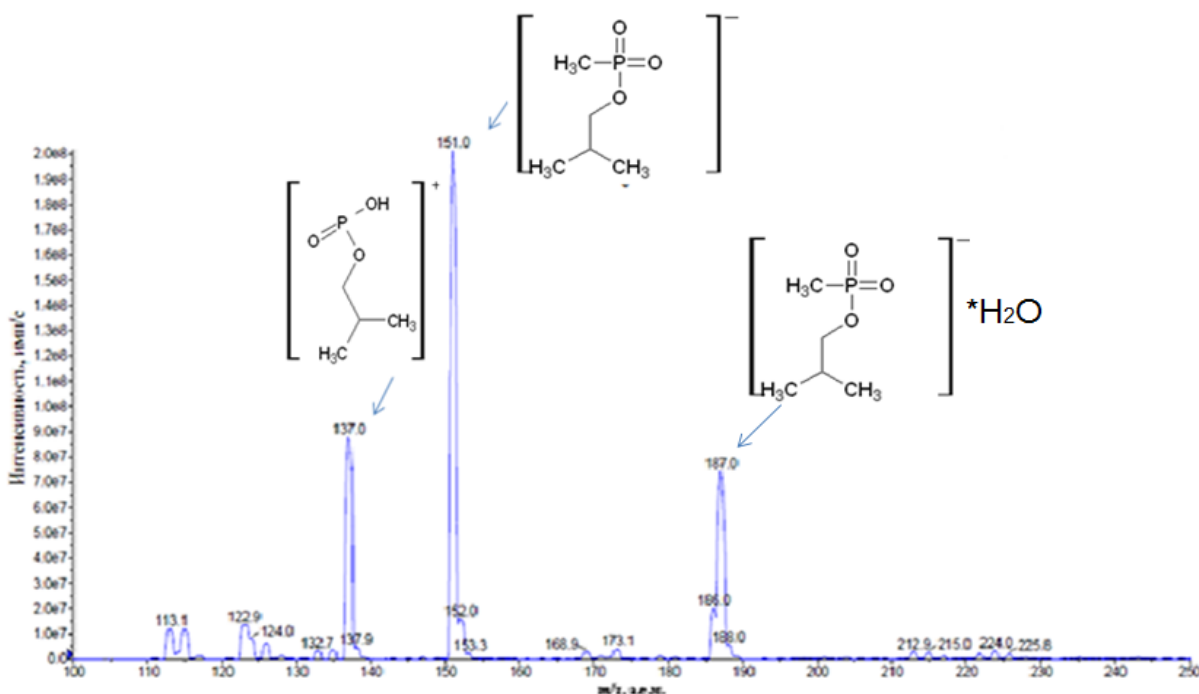


Рис. 72 . Масс-спектр иБуМФК.

Получали фрагментные ионы, образующиеся в ячейке соударений. На Рис. 73 представлен масс-спектр ионов-продуктов, полученных из иона-предшественника с m/z 151 для иБуМФК.

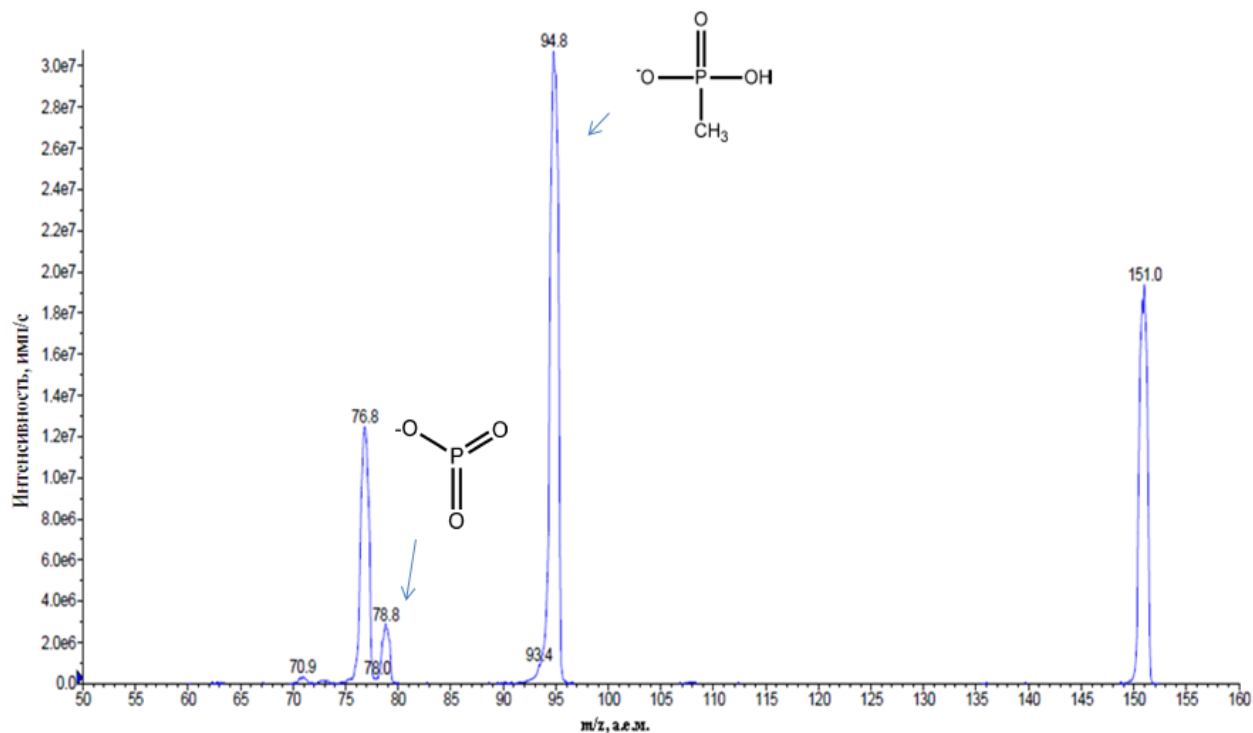


Рис. 73. Спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы $[M-H]^-$ с m/z 151.

Для определения нами выбраны следующие ионные переходы для каждой из алкилметилфосоновых кислот, представленные в Табл. 46.

При помощи варьирования значений потенциала декластеризации и энергии соударений были подобраны наиболее подходящие значения интенсивность сигнала ионов-предшественников и ионов-продуктов. На Рис. 74 представлена зависимость интенсивности дочерних ионов от энергии соударений для иБуМФК.

Таблица 46. Значения потенциалов декластеризации и энергии соударений для алкилметилфосоновых кислот

Параметр	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Потенциал декластеризации (DP), В	-20	-26	-29	-33
Энергия соударений (Collision energy), В	-32	-18	-37	-26
	-15	-37	-21	-45

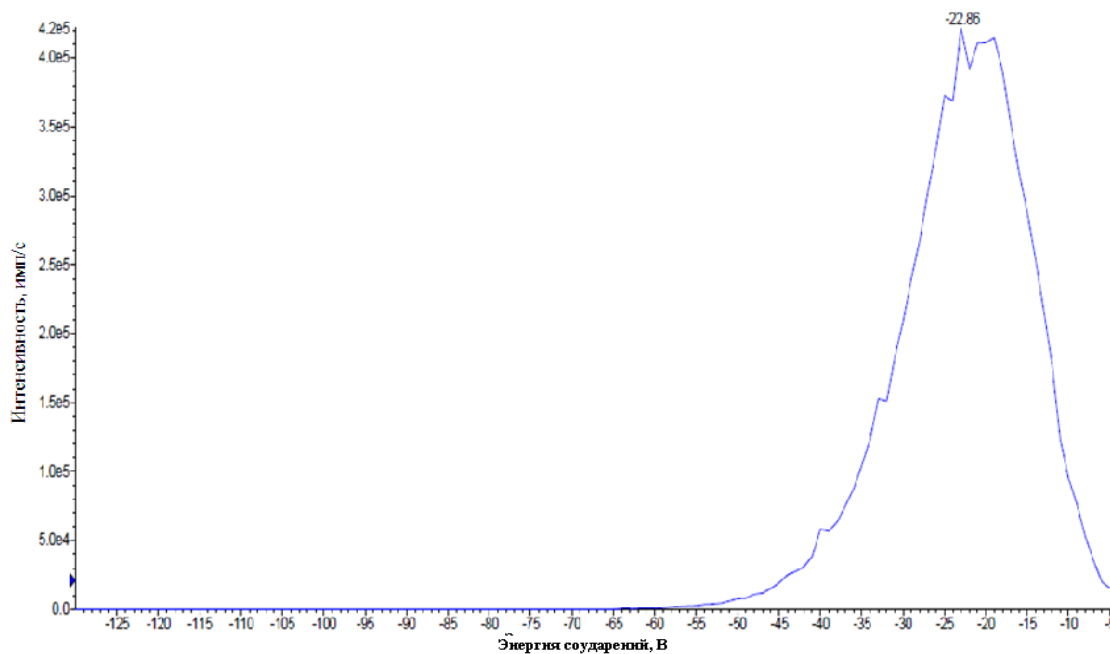


Рис. 74. Зависимость интенсивности сигнала фрагментных ионов от энергии соударений для иБуМФК.

Подбор хроматографических условий. Разделение МФК и АМФК проводили на колонке Luna HILIC при скорости потока 1.5 мл/мин. В качестве подвижной фазы выступала смесь растворителей, состоящая из А – 10 мМ ацетата аммония в воде и Б – ацетонитрила.

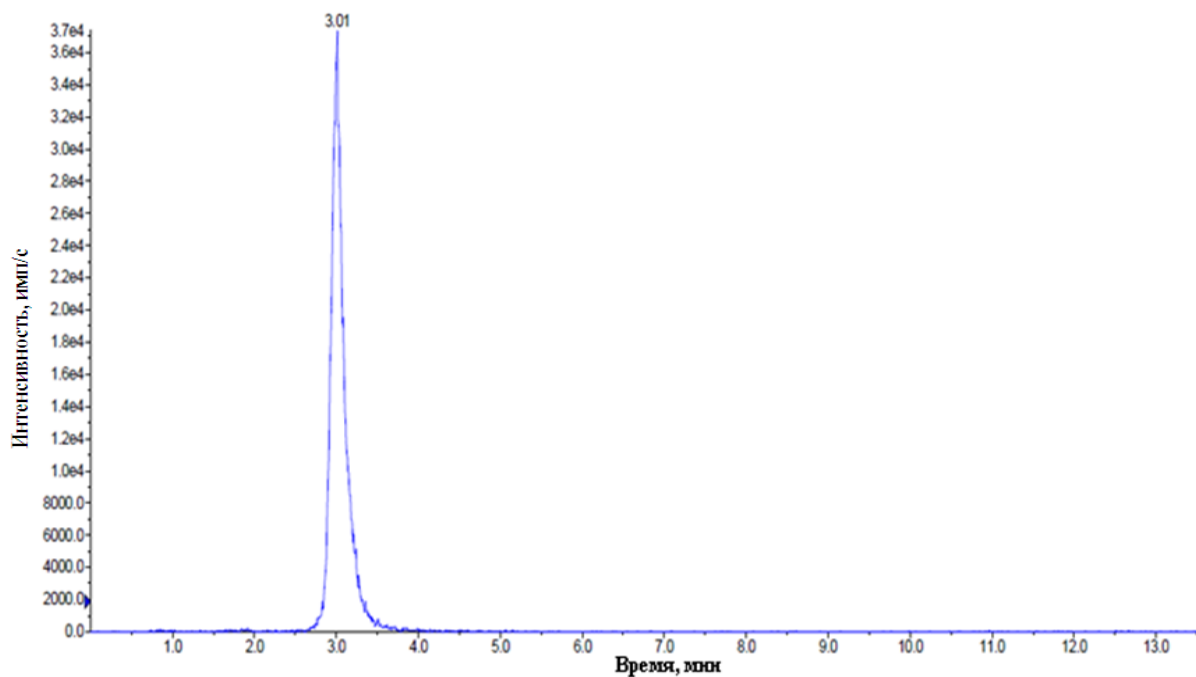


Рис. 75. Хроматограмма 50 нг/мл производного МФК по выбранному ионному переходу.

Применяя данную программу, получали значения хроматографических параметров удерживания, представленных в Табл. 47. На Рис. 75 показана хроматограмма по выбранным ионным переходам раствора МФК в выбранных хроматографических условиях.

Таблица 47. Значения времени удерживания и коэффициента емкости для алкилметилфосфоновых кислот

Параметр	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Время удерживания t_R , мин	3,01±0,2	5,10 ± 0,01	4,74 ± 0,01	4,02 ± 0,12	3,78 ± 0,05
Коэффициент емкости, k'	2.5	5	4.5	3.7	3.4

Выбор способа пробоподготовки пробоподготовки. Трудностью определения МФК в виде производного является невозможность проведения реакции дериватизации в водной среде. Для анализа образцов грунто-пылевой смеси необходимы ее диспергирование, экстрагирование водой в УЗ-ванне в течение 20 минут, центрифугирование надосадочного слоя в течение 2 минут, фильтрование, упаривание водной матрицы до 50 мкл и растворение в ацетонитриле. Упаривание проводили методом отгонки при пониженном давлении на ротационном испарителе.

В круглодонную колбу на 10 мл порциями по 2 мл добавляли 10 мл водных стандартных растворов МФК и АМФК с концентрациями 20 нг/мл. На насосе, создающем пониженное давление, выставляли минимальное значение 15 мбар. На термостате, обогревающем колбу, выставляли 35 °С для минимизации возможных потерь при более высокой температуре. Так как в предыдущих экспериментах было выяснено, что содержание воды должно составлять 50 мкл, то упаривание проводили до объема 50 мкл. Доводили ацетонитрилом до объема 1 мл (ожидаемый коэффициент концентрирования 10) и колбу помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. Далее проводили реакцию дериватизации с *para*-бромфенацил бромидом. Во избежание образования капель жидкости в каплеуловителе применен подход, включающий в себя обогрев каплеуловителя до и во время упаривания. Используя данный подход удалось

добиться высоких значений коэффициента концентрирования (больше 9) для МФК и АМФК.

Наилучшим для упаривания выбран объем равный 10 мл. При выборе данного значения рассматривали две противоположно действующие тенденции. При увеличении объема образца увеличивается время, требуемое для упаривания. При уменьшении объема образца, с учетом коэффициента концентрирования, снижается предел обнаружения. При объеме образца равному 10 мл удается достичь снижения пределов обнаружения при приемлемом времени упаривания.

Таким образом, исходя из значения коэффициента концентрирования и количества потерь МФК, наиболее подходящим выбран способ упаривания при пониженном давлении на ротационном испарителе с обогреванием каплеуловителя.

Валидация методики. В рамках валидации методики оценивали степень извлечения МФК и АМФК при экстракции водой, коэффициент концентрирования, матричный эффект, строили градуировочную зависимость в диапазоне концентраций для водных стандартных растворов МФК и АМФК 0,005-100 нг/мл, оценивали такие метрологические характеристики как предел количественного определения (ПКО) и предел обнаружения (ПО), прецизионность в условиях одного дня и между днями.

Коэффициент концентрирования. Получали точное значение коэффициента концентрирования на двух уровнях концентраций – 3 и 50 нг/мл. Проводили две серии опытов. В первой серии опытов упаривали 10 мл водных растворов смеси МФК и АМФК с концентрациями 0,3 и 5 нг/мл до объема менее 100 мкл. Доводили до объема 1 мл ацетонитрилом, помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут, переносили в полипропиленовую пробирку и проводили реакцию дериватизации с *n*-бромфенацил бромидом. Во второй серии опытов готовили смеси МФК и АМФК с концентрациями 3 и 50 нг/мл в 1 мл ацетонитрила, содержащем 50 мкл воды и проводили реакцию дериватизации с *n*-бромфенацил бромидом. Коэффициент концентрирования получали при помощи сравнения площади пика деривата, полученного после первой серии опытов, с площадью пика деривата, полученного после второй серии опытов.

Количественные характеристики определения коэффициента концентрирования представлены в Табл. 48.

Табл. 48. Значения коэффициента концентрирования МФК и АМФК на двух уровнях концентрации МФК и АМФК (n=3, P =0,95)

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

Степень извлечения при экстракции водой. Степень извлечения при экстракции водой оценивали, проводя эксперименты на уровне концентрации – 50 нг/мл в трех повторениях. Проводили две серии опытов. В первой серии навеску 1 г грунто-пылевой смеси, не содержащую МФК и АМФК, экстрагировали 5 мл деионизованной воды, используя УЗ ванну в течение 10 минут. Затем раствор пропускали через пористый фильтр, добавляли стандартные растворы МФК и АМФК до концентрации 50 нг/мл, отбирали 1 мл и проводили упаривание до объема менее 100 мкл. Полученный раствор доводили до объема 1 мл ацетонитрилом, помещали в УЗ ванну на 10 минут. Полученный раствор переносили в полипропиленовую пробирку и проводили реакцию дериватизации с *n*-бромфенацил бромидом. Во второй серии опытов к навеске 1г грунто-пылевой смеси добавляли 20 мкл стандартных растворов МФК и АМФК с концентрацией 50 мкг/мл. Далее навеску оставляли на шейкере в течение 24 часов. Затем МФК и АМФК экстрагировали 5 мл деионизованной воды, используя УЗ баню в течение 10 минут. Раствор пропускали через пористый фильтр и упаривали 1 мл до объема менее 100 мкл. Полученный раствор доводили до объема 1 мл ацетонитрилом, помещали в УЗ ванну и проводили реакцию дериватизации с *n*-бромфенацил бромидом.

Степень извлечения рассчитывали при помощи сравнения площади пика деривата, полученного после первой серии опытов, с площадью пика деривата, полученного после второй серии опытов. Количественные характеристики определения представлены в Табл. 49.

Табл. 49. Значения степени извлечения при экстракции водой МФК и АМФК из грунто-пылевой смеси на уровне концентрации 50 нг/мл (n=3, P=0,95)

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

Матричный эффект. Исследовали влияние матричного эффекта. Для этого в первой серии экспериментов через все стадии пробоподготовки пропускали образцы грунто-пылевой смеси с добавками смеси МФК и АМФК на двух уровнях концентрации 0.3 и 5 нг/мл и проводили реакцию дериватизации. Во второй серии экспериментов готовили 10 мл смеси МФК и АМФК с концентрациями 0.3 и 5 нг/мл в воде из исходных концентрированных стандартных растворов. Проводили упаривание до объема менее 100 мкл, доводили до объема 1 мл ацетонитрилом и проводили реакцию дериватизации.

Влияние матричного эффекта находили по отношению площади пика деривата, полученного в образцах грунто-пылевой смеси с добавками МФК и АМФК к площади пика, полученного в стандартных водных образцах смеси исследуемых кислот. Чем ближе полученное значение к 100%, тем меньше влияние матрицы. Результаты определения матричного эффекта представлены в Табл. 50.

Табл. 50. Значения матричного эффекта для АМФК в грунте (n=3, P=0,95)

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

Градуировочная зависимость. Для построения градуировочной зависимости готовили растворы МФК и АМФК в ацетонитриле с концентрацией 1 мкг/мл. Из него методом последовательных разбавлений смесью ацетонитрил-вода (95:5) готовили растворы МФК и АМФК с концентрациями в диапазоне от 0.005-100 нг/мл.

Предел количественного определения и предел обнаружения. В качестве предела количественного определения выбирали концентрацию раствора кислот, для которой

соотношение сигнал/шум (или сигнал холостой пробы) составляло не менее 10:1. На Рис. 76 представлена хроматограмма иБуМФК на уровне ПКО.

Предел обнаружения разработанного способа находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика 3:1). На Рис. 77 представлена хроматограмма для иБуМФК на уровне ПО.

Количественные характеристики ВЭЖХ-МС/МС определения МФК и АМФК представлены в Табл. 51.

Таблица 49. Характеристики способа определения МФК и АМФК

Вещество	Линейная область градуировочного графика, нг/мл	Уравнение градуировочной зависимости $S_i = \alpha \cdot c_i^*$	R^2	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	S_r^{**}
МФК	0,6—100	$S_i = (2,1 \pm 0,2) \times 10^3 c_i$	0,998	0,6	0,08
ЭМФК	0,2—100	$S_i = (9,7 \pm 0,2) \times 10^3 c_i$	0,999	0,2	0,06
иПрМФК	0,025—100	$S_i = (71,8 \pm 5,2) \times 10^3 c_i$	0,992	0,025	0,06
иБуМФК	0,025—100	$S_i = (64,4 \pm 3,8) \times 10^3 c_i$	0,995	0,025	0,08
ПинМФК	0,015—100	$S_i = (99,4 \pm 4,2) \times 10^3 c_i$	0,997	0,015	0,09

* $P=0,95$; $n=3$.

**Рассчитано для концентраций: МФК – 0,6 нг/мл, ЭМФК – 0,2, иПрМФК, иБуМФК – 0,025, ПинМФК – 0,015 нг/мл ($P=0,95$; $n=3$).

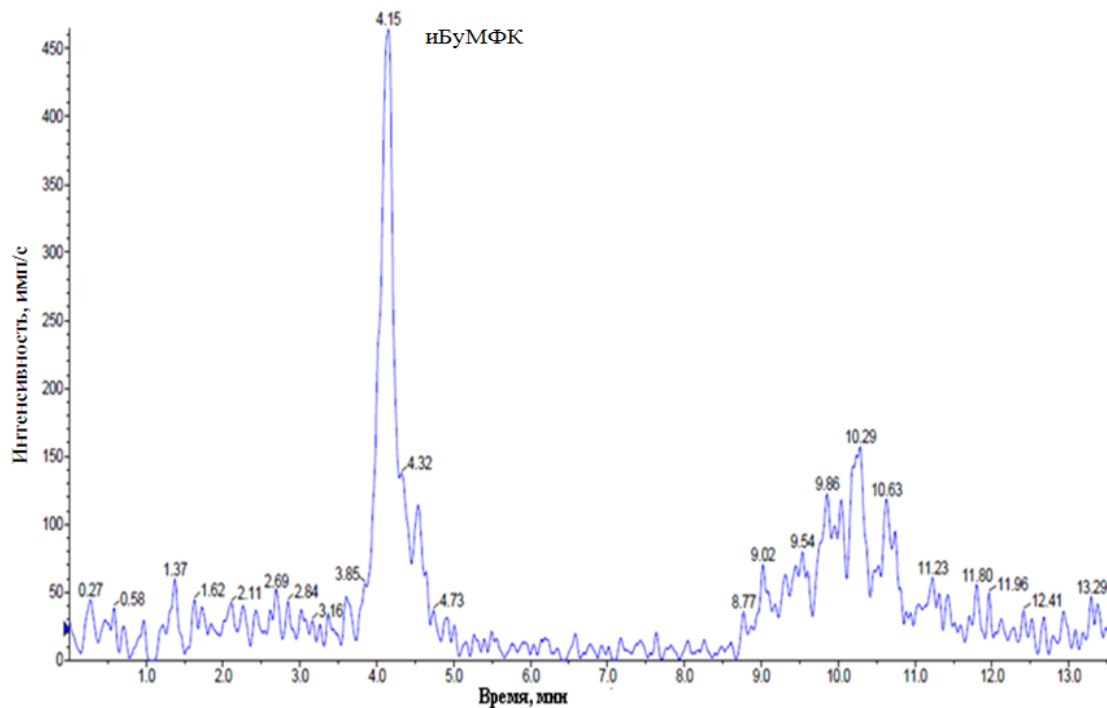


Рис. 76. Хроматограмма 0,025 нг/мл иБуМФК. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза – 10 мМ ацетат аммония – ацетонитрил.

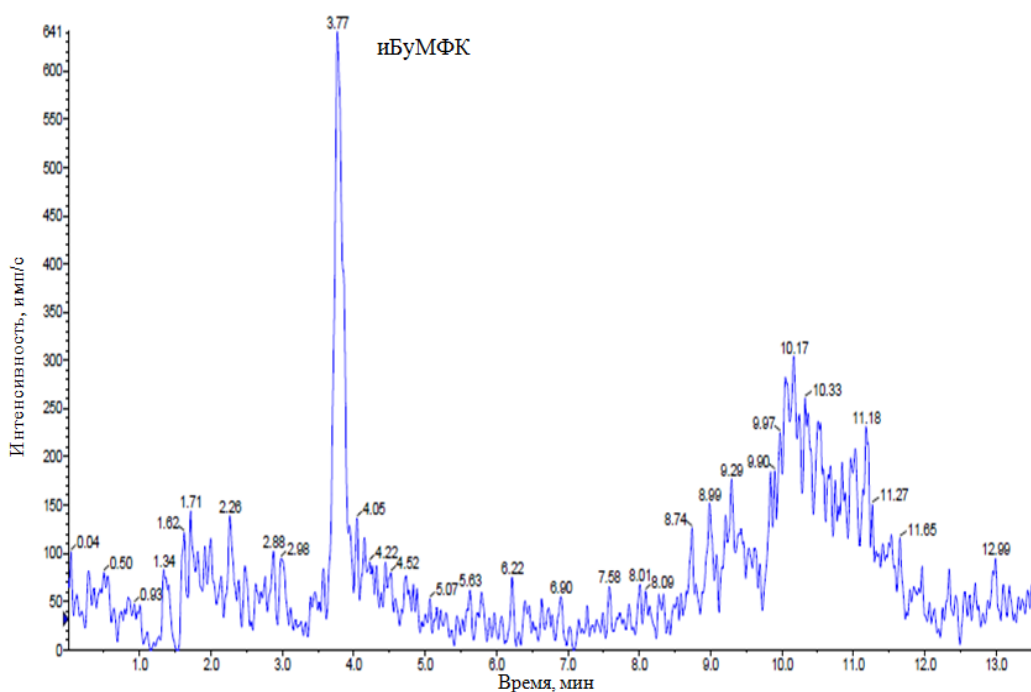


Рис. 77. Хроматограмма 0,008 нг/мл для иБуМФК. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза – 10 мМ ацетат аммония – ацетонитрил.

Прецизионность методики в условиях одного дня. Для оценки прецизионности методики в условиях одного дня проводили пять параллельных анализов грунто-

пылевой смеси с добавкой МФК и АМФК до концентрации 50 нг/мл ниже максимальной концентрации в области линейности по градуировочному графику в максимально близких условиях (в один день). В качестве количественной характеристики прецизионности оценивали величину относительного стандартного отклонения (s_r). Полученные данные представлены в Табл. 50.

Таблица 50. Прецизионность в условиях одного дня

Вещество	s_r
МФК	0,06
ЭМФК	0,02
иПрМФК	0,02
иБуМФК	0,03
ПинМФК	0,02

В рамках валидации также рассчитывали метрологические характеристики определения МФК для концентрации 1 нг/мл и ЭМФК до концентрации 0.5 нг/мл, иПрМФК, иБуМФК, ПинМФК до концентрации 0.03 нг/мл (близкой к пределу количественного определения). Полученные данные представлены в Табл. 51.

Таблица 51. Прецизионность в условиях одного дня для концентраций, близких к ПКО

Вещество	Концентрация, нг/мл	s_r
МФК	1	0,03
ЭМФК	0.5	0,08
иПрМФК	0.03	0,02
иБуМФК	0.03	0,05
ПинМФК	0.03	0,1

Прецизионность методики между днями. Для оценки прецизионности между днями проводили три последовательных анализа стандартных раствора МФК и АФМК

до концентрации 50 мкг/мл в разные дни. В качестве количественной характеристики прецизионности оценивали величину относительного стандартного отклонения (s_r) найденной концентрации образцов. Полученные данные представлены в Табл. 52.

Табл. 52. Прецизионность между днями

Вещество	s_r
МФК	0,2
ЭМФК	0,3
иПрМФк	0,3
иБуМФК	0,1
ПинМФК	0,2

Также оценивали прецизионность методики для МФК и АМФК на уровнях концентраций, близких к ПКО. Полученные данные в Табл. 53.

Табл. 53. Прецизионность между днями для концентраций, близких к ПКО

Вещество	Концентрация, нг/мл	s_r
МФК	1	0,3
ЭМФК	0.5	0,3
иПрМФк	0,03	0,3
иБуМФК	0,03	0,4
ПинМФК	0,03	0,3

Апробация методики. Разработанный подход использовался для анализа реальных объектов, содержащих продукты деструкции химического оружия. Реальные образцы представляют собой пробы грунто-пылевой смеси с места бывшего завода по производству химического оружия в Волгоградской области. Результаты представлены в Табл. 54.

Табл. 54. Содержание МФК и АМФК в реальных образцах грунто-пылевой смеси (P=0,95, n=3)

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

На рисунках 78 – 80 представлены хроматограммы найденных кислот в реальном объекте.

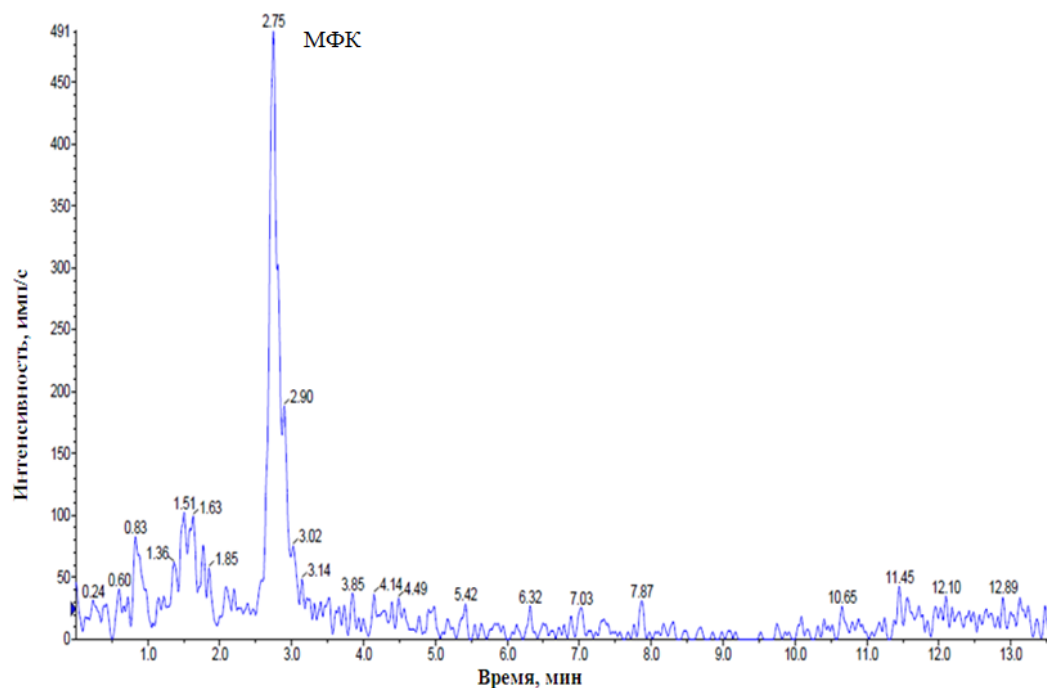


Рис. 78. Хроматограмма деривата МФК в реальном объекте 2 по ионному переходу 293→265. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм).

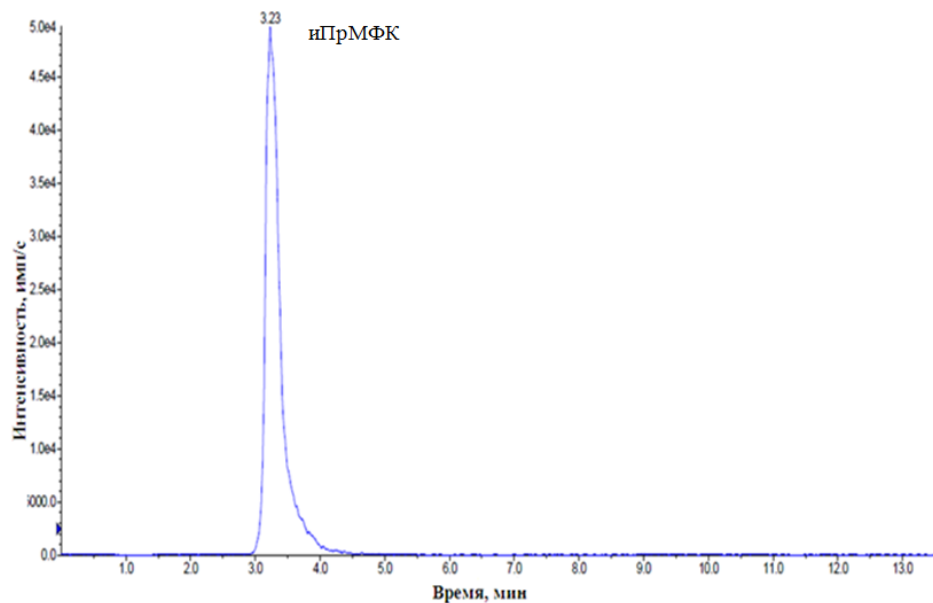


Рис. 79. Хроматограмма nPrMFC в реальном объекте 2 по ионному переходу 137→95. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм).

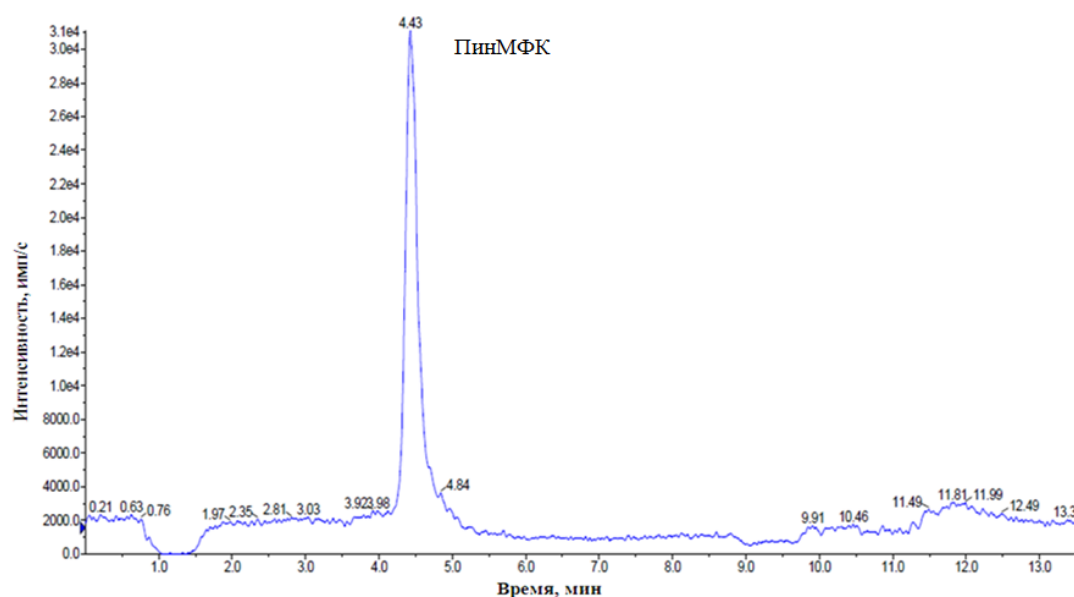


Рис. 80. Хроматограмма PinMFC в реальном объекте 2 по ионному переходу 179→95. Колонка – Luna HILIC (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм).

В результате работы предложен способ пробоподготовки для реальных образцов почв, характеризующийся высокой степенью извлечения. Было показано, что использование *para*-бромфенацил бромида в качестве дериватирующего агента приводит к высокой чувствительности масс-спектрометрического определения МФК в виде производного. Данный метод определения характеризуется высоким коэффициентом концентрирования, превосходной чувствительностью. Предложенная

методика апробирована на грунто-пылевой смеси и применена к анализу реальных объектов.

3.8 Определение продуктов гидролитической трансформации VX и VR в водных экстрактах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии

Присутствие S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфотиоата (ДЭМФ, продукт деструкции VR-газа), S-(2-диизопропиламиноэтил) метилфосфотиоата (ДПМФ, продукт деструкции VX-газа), бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида (ДЭАС, продукт деструкции VR-газа) и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)дисульфида (ДПАС, продукт деструкции VX-газа) в водной среде может являться доказательством применения отравляющих веществ. Данные соединения также могут образовываться в случае аварийного поступления в окружающую среду при хранении, производстве и переработке высокотоксичных фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) нервно-паралитического действия, которые подлежат полному запрещению и уничтожению согласно конвенции «О запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении» [1]. На Рис. 81 представлена схема процесса разложения ФОВ V-газов в окружающей среде [148]:

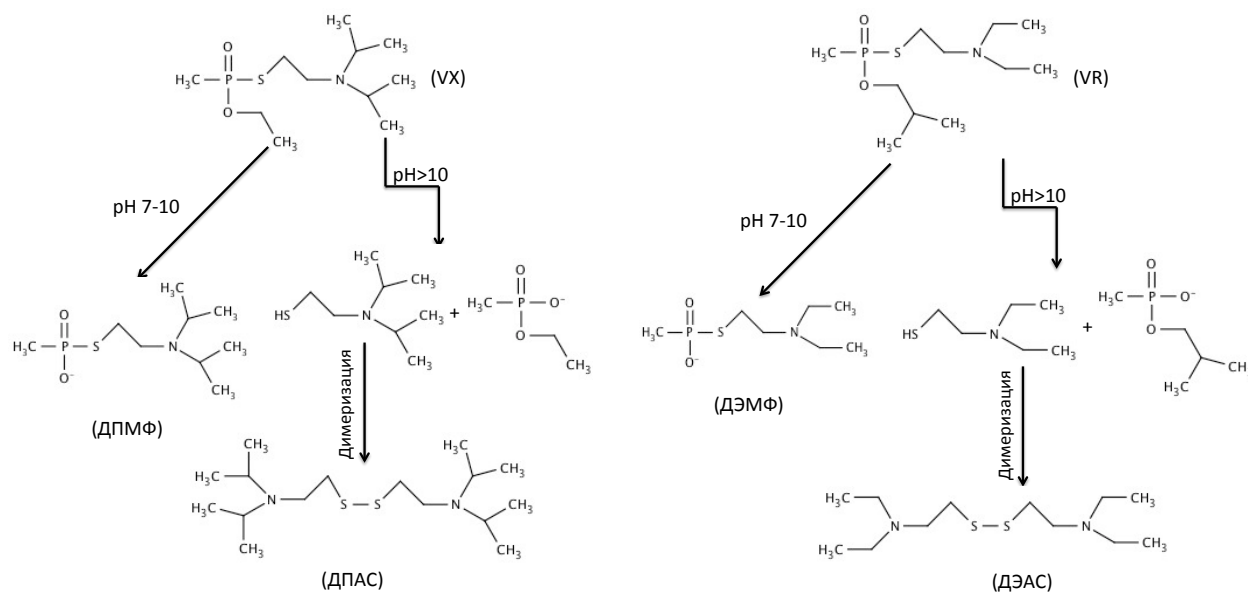


Рис. 81. Схема гидролиза VX и VR с образованием ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС [148].

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования. В ходе исследования использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации

положительных ионов, поскольку ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в своем составе имеют аминогруппы, которые отвечают за образование протонированных положительно заряженных молекул в ходе ионизации, и поэтому нет необходимости использовать химическую ионизацию при атмосферном давлении, которая, как правило, используется для трудноионизируемых, слабополярных соединений. Оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования с варьированием напряжения на распыляющем капилляре проводили в режиме прямого ввода, непосредственно вводя растворы стандартов исследуемых соединений с концентрацией 2 мкг/мл в источник ионов, минуя хроматографическую колонку.

На первом этапе работы исследовали влияние напряжения источника ионизации на величины сигналов протонированных молекулярных ионов ДЭМФ (m/z , ДПМФ ($m/z = 240$), ДЭАС ($m/z = 265$) и ДПАС ($m/z = 321$). Для этого использовали типичные параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем и прописанные в файле автоматической настройки системы – «автотюнинга». Напряжение источника ионизации варьировали в диапазоне 2500 В – 5500 В. В случае ДЭМФ и ДПМФ при увеличении напряжения источника ионизации с 4500 В до 5500 В происходит увеличение интенсивности сигнала на 40-50 %, при этом величина шума увеличивается не более чем на 10 %, поэтому в дальнейшем использовали напряжение источника ионизации 5500 В при определении ДЭМФ и ДПМФ. При исследовании ДЭАС и ДПАС наблюдали увеличение интенсивности сигнала на 20-30 % при увеличении напряжения источника ионизации с 4500 В до 5500 В, однако при этом величина шума увеличивается на 50 %, поэтому на следующих этапах оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования использовали напряжение источника ионизации 4500 В при детектировании ДЭАС и ДПАС.

На следующем этапе проводили выбор оптимальных пар ионных переходов при определении исследуемых соединений. Поскольку в масс-спектрах ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС присутствуют интенсивные сигналы протонированных молекулярных ионов, далее исследовали их фрагментацию. На Рис. 82 представлены масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС,

а также приведены возможные структурные формулы образующихся фрагментов. Далее, после выбора характерных пар фрагментных ионов для каждого из исследуемых продуктов трансформации ФОВ исследовали влияние энергии и амплитуды фрагментаций на величину аналитического сигнала этих ионов (Рис. 83). В Табл. 55 приведены условия масс-спектрометрического детектирования ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС, при которых удается достичь максимальной интенсивности сигналов выбранных ионных реакций.

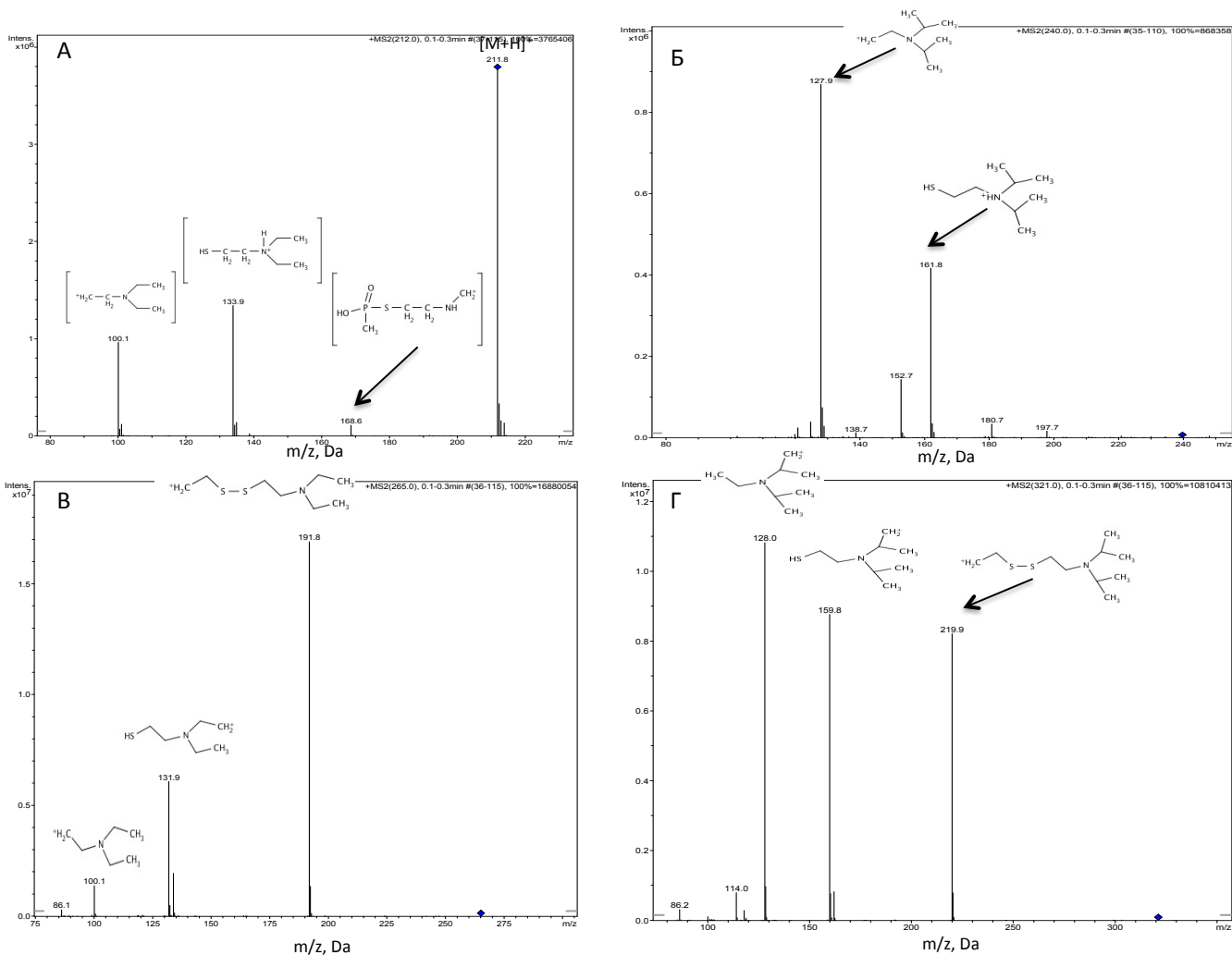


Рис. 82. Масс-спектры фрагментации протонированных молекулярных ионов ДЭМФ, ДПМФ, ДЭАС и ДПАС с $m/z=212$ (А), $m/z=240$ (Б), $m/z=265$ (В) и $m/z=321$ (Г), соответственно. Режим регистрации положительно заряженных ионов.

Таблица 55. Оптимальные параметры детектирования ДМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в выбранных условиях масс-спектрометрического детектирования

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

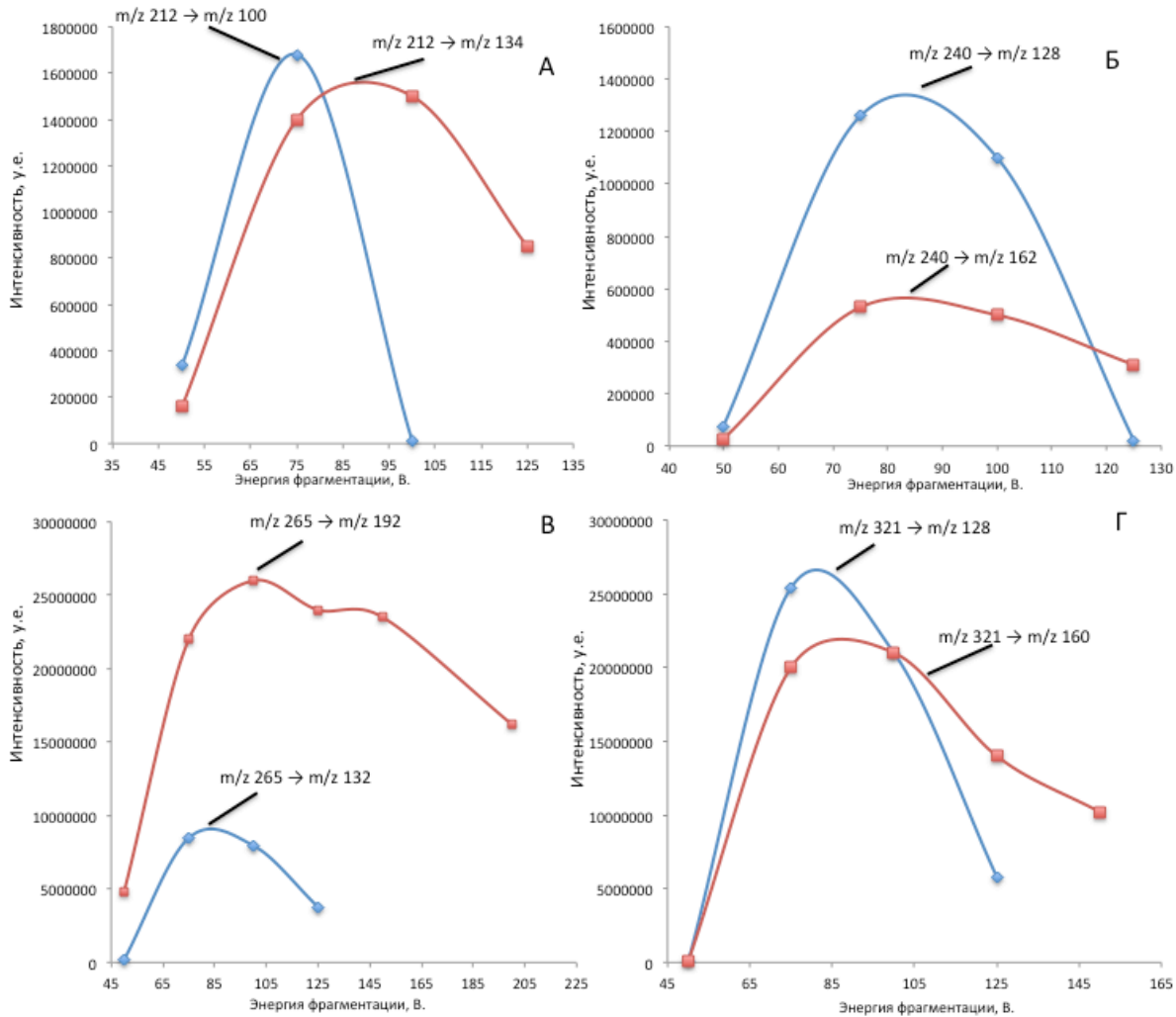


Рис. 83. Зависимости интенсивностей выбранных ионных реакций используемых для обнаружения (нижн.) и определения (верхн.) исследуемых соединений от энергии фрагментации ДЭМФ (А), ДМФ (Б), ДЭАС (В) и ДПАС (Г). Режим электрораспылительной ионизации в положительных ионах.

Выбор условий хроматографического разделения. В рассматриваемом нами методе ВЭЖХ-МС/МС назначение хроматографической системы и требования, предъявляемые к ней, несколько отличаются от таковых в традиционных вариантах ВЭЖХ. В отличие от традиционных универсальных детекторов, характеризующихся низкой селективностью, масс-спектрометр позволяет регистрировать строго специфический параметр каждого определяемого соединения - набор отношений m/z образующихся ионов. При работе в режиме выбранных ионных реакций, для большинства соединений, не возникает необходимости полного хроматографического разделения компонентов смеси, поскольку набор выбранных ионных реакций для каждого соединения специфичен и влияние сигнала от посторонних компонентов на аналитический сигнал аналита в этом случае ничтожно мала. При подборе подвижной фазы для ВЭЖХ-МС необходимо учитывать, что для подвижной фазы можно применять только летучие компоненты.

В качестве неподвижной фазы при определении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в пробах использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом Zorbex SB-C18, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4.6 мм, размером зерна сорбента 1.8 мкм, фирмы «Agilent».

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

При хроматографическом разделении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС использовали следующую программу градиентного элюирования: 0–1 мин: 95 % А, 1–4 мин: 5-100 % В, 4–6 мин: 100 % В, 6–10 мин: 95 % А (А - 0.5 % муравьиной кислоты в

воде, В - ацетонитрил), в условиях которой коэффициенты емкости (k) ДЭМФ, ДПМФ, ДЭАС и ДПАС составили 3.9, 6.6, 3.6 и 6.6, соответственно, и являются приемлемыми для метода хроматографического анализа. В Табл. 56 представлены хроматографические параметры при разделении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС.

Таблица 56. Хроматографические параметры при разделении ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС. При расчетах использовали величину мертвого времени равную 0.7 мин.

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

На Рис. 84 представлены типичные хроматограммы, полученные в выбранных условиях разделения ДПМФ и ДПАС. На хроматограммах представлены величины аналитического сигнала по каждому из соответствующих выбранных ионных переходов (верхняя хроматограмма – для выбранного ионного перехода для количественного анализа, нижняя хроматограмма – для подтверждения).

В качестве критерия установления присутствия ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС в пробах использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных переходов, соответствующих определяемому компоненту.

Оценка предела обнаружения и апробация на реальных объектах. В выбранных условиях разделения ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС построены градуировочные зависимости в диапазоне концентраций 0.02 – 5 мкг/мл для ДПМФ и ДЭМФ, 0.5– 10 мкг/мл для ДЭАС и 0.1 – 2 мкг/мл ДПАС (Рис. 85), рассчитаны и метрологические характеристики разработанных подходов (Табл. 57). Предел обнаружения разработанного способа находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум

для хроматографического пика 3:1).. В случае определения ДЭАС и ДПАС, из-за особенности строения (низкая термическая стабильность) при концентрации 0.5 мкг/мл для ДЭАС и 0.2 мкг/мл для ДПАС происходит резкое уменьшение интенсивности сигнала (по-видимому, происходит термическая деструкция молекул в камере ионизации и, как следствие, резко падает выход ионизации молекулярных ионов), поэтому, несмотря на высокие коэффициенты чувствительности градуировочных зависимостей, пределы обнаружения ДЭАС и ДПАС составили 0.3 мкг/мл и 0.05 мкг/мл, соответственно (Табл. 57).

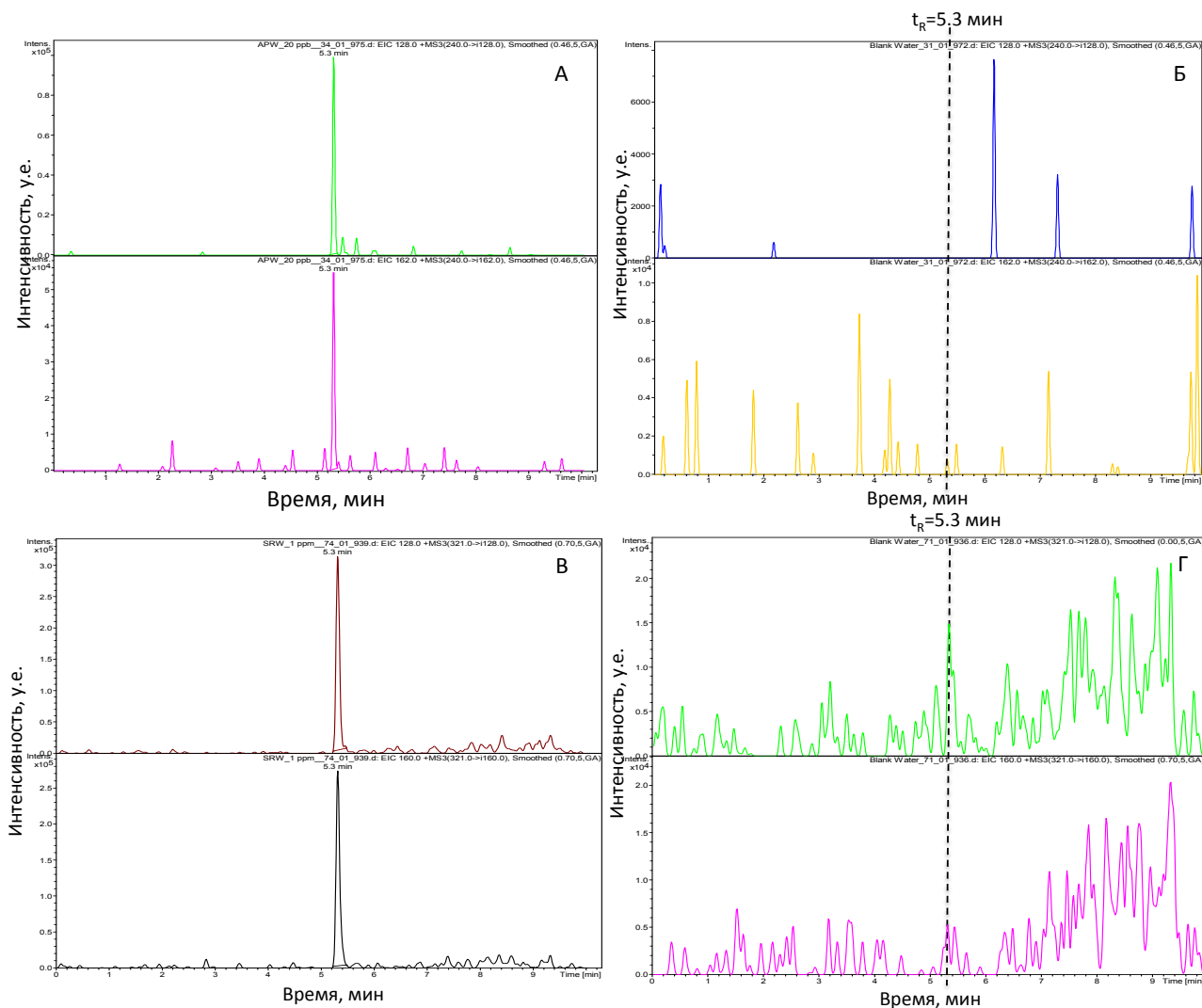


Рис. 84. Хроматограммы стандартных водных растворов не содержащих ДПМФ и ДЭАС (Б и Г, соответственно), содержащих 20 нг/мл и 1000 нг/мл ДПМФ (А) и ДЭАС (В), соответственно. Режим регистрации выбранных ионных реакций (см. раздел 2.2.2).

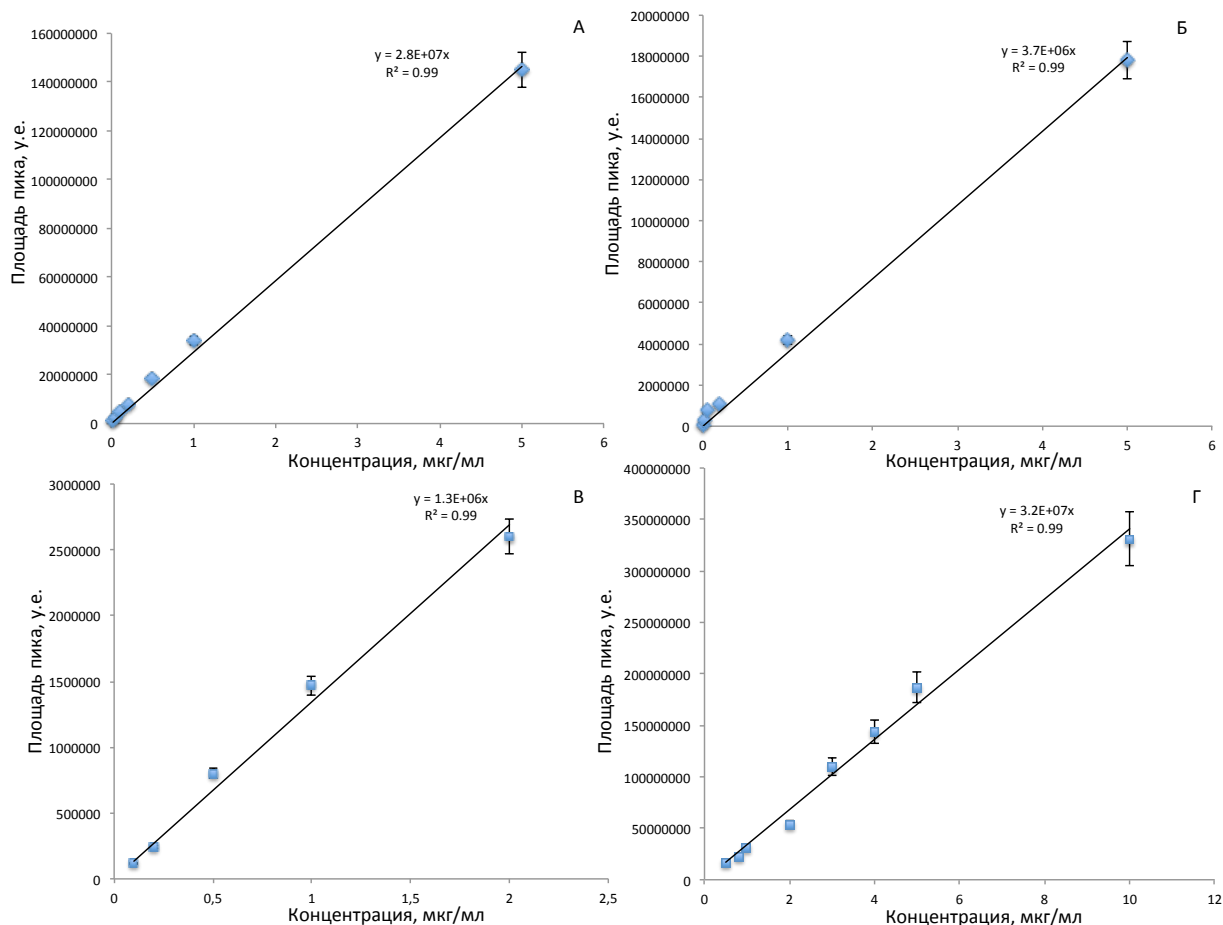


Рис. 85. Градуировочные зависимости ДЭМФ (А), ДПМФ (Б), ДПАС (В) и ДЭАС (Г) в диапазоне концентраций 0.02 – 5 мкг/мл для ДПМФ и ДЭМФ, 0.5– 10 мкг/мл для ДЭАС и 0.1– 2 мкг/мл ДПАС, построенные в выбранных условиях ВЭЖХ-МС/МС.

Таблица 57. Метрологические характеристики разработанного подхода определения ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС

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

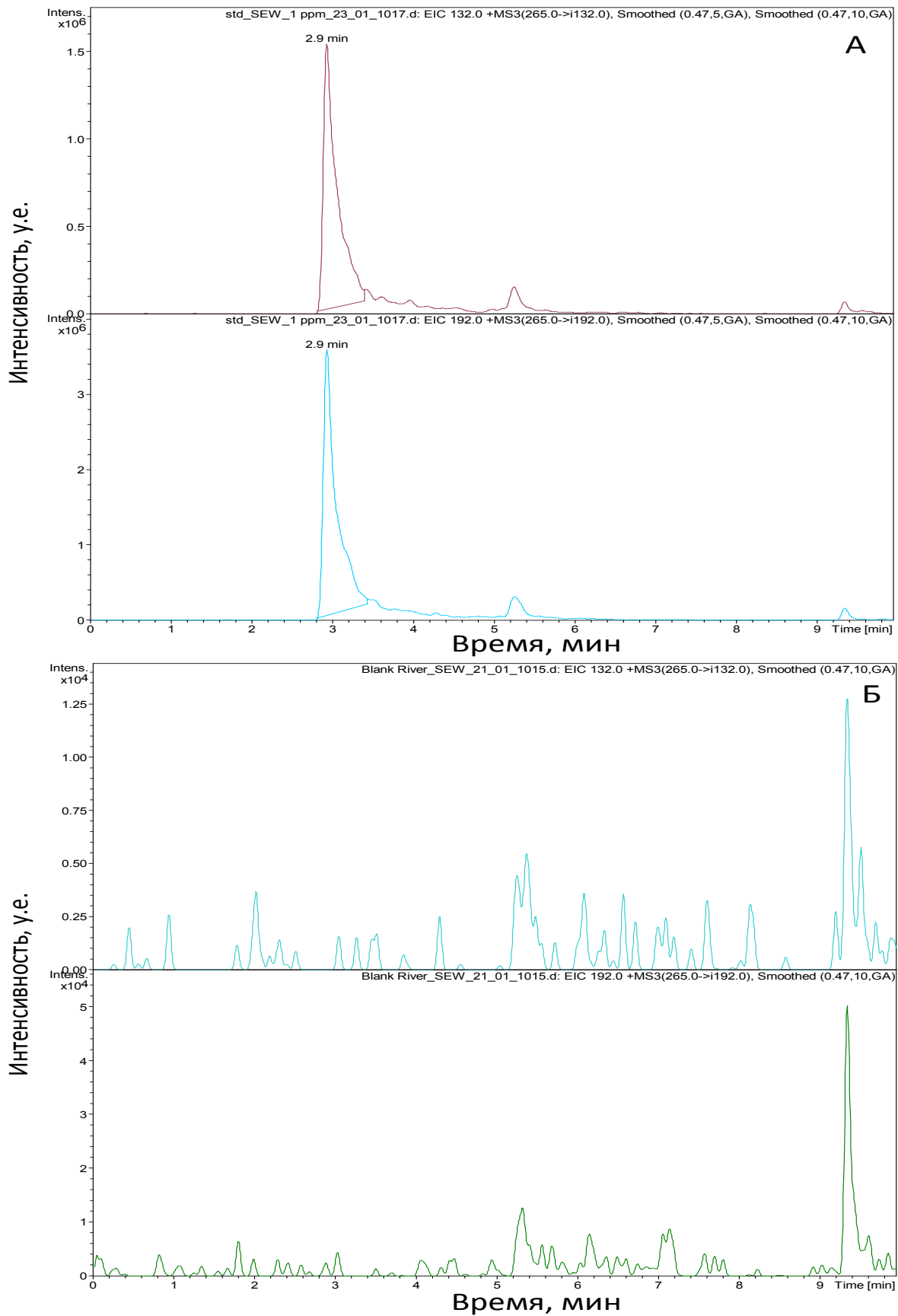


Рис. 86. Хроматограммы растворов речной воды с добавлением 1 мкг/мл ДЭАС и не содержащей ДЭАС (А и Б, соответственно). Режим регистрации выбранных ионных реакций.

Разработанный способ определения исследуемых продуктов деструкции V-газов методом ВЭЖХ-МС/МС опробован при анализе растворов смесей этих соединений в реальных пробах воды. Проверку правильности подхода проводили методом «введено-найдено» (Табл. 4). В качестве объектов для исследования использовали образцы воды различного состава: водопроводную воду, колодезную воду, воду из скважины и речную воду. На Рис. 86 представлены хроматограммы растворов речной воды с добавлением 1 мкг/мл ДЭАС (А) и не содержащей ДЭАС (Б). Как видно из представленных результатов определению ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС во всех исследуемых типах водных проб не мешает присутствие неорганических анионов, металлов, повышенные значения жесткости, мутности и цветности, а также значительное валовое содержание органических веществ.

Таблица 58. Проверка правильности разработанного подхода определения ДПМФ, ДЭМФ, ДЭАС и ДПАС методом «введено-найдено»

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

4. Разработка способов аналитического контроля продуктов трансформации сернистого иприта в биопробах

Сернистый иприт является одним из наиболее старых и широко известных боевых отравляющих веществ. Поступивший в организм человека или теплокровных животных иприт быстро подвергается процессам быстрой биохимической деградации. В результате уже через незначительное время после интоксикации в организме невозможно обнаружить свободный иприт, однако в больших количествах присутствуют разнообразные метаболиты, в том числе, продукты взаимодействия с белками. Таким образом, для обнаружения факта воздействия иприта, необходимо проведение определения (обнаружения) именно таких продуктов трансформации.

Для достоверного обнаружения факта экспозиции ипритом целесообразно определение известных продуктов трансформации— 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] (СБАЦЭ), 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана (МСМТЭСЭ)[147-150]. Данные вещества образуются при взаимодействии иприта с белками в присутствии β-лиазы (рис. 87) и содержатся в значительных количествах в биожидкостях организмов, отравленных ипритом. Они обладают высокой устойчивостью и имеют строго экзогенную природу (образуется в организме только в случае поступления иприта), что исключает получение ложноположительных заключений при проведении анализа. Как видно из рисунка 38 СБМСЭ образуется при дальнейшем окислении МСМТЭСЭ, поэтому разработка экспрессного подхода одновременного определения СБМСЭ и МСМТЭСЭ в биожидкостях позволит изучить метаболизм иприта в живых организмах, так как их суммарное содержание позволяет оценить дозу интоксикации ОВ.

Использование тандемного масс-спектрометрического детектирования позволит существенно снизить предел обнаружения разрабатываемого подхода, а также сделать её максимально экспрессной за счет высочайшей селективности указанного детектора.

Для разработки способа мониторинга указанных соединений при попадании иприта в живой организм необходимо выработать оптимальные условия хромато-масс-

спектрометрического определения 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана], 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана и проведения пробоподготовки образцов биоматериала.

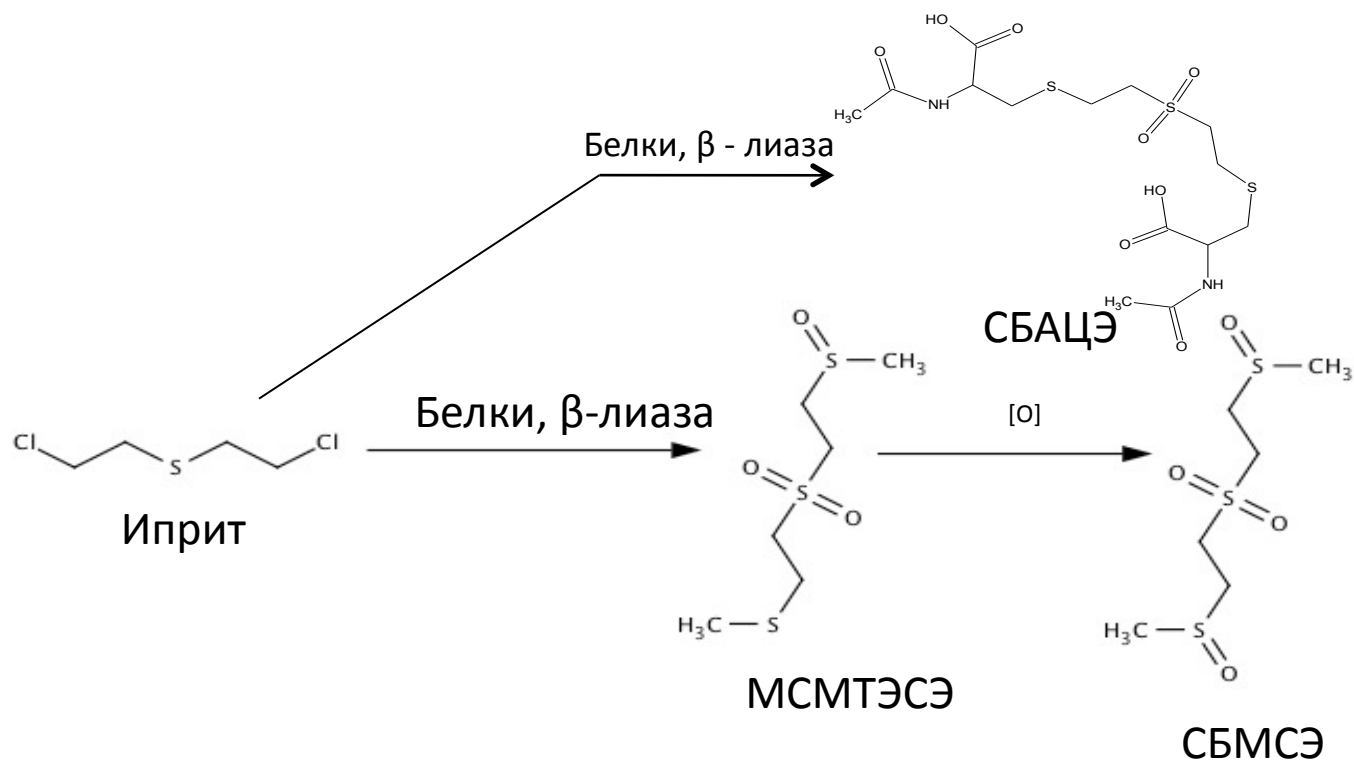


Рис. 87. Схема процесса разложения иприта в живых организмах под действием фермента β – лиазы [105-108].

4.1 Разработка подхода хромато-масс-спектрометрического определения 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана]

При использовании химической ионизации при атмосферном давлении установлено, что ионизация определяемого вещества как в положительной, так и отрицательной полярности практически не наблюдается, интенсивности сигнала малы. По-видимому, это объясняется тем, что химическая ионизация при атмосферном давлении включает в себя стадию термического испарения пробы, в этот момент определяемые компоненты проходят через зону с температурой несколько сотен градусов Цельсия, а определяемое вещество является термически малоустойчивым, что приводит к его разложению в источнике ионизации.

Использование электрораспылительной ионизации, относящейся к категории мягких способов ионизации, позволяет получить интенсивные сигналы определяемого

вещества, как в положительной, так и отрицательной полярности. На рисунке 88 приведены масс-спектры 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана], полученные с использованием электрораспылительной ионизации. Из представленного рисунка видно, что в случае регистрации положительных ионов наблюдается интенсивный пик протонированной молекулы СБАЦЭ (MH^+ с m/z 445), аддуктные ионы сложного состава, и небольшое число фрагментных ионов. В масс-спектре, полученном при регистрации отрицательных ионов, отсутствуют аддукты, наблюдается интенсивный пик молекулярного иона (M^- с m/z 443) и сигналы, отвечающие фрагментным ионам.

Для достижения оптимальной чувствительности детектирования оценивали эффективность регистрации положительных и отрицательных ионов для определяемого вещества – сравнивали соотношения сигнал/шум при детектировании молекулярного иона, и оказалось, что при использовании отрицательной ионизации интенсивность пика депротонированной молекулы в пять раз выше, чем в случае регистрации положительных ионов. В связи с этим в качестве материнского характеристичного иона выбрана депротонированная молекула СБАЦЭ со значением m/z 443.

Для выбора характеристичных ионов для детектирования проводили фрагментацию первичных материнских ионов (напряжение фрагментации 46 В – оптимизированное, диапазон сканирования m/z 80 – 450). На рисунке 89 представлен масс-спектр ионов-продуктов, полученный в результате фрагментации депротонированной молекулы.

Наиболее интенсивными оказались пики ионов со значениями m/z 127 и 164, которые соответствуют фрагментам, образующимися в результате разрыва связей S-C и C-N молекулярного иона СБАЦЭ с m/z 443. В дальнейшем указанные ионы использовали в качестве характеристичных при детектировании СБАЦЭ в режиме регистрации выбранных реакций (m/z 443 \rightarrow m/z 127 и m/z 443 \rightarrow m/z 164).

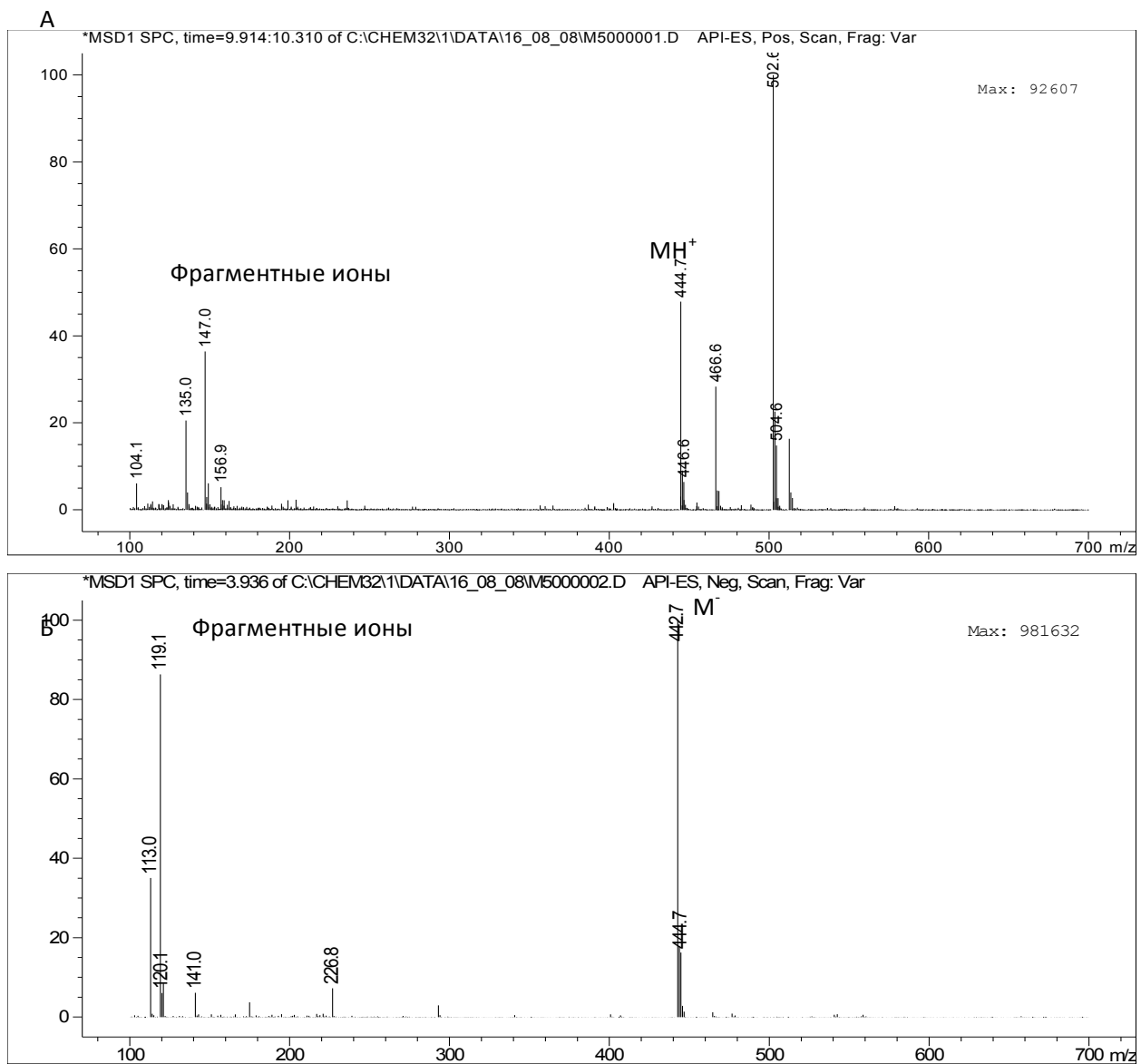


Рис. 88. Масс-спектры СБАЦЭ. Электрораспылительная ионизация. Сканирование в диапазоне 100 – 700m/z. А – положительные ионы, Б – отрицательные ионы.

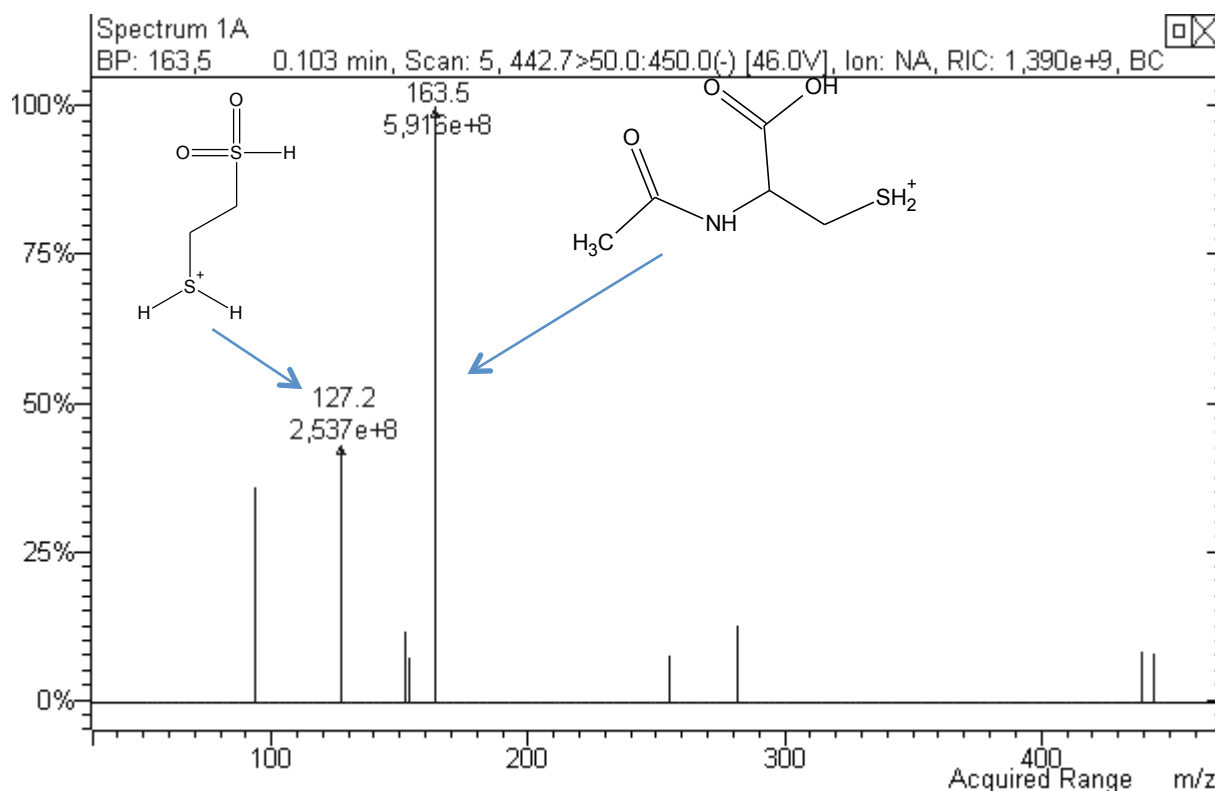


Рис. 89. Масс-спектр ионов-продуктов молекулярного иона СБАЦЭ с m/z 443. Режим регистрации отрицательных ионов. Напряжение фрагментации 46 В.

Для повышения чувствительности детектирования оптимизировали параметры работы масс-спектрометрического детектора. Оптимальные значения параметров, полученные экспериментальным путем, представлены в таблице 59.

Таблица 59. Оптимальные значения параметров детектирования СБАЦЭ

Параметр	Значение
Напряжение в источнике ионизации	- 2000 В
Давление газа-распылителя	50 psi
Давление газа-осушителя	25 psi
Температура газа-осушителя	300 °С
Напряжение фрагментации	46 В

Тандемное масс-спектрометрическое детектирование позволяет обойтись без хроматографического разделения пробы, однако применение такового позволяет снизить загрязнение источника ионизации и повысить достоверность обнаружения. При варьировании на стадии хроматографического разделения рН подвижной фазы

возможно повышение чувствительности определения за счет увеличения доли заряженной формы определяемого вещества в растворе.

Для хроматографического разделения была выбрана колонка с сорбентом «Synergi Polar RP» размером 250x2 мм и зерном сорбента 4 мкм. Данная фаза характеризуется высокой эффективностью для сильнополярных веществ и оптимальна для различных азотсодержащих органических соединений, а колонка диаметром 2 мм и мелкодисперсный сорбент позволят минимизировать размывание пиков.

Для выяснения оптимального значения рН подвижной фазы готовили раствор 20 мМ ацетата аммония и с помощью уксусной кислоты или аммиака по показаниям рН-метра доводили до необходимого значения (элюент А). На данном этапе работы также параллельно варьировали программу градиентного элюирования по ацетонитрилу (элюент В) таким образом, чтобы добиться максимальной эффективности, чувствительности и оптимального коэффициента емкости (1-5). Измерение проводили в режиме регистрации выделенных выбранных реакций, в качестве пробы использовали водный раствор СБАЦЭ с содержанием 0,1 мкг/мл. В таблице 60 приведены достигнутые характеристики разделения.

Таблица 60. Оптимизация хроматографического разделения СБАЦЭ

рН	Время удерживания, мин	Площадь пика, у.е.	Эффективность, ТТ/м	Симметрия
2,5	1,9	$2,1 \cdot 10^7$	8000	0,6
3,8	3,7	$5,0 \cdot 10^7$	11000	0,8
5,4	5,2	$1,4 \cdot 10^8$	22000	0,9
6,6	4,3	$1,0 \cdot 10^8$	13000	0,7
8,0	2,9	$7,3 \cdot 10^7$	5000	0,8

Сильно выраженное влияние рН на удерживание и чувствительность детектирования связано с тем, что в структуре СБАЦЭ присутствуют многочисленные группы кислотной и основной природы, поэтому при небольшом изменении кислотности происходит перепротонирование различных функциональных групп и переход вещества из одной протонированной формы в другую, сильно отличающиеся друг от друга. Оптимальным следует признать значение рН подвижной фазы 5,4, при котором, по-видимому, существует наиболее гидрофобный цвиттер-ион, хорошо

удерживающийся на колонке и легко ионизирующийся. В таблице 61 представлены оптимальные параметры хроматографического разделения СБАЦЭ. На рисунке 90 представлена хроматограмма стандартного водного раствора 100 нг/мл СБАЦЭ, полученного в оптимальных условиях разделения.

С использованием стандартных растворов 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] провели оценку метрологических характеристик разработанного способа. Разброс времени удерживания определяемого компонента не превышает 0.3 минуты, а предел обнаружения – 0.5 нг в 1 мл мочи.

Таблица 61. Условия хроматографического разделения при определении СБАЦЭ. Подвижная фаза А – 20 мМ аммонийно-ацетатного буфера в воде с рН 5.4, подвижная фаза В – ацетонитрил.

объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.3 мл/мин;
Программа градиентного элюирования	0.00 – 2 мин – 2 % В, 2- 5 мин – 2%-20% В, 5-6 мин- 20 % - 90 % В, 6-8 мин- 90 % В, 8-10 мин- 2 % В

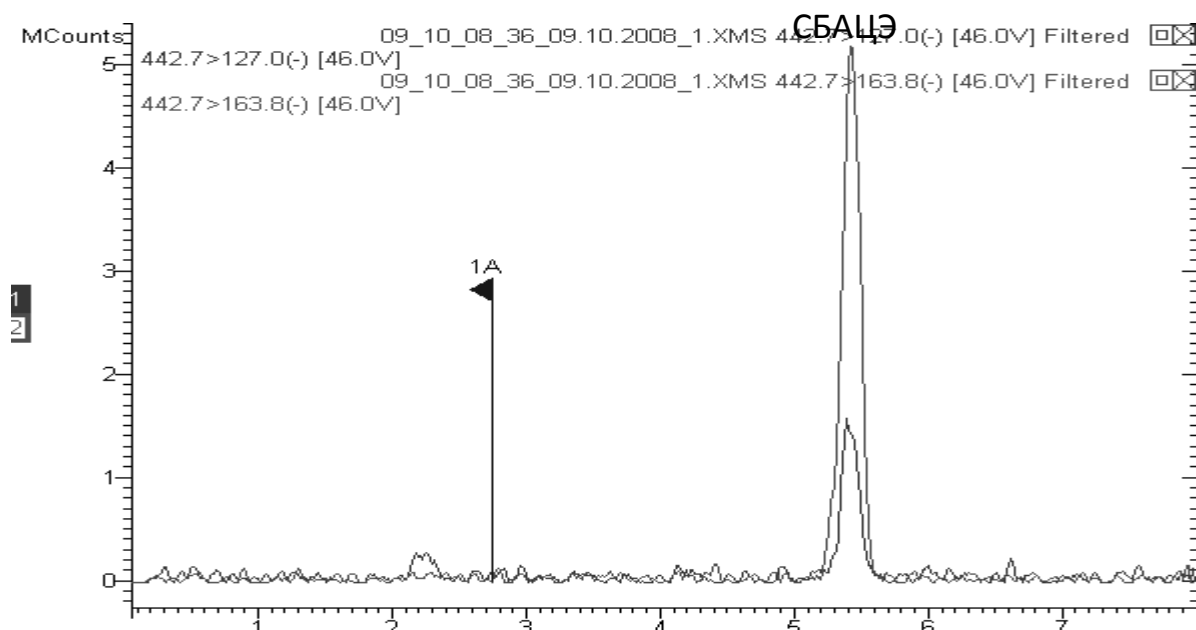


Рис.90. Хроматограмма модельного раствора, содержащего 100 нг/мл 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана].

Поскольку метод ВЭЖХ-МС/МС характеризуется высочайшей чувствительностью и специфичностью, то к стадии пробоподготовки также прилагаются весьма скромные

требования. По сути, в данном методе пробоподготовка сводится к переводу пробы в удобную для определения форму, а также удаления некоторых компонентов, присутствие которых в образце приводит к быстрому ухудшению характеристик хроматографической колонки и загрязнению детектора.

Для анализа проб крови и плазмы, в которых в больших количествах содержится только белок, достаточным оказалось проведение процедуры удаления белков – депротеинезации – к 1,5 мл образца приливали 1 мл 10 % соляной кислоты, подвергали центрифугированию при 16000 об/мин и хроматографировали.

Моча, в отличие от крови и плазмы, содержит незначительное количество белка и большое количество разнообразных органических веществ. Для проведения пробоподготовки проб мочи опробовали несколько схем твердофазной экстракции, в частности, твердофазную экстракцию на удерживание и на пропускание.

Для проведения твердофазной экстракции на удерживание использовали концентрирующие патроны следующих типов: Strata SDB-L (полимерный сорбент на основе стирол-дивинилбензольного сополимера), Strata C 18 E (обращено фазовый силикагель с радикалами C 18 и полярным эндкепингом) и Strata SCREEN-C (смешанный обращенно-фазовый-катионообменный сорбент). Процедуру проводили по следующей схеме:

- Для патронов SDB-L и C 18 E. Доводили pH стандартного водного раствора 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] (содержание 0,1 мкг/мл) до 2,5, 5,4, и 12 (области устойчивости гидрофобных цвиттер-ионов) и через патроны, предварительно промытые последовательно ацетонитрилом и водой, пропускали по 5 мл указанных стандартных растворов. После сушки патрона сорбат элюировали ацетонитрилом. Элюат и экстракт собирали и анализировали хромато-масс-спектрометрически.

- Для патронов SCREEN-C. Доводили pH стандартного водного раствора СБАЦЭ (содержание 0,1 мкг/мл) до 2,5, 5,4, и 12 (области устойчивости гидрофобных цвиттер-ионов) и через патроны, предварительно промытые последовательно ацетонитрилом и водой, пропускали по 5 мл указанных стандартных растворов. После сушки патрона

сорбат элюировали раствором, содержащим 1 М КСl и 50 % ацетонитрила. Элюат и экстракт собирали и анализировали хромато-масс-спектрометрически.

Результаты анализа растворов, пропущенных через патрон и элюатов, приведены в таблице 62. Видно, что высокая полярность СБАЦЭ и существование в заряженной форме не позволяют добиться высоких степеней извлечения определяемого вещества, таким образом твердофазная экстракция на удерживание не подходит для проведения пробоподготовки. Результаты исследования содержания СБАЦЭ в элюате при использовании картриджа StrataC 18 E близки к 100 %, что позволяет предположить, что в этом варианте на патроне удерживаются мешающие компоненты, а определяемое вещество беспрепятственно проходит через патрон. Пропускание образца мочи через патрон приводило к его полному обесцвечиванию, что свидетельствует об эффективности подобной очистки пробы.

Таблица 62. Удерживание и извлечение СБАЦЭ на картриджах Strata

Патрон	pH пробы	Содержание в элюате, % от исходного	Содержание в экстракте, % от исходного
SDB-L	2,5	92	5
	5,4	39	87
	12	70	21
C 18 E	2,5	> 99	≤ 1
	5,4	47	40
	12	80	10
SCREEN-C	2,5	90	5
	5,4	78	20
	12	91	5

С целью оценки чувствительности обнаружения селективности обнаружения 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] на аналитической системе ВЭЖХ-МС-МС с электрораспылительной ионизацией в режиме отрицательной ионизации проведена серия измерений с внесением в мочу добавок с различными массовыми

концентрациями. Мочу подвергали процедуре пробоподготовки согласно п. 4.1.3. Результаты исследования приведены в таблице 63.

Таблица 63. Результаты определения 1,1'-сульфонилбис[2-s-(n-ацетилцистеинил) этана] (с различными массовыми концентрациями), полученные на аналитической системе ВЭЖХ-МС методом ХИАД в режиме отрицательной ионизации

Массовая концентрация СБАЦЭ	Площадь пика аналита, отн.ед. ²	Соотношение сигнал/шум
0,5	$3,6 \cdot 10^7$	5:1
1	$7,2 \cdot 10^7$	10:1
10	$8 \cdot 10^8$	110:1
50	$3,1 \cdot 10^9$	450:1

Анализ приведенных в таблице 63 экспериментальных данных показывает, что чувствительность аналитической системы ВЭЖХ-МС-МС при обнаружении СБАЦЭ в моче составляет 0,5 нг/мл с соотношением сигнал/шум=5:1. Хроматограмма модельного образца мочи, содержащего 1 нг/мл 1,1'-сульфонилбис[2-s-(n-ацетилцистеинил) этана] приведена на рисунке 91. Для малых концентраций наблюдается некоторое снижение времени удерживания, однако это не мешает обнаружению пика, поскольку основным критерием в данном случае являются масс-спектральные данные – сравнивают масс-спектр ионов-продуктов от молекулярного иона с масс-спектром стандарта.

Для проведения экспериментальной оценки применимости разработанной хромато-масс-спектрометрического способа определения метаболита сернистого иприта в образцах биопроб лабораторных крыс, получавших несмертельную дозу иприта.

На первом этапе апробации анализировали образцы экстрактов плазмы и форменных элементов человеческой крови, зараженных сернистым ипритом в эксперименте *invitro*. В ходе исследований проб плазмы после процедуры пробоподготовки СБАЦЭ не обнаружен на уровне чувствительности разработанного подхода – 0,5 нг/мл. На рисунке 92 представлена типовая хроматограмма полученная в результате анализа указанных проб. Отсутствие определяемого компонента в пробах, зараженных большими количествами иприта можно объяснить по-видимому высокой прочностью его связывания

белками крови, или тем что в условиях эксперимента *invitro* не происходит образование указанного метаболита иприта.

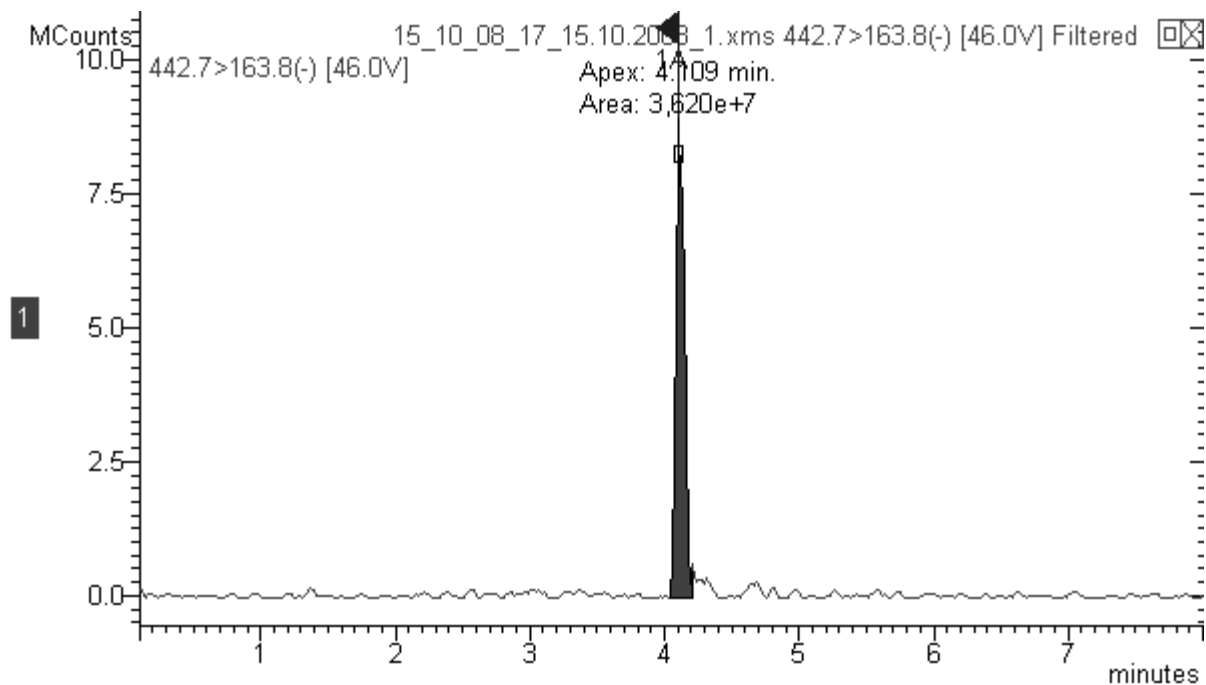


Рис. 91. Хроматограмма образца мочи, содержащего 1,0 нг/мл СБАЦЭ.

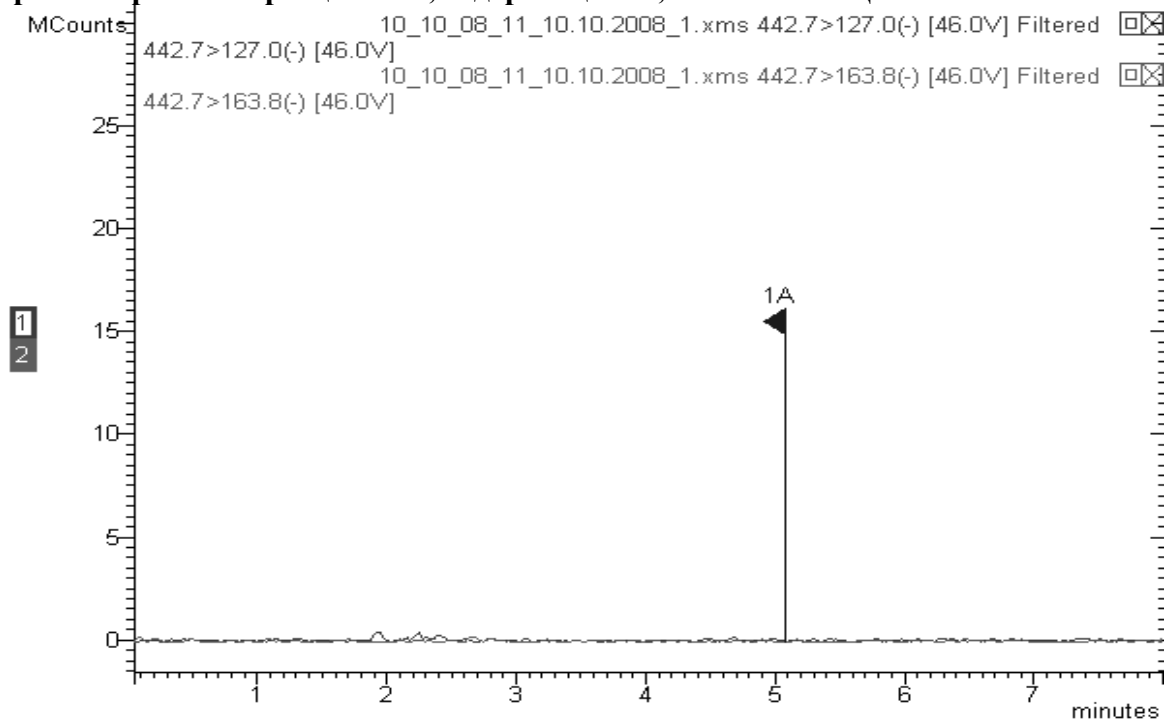


Рис. 92. Хроматограмма образца «Экстракт метанолом из плазмы эритроцитов человеческой крови, в которую *invitro* вносили 0.25 мг/мл иприта», полученная при определении СБАЦЭ.

На втором этапе работ проводили исследования проб мочи крыс, которые инъекционно получали несмертельные дозы иприта. Пробы готовили и анализировали

согласно разработанного способа пробоподготовки. Для повышения достоверности проводимых исследований также анализировали холостые образцы – пробы мочи крыс, которые не получали ОВ. В таблице 64 приведены описания и результаты исследованных проб.

Использование предложенного подхода позволило добиться большой ретроспективности анализа – достоверное обнаружение метаболита иприта осуществляется в образцах мочи, полученной на 22 день после проведения интоксикации. На рисунках 93 – 95 представлены хроматограммы исследуемых проб мочи.

Таким образом, показана высокая эффективность разработанного способа обнаружения для подтверждения факта воздействия иприта на организм млекопитающих. Целесообразно, проведение апробации предложенного способа на пробах крови полученных в экспериментах *in vivo* для проведения достоверной оценки возможностей настоящего подхода для анализа крови, поскольку в силу физиологических и биохимических причин невозможно проведение апробации на пробах крови полученных в экспериментах *in vitro*.

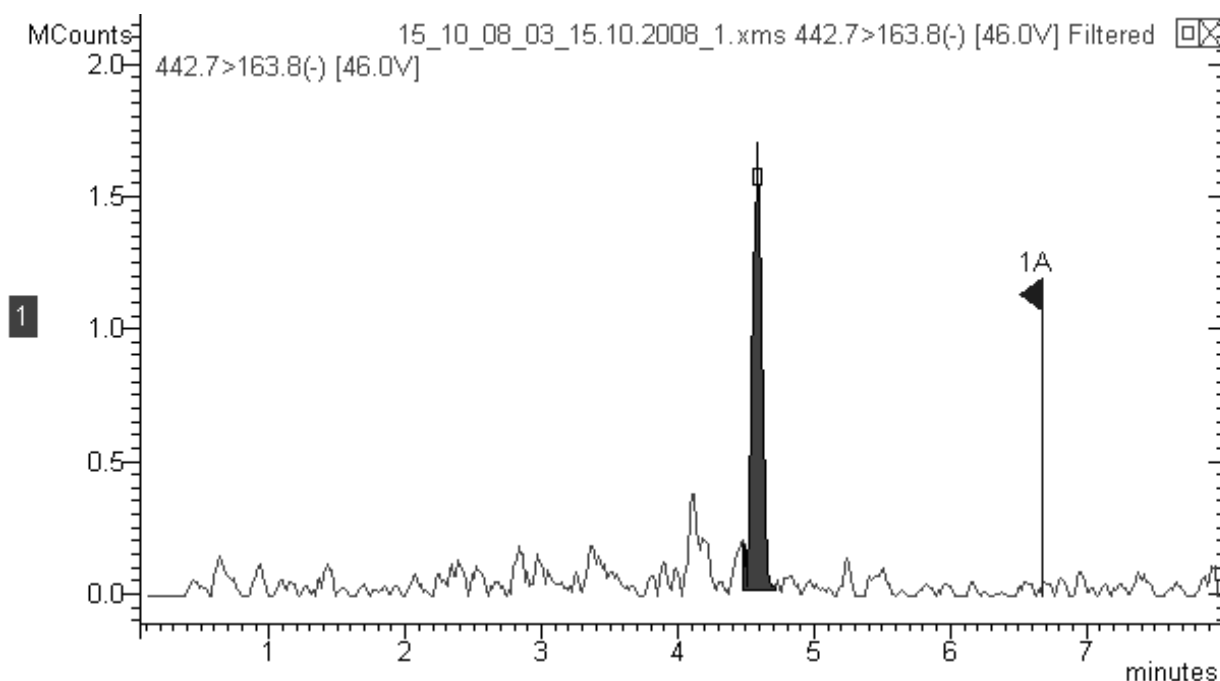


Рис. 93. Хроматограмма образца И – 66 – 72, полученная при определении СБАЦЭ. Режим регистрации выбранной реакции и m/z 443 \rightarrow m/z 164.

Таблица 64. Результаты анализа биопроб *in vivo* на содержание в них 1,1'-сульфонилбис-[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана]

Шифр пробы	Описание пробы	Наличие СБАЦЭ
И – 0 - 6	5 мг/кг HD, крыса моча через 6 ч после интоксикации	обнаружен
И – 6 - 24	5 мг/кг HD, крыса моча через 6 - 24 ч после интоксикации	обнаружен
И - 36 - 48	5 мг/кг HD, крыса моча через 36 – 48 ч после интоксикации	обнаружен
И - 66 - 72	5 мг/кг HD, крыса моча через 66-72 ч. после интоксикации	обнаружен
И - 138 - 144	5 мг/кг HD, крыса моча через 138 – 144 ч. после интоксикации	обнаружен
И - 162 - 168	5 мг/кг HD, крыса моча через 162 – 168 ч. после интоксикации	обнаружен
7К	Моча контрольная для вышеперечисленных проб	не обнаружен
I 8 - 9	5 мг/кг HD, крыса моча через 8 – 9 сут. после интоксикации	обнаружен
К 8 - 9	Моча контрольная для пробы I 8 - 9	не обнаружен
I 14-15	5 мг/кг HD, крыса моча через 14 -15 сут. после интоксикации	обнаружен
К 14-15	Моча контрольная для пробы I 14-15	не обнаружен
I 21-22	5 мг/кг HD, крыса моча через 21 - 22 сут. после интоксикации	обнаружен
К 21-22	Моча контрольная для пробы I 21 - 22	не обнаружен

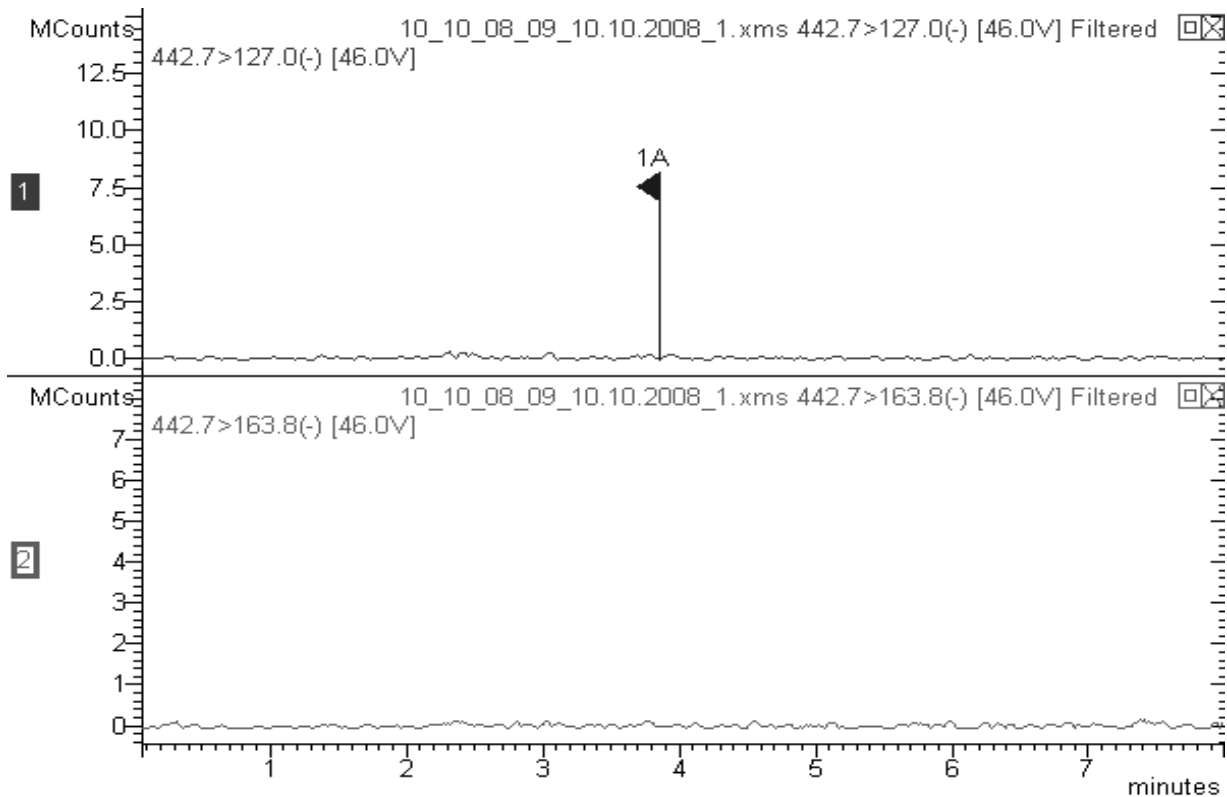


Рис. 94. Хроматограмма контрольного образца мочи 7 К, полученная при определении СБАЦЭ (верхняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции $443 \rightarrow m/z 127$, нижняя хроматограмма – режим регистрации выбранной реакции и $m/z 443 \rightarrow m/z 164$).

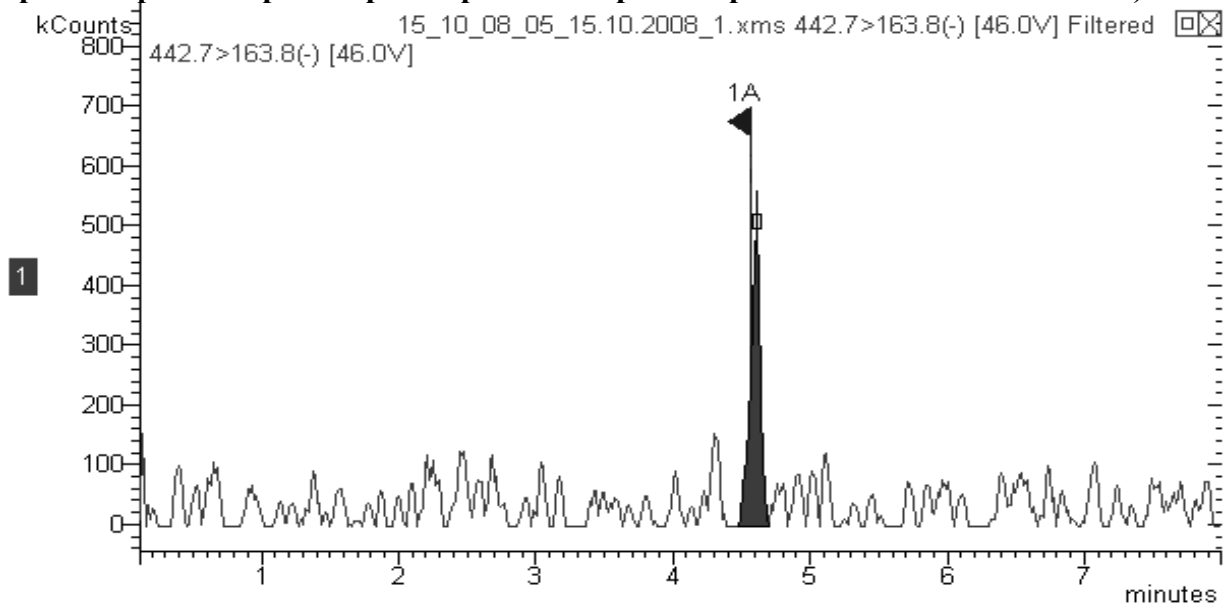


Рис. 95. Хроматограмма образца I 14-15, полученная при определении СБАЦЭ. Режим регистрации выбранной реакции и $m/z 443 \rightarrow m/z 164$.

В ходе исследований разработан быстрый и чувствительный подход, позволяющий проводить определение одного из продуктов трансформации иприта – СБАЦЭ – в образцах крови и мочи. Использование предложенной процедуры пробоподготовки в

сочетании с режимом регистрации выбранных реакций позволяет проводить достоверное и высокоселективное обнаружение СБАЦЭ. Данный способ успешно применен в ходе испытаний по определению СБАЦЭ в образцах мочи крыс, подвергшихся воздействию иприта в рамках лабораторных испытаний.

4.2 Разработка подхода одновременного хромато-масс-спектрометрического определения 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана

По химическим свойствам 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана (МСМТЭСЭ) относятся к категории среднеполярных органических веществ со средней гидрофобностью, имеют в структуре атомы кислорода, которые обладают кислотными свойствами и способны принимать атомы водорода (в водных растворах равновесие сдвинуто в сторону незаряженной формы), в следствие этого при определении СБМСЭ и МСМТЭСЭ методами с масс-спектрометрическим детектированием целесообразно использовать режим регистрации положительно заряженных (протонированных) частиц.

Для разработки способа определения СБМСЭ и МСМТЭСЭ методом ВЭЖХ-МС-МС необходимо провести оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования, подобрать подходящие условия хроматографического разделения (обеспечивающие экспрессное и эффективное разделение исследуемых соединений), оценить метрологические характеристики (предел обнаружения, диапазон линейности градуировочного графика) и провести апробацию разработанного подхода на примере анализа образцов человеческой мочи, искусственно загрязненных данными метаболитами иприта.

Работу проводили в режиме прямого ввода с использованием шприцевого насоса (использовали водно-ацетонитрильные растворы СБМСЭ и МСМТЭСЭ с концентрацией 1 мкг/мл). На рисунках 96 – 97 представлены масс-спектры растворов СБМСЭ и МСМТЭСЭ, на которых присутствуют протонированные молекулы СБМСЭ и МСМТЭСЭ с m/z 247 и 231, соответственно (режим регистрации положительных

ионов). Образование молекулярного иона вероятней всего происходит за счет протонирования атомов кислорода СБМСЭ и МСМТЭСЭ.

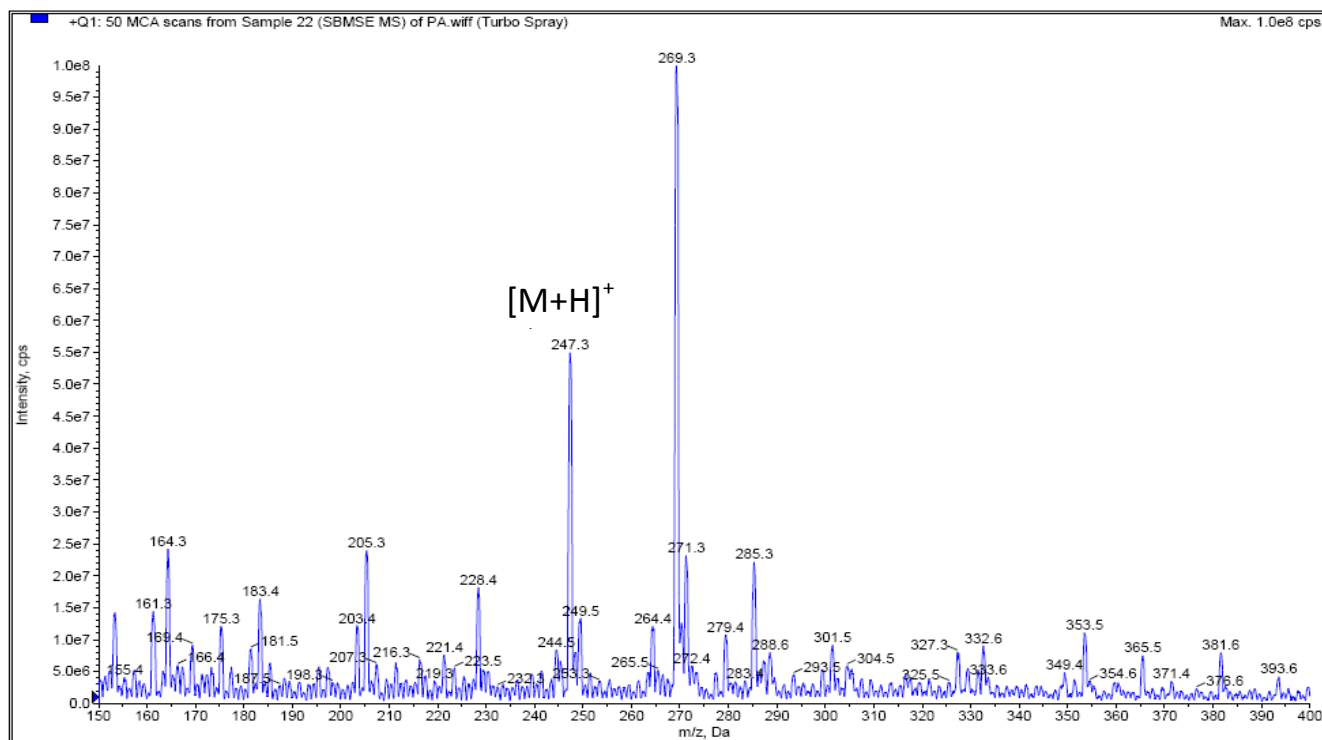


Рис. 96. Масс-спектр 1 мкг/мл водно - ацетонитрильного раствора СБМСЭ. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительных ионов.

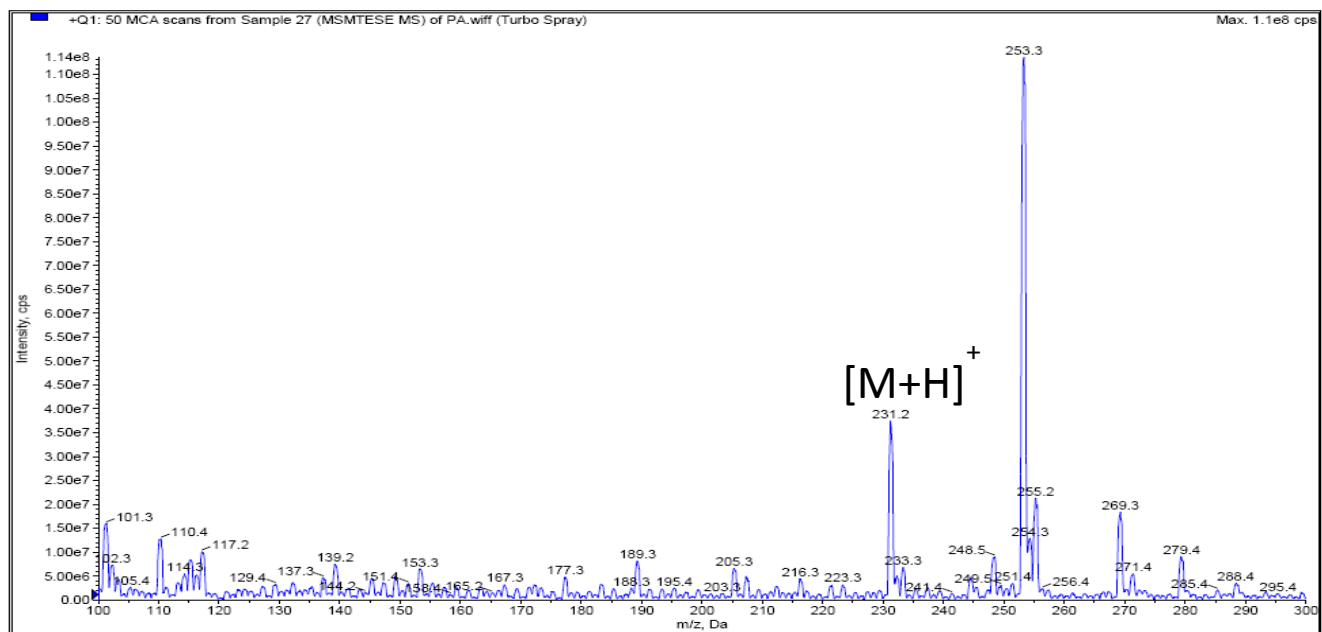


Рис. 97. Масс-спектр 1 мкг/мл водно - ацетонитрильного раствора МСМТЭСЭ. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительных ионов.

Критерием выбора оптимальных значений потенциала декластеризации на нулевом квадруполе масс-спектрометрического детектора является максимальная интенсивность пика молекулярного иона в масс-спектре. Для этого изучали зависимость величины сигнала молекулярных ионов СБМСЭ и МСМТЭСЭ от величины потенциала. При детектировании СБМСЭ и МСМТЭСЭ в режиме **электрораспылительной ионизации** в варианте регистрации отрицательных ионов необходимо использовать потенциалы декластеризации + 26 В и +25 В соответственно.

Следующим этапом оптимизации масс-спектрометрического детектирования СБМСЭ и МСМТЭСЭ является выбор характеристичных ионных переходов. Для этого проводили исследование влияния энергии фрагментации (СЕ) в камере соударения масс-спектрометра на характер спектра ионов-продуктов, образующихся при распаде молекулярных ионов СБМСЭ и МСМТЭСЭ, и интенсивность пиков образующихся ионов-продуктов. На рисунках 98 - 99 представлены масс-спектры ионов-продуктов СБМСЭ и МСМТЭСЭ, полученные в режиме регистрации положительных ионов в варианте электрораспылительной ионизации, при этом использовали оптимизированные параметры работы селективного масс-анализатора. Наиболее интенсивными ионными переходами оказались m/z 247 \rightarrow 183 (брутто-формула иона-продукта $C_5H_{11}O_3S_2$), m/z 247 \rightarrow 119 (брутто-формула иона-продукта $C_5H_{11}O_3S_2$), при определении СБМСЭ, m/z 231 \rightarrow 75 (брутто-формула иона-продукта C_3H_7S), m/z 231 \rightarrow 167 (брутто-формула иона-продукта $C_5H_{11}O_2S_2$), при определении МСМТЭСЭ. Фрагментация СБМСЭ и МСМТЭСЭ идет с образованием продуктов разрушения связей S-C и C-N протонированных молекул СБМСЭ и МСМТЭСЭ.

Таким образом, для получения максимального аналитического сигнала при детектировании СБМСЭ и МСМТЭСЭ в выбранном варианте источника ионизации в режиме регистрации положительных ионов необходимо использовать следующие параметры работы масс-спектрометра (табл. 65).

Таблица 65. Оптимальные условия детектирования СБМСЭ и МСМТЭСЭ с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов

Параметр	Описание
Полярность регистрируемых ионов	Отрицательные
Напряжение источника ионизации	5.5 кВ
Температура источника ионизации	300 °С
Давление газа-завесы	15 PSI
Давление газа-распылителя	30 PSI
Режим регистрации	Регистрация выбранных реакций (MRM)
Напряжение на фрагменторе	+26 В (СБМСЭ); +25 В (МСМТЭСЭ)
Напряжение в ячейке соударения	+12 В (СБМСЭ); +29 В (МСМТЭСЭ)
MRM № 1, m/z	247 → 183 (СБМСЭ); 231 → 75 (МСМТЭСЭ)
MRM № 2, m/z	247 → 119 (СБМСЭ); 231 → 167 (МСМТЭСЭ)

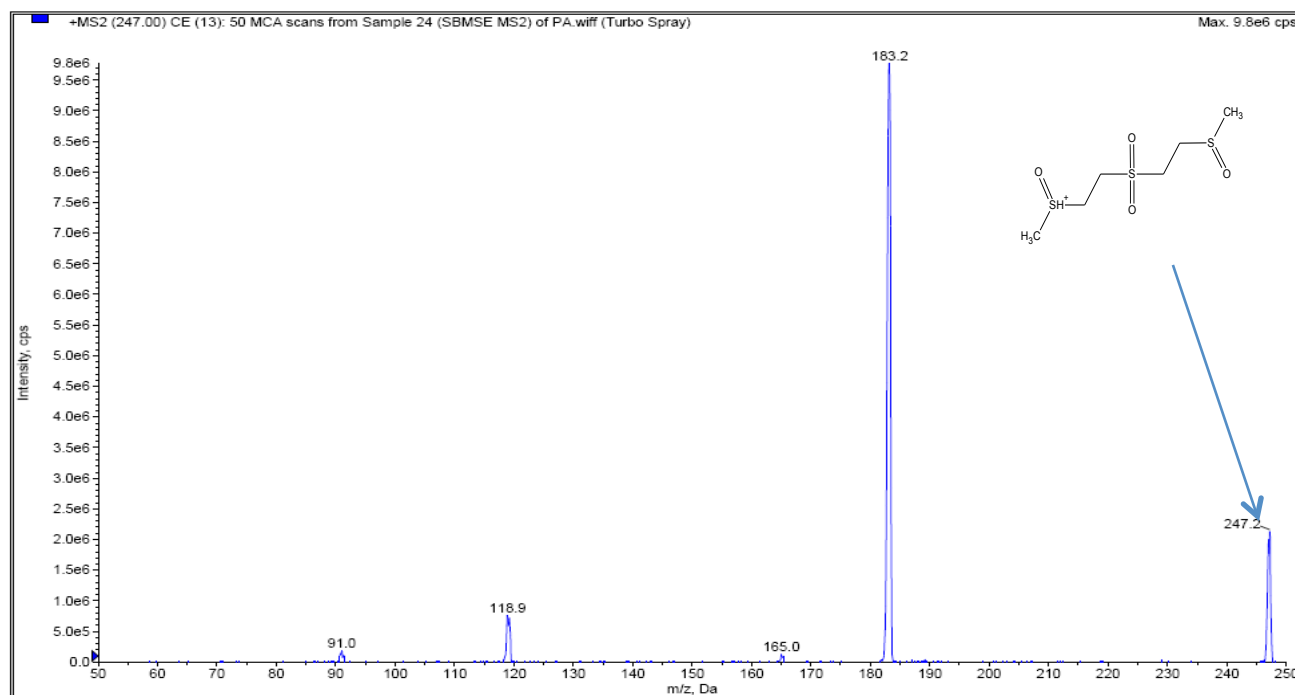


Рис.98. Масс-спектр ионов-продуктов протонированной молекулы СБМСЭ с m/z=247. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительных ионов.

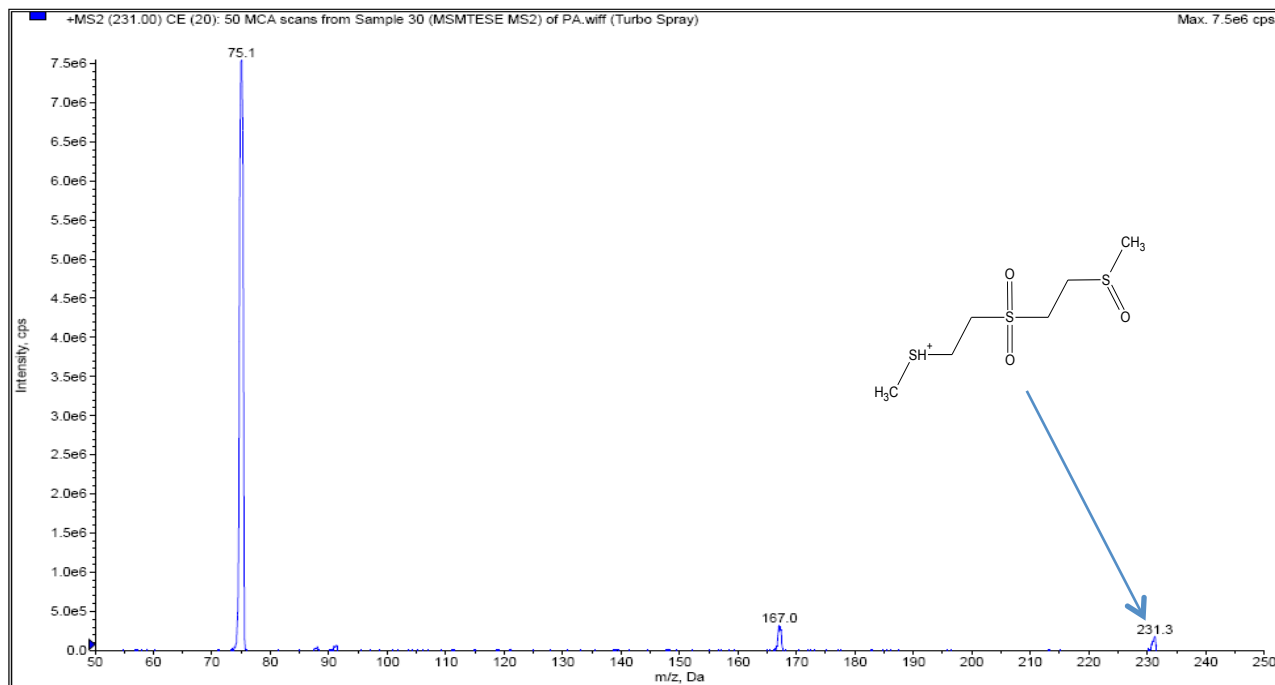


Рис. 99. Масс-спектр ионов-продуктов протонированной молекулы МСМТЭСЭ с $m/z=231$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительных ионов.

В ходе разработки способа разделения МСМТЭСЭ и СБМСЭ использовали так называемый метод ультраВЭЖХ (работа при давлении в системе более 500 bar), который позволяет существенно сократить время анализа и добиться высоких значений эффективности разделения.

В качестве неподвижной фазы при определении МСМТЭСЭ и СБМСЭ использовали обращенно-фазовый сорбент Acclaim RSLC, длиной 150 мм, внутренним диаметром 2.1 мм, размером зерна сорбента 2.2 мкм, фирмы «Thermo». Для того, чтобы увеличить долю заряженных частиц МСМТЭСЭ и СБМСЭ в камере ионизации в ходе анализа в качестве подвижных фаз использовали 0.5 % водный раствор муравьиной кислоты и 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, которые способствуют образованию протонированных положительно заряженных молекул МСМТЭСЭ и СБМСЭ. При хроматографическом определении МСМТЭСЭ и СБМСЭ использовали программу градиентного элюирования (табл. 66), в условиях которой коэффициенты емкости (k) МСМТЭСЭ и СБМСЭ составили 7.3 и 2.4 соответственно и являются приемлемыми для метода хроматографического анализа. В таблице 67 представлены хроматографические параметры при разделении МСМТЭСЭ и СБМСЭ.

Таблица 66. Условия хроматографического разделения при определении МСМТЭСЭ и СБМСЭ. Подвижная фаза А – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле.

объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.45 мл/мин;
Программа градиентного элюирования	0.00 – 1.5 мин – 2 % В, 1.51- 8.00 мин – 2%-100% В, 8.01-8.30 мин- 100 % - 2 % В

На рисунках 100 - 101 представлены хроматограммы стандартных водных растворах, содержащих МСМТЭСЭ и СБМСЭ, полученные при использовании выбранных условиях хромато-масс-спектрометрического определения МСМТЭСЭ и СБМСЭ.

Таблица 67. Хроматографические параметры при определении МСМТЭСЭ и СБМСЭ. При расчетах использовали величину мертвого времени равную 0.60 мин

Соединение	Параметры	Время удерживания	Коэффициент емкости	N, ТТ/м
		мин		
МСМТЭСЭ		4.96	7.3	260000
СБМСЭ		2.01	2.4	30000

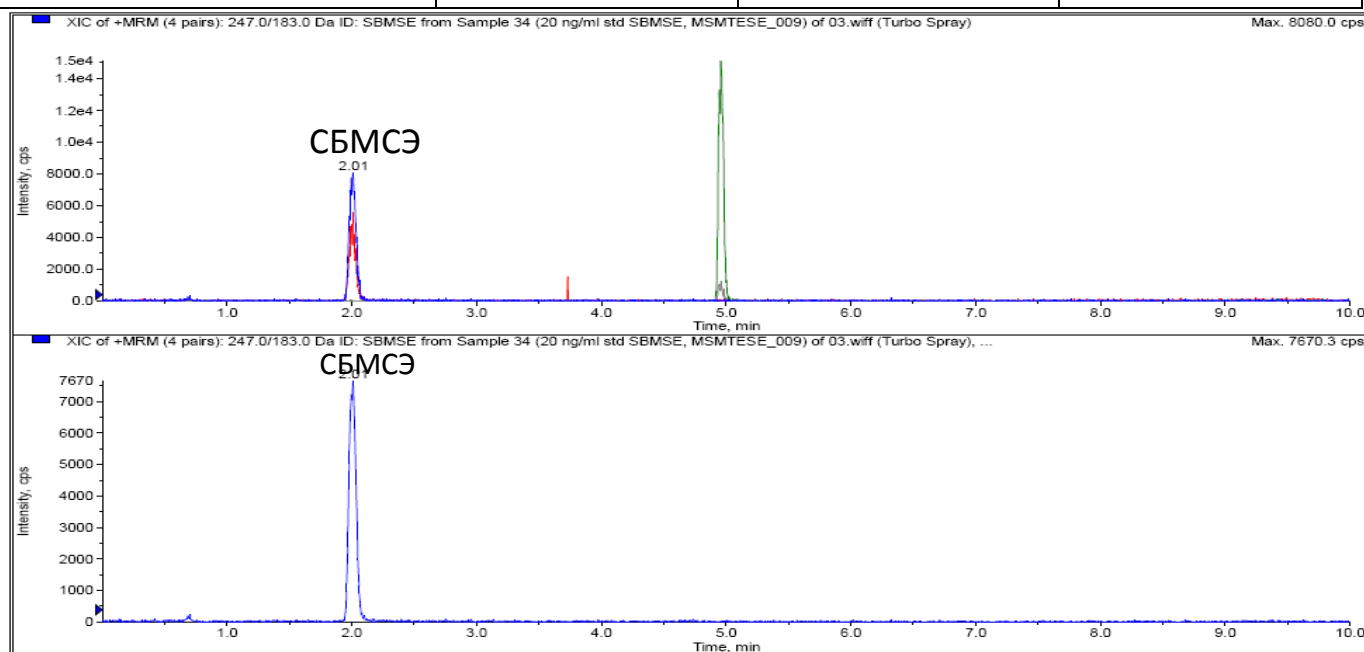


Рис. 100. Хроматограмма стандартного водного раствора 20 нг/мл СБМСЭ.

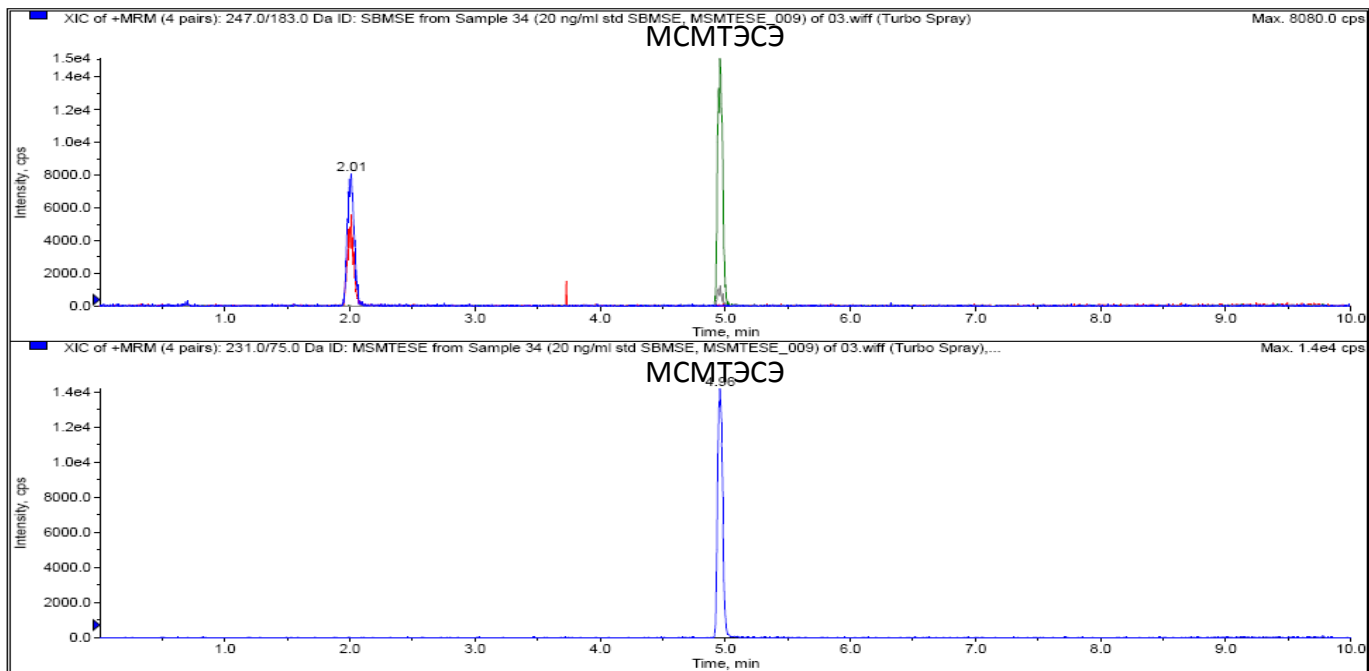


Рис. 101. Хроматограмма стандартного водного раствора 20 нг/мл МСМТЭСЭ.

В качестве процедуры пробоподготовки мочи использовали очистку исследуемых образцов на картриджах. Для этого образец мочи подкисляли раствором уксусной кислоты до pH 2.5, чтобы перевести МСМТЭСЭ и СБМСЭ в катионы, которые плохо удерживаются на сорбентах картриджей, и далее пропускали пробу через картридж.

На этапе оптимизации процедуры пробоподготовки исследовали влияние типа сорбента на пропускание МСМТЭСЭ и СБМСЭ. В ходе работы провели очистку образцов мочи на двух типах картриджей: Strata C (смешанный сорбент с лигандами C8 и катионно-обменными группами) и Strata SDB-L (сорбент сополимера стирола и дивинилбензола). Критерием выбора оптимального картриджа является максимальное пропускание МСМТЭСЭ и СБМСЭ через сорбент картриджа. Расчет величины пропускания проводили согласно формуле:

$$\text{Пропускание, \%} = \left(\frac{S_{\text{СБМСЭ(МСМТЭСЭ)}} \text{ после прохождения через картридж}}{S_{\text{СБМСЭ(МСМТЭСЭ)}} \text{ в пробе до процедуры пробоподготовки}} \right) * 100\%$$

В таблице 68 представлены результаты расчета пропускания МСМТЭСЭ и СБМСЭ через два типа картриджей, используемых в ходе процедуры пробоподготовки. Расчет величины пропускания МСМТЭСЭ и СБМСЭ проводили относительно содержания МСМТЭСЭ и СБМСЭ в стандартном водном растворе до процедуры пробоподготовки.

Таблица 68. Расчет пропускания МСМТЭСЭ и СБМСЭ через картриджи Strata C и Strata SDB-L в ходе процедуры пробоподготовки (P=0.95, n=3)

	Strata C	StrataSDB-L
Пропускание _{МСМТЭСЭ} , %	65±7	88±7
Пропускание _{СБМСЭ} , %	78±9	90±5

В таблице 69 представлены метрологические характеристики разработанного подхода определения МСМТЭСЭ и СБМСЭ в образцах человеческой мочи, искусственно загрязненных МСМТЭСЭ и СБМСЭ. 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).

Таблица 69. Метрологические характеристики разработанного подхода определения продуктов трансформации ирита МСМТЭСЭ и СБМСЭ в модельных образцах человеческой мочи

Параметр	СБМСЭ	МСМТЭСЭ
Уравнение градуировочной зависимости у- площадь хроматографического пика (отн. ед.) С-концентрация анализируемого вещества, (нг мл ⁻¹)	y=23×С	y=44×С
R, коэффициент корреляции	0.999	0.999
Предел обнаружения C _{min} , нг мл ⁻¹	2	1
Диапазон линейности градуировочной зависимости, нг мл ⁻¹	5-5000	2-2000

Для проведения экспериментальной оценки применимости разработанного хромато-масс-спектрометрического подхода одновременного определения МСМТЭСЭ и СБМСЭ методом ультраВЭЖХ-МС-МС в образцах биоматериалов анализировали модельные образцы человеческой мочи, искусственно загрязненной МСМТЭСЭ и СБМСЭ. Апробация разработанного подхода проходила в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО и заключалась в обнаружении МСМТЭСЭ и СБМСЭ в зашифрованных пробах человеческой мочи.

Пробы готовили и анализировали согласно разработанной процедуре пробоподготовки. Для повышения достоверности проводимых исследований также

анализировали холостые образцы – пробы человеческой мочи, не содержащие МСМТЭСЭ и СБМСЭ. В таблице 70 приведены описания и результаты исследования проб, представленных ОЗХО. На рисунках 102-104 представлены хроматограммы человеческой мочи, не загрязненной СБМСЭ, и образцов «А-LC-3» и «Е-LC-3», в которых удалось обнаружить СБМСЭ. Полученные данные полностью подтверждены независимым ГХ-МС-МС анализом с применением реакции дериватизации, который проводился в сторонней аккредитованной лаборатории.

Таблица 70. Результаты анализа биопроб человеческой мочи в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО на содержание МСМТЭСЭ и СБМСЭ

Шифр пробы	Наличие МСМТЭСЭ	Наличие СБМСЭ
А-LC-3	Не обнаружено	Достоверно обнаружено (на уровне 10 нг/мл)
В-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено
С-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено
Д-LC-3	Не обнаружено	Не обнаружено
Е-LC-3	Не обнаружено	Достоверно обнаружено (на уровне 5 нг/мл)

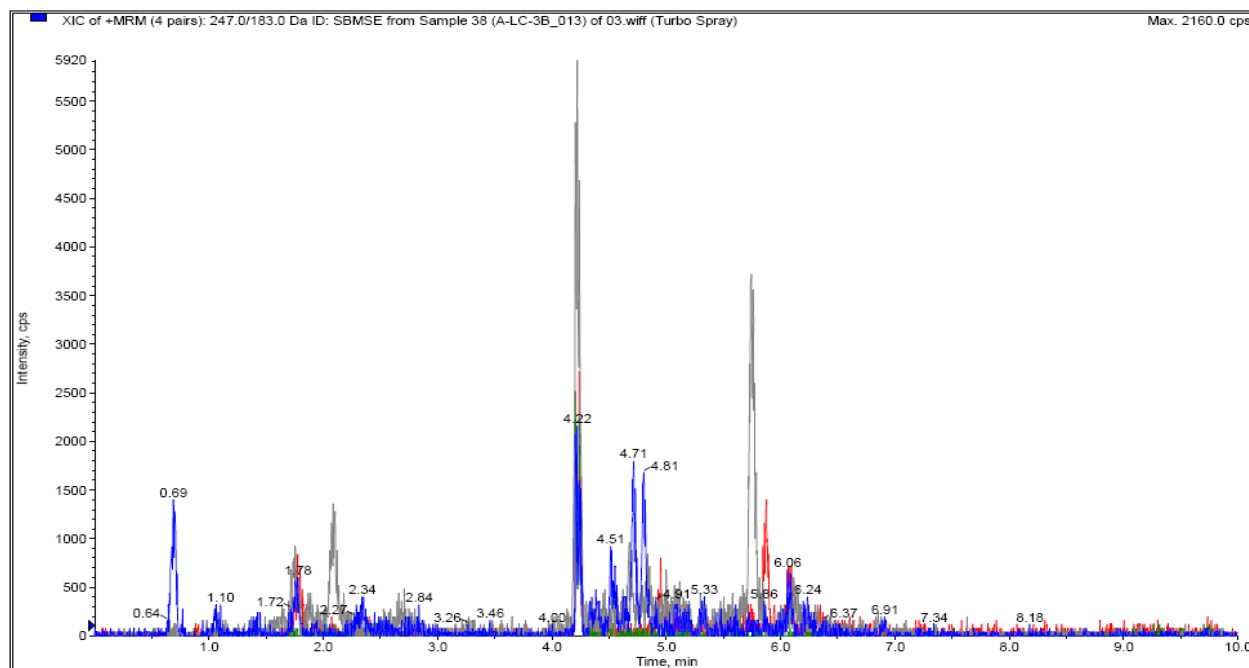


Рис. 102. Хроматограмма образца человеческой мочи, не содержащего СБМСЭ и МСМТЭСЭ. Режим регистрации выбранных реакции для СБМСЭ и МСМТЭСЭ.

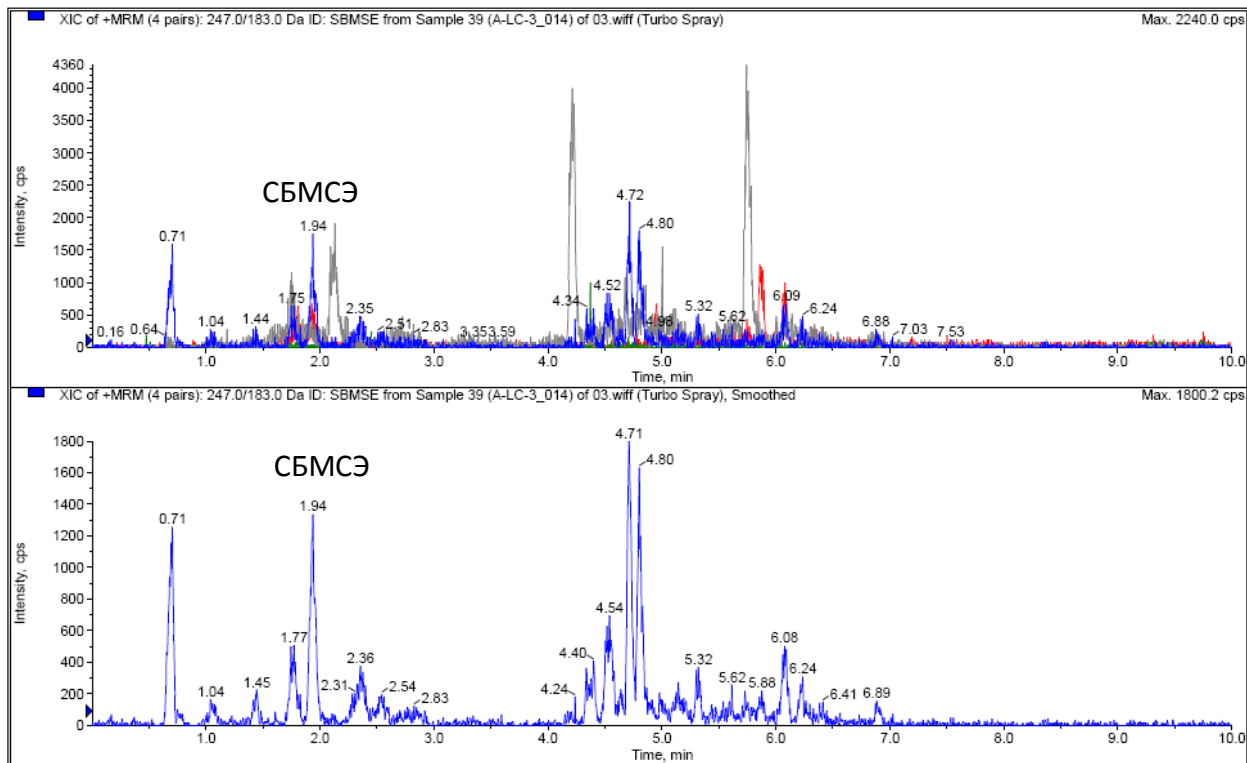


Рис. 103. Хромотограмма образца «А-LC-3», полученная при регистрации СБМСЭ. Верхняя хромотограмма – режим регистрации выбранных реакции для СБМСЭ и МСМТЭСЭ. Нижняя хромотограмма – режим регистрации выбранной реакции для СБМСЭ 247 → 183.

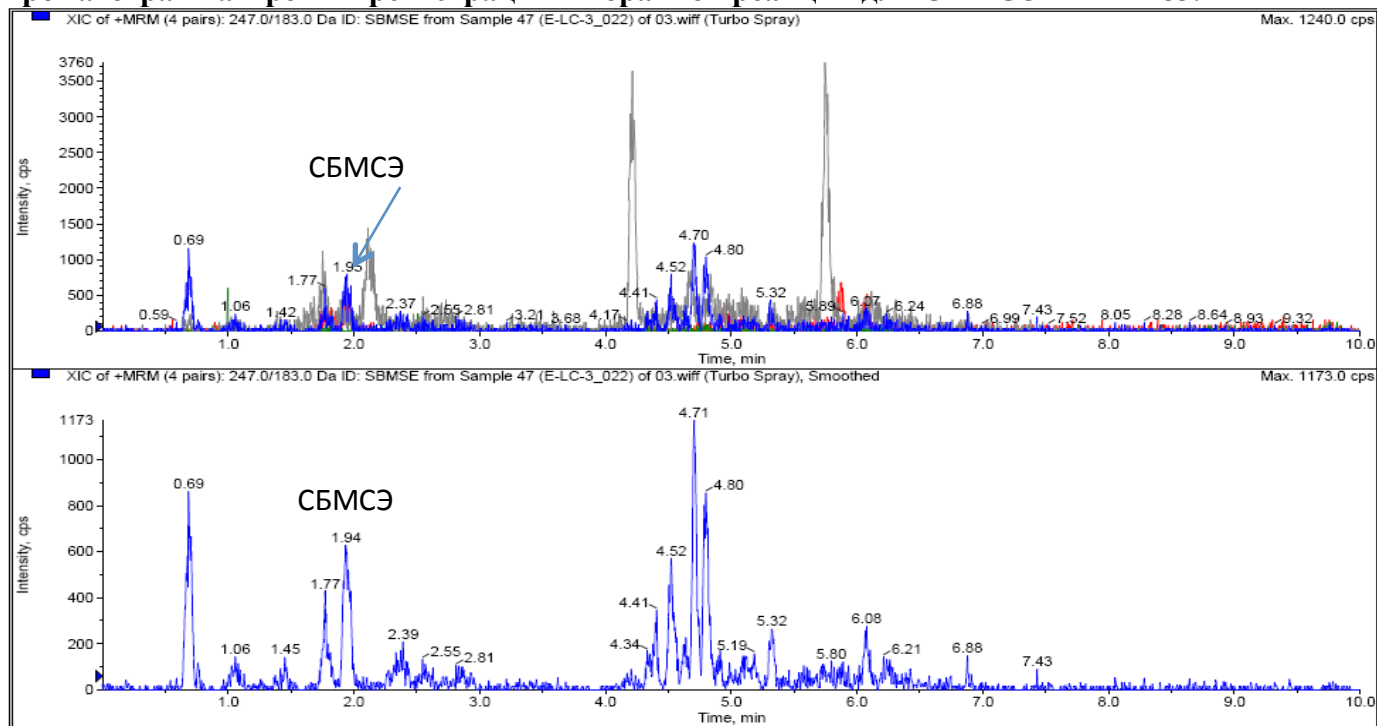


Рис. 104. Хромотограмма образца «Е-LC-3», полученная при регистрации СБМСЭ. Верхняя хромотограмма – режим регистрации выбранных реакции для СБМСЭ и МСМТЭСЭ. Нижняя хромотограмма – режим регистрации выбранной реакции для СБМСЭ 247 → 183.

4.3 Экспрессное определение ТДГК в природных водах и моче методом ВЭЖХ-МС/МС

Хроматографическое разделение проводили на колонке Acclaim RSLC (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 0.1% муравьиная кислота в воде и (Б) ацетонитрил. Хроматограммы получали в режиме градиентного элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин (Табл. 71). Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Таблица 71. Программа градиентного элюирования.

Время, мин	Содержание ацетонитрила Б, %
0	2
2	2
6	95
7	95
7.2	2
10.2	2

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выбранных ионных реакций: m/z 149→105 (определение), m/z 149→61 (качественное подтверждение). Температура переходного капилляра составляла 350°C, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi.

Разработанный ВЭЖХ-МС/МС подход для определения ТДГК демонстрирует хорошую чувствительность, селективность и устойчивость. ТДГК легко ионизировалась в условиях электрораспылительной ионизации, форма пиков была хорошей, а ионы-продукты, образующиеся в ячейке соударений - интенсивные (Рис. 105).

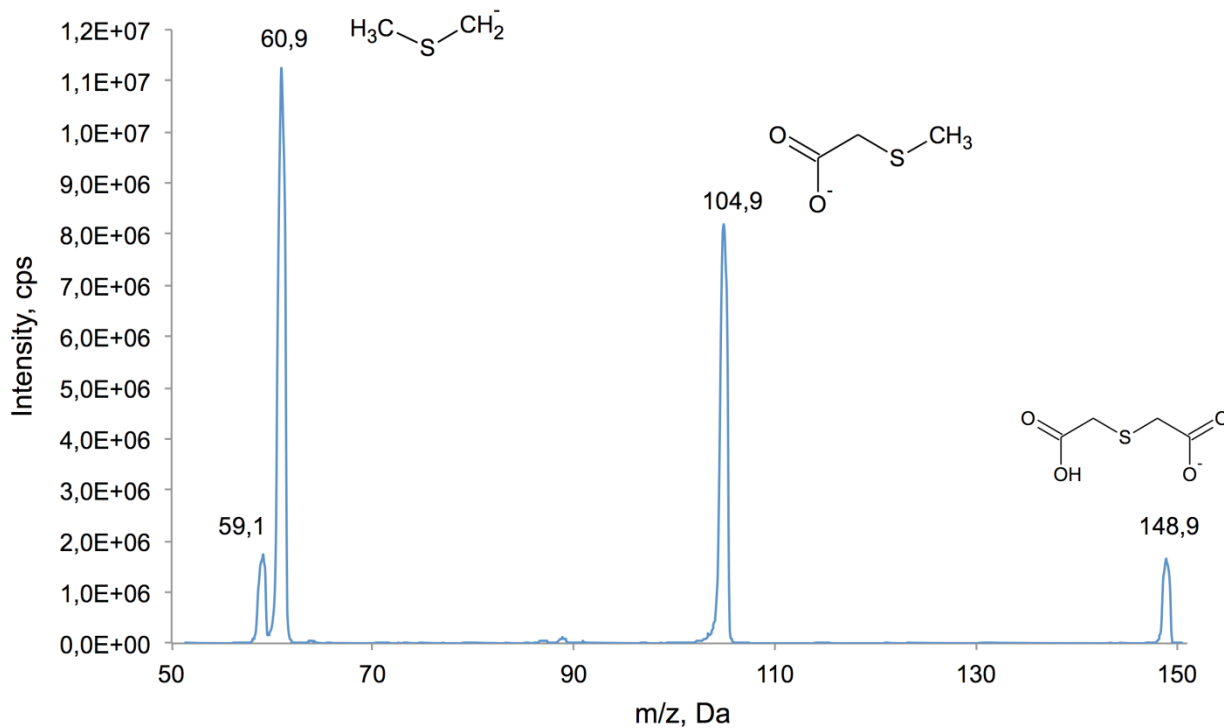


Рис.105. Масс-спектр фрагментных ионов ТДГК.

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

ТДГК является очень полярной молекулой за счет двух карбоксильных групп в своем составе. ТДГК частично существует в диссоциированном виде в окружающей среде и биологических жидкостях. Когда мы использовали 20 мМ ацетата аммония и ацетонитрил в качестве подвижной фазы удерживания ТДГК не наблюдалось и ТДГК элюировалась с мертвым временем колонки. Использование 0.1% муравьиной кислоты помогло в решении этой проблемы. Диссоциированная молекула ТДГК протонируется муравьиной кислотой и становится менее заряженной. Применение муравьиной кислоты привело к увеличению времени удерживания ТДГК, значение коэффициента емкости – 2.1.

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

Селективность. Мешающих пиков эндогенных соединений в моче и природных водах на времени удерживания ТДГК не наблюдалось. Хроматограммы пустых образцов мочи, природных вод и образцов мочи и природных вод с добавками ТДГК представлены на Рис. 106 - 107.

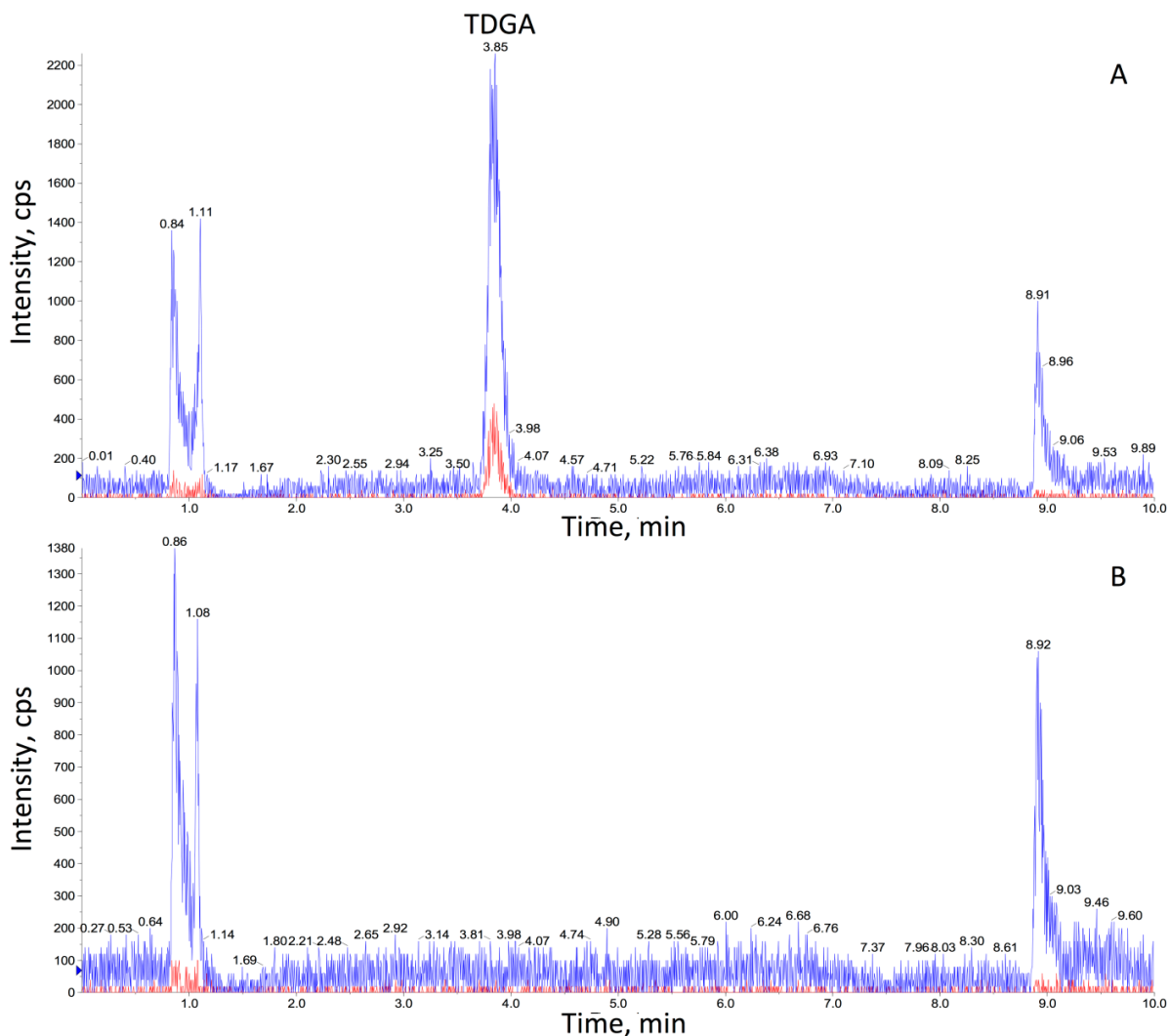


Рис. 106. Хроматограмма образца природных вод с добавкой 20 нг/мл ТДГК (А) и образца природных вод без ТДГК (Б).

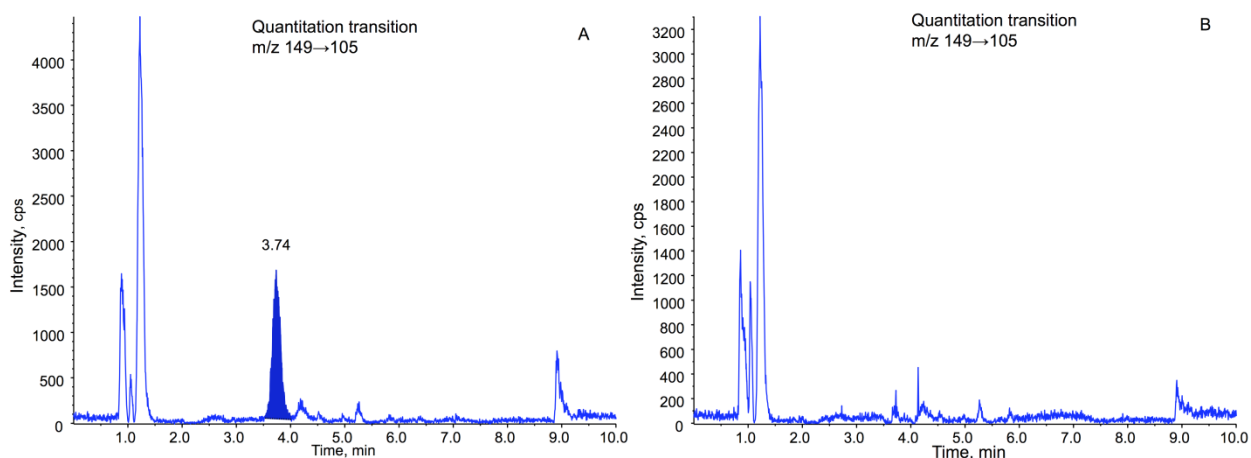


Рис. 107. Хроматограммы образца мочи с добавкой 150 нг мл^{-1} ТДГК (А) и образца мочи без ТДГК (Б).

Линейность. Градуировочные зависимости ТДГК в моче человека и природной воде были проанализированы в течение 3-недельного периода. Градуировочные зависимости для ТДГК были построены в диапазоне концентраций $150\text{-}5000 \text{ нг мл}^{-1}$ для определения ТДГК в моче и в диапазоне концентраций $20\text{-}2000 \text{ нг мл}^{-1}$ для определения ТДГК в природной воде. На каждом уровне концентрации было получено по две точки (коэффициенты корреляции больше, чем 0,998 для образцов мочи и природных вод с добавками ТДГК).

Каждая градуировочная зависимость показала отличную линейность с коэффициентами корреляции, как правило $= 0,99$. Градуировочная зависимость охватывала почти два порядка. Стандартные отклонения показывают отличную воспроизводимость измерений концентрации на каждом уровне

Предел обнаружения. Предел обнаружения разработанного способа находили как минимальное содержание определяемого вещества в пробе, которое может достоверно регистрироваться (отношение сигнал/шум для хроматографического пика 3:1). В моче значение шума определяли при концентрации ТДГК 100 нг мл^{-1} , в воде -20 нг мл^{-1} . Таким образом, в моче ПО составил 50 нг мл^{-1} , в воде -10 нг мл^{-1} .

Точность и воспроизводимость. В рамках процесса валидации, образцы контроля качества (КК) анализировали в 20 повторных измерениях. Результаты анализа образцов КК были приемлемыми для всех трех уровней концентраций. В качестве примера на

Рис. 108 - 109 представлены результаты анализа образца КК на низком уровне в природной воде и моче.

Среднее значение результатов для образцов низкого, среднего и высокого КК для ТДГК в воде (40, 95 и 380 нг мл⁻¹, соответственно) и моче (380, 2160 и 3360 нг мл⁻¹, соответственно) были в хорошем согласии с расчетными концентрациями в воде - 40, 100 и 400 нг мл⁻¹ и моче - 400, 2000 и 3500 нг мл⁻¹. Относительное стандартное отклонение для образцов КК на низком уровне было менее 6%, на среднем уровне менее 5%, а на высоком уровне менее 5%. Данные по воспроизводимости внутри- и между днями для ТДГК в воде и моче представлены в Табл. 72 и 73.

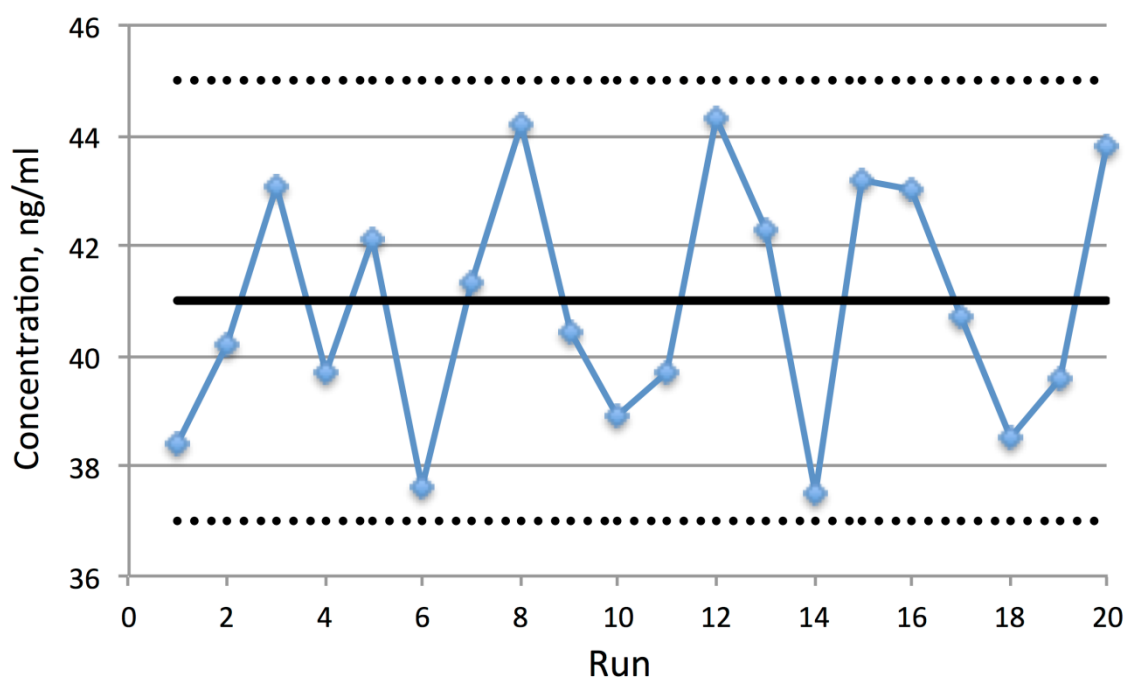


Рис. 108. Результаты анализа образцов КК на низком уровне концентраций: 41 ± 4 нг мл⁻¹ (среднее \pm стандартное отклонение) по сравнению с ожидаемым значением - 40 нг мл⁻¹. Двадцать вводов образцов контроля качества были получены в течение 4-дневного периода для демонстрации точности и воспроизводимости результатов во времени.

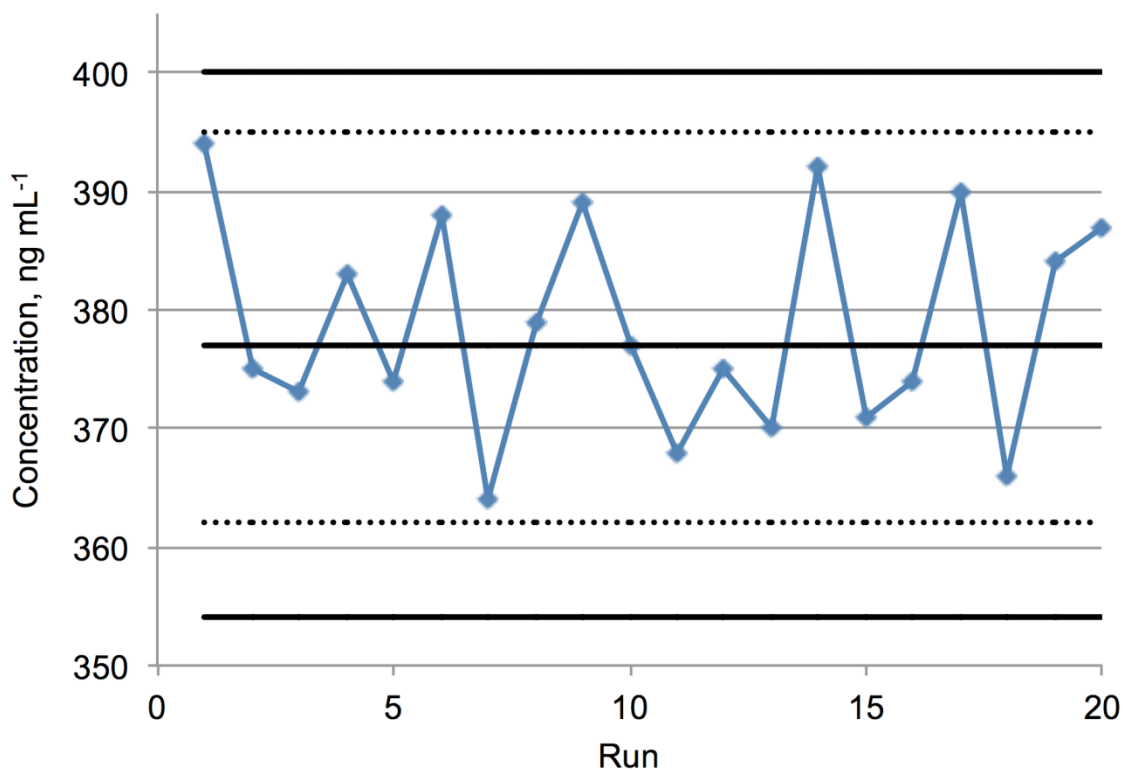


Рис. 109. Результаты анализа образцов КК на низком уровне концентраций: 378 ± 9 нг мл⁻¹ (среднее \pm стандартное отклонение) по сравнению с ожидаемым значением - 400 нг мл⁻¹. Двадцать вводов образцов контроля качества были получены в течение 4-дневного периода для демонстрации точности и воспроизводимости результатов во времени.

Таблица 72. Воспроизводимость и точность метода для образца КК с концентрацией 40 нг мл⁻¹ в воде

Параметр	ТДГК, внутри дня (n=5)	ТДГК, между днями (n=20)
Найденная концентрация (нг мл ⁻¹) (среднее \pm СО)	40 \pm 3	38 \pm 4
Точность (%)	105	97.5
Воспроизводимость (%)	7.5	10.5
Матричный эффект среднее \pm СО (%)	96 \pm 5	102 \pm 4

Таблица 73. Воспроизводимость и точность метода для образца КК с концентрацией 380 нг мл⁻¹ в моче

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

С учетом матричного эффекта все концентрации были между 94% и 96% от номинальных значений (Табл. 72 и 73). Этот факт означает то, что существенного эффекта матрицы не наблюдалось и что матричные компоненты не повлияли на ионизацию ТДГК. Результаты были воспроизводимыми и воспроизводимость внутри и между-днями были менее 3%. Значения точности были в диапазоне 94.5 - 103.0%. Точность и воспроизводимость образцов мочи и природной воды с добавками ТДГК продемонстрировали применимость разработанного подхода к различным образцам мочи и природной воды.

Стабильность. Результаты показали стабильное поведения ТДГК при тестируемых условиях. Нет существенной разницы (<5%) между концентрациями ТДГК в начале и в конце экспериментов.

Применение подхода для анализа реальных образцов природной воды и мочи человека. Несколько аналитических подходов было разработано для количественного определения ТДГК в биологических образцах и природных водах; однако по нашим сведениям, среди них не было подхода включающего в себя измерения ТДГК в моче и природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная ВЭЖХ-МС/МС методика определения ТДГК была использована в 30-м официальном профессиональном тестировании ОЗХО в лаборатории № 8 (Россия) для анализа образцов природных вод, на наличие ТДГК. Результаты показали присутствие ТДГК в воде (Рис. 110).

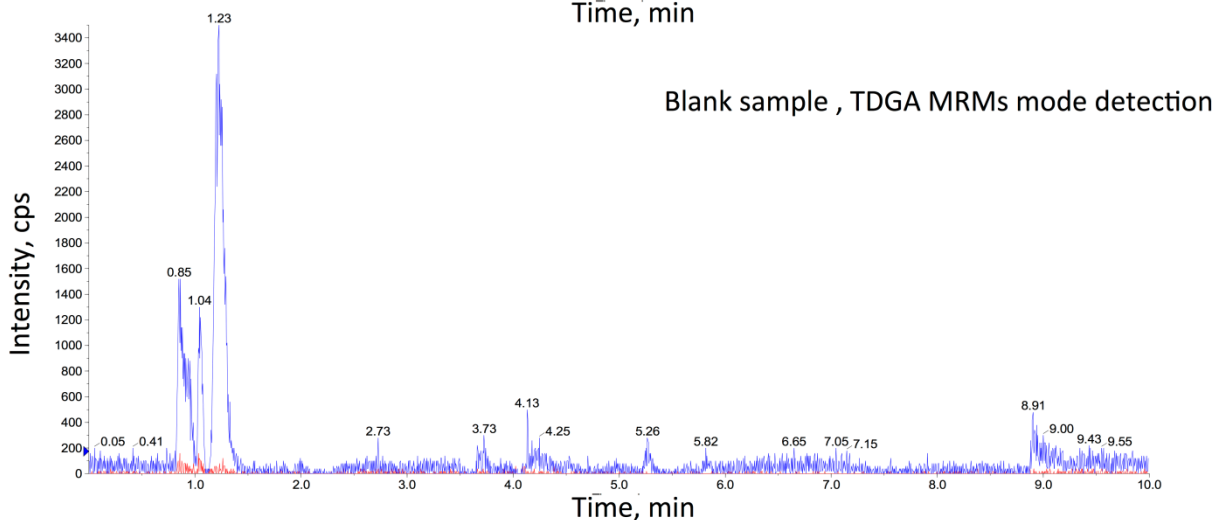
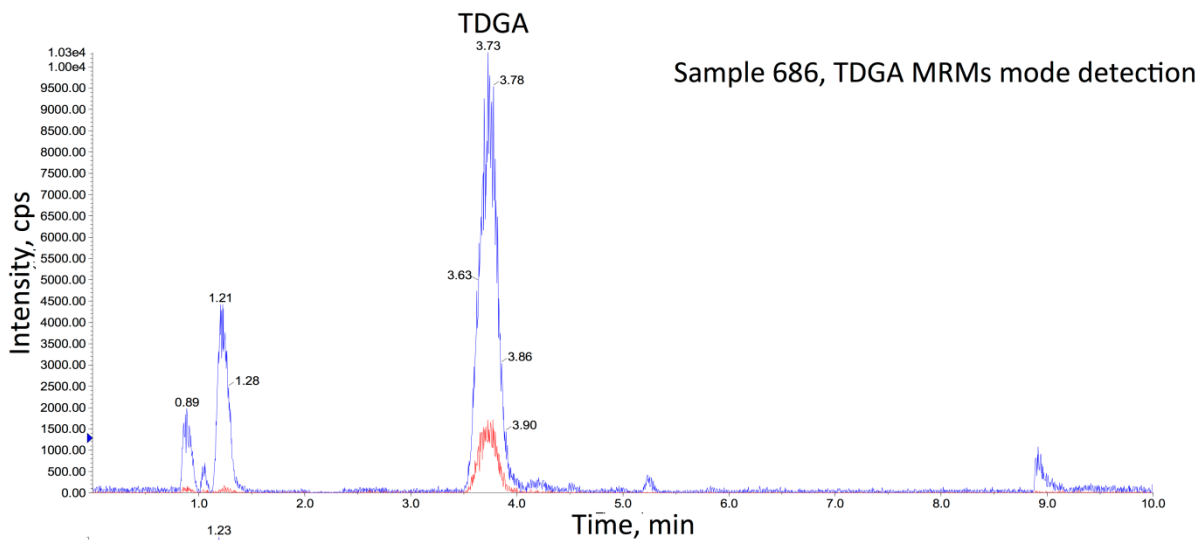


Рис. 110. Хроматограмма реального образца природных вод, анализируемого в рамках 30-го профессионального тестирования лабораторий ОЗХО.

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

5. Разработка способа обнаружения и определения продуктов трансформации люизита методом ВЭЖХ-МС-МС

Определение люизита и его продуктов трансформации (хлорвиниларсонистой (ХВАК) и хлорвиниларсоновой (ХВОАК) кислот) методом ГХ почти во всех случаях требует усложненной пробоподготовки и длительного подбора реагентов для модификации исследуемого вещества, что влечет за собой увеличение времени анализа и не всегда дает возможность селективного определения вещества.

5.1. Определение хлорвиниларсонистой и хлорвиниларсоновой кислот в водных объектах методом капиллярного электрофореза с прямым спектрофотометрическим детектированием

Присутствие хлорвиниларсонистой (ХВАК) или хлорвиниларсоновой (ХВОАК) кислот в водной среде является косвенным доказательством применения, хранения, производства и переработки высокотоксичного отравляющего вещества - люизита, который подлежит полному запрещению и уничтожению согласно Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении [1]. Механизм кожно-нарывного действия люизита связан с разрушением клеточных структур. ХВАК и ХВОАК являются мышьякорганическими соединениями, не встречающимися в природе и являющиеся продуктами трансформации (гидролиза и окислительного гидролиза) люизита (Рис.111).

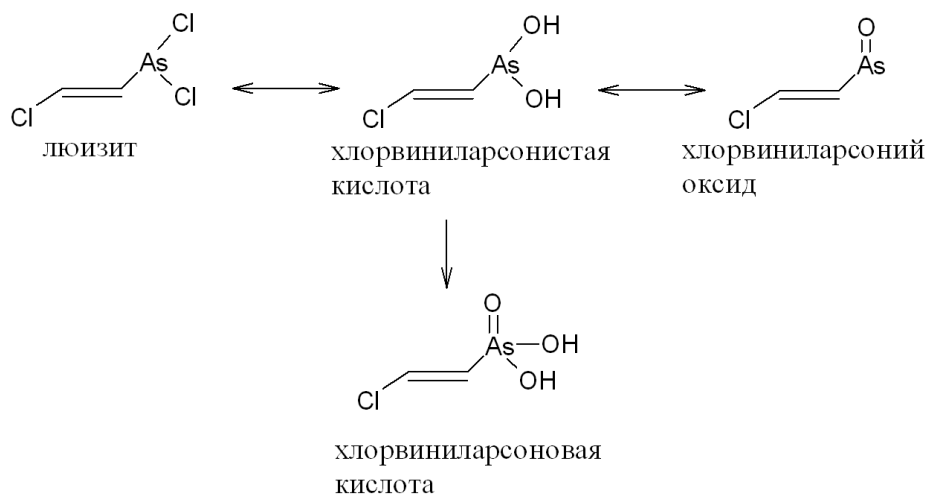


Рис. 111. Схема трансформации люизита

Хлорвиниларсонистая и хлорвиниларсоновая кислоты представляют собой органические кислоты средней силы, обладают высокими температурами плавления (с разложением), нелетучи [138]. Хорошо растворимы в воде и хуже в полярных органических растворителях. В связи с тем, что образующиеся кислоты являются достаточно стойкими соединениями и сохраняются в различных средах чрезвычайно долго, их принято расценивать, как «свидетелей» запрещенной по Конвенции деятельности, а методы их идентификации – как весьма актуальные.

Выбор начальных условий разделения. В методе капиллярного зонного электрофореза разделение веществ достигается за счет различий в собственной электрофоретической подвижности разделяемых веществ. Электрофоретическая подвижность органического иона зависит от двух факторов – заряда и ионного радиуса. Исследуемые вещества представляют собой слабые органические кислоты, поэтому в щелочной среде существуют, практически полностью, в виде анионов (за счет депротонирования). Можно предположить, что этих отличий в размерах окажется достаточно, для того чтобы обеспечить исследуемым веществам существенно различающуюся электрофоретическую подвижность, что приведет к их селективному разделению методом КЗЭ. Таким образом, для достижения необходимых параметров разделения (эффективности и селективности) необходимо варьировать состав ведущего электролита, напряжение и диаметр капилляра.

Для детектирования веществ в методе капиллярного электрофореза чаще всего проводят измерение оптической плотности зоны пробы на выходе из капилляра (имеется в виду выход из участка капилляра, где происходит разделение пробы, который определяется т.н. эффективной длиной капилляра). Для детектирования чаще всего используют характеристичные длины волн, отличающиеся максимальным поглощением определяемого вещества (прямое спектрофотометрическое детектирование) или длины волн, отвечающие максимальному поглощению специально введенного в состав буферного раствора красителя (косвенное детектирование). Однако метод прямого детектирования более прост и универсален.

В качестве рабочего капилляра из соображений более высокой чувствительности был выбран немодифицированный капилляр с внутренним диаметром 75 мкм и эффективной длиной 50 см (общая длина 60 см). Электрофореграмма, полученная в указанных в разделе 2.2.1 условиях представлена на Рис. 112.

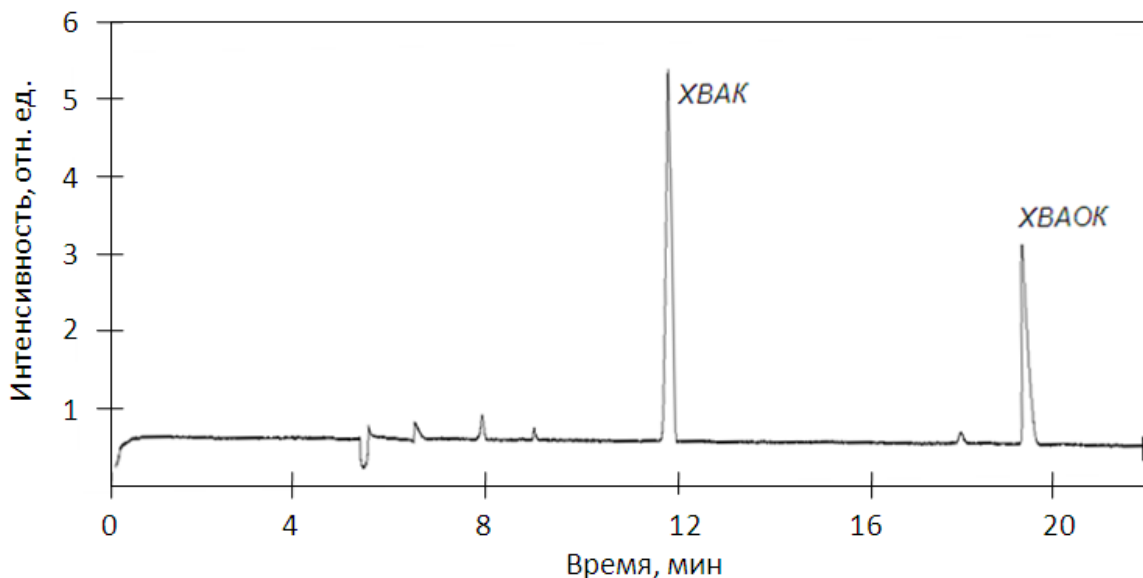


Рис. 112. Электрофореграмма смеси 2-хлорвиниларсоновой и 2-хлорвиниларсонистой кислот. Концентрация компонентов в смеси 25 мг/л

Из представленного рисунка видно, что оба компонента анализируемой смеси полностью разделяются между собой. В Табл. 74 представлены полученные характеристики разделения, позволяющие проводить селективное разделение XBAK и XBAOK в смеси.

Таблица 74. Характеристики разделения исследуемых соединений.

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

Выбранные для разделения компонентов условия позволяют проводить успешное и селективное разделение пробы. Для дальнейшей оптимизации схемы определения

проводили варьирование рН буферного раствора ведущего электролита и выбирали подходящие параметры детектирования, промывки капилляра и ввода пробы.

Выбор длины волны для прямого детектирования. При проведении прямого спектрофотометрического детектирования измеряют оптическую плотность раствора выходящего из капилляра. Для достижения максимальной чувствительности, обычно используют длину волны соответствующую максимуму поглощения исследуемых веществ, или находящуюся вблизи этого максимума. Также при выборе длины волны необходимо учитывать величину фонового сигнала и уровень шума, которые обычно определяются поглощением компонентов ведущего электролита при заданной длине волны.

Для выбора оптимальных условий прямого детектирования и построения спектров поглощения анализируемых компонентов был снят ряд электрофореграмм двухкомпонентной смеси кислот в диапазоне длин волн от 190 до 254 нм. Полученные спектры поглощения представлены на Рис. 113.

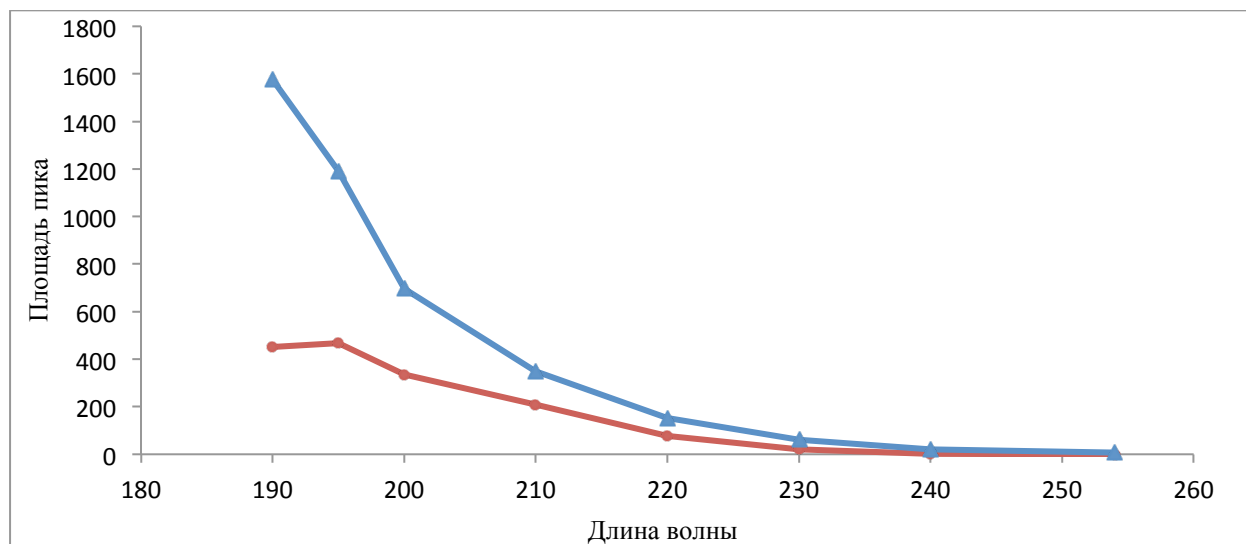


Рис. 113. Зависимость площади пиков ХВАК и ХВАОК от длины волны детектирования: ▲ - ХВАК; ● - ХВАОК.

Максимумы поглощения исследуемых веществ находятся в коротковолновой (дальней) области ультрафиолетового спектра за минимальной границей рабочего диапазона прибора (190 нм). Однако при уменьшении длины волны наряду с интенсивностью аналитического сигнала возрастает шум базовой линии, что обусловлено поглощением воды и растворенного в ней кислорода. С уменьшением

длины волны детектирования увеличение шума превалирует над ростом оптической плотности, поэтому при детектировании в области 190 нм соотношение сигнал/шум не достигает максимального значения. Однако в районе 195-200 нм поглощение ведущего электролита существенно снижено, коэффициенты оптической экстинкции аналитов еще достаточно высоки. Таким образом, оптимальные результаты достигаются при использовании длины волны 195 нм (которая применялась в дальнейшей работе для прямого детектирования).

Оптимизация способа промывки капилляра и объема вводимой пробы. В капиллярном электрофорезе большое значение с точки зрения стабильности и воспроизводимости получаемых результатов имеет программа промывки капилляра между анализами. На этой стадии анализа происходит удаление мешающих компонентов, задержавшихся в капилляре после исследования предыдущего образца, регенерируются гидроксильные группы, находящиеся на поверхности кварцевого капилляра, что необходимо для достижения стабильных времен миграции определяемых веществ. Использование недостаточно оптимизированной программы промывки может приводить к неудовлетворительному разделению смеси, дрейфу времен миграции и появлению пиков-артефактов, мешающих проведению анализа.

На стадии оптимизации программы промывки капилляра между анализами варьировали продолжительности воздействия на капилляр двумя промывочными растворами: деионизированной водой и рабочим электролитом. Критерием оптимизации являлось максимально быстрое получение стабильной базовой линии, с минимально возможным на данной длине волны шумом. Наилучшие результаты были получены при использовании программы промывки, представленной в Табл. 75.

Таблица 75. Программа промывки капилляра

Порядок промывки	Раствор	Время промывки, мин
1	Деионизованная вода	3
2	Рабочий буферный раствор	3

Увеличение объема вводимой пробы позволяет повысить чувствительность анализа, однако с увеличением объема пробы уменьшается эффективность разделения. Влияние объема вводимой пробы, как функции давления ввода пробы и времени, на площадь пика и эффективность показано на Рис. 114. Давление ввода пробы выбирали постоянным 30 мбар, время ввода варьировали в диапазоне от 4 до 18 с.

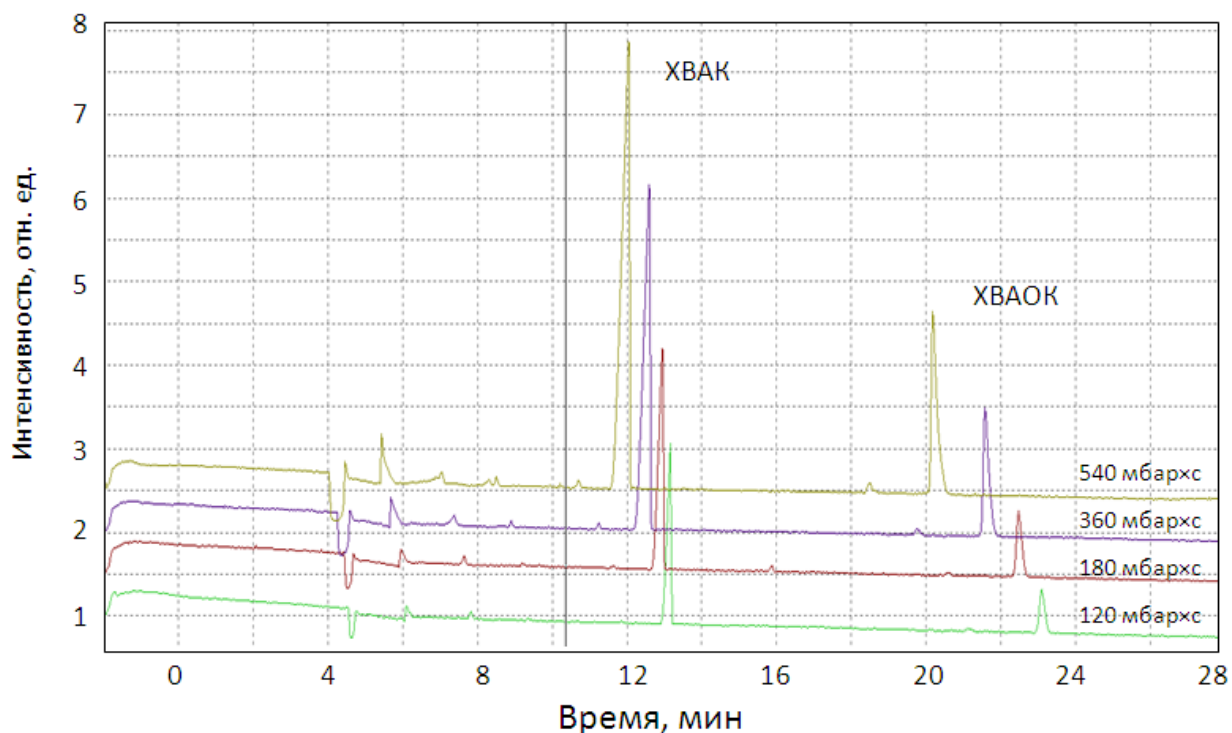


Рис. 114. Наложение электрофореграмм, полученных для разного объема вводимой пробы, в одном масштабе. Концентрация компонентов в смеси 10 мг/л. Боратный буфер 30 мМ (рН 8,85), внутренний диаметр капилляра = 75 мкм, $L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$ см, напряжение - 20 кВ (анодный вариант), длина волны - 195 нм, температура - 20°C

Объем вводимой пробы прямо пропорционально влияет на площадь пика и обратно пропорционально на эффективность разделения. При отсутствии сильного влияния компонентов матрицы это может быть использовано для повышения чувствительности определения.

Выбор рабочего напряжения, концентрации раствора ведущего электролита.

Напряжение, прикладываемое к капилляру для достижения разделения компонентов пробы, является важным фактором, влияющим на получаемый результат. Повышение напряжения приводит к ускорению электроосмотического потока и увеличению собственной скорости дрейфа ионов определяемых веществ, что позволяет проводить

более экспрессный анализ, однако значительное увеличение прикладываемого напряжения может приводить к перегреву капилляра, протеканию в нем электролиза, приводящего к образованию пузырьков газ внутри капилляра, что существенно снижает стабильность работы всей системы. Уменьшение напряжения практически не влияло на селективность разделения, “растягивая” электрофореграмму по оси времени.

Концентрация буферного раствора в ведущем электролите может оказывать существенное влияние на селективность разделения пробы. В работе изучали влияние концентрации буфера на картину разделения. Время анализа при использовании 20 мМ буфера наименьшее, однако снижается воспроизводимость результатов. Поэтому для дальнейшей работы был выбран боратный буфер с рабочей концентрацией 30 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации рабочего буфера приводило лишь к увеличению времени анализа.

Построение градуировочных зависимостей. В выбранных условиях были построены градуировочные зависимости для компонентов анализируемой смеси в диапазоне концентраций 1.0 – 40 мкг/мл для 2-хлорвиниларсонистой кислоты и 1.5-60 мкг/мл для 2-хлорвиниларсоновой кислоты, рассчитаны пределы обнаружения и метрологические характеристики анализа (Табл. 76).

Предложенный подход характеризуется необходимой чувствительностью, хорошими метрологическими характеристиками и экспрессностью определения

Таблица 76. Метрологические характеристики разработанного подхода

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

Изучение мешающего влияния матрицы и проверка правильности разработанного подхода. Предложенный подход был опробован при анализе растворов

смесей анализируемых веществ в реальных пробах воды (проверка правильности подхода методом введено – найдено, табл. 77).

Таблица 77. Проверка правильности разработанного подхода методом «введено-найденно»

Проба воды	Введено в смеси, мг/л	Найдено, мг/л	
		ХВАК	ХВАОК
Вода из скважины	2	2.0±0.3	1.9±0.2
Речная вода	2	2.0±0.1	1.9±0.2
Колодезная вода	2	2.0±0.1	1.7±0.2
Водопроводная вода	2	1.7±0.2	1.4±0.1
Вода сточная	2	1.4±0.2	1.5±0.3

В Табл. 78 представлены данные по химическому составу использованных при апробации методики вод.

Полученные электрофореграммы представлены на Рис. 115. В качестве объектов для исследования выбирали образцы воды, существенно отличающиеся по ключевым параметрам, характеризующим химический состав – концентрациям металлов, анионов, органических веществ и другим показателям (Табл. 78).

Как видно из представленных результатов мешающее влияние матрицы в пяти исследованных реальных образцах вод практически не сказывается на определении анализируемых компонентов на уровне содержания 2 мг/л и выше. Таким образом, определению аналитов не мешает присутствие неорганических анионов, металлов, повышенные значения жесткости, мутности и цветности.

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

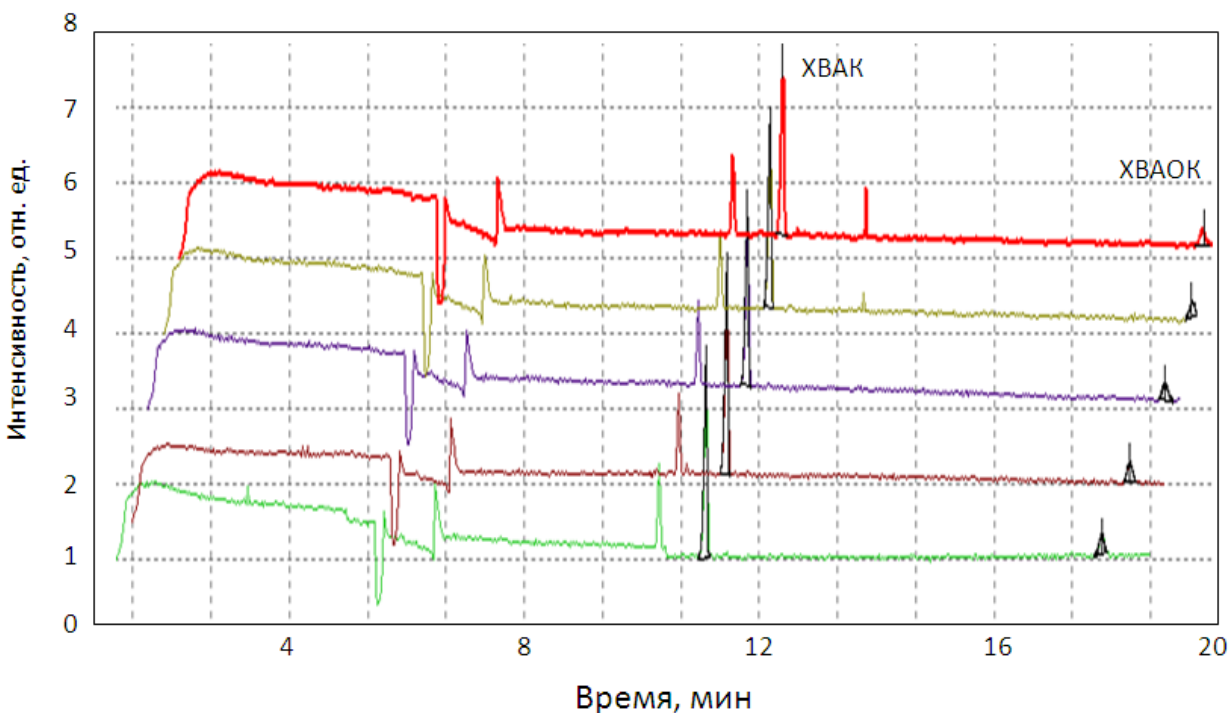


Рис. 115. Наложение электрофореграмм, полученных при использовании различных реальных образцов вод в качестве матрицы, в одном масштабе.

Таблица 78. Некоторые показатели химического состава образцов природных вод, выбранных для проведения исследований

Параметр	Вода из скважины	Речная вода	Колодезная вода	Водопродная вода	Вода сточная
Цветность в градусах	0	9	1	1	72
Мутность, ЕМФ, мг/л	0.7	117	1.4	0.3	0
Водородный показатель (рН)	7.09	7.11	7.14	7.17	7.35
Общая жесткость, мг-экв/л	4.15	8.89	7.88	6.07	4.95
Хлориды, мг/л	13.1	13.5	42.5	1.36	4.4
Сульфаты, мг/л	26.9	68.0	90.0	9.34	21.1
Марганец, мг/л	0.023	0.085	0.031	0.041	0.090
Фториды, мг/л	0.12	0.68	0.19	0.45	0.1
Железо общее, мг/л	0.01	8.50	0.22	0.06	12.15
Нитраты, мг/л	29.6	<0.01	<0.01	1.20	0.4
Окисляемость перманганатная, мг O ₂ /л	4	30	5	13	15

5.2 Разработка способа одновременного обнаружения и определения ХВАК и ХВАОК методом ВЭЖХ-МС-МС

Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования ХВАК. На стадии проведения оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования проводили установление влияния параметров, отвечающих за настройки работы квадруполей в масс-детекторе (потенциал декластеризации, входной потенциал на нулевом квадруполе масс-анализатора, энергия фрагментация и др.) и выбор оптимальных пар MRM переходов для масс-спектрометрического детектирования 2-хлорвиниларсонистой кислоты;

Работу проводили в режиме прямого ввода с использованием шприцевого насоса (использовали водно-ацетонитрильный раствор 2-хлорвиниларсонистой кислоты концентрацией 500 нг/мл). На рисунке 116 представлен масс-спектр раствора 2-хлорвиниларсонистой кислоты, в котором присутствует депротонированная молекула ХВАК с m/z 169 (режим регистрации отрицательных ионов) и интенсивный пик иона с m/z 213. Происходит депротонирования одной из гидроксильных групп, которые обладают кислотными свойствами.

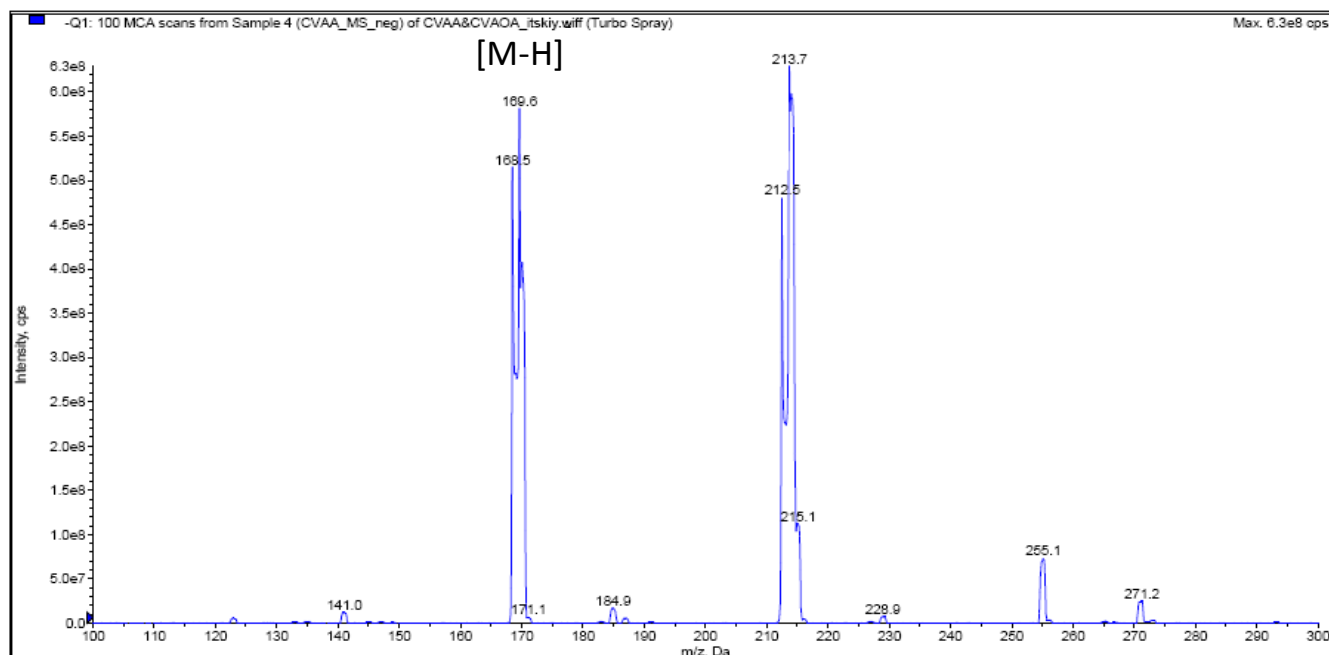


Рис. 116. Масс-спектр ХВАК. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

На рисунке 117 представлен масс-спектр ионов-продуктов производного ХВАК с m/z 213, полученный в режиме регистрации отрицательных ионов в варианте электрораспылительной ионизации, при этом использовали следующие оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования: потенциал декластеризации -12 В, входной потенциал на нулевом квадруполе -5 В, энергия фрагментации -11 В, диапазон сканирования масс - 50-230 m/z . Наиболее интенсивным MRM переходом оказался $213 \rightarrow 169$, при этом образование этих фрагментов происходит с разрушением связи С-О депротонированной молекулы с m/z 213.

Следующим этапом оптимизации масс-спектрометрического детектирование ХВАК является выбор подходящих MRM переходов.

На первом этапе работы проводили исследование влияния энергии фрагментации (CE) в камере соударения масс-спектрометра на характер спектра ионов-продуктов, образующихся при распаде наиболее интенсивного пика иона, присутствующего в растворе 500 нг/мл ХВАК с m/z 213. На рисунке 117 представлен масс-спектр ионов-продуктов, образующихся в результате фрагментации иона с $m/z=213$, на котором присутствуют ионы с m/z 213 и m/z 169, последний из которых соответствует депротонированной молекуле ХВАК.

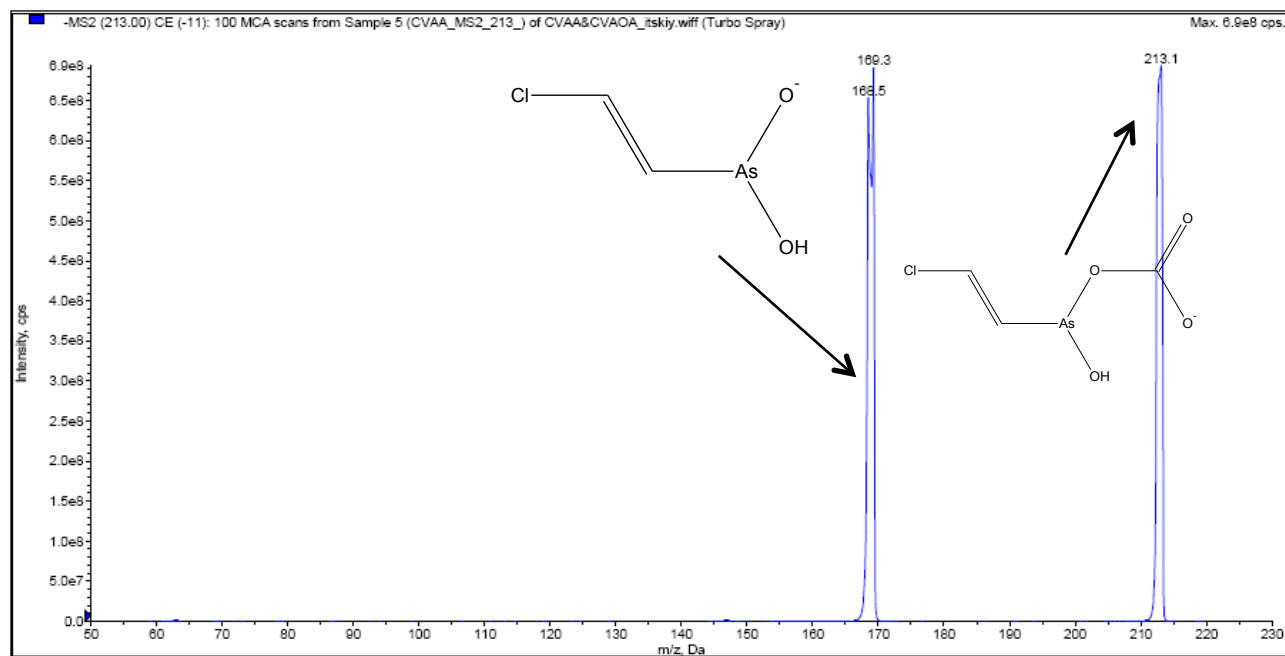


Рис. 117. Масс-спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы с $m/z=213$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что ион с $m/z=213$, присутствующий в растворе 500 нг/мл ХВАК, представляет собой аддукт ХВАК с присутствующей в растворе муравьиной кислотой.

Таким образом, для получения максимального аналитического сигнала при детектировании ХВАК в выбранном варианте источника ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов необходимо использовать следующие параметры работы масс-спектрометра (табл. 79).

Таблица 79. условия детектирования ХВАК

Параметр	Оптимизированное значение
потенциал декластеризации	-12 В
входной потенциал на нулевом квадруполе	-5 В
энергия фрагментации	-11 В
выбранный MRM переход №1	213 → 169
полярность регистрируемых ионов	отрицательные

На стадии проведения оптимизации условий тандемного масс-спектрометрического детектирования проводили установление влияния параметров, отвечающих за настройки работы квадруполей в масс-детекторе (потенциал декластеризации, входной потенциал на нулевом квадруполе масс-анализатора, энергия фрагментация и др.) и выбор оптимальных пар MRM переходов для масс-спектрометрического детектирования 2-хлорвиниларсоновой кислоты;

Работу проводили в режиме прямого ввода с использованием шприцевого насоса (использовали водно-ацетонитрильный раствор 2-хлорвиниларсоновой кислоты концентрацией 500 нг/мл). На рисунке 118 представлен масс-спектр раствора 2-хлорвиниларсоновой кислоты, на котором присутствует депротонированная молекула ХВАОК с $m/z=185$ (режим регистрации отрицательных ионов). Вероятней всего происходит за счет депротонирования одной из гидроксильных групп, которая обладает ярко-выраженными кислотными свойствами.

Следующим этапом оптимизации масс-спектрометрического детектирование ХВАОК является выбор подходящих MRM переходов.

На первом этапе работы проводили исследование влияния энергии фрагментации (CE) в камере соударения масс-спектрометра на характер спектра ионов-продуктов, образующихся при фрагментации депротонированного молекулярного иона ХВАОК с m/z 185.

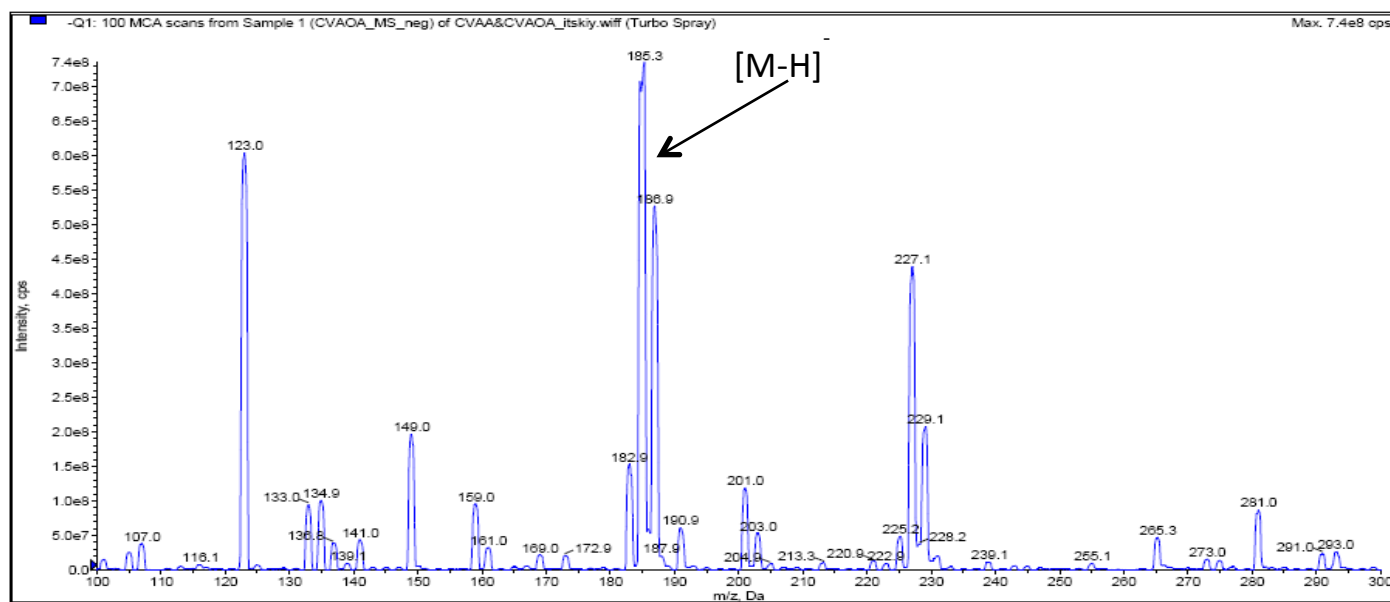


Рис. 118. Масс-спектр ХВАОК. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

На рисунке 119 представлен масс-спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы ХВАОК с m/z 185, полученный в режиме регистрации отрицательных ионов в варианте электрораспылительной ионизации, при этом использовали следующие оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования: потенциал декластеризации -40 В, входной потенциал на нулевом квадруполе -5 В, энергия фрагментации -20 В, диапазон сканирования масс - 50-200 m/z . Наиболее интенсивными MRM переходами оказались: $185 \rightarrow 123$ (брутто-формула иона-продукта HAsO_3) и $185 \rightarrow 149$ (брутто-формула иона-продукта $\text{C}_2\text{H}_2\text{AsO}_3$), при этом образование этих фрагментов происходит с разрушением углеродного скелета депротонированной молекулы ХВАОК.

Таким образом, для получения максимального аналитического сигнала при детектировании ХВАОК в выбранном варианте источника ионизации в режиме

регистрации отрицательных ионов необходимо использовать следующие параметры работы масс-спектрометра (табл. 80).

Таблица 80. Оптимальные условия детектирования ХВАОК с использованием электрораспылительной ионизации в режиме регистрации отрицательных ионов

Параметр	Оптимизированное значение
потенциал декластеризации	-40 В
входной потенциал на нулевом квадруполе	-5 В
энергия фрагментации	-20 В
выбранный MRM переход №1	185 → 123
выбранный MRM переход №2	185 → 149
полярность регистрируемых ионов	отрицательные

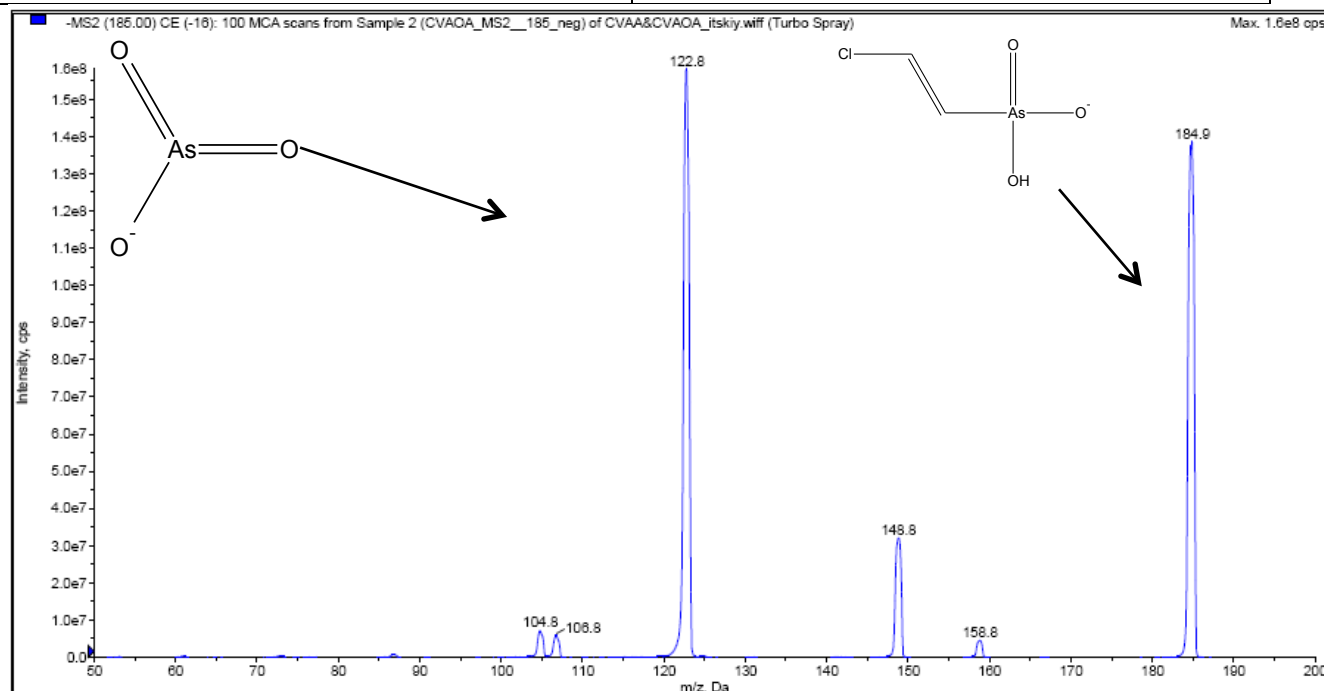


Рис. 119. Масс-спектр ионов-продуктов депротонированной молекулы с $m/z=185$. Режим электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательных ионов.

В качестве неподвижной фазы при определении ХВАК и ХВАОК использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом SynergiPolar, длиной 25 мм, внутренним диаметром 2,0 мм, размером зерна сорбента 4 мкм, фирмы «Phenomenex». ХВАК и ХВАОК обладают различной кислотностью, поэтому в ходе определения ХВАК и ХВАОК использовали различные программы градиентного элюирования, в условиях которых удастся добиться приемлемых значений хроматографических параметров разделения этих кислот. В таблице 81 представлена программа градиентного элюирования, которую использовали при хроматографическом определении ХВАК, в условиях которой коэффициент емкости (k) ХВАК составляет 5.6. В таблице 82 представлена программа градиентного элюирования, которую использовали при хроматографическом определении ХВАОК, в условиях которой коэффициент емкости ХВАОК равняется 0.7. Для того чтобы уменьшить размывание пиков ХВАК и ХВАОК, в ходе анализа в качестве подвижной фазы использовали 0.5 % водный раствор муравьиной кислоты, которая подавляет диссоциацию кислот и в растворе преимущественно существуют незаряженные формы ХВАК и ХВАОК. (расчетные значения $pK_{a,ХВАК}=4.5$, $pK_{a,ХВАОК}=3.0$, согласно программе ACD/ChemSketch 10.0). В таблице 83 представлены хроматографические параметры при определении ХВАК и ХВАОК.

Таблица 81. Условия хроматографического разделения при определении ХВАК в водных растворах и в модельных образцах человеческой мочи. Подвижная фаза А – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В – ацетонитрил

объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.30 мл/мин;
Программа градиентного элюирования (градиент 1)	0.00 – 2.00 мин – 10 % В, 2.01- 9.00 мин – 10%-60% В, 9.01-10.50 мин- 60 % В, 10.51- 10.80 мин- 60%-10% В, 10.81-11.80 мин – 10 % В

Таблица 82. Условия хроматографического разделения при определении ХВАОК. Подвижная фаза А – 0.5 % раствор муравьиной кислоты в воде, подвижная фаза В – ацетонитрил

объем вводимой пробы	0.020 мл;
температура термостата колонки	20 °С;
скорость подачи элюента	0.30 мл/мин;
Программа градиентного элюирования	0.00 – 2.00 мин – 5 % В, 1.51- 7.00 мин – 5%-70% В, 7.01-9.50 мин- 70 % В, 9.51-9.80 мин- 70%-5% В, 9.81-11.80 мин – 5 % В

Таблица 83. Хроматографические параметры при определении ХВАК и ХВАОК. При расчетах использовали величину мертвого времени равную 1.10 мин

Соединение	Параметры	Время удерживания, мин	Коэффициент емкости	N, ТТ/м
ХВАК		7.30	5.6	16000
ХВАОК		1.87	0.7	9000

На рисунках 120 - 121 представлены хроматограммы стандартных водных растворах, содержащих ХВАК и ХВАОК, полученные при использовании выбранных условиях хромато-масс-спектрометрического определения ХВАК и ХВАОК.

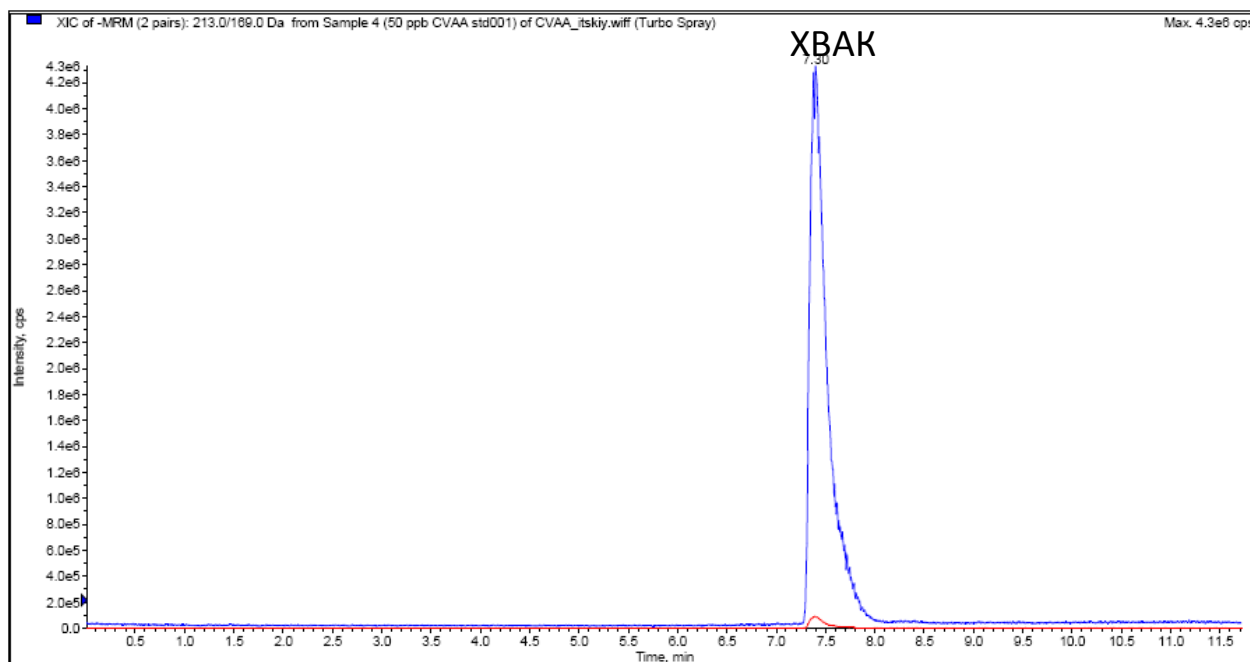


Рис. 120. Хроматограмма стандартного водного раствора 50 нг/мл ХВАК. Программа градиентного элюирования указана в тексте.

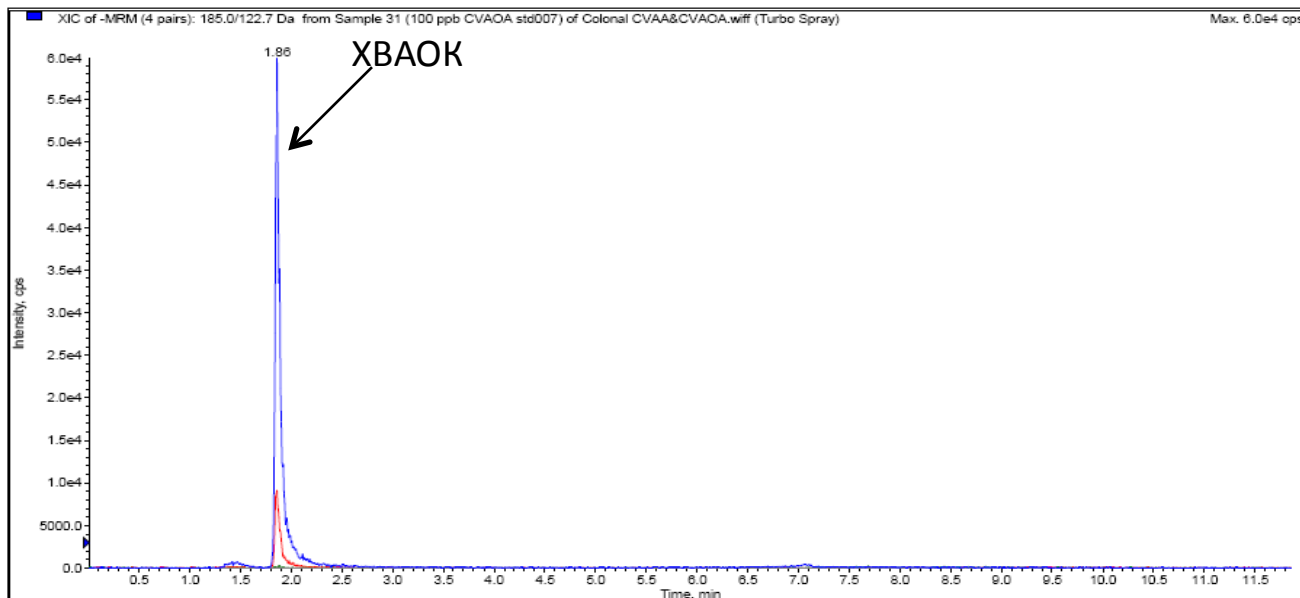


Рис. 121. Хроматограмма стандартного водного раствора 100 нг/мл ХВАОК. Программа градиентного элюирования указана в тексте.

На стадии пробоподготовки мочи использовали очистку исследуемых образцов на картриджах. Для этого образец мочи подщелачивали аммиаком до pH=9, чтобы перевести ХВАК и ХВАОК в анионы, которые плохо удерживаются на сорбентах картриджей, и далее пропускали пробу через картридж.

На первом этапе оптимизации процедуры пробоподготовки исследовали влияние типа сорбента картриджа на пропускание ХВАК и ХВАОК. В ходе работы провели очистку образцов мочи на двух типах картриджей: Strata C (смешанный сорбент с лигандами C8 и катионно-обменными группами) и Strata X (сорбент с привитыми группами сульфобензоловой кислоты, обладающий катионно-обменными свойствами). Критерием выбора оптимального картриджа является максимальное пропускание ХВАК и ХВАОК через сорбент картриджа. Расчет величины пропускания проводили согласно формуле:

$$\text{Пропускание, \%} = \left(\frac{S_{\text{хва(о)к}} \text{ после прохождения через картридж}}{S_{\text{хва(о)к}} \text{ в пробе до процедуры пробоподготовки}} \right) * 100\%$$

На рисунках 122 - 128 представлены хроматограммы модельных образцов человеческой мочи, искусственно загрязненных ХВАК и ХВАОК, до процедуры пробоподготовки и после стадии пропускания через картридж.

В таблице 83 представлены результаты расчета пропускания ХВАК и ХВАОК через два типа картриджей, используемых в ходе процедуры пробоподготовки. Расчет величины пропускания ХВАК и ХВАОК проводили относительно содержания ХВА(О)К в стандартном водном растворе до процедуры пробоподготовки.

Таблица 83. Расчет пропускания ХВАК и ХВАОК через картриджи Strata C и Strata X в ходе процедуры пробоподготовки (P=0.95, n=3)

	Strata C	Strata X
Пропускание _{ХВАК} , %	95±7	62±7
Пропускание _{ХВАОК} , %	88±9	24±5

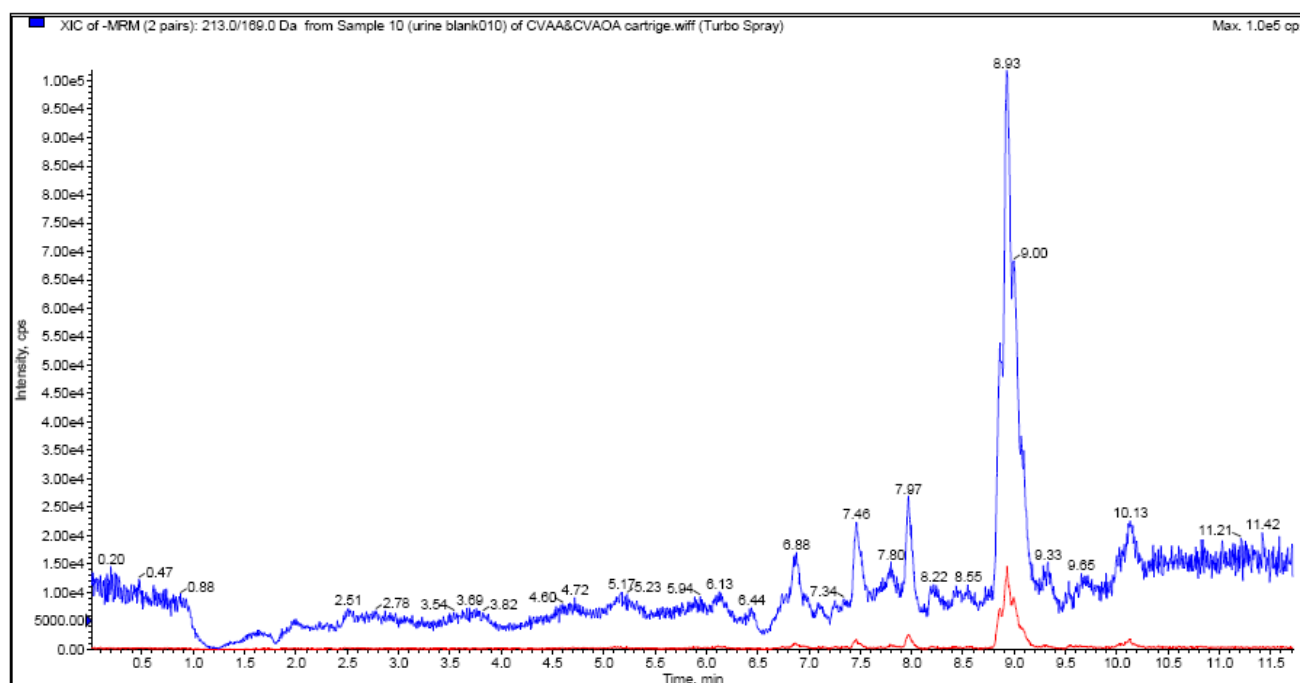


Рис. 122. Хроматограмма образца человеческой мочи, не содержащей ХВАК и ХВАОК (получена при детектировании ХВАК). Программа градиентного элюирования представлена в тексте.

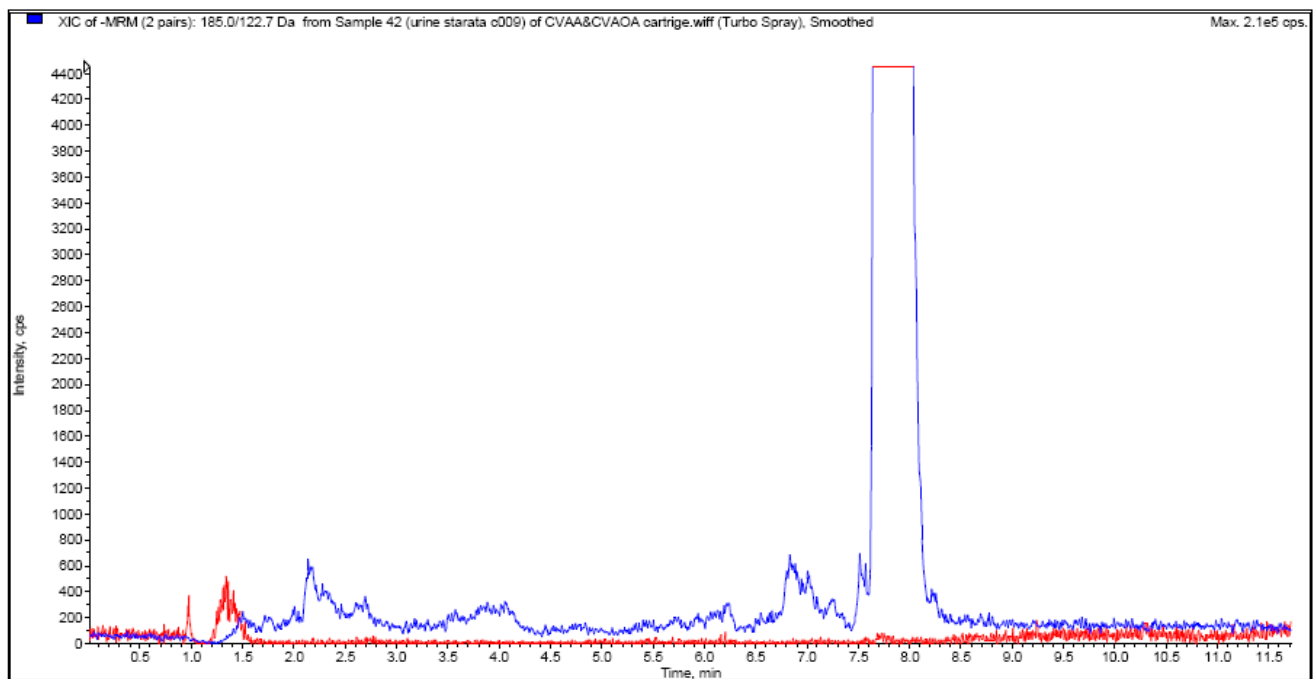


Рис. 123. Хроматограмма образца человеческой мочи, не содержащей ХВАК и ХВАОК (получена при детектировании ХВАОК).

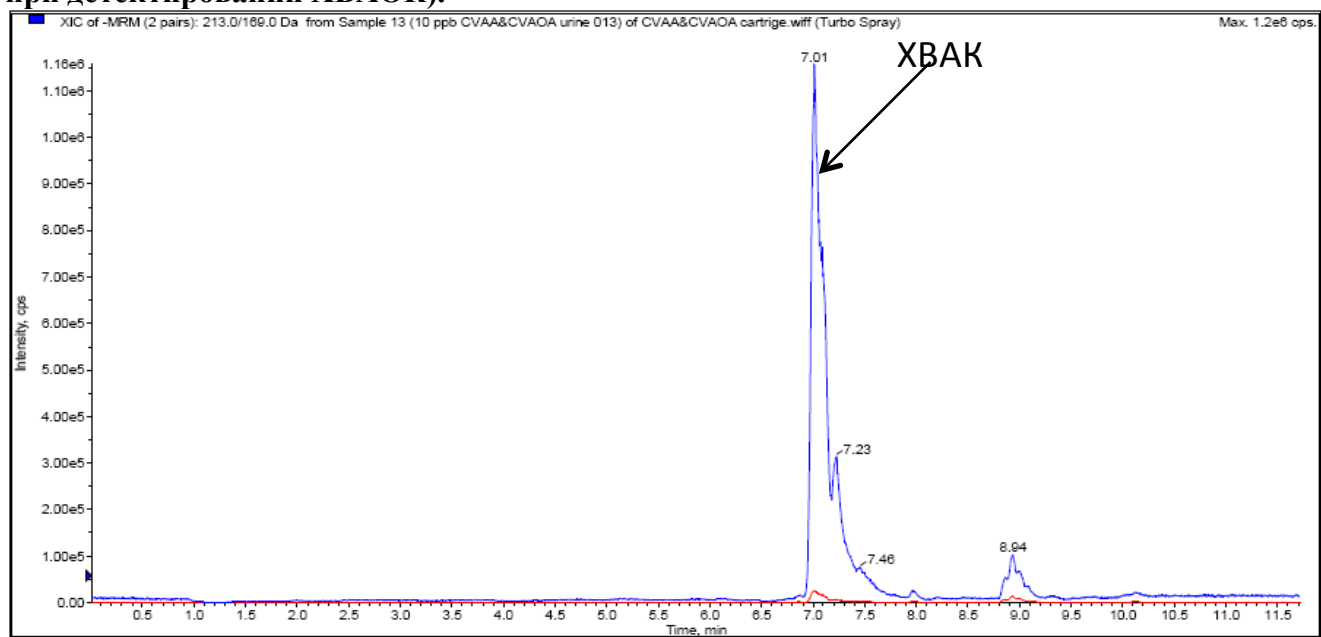


Рис. 124. Хроматограмма образца человеческой мочи содержащей 10 нг/мл ХВАК, полученная без процедуры пробоподготовки. Программа градиентного элюирования представлена в тексте.

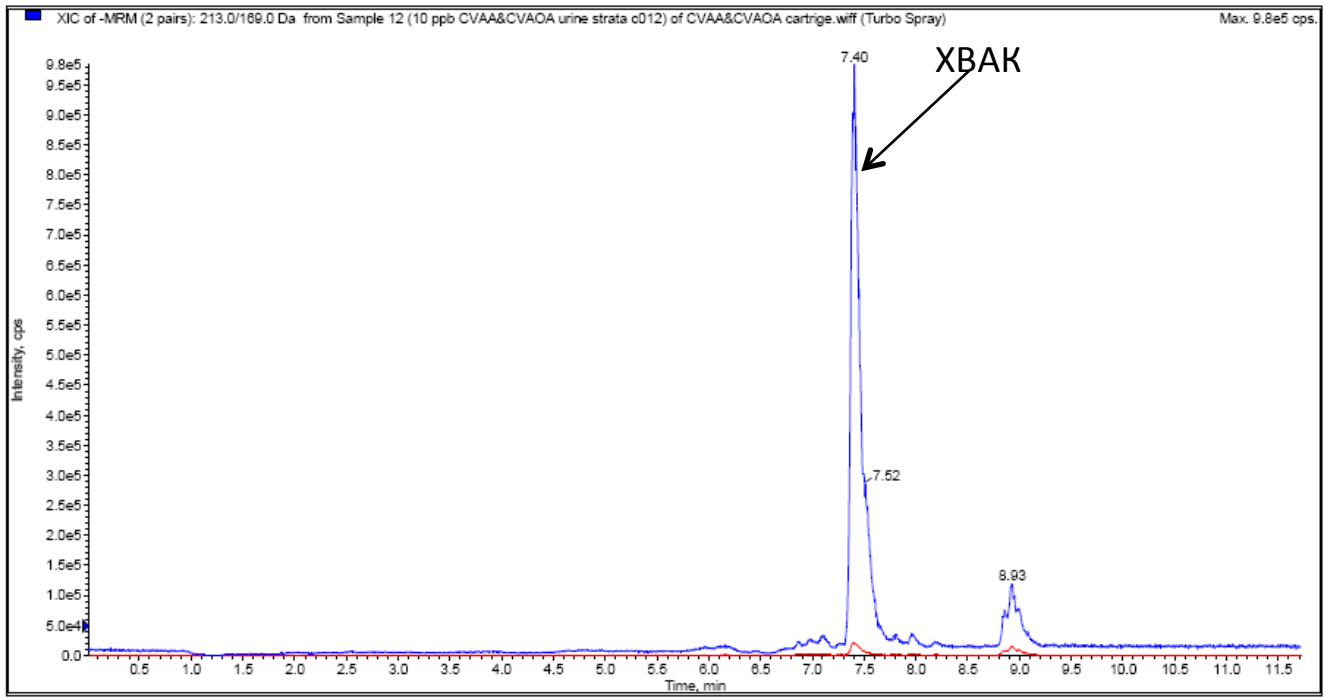


Рис. 125. Хроматограмма образца человеческой мочи, содержащей 10 нг/мл ХВАК после пропускания через картридж Strata C. Программа градиентного элюирования представлена в тексте.

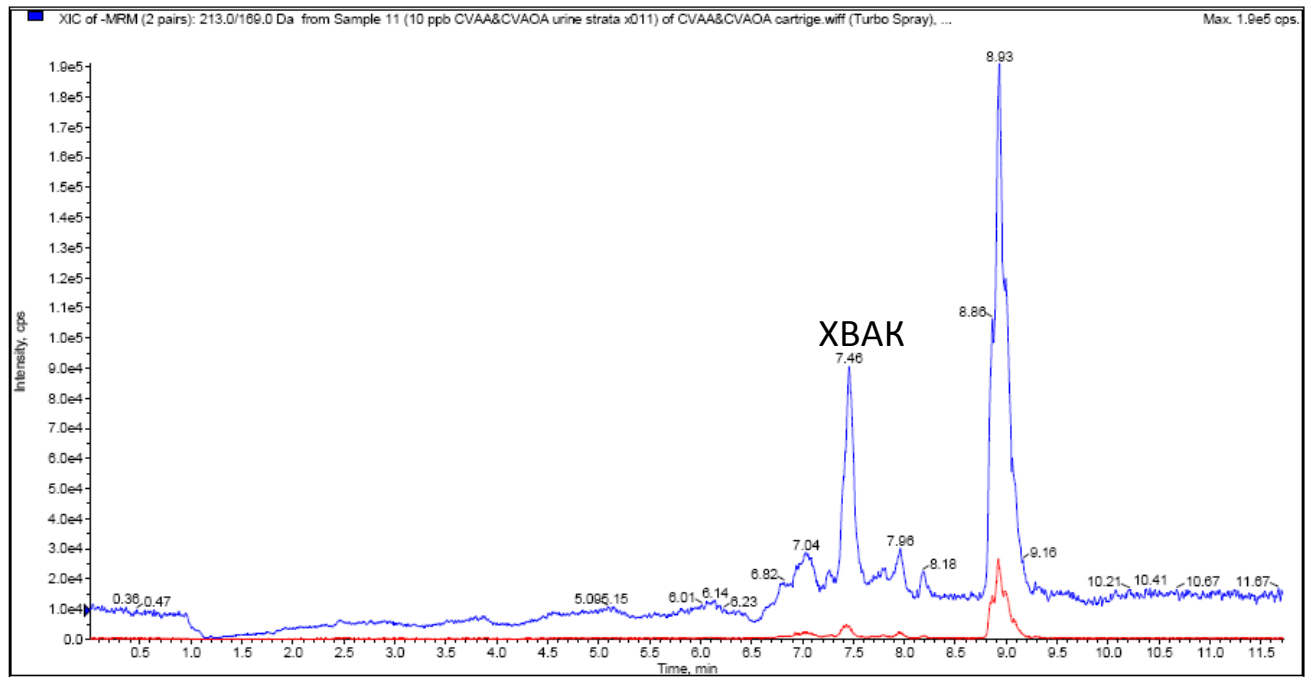


Рис. 126. Хроматограмма образца человеческой мочи, содержащей 0.5 нг/мл ХВАК после пропускания через картридж Strata X. Программа градиентного элюирования представлена в тексте.

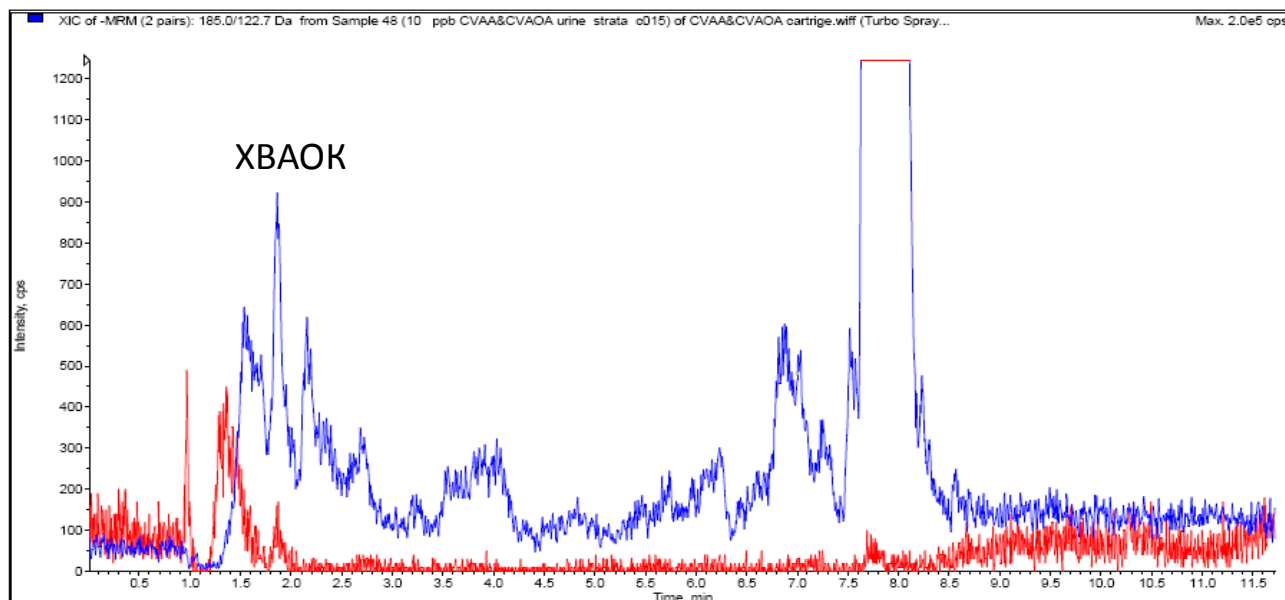


Рис. 127. Хроматограмма образца человеческой мочи содержащей 10 нг/мл ХВАОК после пропускание через картридж Strata C.

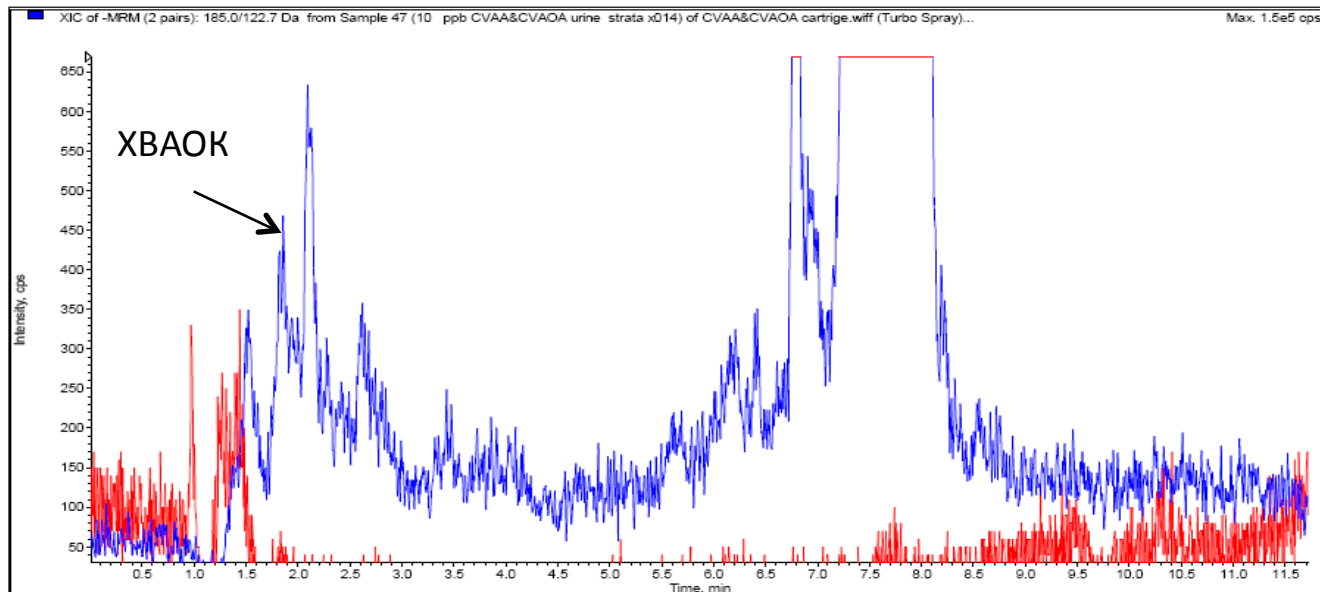


Рис. 128. Хроматограмма образца человеческой мочи содержащей 10 нг/мл ХВАОК после пропускание через картридж Strata X.

Из представленных данных можно сделать вывод, что использование процедуры очистки на картриджах позволяет уменьшить влияние матрицы при детектировании ХВАК и ХВАОК и тем самым уменьшает количество мешающих компонентов, попадающих в систему в ходе анализа. В случае определения ХВАОК в образце человеческой мочи, содержащей 10 нг/мл ХВАОК и анализируемой без стадии пробоподготовки, не удалось обнаружить ХВАОК на хроматограмме, что, по-видимому, связано с тушением ионизации из-за влияния мешающих компонентов,

содержащихся в пробе. На основании полученных данных можно сделать вывод, что стадия пробоподготовки при определении ХВАК и ХВАОК в образцах мочи необходима и позволяет уменьшить влияние посторонних компонентов, содержащихся в пробе, при детектировании ХВАК и ХВАОК. В ходе дальнейших исследований содержания ХВАК и ХВАОК в образцах человеческой и крысиной мочи на стадии пробоподготовки использовали картридж StrataС. Использование картриджа Strata X приводит к значительным потерям ХВАК и ХВАОК на сорбенте картриджа, что неприемлемо при определении следовых количеств ХВАК и ХВАОК в пробах мочи (табл. 83).

Проводили анализ образцов человеческой мочи, искусственно загрязненной ХВАК и ХВАОК, и образцов крысиной мочи, полученных от крыс зараженных люизитом *in vivo*.

На рисунках 129 – 133 представлены хроматограммы образцов человеческой мочи искусственно загрязненных 0.5 нг/мл и 5 нг/мл ХВАК и ХВАОК, а также хроматограммы мочи, не содержащей ХВАК и ХВАОК. Предел обнаружения в случае определения ХВАК и ХВАОК в образцах человеческой мочи составил 0.3 нг/мл для ХВАК и 3 нг/мл для ХВАОК.

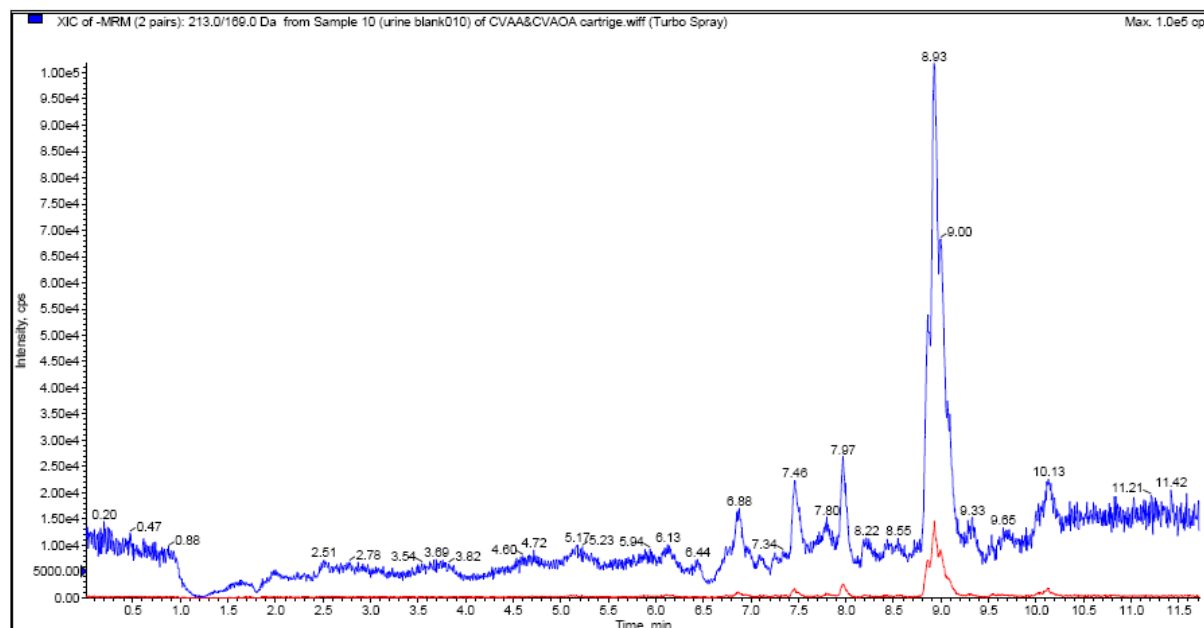


Рис. 129. Хроматограмма образца человеческой мочи, не содержащей ХВАК.

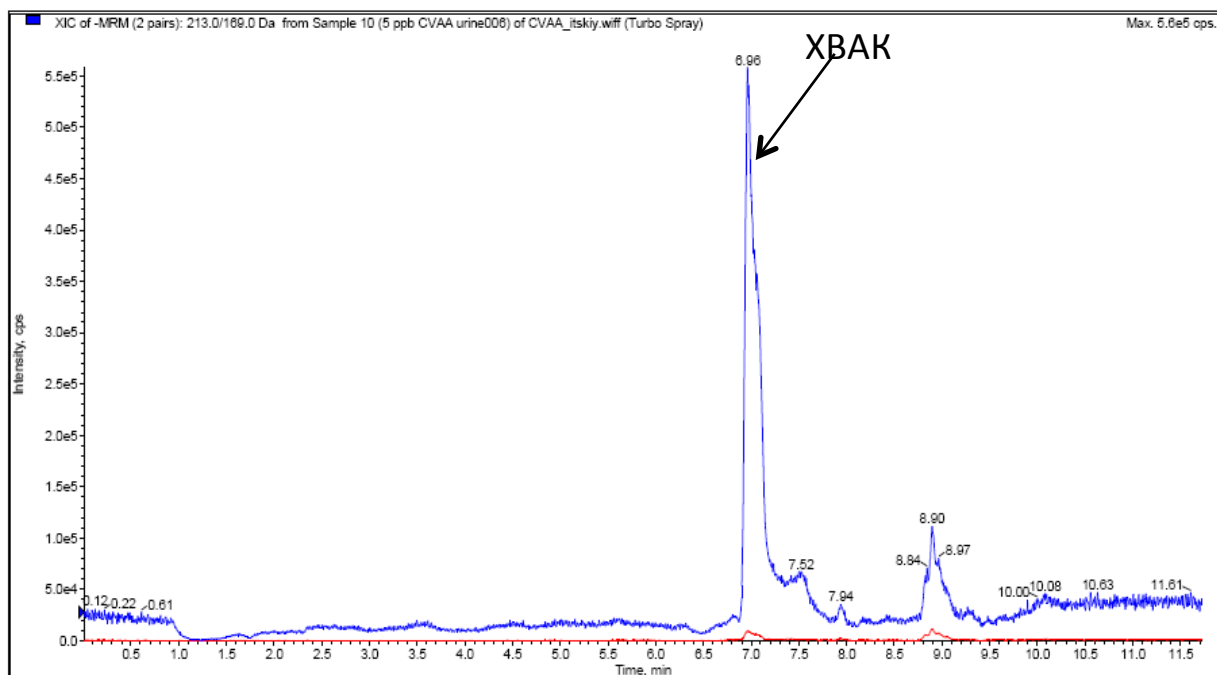


Рис. 130. Хроматограмма образца человеческой мочи, содержащей 5 нг/мл ХВАК.

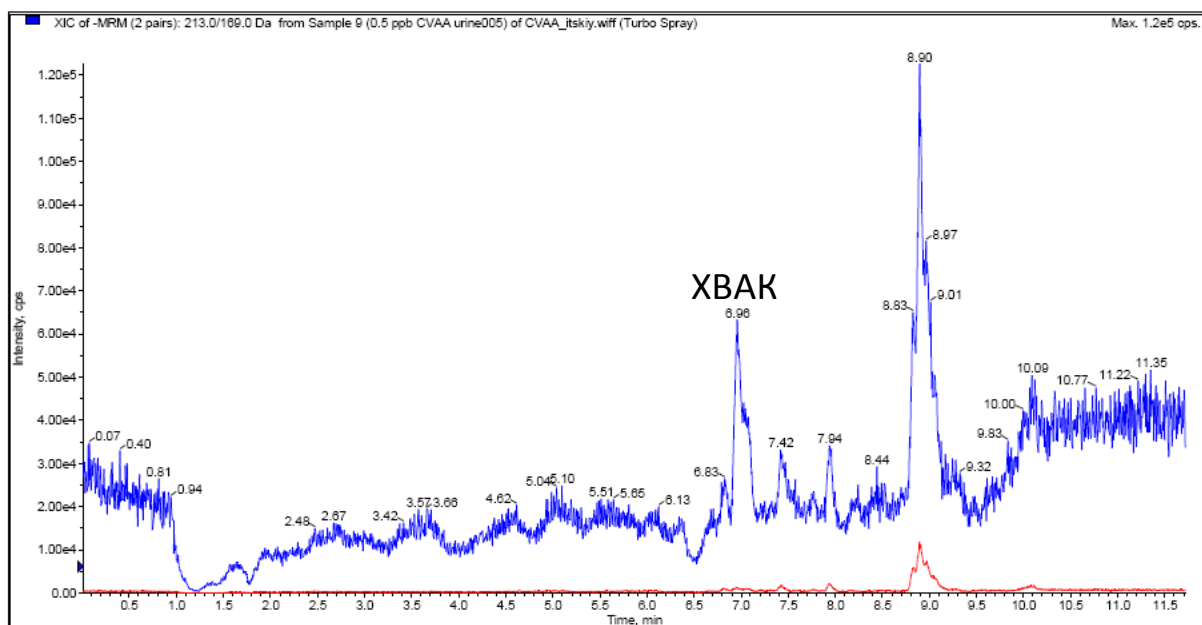


Рис. 131. Хроматограмма образца человеческой мочи, содержащей 0.5 нг/мл ХВАК.

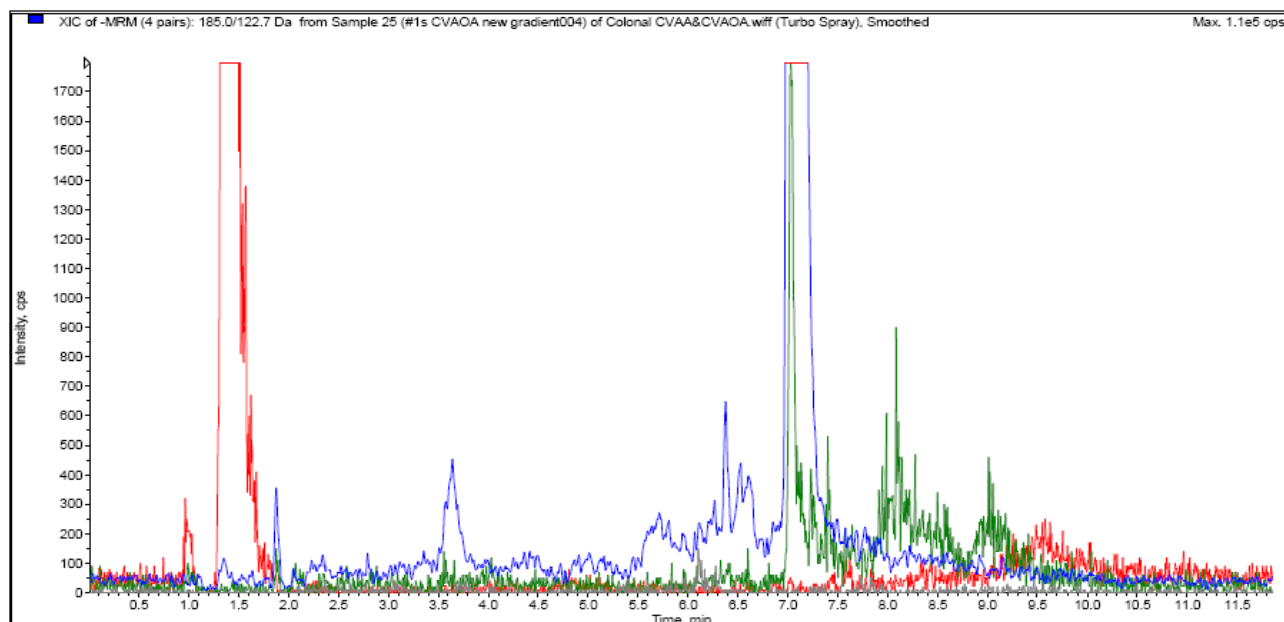


Рис. 132. Хроматограмма образца человеческой мочи, не содержащей ХВАОК.

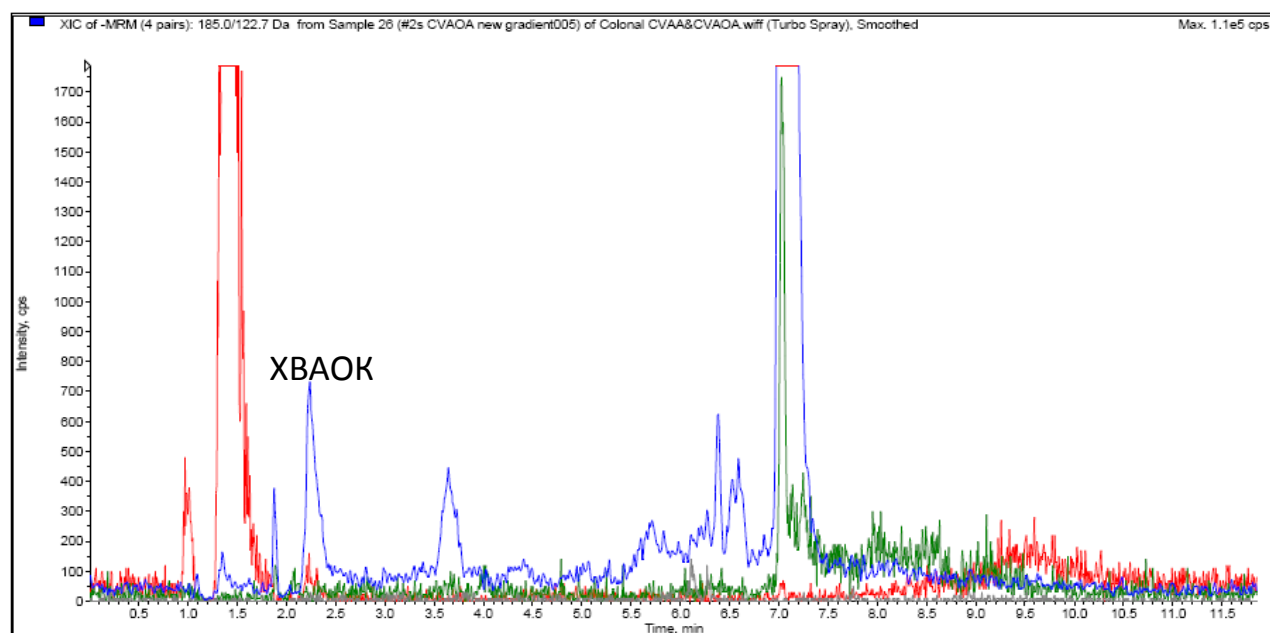


Рис. 133. Хроматограмма образца человеческой мочи, содержащей 10 нг/мл ХВАОК. Процедура пробоподготовки указана в тексте.

На этапе апробации разработанного подхода обнаружения и определения ХВАК и ХВАОК методом ВЭЖХ-МС-МС проводили анализ образцов крысиной мочи, отобранных в разные дни после получения дозы люизита *in vivo*. Крыс подвергали воздействию люизита в различных дозах: 0.25 LD₅₀ и 0.1 LD₅₀ (1,25 и 0,5 мг/кг соответственно). В результате исследования не удалось обнаружить ХВАК (рис. 134) в пробах, однако на следующий день после заражения люизитом в образцах мочи крыс

наблюдается интенсивный пик ХВАОК, который соответствует содержанию ХВАОК 20 мкг/мл (рис. 135).

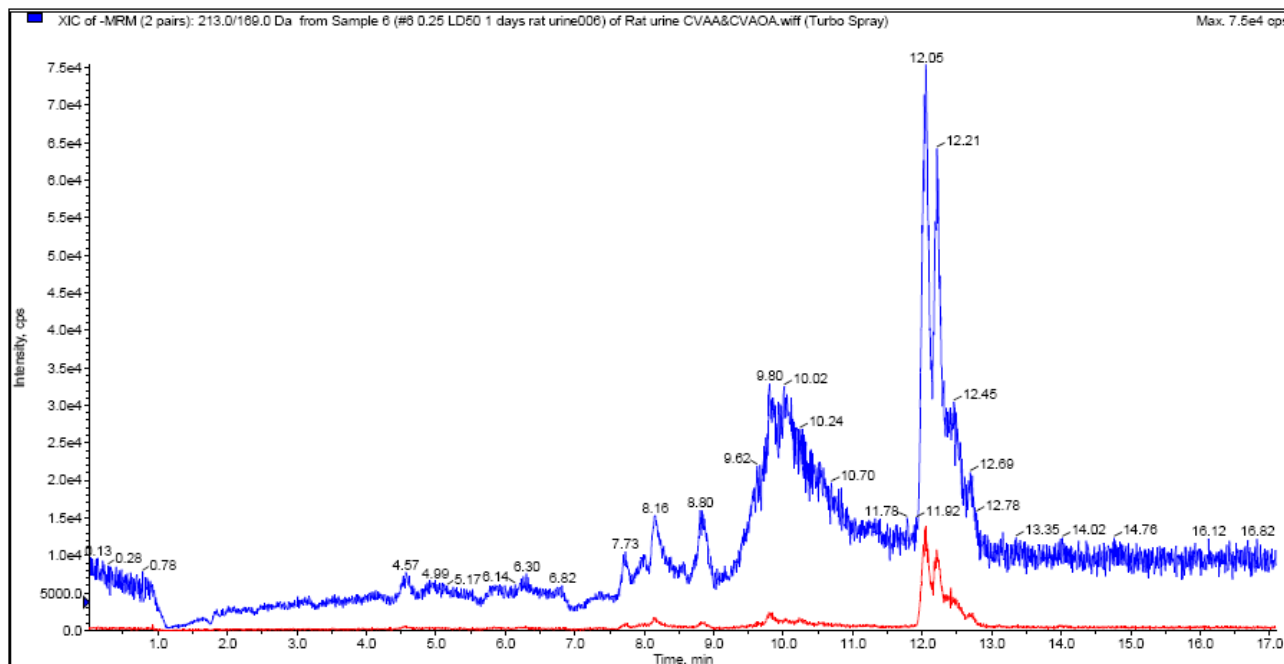


Рис. 134. Хроматограмма образца крысиной мочи при определении ХВАК через 1 день с момента получения дозы 0.25 LD₅₀ люизита. Программа градиентного элюирования представлена в тексте.

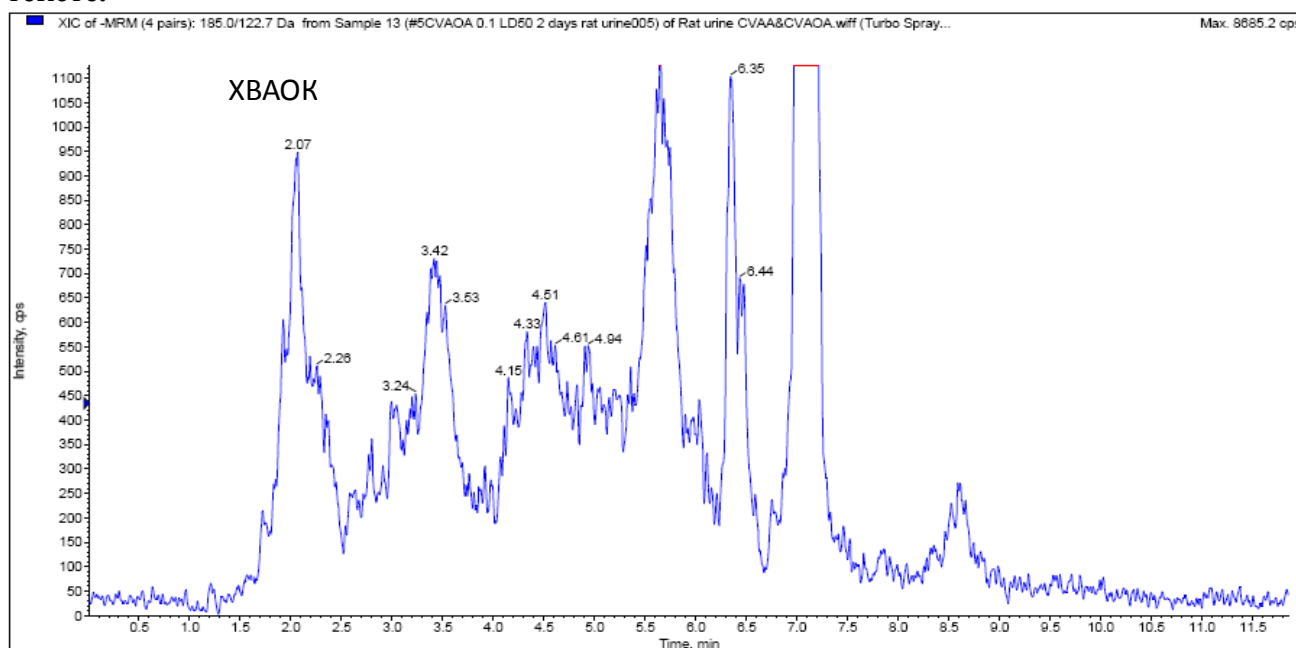


Рис. 135. Хроматограмма образца крысиной мочи на 2 день с момента получения дозы 0.1 LD₅₀ люизита.

На рисунках 135 - 137 представлены хроматограммы образцов крысиной мочи, отобранные через 1-3 дня с момента получения дозы люизита *in vivo*.

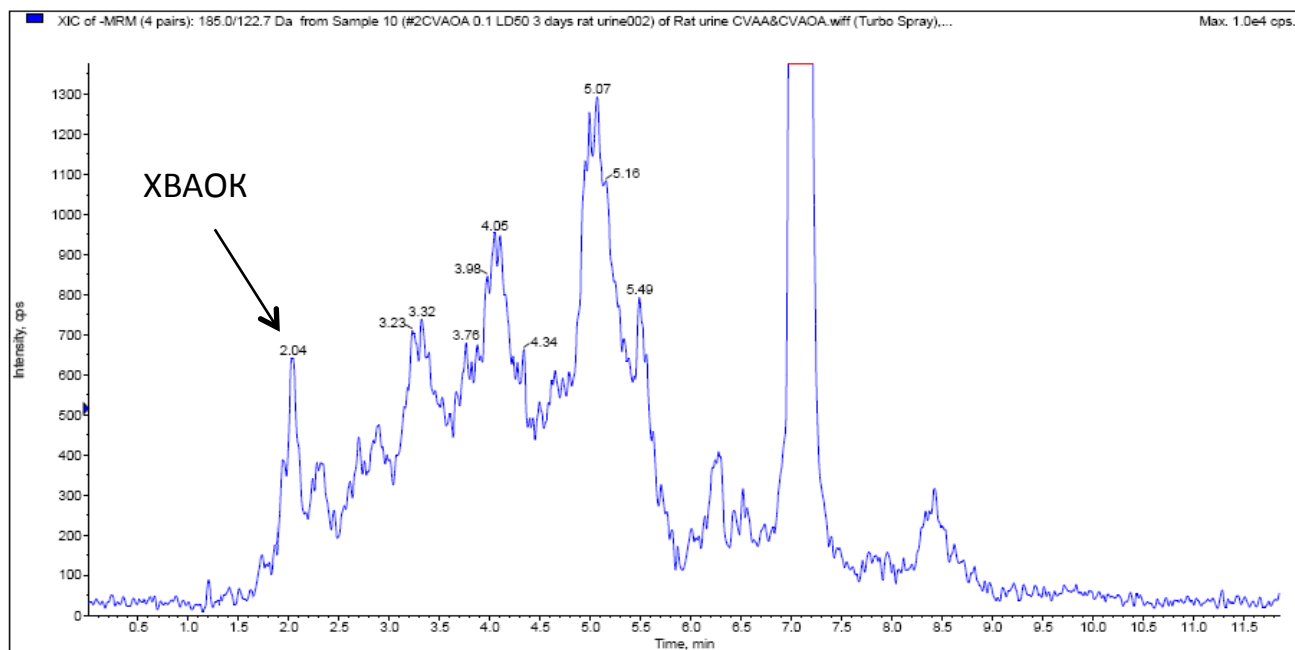


Рис. 136. Хроматограмма образца крысиной мочи на 3 день с момента получения дозы 0.1 LD₅₀ люизита.

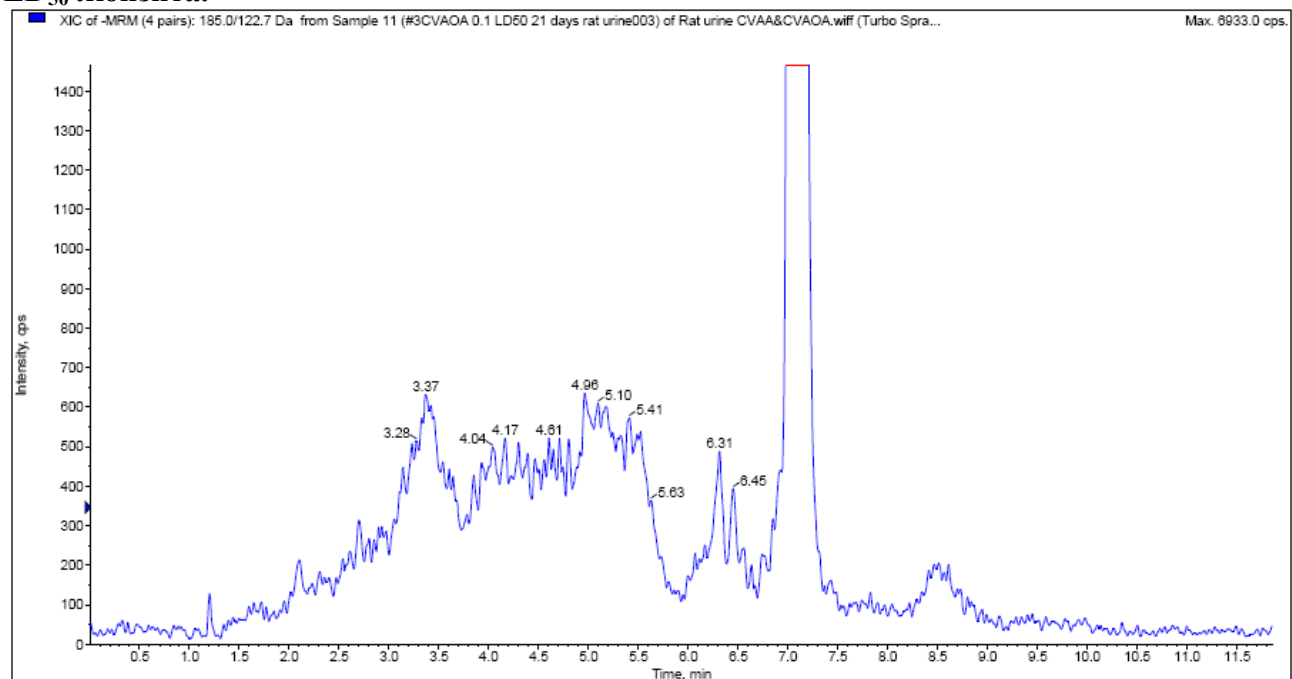


Рис. 137. Хроматограмма образца крысиной мочи при определении ХВАОК на 21й день с момента получения дозы 0.1 LD₅₀ люизита.

На основании полученных данных можно сделать предположение, что люизит в организме крыс в течение первого дня с момента заражения превращается в ХВАОК через стадию образования ХВАК. Таким образом, данный способ позволяет проводить селективное и чувствительное определение ХВАК и ХВАОК (пределы обнаружения составили 0.5 нг и 3 нг в 1 мл мочи для

ХВАК и ХВАОК, соответственно) в моче в течение 3 дней с момента интоксикации люизитом.

В результате проделанной работы впервые продемонстрированы возможности ВЭЖХ-МС-МС при обнаружении и определении основных продуктов трансформации люизита – ХВАК и ХВАОК без использования трудоемкой процедуры дериватизации. Разработанный способ успешно применен при анализе человеческой мочи, искусственно загрязненной ХВАК и ХВАОК, и мочи крыс, подвергшихся воздействию люизита.

Выводы

1. Получен комплекс данных об особенностях масс-спектров первого и второго порядка электрораспылительной ионизации и химической ионизации при атмосферном давлении ряда О-алкилметилфосфоновых кислот, алкилфосфоновых кислот, диалкилтауринов, продуктов превращения V-газов, тиодигликолевой кислоты, ряда продуктов ферментативного превращения иприта (β -лиазные аддукты), хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот и особенностях их удерживания в условиях обращенно-фазовой хроматографии.
2. Предложены условия проведения пробоподготовки для хромато-масс-спектрометрического определения продуктов трансформации ОВ, отличающиеся простотой, экспрессностью и обеспечивающие необходимое извлечение и отделение мешающих компонентов матрицы пробы. Обоснована возможность существенного упрощения пробоподготовки образцов мочи и плазмы крови с использованием сорбционного концентрирования, а также способа ввода пробы после разбавления (техника «dilute and shoot»).
3. Предложены способы высокочувствительного определения: метилфосфоновой кислоты методом гидрофильной ВЭЖХ-МС/МС в природных водах и в экстрактах пыле-грунтовых смесей с пределом обнаружения 200 пг/мл; 2-(N,N-диалкиламино)-этансульфоновых кислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС с пределом обнаружения 25 нг/мл; тиодигликолевой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС в биологических образцах и природных водах с пределами обнаружения 50 и 10 нг/мл, соответственно; пинаколил метилфосфоновой кислоты, изобутилметилфосфоновой кислоты, изопропил метилфосфоновой кислоты и этилметилфосфоновой кислоты в биологических жидкостях в варианте обращенно-фазовой (ультра)-ВЭЖХ-МС(-МС), с пределами обнаружения 0,1, 0,4, 0,5 и 0,8 нг/мл; хлорвиниларсоновой и хлорвиниларсонистой кислот – методом ВЭЖХ-МС-МС без использования дериватизации в образцах мочи с пределами

обнаружения 3 и 0,5 нг в 1 мл мочи, соответственно; S-(2-диэтиламиноэтил) метилфосфонотиоата, S-(2-диизопропиламиноэтил)метилфосфонотиоата, бис(2-N,N-диэтиламиноэтил)дисульфида и бис(2-N,N-диизопропиламиноэтил)-дисульфида в природных водах методом ВЭЖХ-МС/МС с пределами обнаружения 0,3 – 50 нг/мл, 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этана] и 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этана, а также 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] в моче методом ВЭЖХ-МС/МС с пределами обнаружения 0,05 – 5 нг/мл.

4. Разработанные способы апробированы на реальных объектах: показано, что данные подходы позволяют проводить надежное определение исследуемых продуктов трансформации ОБ в биологических жидкостях (моче и крови) лабораторных животных, которые подверглись воздействию нервно-паралитических ОБ, иприта и люизита. Подтверждена правильность их обнаружения в образцах человеческой мочи с использованием разработанных способов.
5. Изучены процессы выведения некоторых продуктов трансформации ОБ из организмов крыс и оценена ретроспективность предложенных подходов. Показано, что О-изопропилметилфосфонат, О-пинаколил-метилфосфонат, О-изобутилметилфосфонат выводятся из организма лабораторных крыс в течение первых двух суток после интоксикации ФОВ. Метаболит иприта 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] удается надежно обнаруживать в образце крысиной мочи даже после 22 дней с момента интоксикации 5-ю мг/кг иприта. Установлено, что люизит в организме крыс в течение первого дня с момента заражения дозой 0,5 мг/кг превращается в хлорвиниларсоновую кислоту через стадию образования хлорвиниларсонистой кислоты.
6. Разработаны способы скрининга продуктов трансформации нервно-паралитических ОБ и люизита в природных водах методом капиллярного электрофореза с пределами обнаружения 0,3 – 5 мкг/мл.

Литература

- [1]. Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction, Technical Secretariat of the Organisation for Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, 1997, accessible through internet [http: / /www.opcw.nl](http://www.opcw.nl).
- [2]. Рыбальченко И.В. Роль аналитической химии в обеспечении международного контроля исполнения Конвенции о запрещении химического оружия // Рос.хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва. им. Д. И. Менделеева.2007. Т. LI, № 2. Стр. 101-108.
- [3]. Black R.M., Harrison J.M. The Chemistry of Organophosphorus Compounds; Ed. F.R. Hartley, Wiley-Interscience, Chichester, 1996. 462 p.
- [4]. Kientz Ch.E. Chromatography and mass spectrometry of chemical warfare agents, toxins and related compounds: state of the art and future prospects // J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 814, N 1-2. P. 1-23.
- [5]. Chemical weapons chemicals analysis, in: M. Mesilaakso (Ed.), Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, New York, 2000.
- [6]. Kostianen O. Analysis of chemicals related to the chemical weapons convention; Ed. Bogusz M.J., Forensic Science, Elsevier, Amsterdam, 2000. 405 p.
- [7] Read, R.W. Verification of exposure to chemical warfare agents // Issues in Toxicology. 2016., № 27. P. 179-218.
- [8] Black, R.M., Read, R.W. Environmental and biomedical sample analysis in support of allegations of use of chemical warfare agents // Toxin Reviews, 2007. № 26 (3), P. 275-298.
- [9] Meer J.A., Trap H.C., Noort D., 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 // J. Chromatogr. B. 2010. Vol. 878, N 17-18. P. 1320-1325.
- [10] Yeung D.T., Smith J.R., Sweeney R.E., Lenz D.E., Cerasoli D.M. A gas chromatographic-mass spectrometric approach to examining stereoselective interaction of human plasma proteins with soman // J. Anal. Toxicol. 2008. Vol. 32, N 1. P. 86-91.

- [11] *Byers C.E., McGuire J.M., Hulet S.W., Burnett D.C., Gaviola B.I., Jakubowski E.M., Thomson S.A.* Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of red blood cells from Göttingen minipig following whole-body vapor exposure to VX // *J. Anal. Toxicol.* 2008. Vol. 32, N 1. P. 57-62.
- [12] *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 Commun. Mass Spectrom.* 2007. Vol. 21, N 18. P. 3109 – 3114.
- [13] *Richardson D.D., Caruso J.A.* Derivatization of organophosphorus nerve agent degradation products for gas chromatography with ICPMS and TOF-MS detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 388, N 4. P. 809-823.
- [14] *Lakshmi V.V., Reddy T.J., Murty M.R., Prabhakar S., Vairamani M.* In situ nucleophilic substitution reaction of N,N-dialkylaminoethyl-2-chlorides monitored by gas chromatography/mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 20, N 14. P. 2209 – 2214.
- [15] *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 // *J. Chromatogr. B.* 2005. Vol. 816, N 1-2. P. 251 – 258.
- [16] *McDaniel L.N., Romero N.A., Boyd J., Coimbatore G., Cobb G.P.* Tandem capillary column gas chromatography-mass spectrometric determination of the organophosphate nerve agent surrogate dimethyl methylphosphonate in gaseous phase // *Talanta.* 2010. Vol. 81, N 4-5. P. 1568 – 1571.
- [17] *Carrick W.A., Cooper D.B., Muir B.* Retrospective identification of chemical warfare agents by high-temperature automatic thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2001. Vol. 925, N 1-2. P. 241-249.
- [18] *Stuff J.R., Cheicante R.L., Morrissey K.M., Durst H.D.* Trace determination of isopropyl methylphosphonofluoridate (GB) and bis (2-chloroethyl) sulfide (HD) in chemical

- neutralization solutions by gas chromatography-mass spectrometry //Journal of Microcolumn Separations. 2000. Vol. 12.P. 87-92.
- [19] *Dennis K. Rohrbaugh, Emory W. Sarver.* Detection of alkyl methylphosphonic acids in complex matrices by gas chromatography–tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography A. 1998. Vol. 809. P. 141 – 150.
- [20] *Rohrbaugh D.K.* Characterization of equimolar VX–water reaction product by gas chromatography–mass spectrometry// J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 809, N 1-2.P. 131-139.
- [21] *Rohrbaugh D.K.* Methanol chemical ionization quadrupole ion trap mass spectrometry of O-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothiolate (VX) and its degradation products // J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 893,N 2. P. 393-400.
- [22] *Лебедев А.Т., Лебедев К.С., Мясоедов Б.Ф., Рыбальченко И.В., Сигейкин Г.И., Суворкин В.Н.* Масс-спектрометрическая идентификация высокотоксичных алкилфторфосфонатов// Масс-спектрометрия. 2006. Т. 3, № 4. С. 277-283.
- [23] *Лебедев А.Т., Морозик Ю.И., Мясоедов Б.Ф., Рыбальченко И.В., Фоменко П.В.* Установление строения О-алкилалкилфторфосфонатов методом масс-спектрометрии и компьютерное прогнозирование их масс-спектров// Масс-спектрометрия. 2007. Т. 4, № 4. С. 255 – 266.
- [24] *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. Vol. 824, N 2. P. 211-221.
- [25] *Kataoka M., Tsuge K., Seto Y.* Efficiency of pretreatment of aqueous samples using a macroporous strong anion-exchange resin on the determination of nerve gas hydrolysis products by gas chromatography–mass spectrometry after tert.-butyldimethylsilylation // Journal of Chromatography A. 2000. Vol. 891, N 2. P. 295-304.
- [26] *Kataoka M., Tsuge K., Takesako H., Hamazaki T., Seto, Y.* Effect of pedological characteristics on aqueous soil extraction recovery and tert-butyl dimethylsilylation yield for gas chromatography-mass spectrometry of nerve gas hydrolysis products from soils // Environmental Science & Technology. 2001. Vol. 35, N 9. P. 1823-1829.

- [27] *Ng W.F., Lakso H.-A.* Determination of chemical warfare agents in natural water samples by solid-phase microextraction. // *Analytical Chemistry*. 1997. Vol. 69, N 1. P.1866-1872.
- [28] *Schneider J.F., Boparai A.S., Reed L.L.* Screening for sarin in air and water by solid-phase microextraction-gas chromatography mass // *Journal of Chromatographic Science*. 2001. Vol. 39 P. 420-424.
- [29] *Sng M.T., Ng W.F.* In-situ derivatisation of degradation products of chemical warfare agents in water by solid-phase microextraction and gas chromatographic–mass spectrometric analysis // *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 832, N 1-2. P. 173-182.
- [30] *M. Katagi, M. Nishikawa, M. Tatsuno, H. Tsuchihashi.* Determination of the main hydrolysis product of O – ethyl S—2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate, ethyl methylphosphonic acid, in human serum // *Journal of Chromatography B*. 1997. Vol. 689. P. 327-333.
- [31] *J. Aa. Tornes, B. A. Johnsen.* Gas chromatographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide // *Journal of Chromatography*. 1989. Vol.467. P. 129 – 138.
- [32] *Deepak Pardasani, Meehir Palit, A.K. Gupta, Pankaj K. Kanaujia, K. Sekhar, D.K. Dubey.* Microemulsion mediated in situ derivatization–extraction and gas chromatography–mass spectrometric analysis of alkylphosphonic acids // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1108. P. 166 – 175.
- [33] *Gary A. Sega, Bruce A. Tomkins, Wayne H. Griest.* Analysis of methylphosphonic acid, ethyl methylphosphonic acid and isopropyl methylphosphonic acid at low microgram per liter levels in groundwater // *Journal of Chromatography A*. 1997. Vol. 790. P. 143 – 152.
- [34] *G.A. Pianetti, L.M. Moreira de Campos.* Application of ion chromatography with indirect spectrophotometric detection to the sensitive determination of alkylphosphonic acids and fosfomycin // *Analytica chimica Acta*. 1993. Vol.284. P.291-299.
- [35] *M. Katagi, M. Nishikawa, M. Tatsuno, H. Tsuchihashi.* Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acid, in human serum by indirect photometric detection ion chromatography // *Journal of Chromatography B*. 1997. Vol. 698. P. 81-88.

- [36] *Sheher Bano Mohsin*. Use of ion chromatography–electrospray mass spectrometry for the determination of ionic compounds in agricultural chemicals // *Journal of Chromatography A*. 2000. Vol. 884. P. 23-30.
- [37] *William H. Robins, Bob W. Wright*. Capillary electrophoretic separation of organophosphonic acids using borate esterification and direct UV detection // *Journal of Chromatography A*. 1994. Vol. 680. P. 667-673.
- [38] *Stuart A. Oehrle, Paul S. Bossle*. Analysis of nerve agent degradation products using capillary electrophoresis // *Journal of Chromatography A*. 1995. Vol. 692. P. 247-252.
- [39] *J. P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambute*. Capillary electrophoresis analysis of chemical warfare agent breakdown products II. Counterelectroosmotic separation of alkylphosphonic acids and their monoester derivatives // *Journal of Chromatography A*. 1996. Vol. 741. P. 279-285.
- [40] *J. P. Mercier, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambute*. Capillary electrophoresis separation of alkylphosphonic acid monoesters with indirect ultraviolet detection // *Journal of Chromatography A*. 1996. Vol. 779. P. 245-252.
- [41] *R. Kostainen, A.P. Bruins*. Identification of degradation products of some chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ionspray mass spectrometry // *Journal of Chromatography*. 1993. Vol. 634. P. 113-118.
- [42] *J.-P. Mercier, P. Chaimbault, Ph. Morin, M. Dreux, A. Tambute*. Identification of phosphonic acids by capillary electrophoresis– ionspray mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 1998. Vol. 825. P. 71-80.
- [43] *M'elanie Lagarrigue, Anne Boss'ee, Arlette B'egos, Anne Varenne, Pierre Gareil, Bruno Bellier*. Separation and identification of isomeric acidic degradation products of organophosphorus chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1137. P. 110-118.
44. *Jellum E., Thorsrud A.K.* Capillary electrophoresis for diagnosis and studies of human disease, particularly metabolic disorders // *J. Chromatogr.* 1991. Vol. 559. P. 455-465.

45. Kelly M.T., Fabre H., Perrett D Determination of taurine in plasma by capillary zone electrophoresis following derivatisation with fluorescamine // *Electrophoresis*. 2000. Vol. 21. P. 699-705.
46. Zhang L., Chen H., Hu S., Cheng J., Li Z.W., Shao M. Determination of the amino acid neurotransmitters in the dorsal root ganglion of the rat by capillary electrophoresis with a laser-induced fluorescence-charge coupled device // *J. Chromatogr. B*. 1998. Vol. 707. P. 59-67.
47. Wu J., Chen Z., Dovichi N.J. Reaction rate, activation energy, and detection limit for the reaction of 5-furoylquinoline-3-carboxaldehyde (FQ) with neurotransmitters in artificial cerebrospinal fluid // *J. Chromatogr. B*. 2000. Vol. 741. P. 85-88.
48. Okamoto H., Uetake A., Tamaya R., Nakajima T., Sagara K., Ito Y. Simultaneous determination of eleven ingredients in ophthalmic solutions by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with tetrabutylammonium salt // *J. Chromatogr. A*. 2000. Vol. 888. P. 299-308.
49. Lillard S.J., Chiu D.T, Scheller R.H., Zare R.N. Separation and Characterization of Amines from Individual Atrial Gland Vesicles of *Aplysia californica* // *Anal. Chem*. 1998. Vol. 70. P. 3517-3524.
- [50] *Paul C. Bossle, John J. Martin, Emory W. Sarver, Harold Z. Sommer*. High-performance liquid chromatography analysis of alkyl methylphosphonic acids by derivatization // *Journal of Chromatography*. 1983. Vol. 267. P. 209-212.
- [51] *E. R. J. Wils, A. G. Hulst*. Determination of organophosphorus acids by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 1988. Vol. 454. P. 261-272
- [52] *E. R. J. Wils, A. G. Hulst*. Determination of O-ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothioate (VX) by thermospray liquid chromatography—mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 1990. Vol.523. P. 151-161.
- [53] *E. R. J. Wils, A. G. Hulst*. The use of thermospray-liquid chromatography/mass spectrometry for the verification of chemical warfare agents. // *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1992. Vol. 342 , N 2. P. 749-58.

- [54] *Tornes J. A.* Identification of Some Alkyl Methylphosphonic Acids by Thermospray Mass Spectrometry // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1996. Vol. 10, N 3. P. 878-882.
- [55] *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. Vol. 759, N 1-2. P. 79-92.
- [56] *Robin M. Black, Robert W. Read.* Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography–mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization // *Journal of Chromatography A*. 1998. Vol. 794. P. 233-244.
- [57] *P.A. D'Agostino, J.R. Hancock, L.R. Provost.* 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. Vol. 837. P. 93-105.
- [58] *D'Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R.* Packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry analysis of organophosphorus chemical warfare agents // *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 840, N 2. P. 289-294.
- [59] *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. Vol. 950, N 1-2. P. 149-156.
- [60] *D'Agostino P.A., Provost L.R.* Determination of chemical warfare agents, their hydrolysis products and related compounds in soil // *Journal of Chromatography A*. 1992. Vol. 589, N 1-2. P. 287-294.
- [61] *D'Agostino P.A., Hancock J.R., Chenier C.L., Jackson Lepage C.R.* 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. P. 86-94.

- [62] *A.T. Лебедев*, Масс-спектрометрия в органической химии, Москва, 2003. 494 с.
- [63] *Borrett V.T., Colton R., Traeger J.C.* ESI-MS of Phosphoric/phosphonic Acid-ester with Alkali ions // *European Journal of Mass Spectrometry*. 1995. Vol. 1. P. 131-140.
- [64] *Timothy L. Hayes, Donald V. Kenny, and Laura Hernon-Kenny.* 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 // *Journal of Medical Chemical, Biological and Radiological Defense*. 2004. Vol. 2. P. 121-144.
- [65] *Douglas B. Mawhinney, Elizabeth I. Hamelin, Rheaclare Fraser, Sathya S. Silva, Antonis J. Pavlopoulos, Robert J. Kobelski.* The determination of organophosphonate nerve agent metabolites in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2007. Vol. 852. P. 235-243.
- [66] *Leigh L. Swaim, Rudolph C. Johnson, Yingtao Zhou, Chris Sandlin, John R. Barr.* 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. Vol.32, N 9. P. 774 – 777.
- [67] *Martins S. Odetokun, M. Angela Montesano, Gayanga Weerasekera, Ralph D. Whitehead Jr., Larry L. Needham, Dana Boyd Barr.* Quantification of dialkylphosphate metabolites of organophosphorus insecticides in human urine using 96-well plate sample preparation and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography B*. 2010. Vol. 878. P. 2567-2574.
- [68] *Frederic L. Ciner, Carla E. McCord, Roy W. Plunkett Jr., Michael F. Martin, Timothy R. Croley.* Isotope dilution LC/MS/MS for the detection of nerve agent exposure in urine // *Journal of Chromatography B*. 2007. Vol. 846. P. 42-50.
- [69] *Katagi M., Tatsuno M., Nishikawa M., Tsuchihashi H.* On-line solid-phase extraction liquid chromatography-continuous flow frit fast atom bombardment mass spectrometric and tandem mass spectrometric determination of hydrolysis products of nerve agents alkyl methylphosphonic acids by p-bromophenacyl derivatization // *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 833, N 2. P. 169-179.

- [70] *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. Vol. 10, N 5. P. 440-447.
- [71] *Qin Liu, Xuying Hu, Jianwei Xie.* Determination of nerve agent degradation products in environmental samples by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization // *Analytica Chimica Acta*. 2004. Vol. 512. P. 93-101.
- [72] *Vijay Tak, Pankaj K. Kanaujia, Deepak Pardasani, Rajesh Kumar, R.K. Srivastava, A.K. Gupta, D.K. Dubey.* Application of Doehlert design in optimizing the determination of degraded products of nerve agents by ion-pair liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1161. P. 198-206.
- [73] *I. A. Rodin, A. V. Braun, I. A. Anan'eva, O. A. Shpigun, E. I. Savel'eva, I. V. Rybal'chenko.* Detection of Nerve Agent Markers by Liquid Chromatography– Mass Spectrometry // *Journal of Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 66, N. 11. P. 1417-1422.
- [74] *Bent T. Røen, Stig R. Sellevag, Elsa Lundanes.* On-line solid phase extraction-liquid chromatography–mass spectrometry for trace determination of nerve agent degradation products in water samples // *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 761. P. 109-116.
- [75] *Vijay Tak, Deepak Pardasani, Pankaj K. Kanaujia, D.K. Dubey.* Liquid–liquid–liquid microextraction of degradation products of nerve agents followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2009. Vol. 1216. P. 4319 -4328.
- [76] *Kevin M. Kubachka, Douglas D. Richardson, Douglas T. Heitkemper, Joseph A. Caruso.* Detection of chemical warfare agent degradation products in foods using liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray ionization mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2008. Vol. 1202. P. 124-131.
- [77] *D'Agostino P.A., Provost L.R.,* Capillary column isobutane chemical ionization mass spectrometry of mustard and related compounds // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1988. Vol.15, N 10. P. 553-564.
- [78] *D'Agostino P.A., Provost L.R., Hansen A.S., Luoma G.A.* Identification of mustard related compounds in aqueous samples by gas chromatography/mass spectrometry // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1989. Vol. 18, N 1. P. 484-491.

- [79] Wils E.R.J., Hulst A.G., De Jong A.L. Determination of mustard gas and related vesicants in rubber and paint by gas chromatography—mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 1992. Vol. 625, N 2. P. 382-386.
- [80] Black R.M., Clark 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 // J. Chromatogr. A. 1993. Vol. 637, N 2.P. 71-80.
- [81] D'Agostino P.A., Provost L.R. Capillary column electron impact and ammonia chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric and gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of mustard hydrolysis products // J. Chromatogr. A. 1993. Vol. 645, N 2. P. 283-292.
- [82] Tomkins B.A., Sega G.A. Determination of thiodiglycol in groundwater using solid-phase extraction followed by gas chromatography with mass spectrometric detection in the selected-ion mode J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 911, N 1. P. 85-96.
- [83] Wils E.R.J., Hulst A.G. The use of Thermospray-Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Verification of Chemical Warfare Agents //J. Anal. Chem. 1992. Vol. 342, N 1. P. 749-758.
- [84] Munavalli S., Jakubowski E.M., Durst H.D.Liquid chromatography/thermospray mass spectrometry of mustard and its metabolites // J. Mass Spec trom. 1995. Vol.30, N 1. P. 1716-1722.
- [85] D'Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R. Analysis of mustard hydrolysis products by packed capillary liquid chromatography—electrospray mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 808, N 1-2. P. 177-184.
- [86] Hooijschuur E.W.J., Kientz Ch.E., Brinkman U.A.Th. Determination of the sulfur mustard hydrolysis product thiodiglycol by microcolumn liquid chromatography coupled on-line with sulfur flame photometric detection using large-volume injections and peak compression // J. Chromatogr. A. 1999. Vol. 849, N 2. P. 433-444.
- [87] Hooijschuur E.W.J., Kientz Ch.E., Hulst A.G., Brinkman U.A.Th. Determination of hydrolysis products of sulfur mustards by reversed-phase microcolumn liquid

chromatography coupled on-line with sulfur flame photometric detection and electrospray ionization mass spectrometry using large-volume injections and peak compression // *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72, N 1. P. 1199-1206.

[88] Halme M, Karjalainen M, Kiljunen H, Vanninen P Development and validation of efficient stable isotope dilution LC-HESI-MS/MS method for the verification of β -lyase metabolites in human urine after sulfur mustard exposure // *J. Chromatogr. B.* 2011. Vol. 879, N 13-14. P. 908-914.

[89] Rohrbaugh D.K., Yang Y.-C. Liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of mustard-related sulfonium ions // *J. Mass Spectrom.* 1997. Vol. 32, N 1. P. 1247-1252.

[90] Headley J.V., Peru K.M., Dickson L.C. Ion-Exchange Electrospray Ionization Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Alkanolamines in Wetland Vegetation Exposed to Sour-Gas Contaminated Groundwater // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999. Vol. 13, N 8. P. 730-736.

[91] S.P. Harvey, T.A. Blades, L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, M.V. Haley, T. Rosso, G.P. Young, in *Arsenic and Old Mustard: Chemical Problems in the Destruction of Old Arsenical and 'Mustard' Munitions*, Ed by J.F. Bunnett, M. Mikolajczyk. Publisher, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 115 (1998).

[92] I.T. Ermakova, I.I. Starovoitov, E.B. Tikhonova, A.V. Slepkin, K.I. Kashparov, A.M. Boronin, "Bioutilization of thiodiglycol, the product of mustard detoxification: isolation of degrading strains, study of biodegradation process and metabolic pathways", *Process Biochem.* **38 (1)**, 31 (2002).

[93] T.-S. Lee, W.A. Weigand and W.E. Bentley, Observation of metabolite formation and variable yield in thiodiglycol biodegradation process: impact on reactor design, *Appl. Biochem. Biotech.* **63/65**, 743 (1997).

[94] T. Lee, S. Chan, W. Weigand and W. Bentley, Biocatalytic transformation of [(2-hydroxyethyl)thio]acetic acid and thiodiglycolic acid from thiodiglycol by *alcaligenes xylosoxydans* ssp. *xylosoxydans* (sh91), *Biotechnol. Prog.* **16**, 363 (2000).

[95] K. Lee and H. Allen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 1720 (1998).

- [96] Z. Dlaskova, T. Navratil, M. Heyrovsky, D. Pelclova, L. Novotny, "Voltammetric determination of thiodiglycolic acid in urine", *Anal. Bioanal. Chem.* **375** (1), 164 (2003)
- [97] T. Green, D.E. Hathway, "The chemistry and biogenesis of the S-containing metabolites of vinyl chloride in rats", *Chem. Biol. Interact.* **17**, 137 (1977).
- [98] S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida, "Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer", *Metabolomics* **6**, 518 (2010).
- [99] P.L. Viola, A. Caputo, "Carcinogenicity studies on vinylidene chloride", *Environ. Health. Perspect.* **21**, 45-47 (1977).
- [100] T. Navratil, Z. Šenholdova-Dlaskova, M. Heyrovsky, K. Pistoupilova, T.I. Pistoupil, "Excretion of thiodiglycolic acid in urine influenced by some victuals and cetirizine", *Anal. Lett.* **37**, 1093 (2004).
- [101] L. Křivánková, E. Samcová, P. Boček, "Determination of thiodiacetic acid in urine of people exposed to vinyl chloride by analytical capillary isotachopheresis", *Electrophoresis* **5**(4), 226 (1984).
- [102] V. Darminski, B. Trojanovska, "Chromatographic determination of thiodiglycolic acid - a metabolite of vinyl chloride", *Arch. Toxicol.* **48**, 289 (1981).
- [103] D. Reichert, H. W. Werner, M. Metzler, D. Henschler, "Molecular mechanism of 1,1-dichloroethylene toxicity: excreted metabolites reveal different pathways of reactive intermediates" *Arch. Toxicol.* **42**, 159 (1979).
- [104] M. Heger, G. Muller und K. Norpoth, "Investigations on the Correlation Between Vinyl Chloride (VCM)-Uptake and Excretion of Its Metabolites by 15 VCM-Exposed Workers II. Measurements of the Urinary Excretion of the VCM-Metabolite Thiodiglycolic Acid", *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.* **50**, 187 (1982).
- [105] G. Muller, K. Norpoth, E. Kusters, K. Herweg and E. Versin, "Determination of Thiodiglycolic Acid in Urine Specimens of Vinyl Chloride Exposed Worker", *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.* **41**, 199 (1978).

- [106] Z.Y. Chen, X.R. Ghu, M.Z. Cu, X.X. Zhu, "Sensitive flame-photometric-detector analysis of thiodiglycolic acid in urine as a biological monitor of vinyl chloride", *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.* **52 (3)**, 281(1983).
- [107] U. Hofman, M. Eichelbaum, S. Seefried, C.O. Meese, "Identification of thiodiglycolic acid, thiodiglycolic acid sulfoxide, and (3-carboxymethylthio)lactic acid as major human biotransformation products of S-carboxymethyl-L-cysteine", *Drug. Metab. Dispos.* **19**, 222 (1991).
- [108] U.V.R. Vijaya Saradhi, S. Prabhakar, T. Jagadeshwar Reddy and M. Vairamani, Ion-pair solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometric determination of acidic hydrolysis products of chemical warfare agents from aqueous samples, *J. Chromatogr. A* **1129**, 9 (2006).
- [109]. Haas R. Determination of Chemical Warfare Agents Gas Chromatographic analysis of Chlorovinylarsines (Lewisite) and their metabolites by derivatization with thiols // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1998. Vol. 5, N 1. P. 2-3.
- [110]. Fowler W.K., Stewart D.C., Weinberg D.S., Sarver E.W. Gas chromatographic determination of the lewisite hydrolysate, 2-chlorovinylarsonous acid, after derivatization with 1,2-ethanedithiol // *J. Chromatogr. A.* 1991. Vol.558, N 1. P. 235-246.
- [111] Hooijschuur E.W.J., Hulst A.G., Jong A.L., Reuver L.P., Krimpen S.H., Baar B.L.M., Wils E.R.J., Kientz Ch.E., Brinkman U.A.Th Identification of chemicals related to the chemical weapons convention during an interlaboratory proficiency test // *Trends Anal. Chem.* 2002. Vol. 21, N 1. P. 116-130.
- [112] Szostek B., Aldstadt J.H. Determination of organoarsenicals in the environment by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1998. Vol. 807, N 2. P. 253-263.
- [113] Tomkins B.A., Sega G.A., Ho C.-H. Determination of Lewisite oxide in soil using solid-phase microextraction followed by gas chromatography with flame photometric or mass spectrometric detection // *J. Chromatogr. A.* 2001. Vol. 909, N 1. P. 13-28.

- [114] Muir B., Slater B. J., Cooper D. B., Timperley C. M. Analysis of chemical warfare agents I. Use of aliphatic thiols in the trace level determination of Lewisite compounds in complex matrices // *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1028. P. 313-320.
- [115] Haas R., Krippendorf A. Determination of Chemical Warfare Agents in Soil and Material Samples // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1997. Vol. 4, N 1. P. 123-124.
- [116] Haas R., Schmidt T.C., Steinbach K. Low E.Chromatographic determination of phenylarsenic compounds // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. Vol. 361, N 1. P. 313-318.
- [117] Schoene K., Bruckert H.J., Juerling H., Steinhanses J. Derivatization of 10-chloro-5,10-dihydrophenarsazine (Adamsite) for gas chromatographic analysis // *J. Chromatogr. A*. 1996. Vol. 719, N 2. P. 401-409.
- [118] Stuff J.R., Creasy W.R., Rodriguez A.A., Durst H.D. Gas Chromatography with Atomic Emission Detection as an Aid in the Identification of Chemical Warfare Related Material // *J. Microcol. Sep.* 1999. Vol. 11. P. 644-651.
- [119] Mazurek M., Witkiewicz Z., Popiel S., Sliwakowski M. Capillary gas chromatography–atomic emission spectroscopy–mass spectrometry analysis of sulphur mustard and transformation products in a block recovered from the Baltic Sea // *J. Chromatogr. A*. 2001. Vol. 919, N 1. P. 133-145.
- [120] Killelea D.R., Aldstadt J.H. Solid-phase microextraction method for gas chromatography with mass spectrometric and pulsed flame photometric detection: studies of organoarsenical speciation // *J. Chromatogr. A*. 2001. Vol. 918, N 1. P. 169-175.
- [121] D.A. Bass, J.S. Yeager, J.T. Kiely, J.S. Crain, L.M. Shem, H.J. O’Niel, M.J. Growdy, in: *Proceedings of the 1995 Scientific Conference on Chemical and Biological Defense Research*, US Army Edgewood Research Development and Engineering Center, 1995, p. 233.
- [122] Wils E.R.J. Chemical weapons chemicals analysis; Ed. M. Mesilaakso, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 2000, p. 987.
- [123] Black R.M., Read R.W., Chemical weapons chemicals analysis; Ed. M. Mesilaakso, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 2000, p. 1013.

- [124] Wils E.R.J., Hulst A.G. Gas chromatographic-mass spectrometric identification of tear-gases in dilute solutions using large injection volumes // *J. Chromatogr. A*. 1985. Vol.330. P. 379-382.
- [125] Ferslew K.E., Orcutt R.H., Hagardorn A.N. Spectral differentiation and gas chromatographic/mass spectrometric analysis of the lacrimators 2- chloroacetophenone and o-chlorobenzylidene malononitrile // *J. Forensic Sci.* 1986. Vol. 31. P. 658-665.
- [126] Kluchinsky T.A., Savage P.B., Sheely M.V., Thomas R.J., Smith P.A. Identification of CS-derived compounds formed during heat-dispersion of CS riot control agent // *J. Microcol. Sep.* 2001. Vol. 13. P. 186-190.
- [127] D'Agostino P.A., Provost L.R. Analysis of irritants by capillary column gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 1995. Vol. 695, N 1. P. 65-73.
- [128] Blau K. *Handbook of Derivatives for Chromatography*; Ed. Halket J., Wiley, Chichester, 1993. 369 p.
- [129] Taguchi V.Y., *Gas Chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical Applications*; Ed. Clement R.E., Wiley, New York, 1990, 129 p.
- [130] Black R.M., Harrison J.M. *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*; Ed. F.R. Hartley, Wiley, Chichester, 1996, 781 p.
- [131] Kuitunen M.-L. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Ed. R.A. Meyers, Wiley, Chichester, 2000, 1055 p.
- [132] Weimaster J.F., Beaudry W.T., Bossle P.C., Ellzy M.W., Janes G.L., Johnson D.W., Lochner J.M., Pleva S.G., Reeder J.H., Rohrbaugh D.K., Rosso T.E., Szafraniec L.J., Szafraniec L.L., Albro T.G., Creasy W.R., Stuff J.R., Smith P.B., Stewart I.R. Chemical analysis of environmental samples collected in Iraq: Analysis for the presence of chemical warfare agents // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1995. Vol. 64. P. 115-128.
- [133] Soderstrom M.T., Bjork H., Hakkinen V.M.A., Kostianen O., Kuitunen M.-L., Rautio M. Identification of compounds relevant to the chemical weapons convention using selective gas chromatography detectors, gas chromatography-mass spectrometry and gas

chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy in an international trial proficiency test // *J. Chromatogr. A.* 1996. Vol. 742, N 1-2. P. 191-203.

[134] Creasy W.R., Stuff J.R., Williams B., Morrissey K., Mays J., Duevel R., Durst H.D. Identification of chemical-weapons-related compounds in decontamination solutions and other matrices by multiple chromatographic techniques // *J. Chromatogr. A.* 1997. Vol. 774, N 1-2. P. 253-263.

[135] Creasy W.R., Brickhouse M.D., Morrissey K.M., Stuff J.R., Cheicante R.L., Ruth J., Mays J., Williams B.R., O'Conner R., Durst H.D. Analysis of chemical weapons decontamination waste from old ton containers from Johnston Atoll using multiple analytical methods. *Environmental Science & Technology* // *Environ. Sci. Technol.* 1999. Vol. 33, N 13. P. 2157-2162.

[136] Wackner G.W., Bartram P.W., Brickhouse M.D., Conell T.R., Creasy W.R., Henderson V.D., Hovanec J.W., Morrissey K.M., Stuff J.R., Williams B.R. Reaction of VX and GD with gaseous ozone // *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2000. Vol. 2. P. 1267-1272.

[137] Brickhouse M.D., Creasy W.R., Williams B.R., Morrissey K.M., O'Connor R.J., Durst H.D. Multiple-technique analytical characterization of a mixture containing chemical-weapons simulant from a munition // *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 883, N 1-2. P. 185-198.

[138] Hanaoka S., Nomura K., Wada T. Determination of mustard and lewisite related compounds in abandoned chemical weapons (Yellow shells) from sources in China and Japan // *J. Chromatogr. A.* 2006. Vol. 1101, N 1-2. P. 268-277.

[139] 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 // *J. Chromatogr. B.* 2010. Vol. 878, N 17-18. P. 1226-1233.

[140] 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 // *J. Chromatogr. B.* 2007. Vol. 852, N 1-2. P. 235-243.

- [141] 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 // *J. Chromatogr. A.* 2012. Vol. 1229. P. 164-171.
- [142] McDaniel L. N., Romero N. A., Boyd J., Coimbatore G., Cobb G. P. Tandem capillary column gas chromatography–mass spectrometric determination of the organophosphate nerve agent surrogate dimethyl methylphosphonate in gaseous phase // *Talanta.* 2010. Vol. 81, N 4-5. P. 1568-1571.
- [143] Gäb J., John H., Melzer M., Blum M-M. 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. Chromatogr. B.* 2010. Vol. 878, N 17-18. P. 1382-1390.
- [144] Roen B. T., Unneberg E., Tornes J., Lundanes E. Trace determination of sulphur mustard and related compounds in water by headspace-trap gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2010. Vol. 1217, N 5. P. 761-767.
- [145] Roen B. T., Unneberg E., Tornes J., Lundanes E. Headspace-trap gas chromatography–mass spectrometry for determination of sulphur mustard and related compounds in soil // *J. Chromatogr. A.* 2010. Vol. 1217, N 14. P. 2171-2178.
- [146] 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 // *J. Chromatogr. A.* 2011. Vol. 1218, N 7. P. 972-980.
- [147] Pardasani D, Palit M., Gupta A.K., Kanaujia P.K., Dubey D.K. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of trifluoroacetyl derivatives of precursors of nitrogen and sulfur mustards for verification of chemical weapons convention // *J. Chromatogr. A.* 2004. Vol. 1059, N 1-2. P. 157-164.
- [148] Kostianen K. Chapter 11D Analysis of chemicals related to the chemical weapons convention // *Handbook of Anal. Separat.* 2000. Vol. 2. P. 405-435.
- [149] 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 ionization // *J. Chromatogr. A.* 1999. Vol. 862, N 2.P. 169-177.
- [150] Applied electrospray mass spectrometry, Ed. by Pramanik B.N., Ganguly A.K., Gross M.L. Marsel Dekker Inc. 2002. 464 p.
- [151] Borrett V.T., Mathews R.J., Colton R., Traeger J.C. Verification of the United Nations Chemical Weapons Convention: the application of electrospray mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. Vol. 10. P. 114-118.
- [152] Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H., Polhuijs M. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage // *Arch. Toxicol.* 1998. Vol. 72. P. 671-675.
- [153] Zi-Hui M., Qin L. Determination of degradation products of nerve agents in human serum by solid phase extraction using molecularly imprinted polymer // *Anal. Chimica Acta.* 2001. V. 435. P. 121-127.
- [154] Driskell W.J., Shih M., Needham L., Barr D. Quantitation of organophosphorus nerve agent metabolites in human urine using isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Tox.* 2002. V. 26. P. 6-10.
- [155] Miki A., Katagi M., Tsuchihashi H., Yamashita M. Determination of alkyl methylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-liquid solid-phase transfer-catalyzed pentafluorobenzoylation // *J. Anal. Tox.* 1999. V. 23. P. 86-93.
- [156] 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 // *J. Chromatogr. A.* 2001. Vol. 912, N 2.P. 291-299.
- [157] 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 Commun. Mass Spectrom.* 2011. Vol. 25, N 22. P. 3411 – 3416.
- [158] 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, N 17 – 18. P. 1253-1256.

- [159] Owens J., Koester C. Quantitative analysis of chemical warfare agent degradation products in beverages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2009. Vol. 57, N 18. P. 8227 – 8235.
- [160] Evans R.A., Jakubowski E.M., Muse W.T., Matson K., Hulet S.W., Mioduszewski R.J., Thomson S.A., Totura A.L., Renner J.A., 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 // *J. Anal. Toxicol.* 2008. Vol. 32, N 1. P. 78 – 85.
- [161] Tsuge K., Seto Y. Detection of human butyrylcholinesterase-nerve gas adducts by liquid chromatography-mass spectrometric analysis after in gel chymotryptic digestion // *J. Chromatogr. B.* 2006. Vol. 838, N 1. P. 21-30.
- [162] Mercier J.-P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A. Liquid chromatography analysis of phosphonic acids on porous graphitic carbon stationary phase with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection // *J. Chromatogr. A.* 1999. Vol. 849, N 1. P. 197-207..
- [163] Winemiller M.D., Bae S.Y. Liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis of 1-(2-chloroethoxy)-2-[(2-chloroethyl)thio] ethane and related compounds: separation of an eleven component mixture // *J. Chromatogr. A.* 2008. Vol. 1210, N 2. P. 185-192.
- [164] Read R.W., Black R.M. Analysis of the sulfur mustard metabolite 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethane] in urine by negative ion electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. Vol. 28, N 5. P. 352-356.
- [165] Read R.W., Black R.M. Analysis of beta-lyase metabolites of sulfur mustard in urine by electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. Vol. 28, N 5. P. 346-351.
- [166] Young C.L., Ash D., Driskell W.J., Boyer A.E., Martinez R.A., Silks L.A., Barr J.R. A rapid, sensitive method for the quantitation of specific metabolites of sulfur mustard in human urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. Vol. 28, N 5. P. 339 – 345.

- [167] Creek J.A., McAnoy A.M., Brinkworth C.S. Rapid monitoring of sulfur mustard degradation in solution by headspace solid-phase microextraction sampling and gas chromatography mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010. Vol. 24, N 23. P. 3419 – 3424.
- [168] Dubey D.K., Pardasania D., Palita M., Gupta A.K., Jain R. On-matrix derivatisation-extraction of precursors of nitrogen- and sulfur-mustards for verification of chemical weapons convention // *J. Chromatogr. A.* 2005. Vol. 1076, N 1-2. P. 27 – 33.
- [169] Capacio B.R., Smith J.R., Delion M.T., Anderson D.R., Graham J.S., Platoff G.E., Korte W.D. Monitoring sulfur mustard exposure by gas chromatography-mass spectrometry analysis of thiodiglycol cleaved from blood proteins // *J. Anal. Toxicol.* 2004. Vol. 28, N 5. P. 306-310.
- [170] Black R.M., Muir B. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products // *J. Chromatogr. A.* 2003. Vol. 1000, N 1-2. P. 253-281.
- [171] Black R.M., Harrison J.M. *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*; Ed. F.R. Hartley, Wiley, Chichester, 1996, 781 p.
- [172] Kroening K.K., Richardson D.D., Afton S., Caruso J.A. Screening hydrolysis products of sulfur mustard agents by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. Vol. 393, N 8. P. 1949 – 1956.
- [173] Barr J.R., Driskell W.J., Aston L.S., Martinez R.A. Quantitation of metabolites of the nerve agents sarin, soman, cyclohexylsarin, VX, and Russian VX in human urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. Vol. 28, N 5. P. 372-378.
- [174] D'Agostino P.A., Hancock J.R., Chenier C.L. Packed capillary liquid chromatography-electrospray ionization (tandem) mass spectrometry of mustard hydrolysis products in soil // *J. Chromatogr. A.* 2004. Vol. 1058, N 1-2. P. 97-105.
- [175] Wood M., Laloup M., Samyn N., del Mar Ramirez Fernandez M., de Bruijn E.A., Maes R.A., De Boeck G. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in

forensic science // J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1130, N 1. P. 3-15.

[176] Kanaujia P.K., Pardasani D., Gupta A.K., Kumar R., Srivastava R.K., Dubey D.K. Extraction of acidic degradation products of organophosphorus chemical warfare agents. Comparison between silica and mixed-mode strong anion-exchange cartridges // J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1161, N 1-2. P. 98-104.

[177] John H., Worek F., Thiermann H. LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning // Anal. Bioanal. Chem. 2008. Vol. 391, N 1. P. 97-116.

[178] 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 // J. Chromatogr. A. 2010. Vol. 1217, N 30. P. 4987-4995.

[179] Yeo T.H., Ho M.L., Loke W.K. Development of a liquid chromatography-multiple reaction monitoring procedure for concurrent verification of exposure to different forms of mustard agents // J. Anal. Toxicol. 2008. Vol. 32, N 1. P. 51-56.

[180] Mou S., Ding X., Liu Y. Separation methods for taurine analysis in biological samples // J. Chromatogr. B. 2002. Vol. 781. P. 251-267.

[181] Black R.M., Read R.W. Biological fate of sulfur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane): identification of [3-lyasemetabolites and hydrolysis products in human urine // Xenobiotica. 1995. Vol. 25. P. 167-173.

[182] Read R.W., Black R.M. Analysis of lyasemetabolites of sulfur mustard in urine by electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 2004. Vol. 28. P. 346-351).

[183] Riches J., Read R.W., Black R.M. Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. 2007. Vol. 845, N 1. P. 114-120.

[184] Barr J.R., Pierce C.L., Smith J.R., Capacio B.R., Woolfitt A.R., Solano M.I., Wooten J.V., Lemire S.W., Thomas J.D., Ash D.H., Ashley D.L. Analysis of urinary metabolites of

sulfur mustard in two individuals after accidental exposure // J. Anal. Toxicol. 2008. Vol. 32. P. 10-16.

[185] Kinoshita K., Shikino O., Seto Y., Kaise T. Determination of degradation compounds derived from Lewisite by high performance liquid chromatography/inductively coupled plasma-mass spectrometry // Appl. Organomet. Chem. 2006. Vol. 20. P. 591-596.

[186] Ю. С. Яшин, И. А. Ревельский, И. Н. Тихонова Анализ силильных производных эфиров метилфосфоновой кислоты методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии с фотоионизацией при атмосферном давлении // Масс-спектрометрия. 2014. Т11. № 2. с 118 – 123.

Приложение 1. Сравнение пределов обнаружения, для соединений, изученных в работе

Вещество	Метод - предел обнаружения, достигнутый в работе	Метод - предел обнаружения в других работах/литературный источник
ТДГК	ВЭЖХ-МС/МС – 10	ГХ-МС – 20 / [108] ГХ-МС – 50 / [105]
МФК ЭМФК иПрМФК ПинМФК	ВЭЖХ-МС/МС – 0.100 ВЭЖХ-МС/МС - 0.06 ВЭЖХ-МС/МС - 0.008 ВЭЖХ-МС/МС - 0.005	ИП-ВЭЖХ-ИСП-МС – 0.139 / [76] ВЭЖХ-МС/МС – 0.07 / [74] ВЭЖХ-МС/МС – 0.04 / [74] ВЭЖХ-МС/МС – 0.01 / [74]
ДИТ ДПТ ДЭТ ДМТ	ВЭЖХ-МС – 25 ВЭЖХ-МС – 25 ВЭЖХ-МС – 15 ВЭЖХ-МС – 15	– – – –
ДЭМФ ДПМФ ДЭАС ДПАС	ВЭЖХ-МС – 0.3 ВЭЖХ-МС – 3 ВЭЖХ-МС – 300 ВЭЖХ-МС – 50	– ВЭЖХ-МС – 760 / [35] – –
СБАЦЭ СБМСЭ МСМТЭСЭ	ВЭЖХ-МС/МС – 0.05 ВЭЖХ-МС/МС – 2 ВЭЖХ-МС/МС – 1	ВЭЖХ-МС/МС – 0.5 / [164] ВЭЖХ-МС/МС – 4 / [88] ВЭЖХ-МС/МС – 4 / [88]
ХВАК ХВАОК	ВЭЖХ-МС/МС – 0.5 ВЭЖХ-МС/МС - 3	ГХ-МС – 1 / [112] ГХ-МС – 20 / [113]