

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОМАРКЕРОВ ЗАРАЖЕНИЯ ИПРИТОМ В ПРОБАХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Д.О. Корнеев, Л.В. Петракова, М.А. Понсов, А.А. Родионов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации,
105005, г. Москва, Бригадирский переулок, 13

Поступила 29.01.2018 г. Принята к публикации 10.09.2018 г.

Актуальность разработки и совершенствования способов определения метаболитов (биомаркеров) отравляющих веществ (ОВ) в биологических жидкостях (крови, моче и т.д.) связана с необходимостью установления фактов воздействия ОВ на организм человека и животных. Необходимость в проведении таких анализов возникает в рамках наблюдения за выполнением положений Конвенции о запрещении химического оружия (КХО), при расследованиях предполагаемого применения ОВ, а также в ходе профессиональных тестов, проводимых Организацией по запрещению химического оружия (ОЗХО). В настоящее время имеется проблема определения низкомолекулярных биомаркеров иприта в биологических пробах методами газовой хроматографии с применением масс-селективного детектирования. Низкомолекулярными биомаркерами серного иприта являются тиодигликоль, оксиды и сульфоксиды иприта. Идентификация и количественная оценка содержания маркеров серного иприта в крови и моче осуществляется по методикам, основанным на вытеснении тиодигликоля и его производных из белковых конъюгатов с помощью трихлорида титана, твердофазной экстракции, концентрировании в растворе этилацетата, дериватизации пентафторбензоилхлоридом, гептафторбутирилимидазолом, ангидридом или хлорангидридом гептафтормасляной кислоты, последующей реэкстракции деривата в соответствующий растворитель и последующем газохроматографическом анализе в режиме химической ионизации метаном с регистрацией отрицательных ионов. После пробоподготовки проводилось определение пределов обнаружения минимальных значений сверхнизких концентраций анализируемых биомаркеров серного иприта в моче и плазме крови. Проведя хроматографический анализ, по результатам строили соответствующие графики зависимости показателей, исходя из концентрации исследуемых биомаркеров в моче и плазме крови, используемые в дальнейшем для разработки соответствующих методик по определению биомаркеров серного иприта в моче и крови человека.

Ключевые слова: биомаркеры; β -лиазные метаболиты; Конвенция; нанопримеси; отравляющие вещества; подготовка пробы плазмы; пробоподготовка; токсичные химикаты; химическое оружие; хроматографическое разделение; хроматографический пик; экологическое обследование.

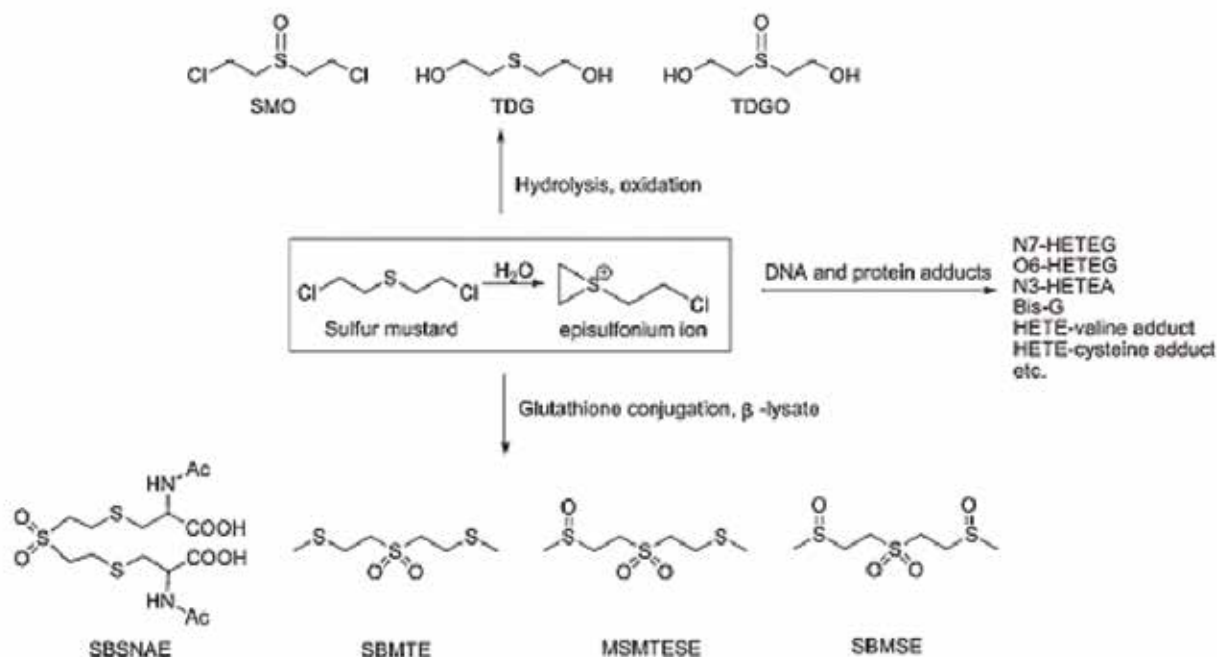
Библиографическое описание: Корнеев Д.О., Петракова Л.В., Понсов М.А., Родионов А.А. Разработка методики определения низкомолекулярных биомаркеров заражения ипритом в пробах биологического происхождения // Вестник войск РХБ защиты. 2018. Т. 2. № 3. С. 40–54.

Необходимость и актуальность разработки и совершенствования различных методик определения метаболитов (биомаркеров) отравляющих веществ (ОВ) в биологических объектах связана с периодически возникающей необходимостью как экстренного, так и ретроспективного установления

фактов воздействия ОВ на организм человека и животных. Последнее, в свою очередь, вытекает как из положений Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении (КЗХО) [1] – списки токсических веществ и их прекурсоров, для

которых должны существовать надежные методики идентификации и обнаружения, содержатся в Приложениях 1–3 КЗХО, так и из сохраняющейся угрозы химического терроризма.

Низкомолекулярными метаболитами (биомаркерами) бис-2-хлорэтилового тиоэфира (серного иприта) являются тиодигликоль, его оксид и диоксид, сульфоксид и сульфон иприта. К β -лиазным метаболитам иприта относятся следующие соединения, представленные на схеме ниже: 1,1'-сульфонил-бис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этан] (SBSNAE), 1,1'-сульфонил-бис[2-(метилтио)этан] (SBMTE), 1-метилсульфинил-2-[2-(метилтио)этилсульфонил]этан (MSMTESE), 1,1'-сульфонилбис-[2-(метилсульфинил)этан] (SBMSE).



Для идентификации и количественной оценки содержания маркеров серного иприта в крови и моче эффективны методики, основанные на вытеснении тиодигликоля и его производных из белковых конъюгатов с помощью трихлорида титана, твердофазной экстракции, концентрировании в растворе этилацетата, дериватизации пентафторбензоилхлоридом, гептафторбутирилимидазолом, ангидридом или хлорангидридом гептафтормасляной кислоты, последующей реэкстракции деривата в соответствующий растворитель и ГХ-МС/МС анализе в режиме химической ионизации метаном с регистрацией отрицательных ионов.

Цель работы – разработка способа определения низкомолекулярных биомаркеров заражения ипритом в пробах биологического происхождения.

Материалы и методы

Использованные реактивы и оборудование^{1,2}

Реактивы

Азот газообразный нулевой марка А, НИИ КМ, ТУ 6-21-39-96, 99,999%;
Ацетон, 99,5%, Alfa Aesar, 32451;
Ацетонитрил, HPLC Grade, 99,7+ %, Alfa Aesar, 22927;
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
Гелий газообразный высокой чистоты, марка 7.0, НИИ КМ, ТУ 0271-001-4590571-02, 99,9999%;
Гептан, для ВЭЖХ, 99+%, Alfa Aesar, 22911;
Метан газообразный, НИИ КМ, ТУ 51-841-87, 99,9%;
Метанол, HPLC Grade, 99,8+%, Alfa Aesar, 22909;
Натрия гидроокись, хч, Химмед, ГОСТ 4328-75;
Пентафторбензоилхлорид, Sigma, 103772-25g;

Пиридин, чда, Химмед, ГОСТ 13547-78;
Сульфат натрия, хч, Химмед, ГОСТ 4166-76;
Титан (III) хлорид, 10 % в 20–30% HCl, Aldrich, 24999-8;
Толуол, HPLC, Acros, 203-625-9;
Этилацетат, 99,7%, Sigma-Aldrich, 34858.

Оборудование

ГХ-МС/МС система:
Газовый хроматограф «Agilent 7890A», трехквартовый масс-селективный детектор «Agilent 7000B GC/MS Triple Quad»;
Вакуумный коллектор Vacuum Manifold, Supelco, кат. № 57160-U;
Ванна ультразвуковая, Elma. S30H. Elmasonic, D-78224 Singen/Htw;

¹ Standard operating procedure for the organisation of OPCW biomedical proficiency tests (QDOC/LAB/SOP/ BioPT01. Issue 1, ReBision 1, dated 28 December 2016.

² Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament. 2017 ed. / Ed. Vanninen P. The Ministry for Foreign Affairs of Finland University of Helsinki. VERIFIN, Department of Chemistry P.O. Box 55, fi-00014 University of Helsinki, Finland. ISBN 978-952-10-7408-0 (pdf).

Вials 1,5 мл с конусом обжимные, Restek, 21051;
 Вials стеклянные с герметично завинчивающимися крышками вместимостью 8,0 мл фирмы Supelco, кат. № 27518;
 Вials стеклянные с герметично завинчивающимися крышками вместимостью 15,0 мл фирмы Supelco, кат. № 27161;
 Вставки стеклянные вместимостью 0,2 мл фирмы Supelco, кат. № 24717;
 Гайка для колонки универсальная, Agilent, кат. № 5181-8830;
 Дозатор пипеточный переменного объема 0,5–10 мкл Sigma, Biohit, кат. № 725020;
 Дозатор пипеточный переменного объема 20–200 мкл, Sigma, Biohit, кат. № 725060;
 Иглы тефлоновые Disposable Flow Control Valve Liners for the Visirprep, Supelco, кат. № 57059;
 Калибровочный стандарт для МСД, Interlab, кат. № 8500-5995;
 Картридж SILICA, 100 мг, Agilent Technologies, кат. № 5982-221;
 Картридж SPE «OASIS HLB», Waters, 3 cc;
 Колонка капиллярная DB-5MS, Interlab, кат. № 19091S-433;
 Крышки для vials 1,5-2 мл обжимные, MN, кат. № 702730;
 Лайнер Inert Liner, splitless, single taper, Agilent, кат. № 5181-3316I;
 Лайнер стеклянный, Agilent, кат. № 5062-3587;
 Лайнер стеклянный, Agilent, кат. № 5183-4647;
 Набор для обслуживания ГХ, Interlab, кат. № 5180-4162;
 Набор принадлежностей для чистки детектора, Interlab, кат. № 9301-0985;

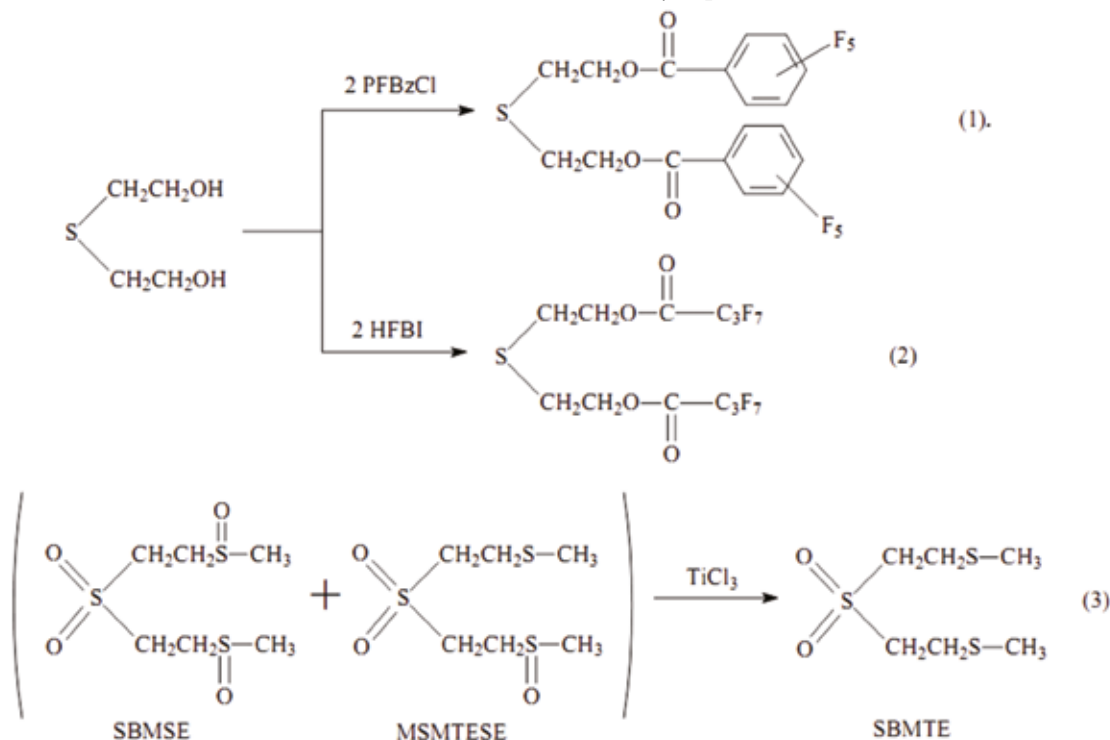
Наждачная бумага, Interlab, кат. № 5061-5896;
 Наконечник к дозатору до 5 мл, Sigma, кат. № Z332925-2РАК;
 Перчатки нейлоновые, Interlab, кат. № 8650-0030;
 Проверочный стандарт, Interlab, кат. № 5188-5348;
 Прокладка для лайнера O-ring, Agilent, кат. № 5188-5311;
 Салфетки для очистки МСД, Interlab, кат. № 9310-4828;
 Тампоны для чистки МСД, Interlab, кат. № 5080-5400;
 Термошкаф, HS 62A;
 Тестовая смесь для GC/MS Semi-Vol Analyzer, Checkout Mix, Interlab, кат. № 5190-0473;
 Ткань без волокон, Interlab, кат. № 05980-60051;
 Ферулы металлические, Agilent, кат. № 5188-5361;
 Шейкер, Tube Shaker TS-36.

Результаты и обсуждение

Оптимизация процедуры пробоподготовки

В качестве объектов исследования были выбраны наиболее характерные метаболиты серного иприта – тиодигликоль и SBMTE.

Наличие тиодигликоля в плазме крови и в моче определяли с помощью двух дериватизирующих реагентов: пентафторбензоилхлорида (PFBzCl) и гептафторбутирилмидазола (HFBI). β -лиазный метаболит иприта SBMTE определяли в моче с помощью треххлористого титана – при взаимодействии последнего со смесью SBMSE и MSMTESE. В результате проведения процедуры дериватизации образуются аналиты 2,2'-тиобисэтанолдипентафторбензоат TDGPFB (1), бис(2-гептафторбутирил)оксисульфид TDGHFB (2) и SBMTE (3) по схеме:



Перед хромато-масс-спектрометрическим исследованием готовили соответствующие калибровочные растворы стандартов изучаемых аналитов (1–3).

Подготовка стандартного раствора TDGPFB (1)

Для приготовления растворов тиодигликоля (ТДГ) в этилацетате с концентрациями 1×10^{-3} ; 1×10^{-4} ; 1×10^{-5} ; 1×10^{-6} и 1×10^{-7} мг/мл проводили дериватизацию каждого раствора: к 500 мкл раствора добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на вортексе 10 мин и центрифугировали; к отобранной аликвоте добавляли 15 мкл пиридина, 20 мкл пентафторбензоилхлорида и 10 мкл метанола (выпадает белый осадок); смесь перемешивали на вортексе 10 мин и центрифугировали; к отобранной аликвоте добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на вортексе 10 мин и опять центрифугировали.

Si-SPE-картридж (100 мг) кондиционировали 1 мл этилацетата, 200 мкл реакционной смеси пропускали через картридж и затем пропускали 400 мкл чистого этилацетата. Фракции (200+400 мкл) объединяли и проводили ГХ-МС/МС анализ³ [2].

Подготовка пробы мочи для определения ТДГ с использованием PFBzCl

Картридж «OASIS HLB» кондиционировали 1 мл ацетонитрила и 1 мл воды. 1 мл урины наносили на картридж, промывали 0,5 мл воды и сушили 5 мин под слабым вакуумом («манифолд»). Смывали в чистую виалу 2,0 мл аналиты ацетонитрила (2 раза по 0,75 мл). Упаривали смесь в токе азота досуха при 400 °С. Добавляли 50 мкл пиридина и 10 мкл PFBzCl, смесь перемешивали на вортексе и выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Добавляли 440 мкл толуола, перемешивали на вортексе, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отделяли в чистую виалу надосадочную жидкость и проводили ГХ-МС/МС анализ⁴ [3].

Осаждение белков из плазмы крови и разложение аддуктов

В виале 12,0 мл к 1 мл плазмы крови добавляли 10 мл ацетона и помещали в шейкер на 10 мин. Охлаждали до 50 °С и центрифугировали при 4300 g 10 мин. Сливали ацетон, к осадку приливали 6–7 мл чистого ацетона и повторяли промывку с перемешиванием, охлаждением и центрифугированием. Сливали ацетон и промывали чистым ацетоном с перемешиванием, охлаждением и центрифугированием еще раз.

Виалу с осадком накрывали марлей (бинтом) и закрепляли ее, чтобы при сушке не «вылетел» легкий осадок, после чего помещали виалу в вакуумный эксикатор и высушивали осадок при комнатной температуре (примерно 1 ч).

После высушивания 25 мг осадка переносили в виалу 4,0 мл, добавляли 200 мкл 1 М раствора NaOH и нагревали в термошкафу при 700 °С до полного растворения (примерно 2 ч). Добавляли 70 мкл 3 М HCl, 1 мл этилацетата и перемешивали на шейкере 10 мин. Добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отбирали аликвоту 500 мкл в виалу 2,0 мл.

Далее проводили дериватизацию: в виалу 2,0 мл к 500 мкл раствора добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин.; к отобранной в виалу 2,0 мл аликвоте добавляли 15 мкл пиридина, 20 мкл PFBzCl (выпадает белый осадок) и 10 мкл метанола; смесь перемешивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин; к отобранной в виалу 2,0 мл аликвоте добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Si-SPE картридж (100 мг) кондиционировали 1 мл этилацетата, 200 мкл реакционной смеси пропускали через картридж и затем пропускали 400 мкл чистого этилацетата. Фракции (200+400 мкл) объединяли и проводили ГХ-МС/МС анализ⁵ [4].

Приготовление растворов метаболита TDGHFB (2) для определения в моче

Картридж «OASIS HLB» кондиционировали 1 мл ацетонитрила и 1 мл воды, 1 мл урины наносили на картридж, промывали 0,5 мл воды и сушили 5 мин под слабым вакуумом. Смывали в чистую виалу (1,5 мл) аналиты ацетонитрилом (2 раза по 0,75 мл). Упаривали смесь в токе азота досуха при 40 °С, перерастворяли осадок в 200 мкл ацетонитрила. Добавляли 30 мкл гептафторбутирилимидазола и выдерживали в термошкафу 30 мин при 50 °С. Смесь охлаждали, добавляли 200 мкл воды, перемешивали на шейкере. Экстрагировали гептаном (2 раза по 300 мкл) и выдерживали в ультразвуковой ванне по 5 мин. Отобранные фракции объединяли в виале 2,0 мл и упаривали в токе азота до 200 мкл, смесь переносили в виалу со вставкой и концентрировали в токе азота до 50 мкл. Фракции объединяли и проводили ГХ-МС/МС анализ⁶ [4].

³ Standard operating procedure...

⁴ Ibid.

⁵ Ibid.

⁶ Ibid.

Подготовка пробы плазмы для определения ТДГ с использованием HFBI

В виалу 10,0–12,0 мл к 1 мл плазмы добавляли 10 мл ацетона и помещали в шейкер на 10 мин. Охлаждали до 5 °С и центрифугировали при 4300 g 10 мин. Сливали ацетон, к осадку приливали 6–7 мл чистого ацетона и повторяли промывку с перемешиванием, охлаждением и центрифугированием. Сливали ацетон и промывали чистым ацетоном с перемешиванием, охлаждением и центрифугированием еще раз.

Виалу с осадком накрывали марлей (бинт) и закрепляли ее, чтобы при сушке не «вылетел» легкий осадок, после чего помещали виалу в вакуумный эксикатор и высушивали осадок при комнатной температуре (примерно 1 ч).

После высушивания 25 мг осадка переносили в виалу 4,0 мл, добавляли 200 мкл 1 М раствора NaOH и нагревали в термошкафу при 70 °С до полного растворения (примерно 2 ч). Добавляли 70 мкл 3 М HCl, 1 мл этилацетата и перемешивали на шейкере 10 мин. Добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Отбирали аликвоту 500 мкл в виалу 2,0 мл.

Далее проводили дериватизацию: в виалу 2,0 мл к 500 мкл раствора добавляли 200 мг сульфата натрия, перемешивали на шейкере 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин; надосадочную жидкость отбирали в чистую виалу, упаривали в токе азота при 40 °С досуха и перерастворяли в 200 мкл ацетонитрила; добавляли к смеси 30 мкл гептафторбутирилимидазола и выдерживали в термошкафу 30 мин при 50 °С, смесь охлаждали, добавляли 200 мкл воды, перемешивали на шейкере, экстрагировали гептаном (2 раза по 300 мкл) и выдерживали в ультразвуковой ванне по 5 мин, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин; отобранные фракции объединяли в виале 2,0 мл и упаривали в токе азота до 200 мкл, смесь переносили во вставку и концентрировали в токе азота до 50 мкл. Фракции объединяли и проводили ГХ-МС/МС анализ 7 [5].

Подготовка пробы мочи для определения β-лиазных метаболитов с трихлоридом титана (TiCl₃) – определение биомаркера SBMTE (3)

Готовили «стандартную» пробу урины следующим образом: по 5 мкл стандартов Std SBMSE и Std MSMTSE с C=10 мкг/мл вносили в виалу 4,0 мл, добавляли 0,99 мл урины, в случае бланка – 1,0 мл урины. К пробе урины (1 мл) прибавляли 1 мл 15% раствора TiCl₃ в 30% HCl, смесь выдерживали 1 ч при 75 °С. После охлаждения осторожно (вспенивание) добавляли к смеси 1 мл 10 М NaOH. Выпавший осадок отде-

ляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отделяли, переносили в виалу 4,0 мл и центрифугировали повторно (при необходимости еще раз). Картридж «OASIS HLB» кондиционировали 2 мл метанола и затем 4 мл воды. Супертанант, не содержащий взвеси, наносили на картридж, промывали 2 мл воды, сушили 15 мин под вакуумом и смывали аналиты 3 мл метанола (виала 4,0 мл).

Смесь переносили в чистую виалу 4,0 мл и упаривали досуха, перерастворяли в 200 мкл смеси (180 мкл толуола + 20 мкл ацетонитрила). Элюат упаривали досуха при 50 °С, осадок перерастворяли в 3 мл ацетонитрила, если появлялся осадок или взвесь, то центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Смесь перемешивали на шейкере и выдерживали в ультразвуковой ванне 5 мин. Смесь переносили в виалу со вставкой и концентрировали до 50 мкл, в случае бланка – до 100 мкл, и проводили ГХ-МС/МС анализ [5].

Синтез соответствующих стандартов (1–3) TDGPFB (1), TDGHFB (2) и SBMTE (3) проводили по известным методикам. Содержание полученных целевых продуктов (по данным хромато-масс-спектрометрии) составляло 97–99,5%.

Пробоподготовка стандартов для последующего хроматографического разделения и масс-детектирования заключалась в обычном приготовлении растворов данных веществ в соответствующих растворителях с концентрациями от 0,01 до 500 нг/мл.

Выбор условий хроматографического разделения и масс-детектирования низкомолекулярных биомаркеров серного иприта

Оптимизированные условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования определяемых биомаркеров (1–3) представлены в таблице 1.

Определение оптимальных значений энергии ячейки соударений для исследуемых биомаркеров

При использовании трехквadrupольных масс-селективных детекторов максимальная интенсивность (Int) хроматографического сигнала в режиме сканирования MRM зависит в основном от оптимальной энергии ячейки соударений (CE) для основного масс-энергетического перехода. Эта величина является индивидуальной для каждого исследуемого органического соединения, и в условиях проводимого эксперимента всегда рассчитывается при варьировании энергии в пределах 1–35 эВ с помощью программного обеспечения.

⁷ Standard operating procedure...

Таблица 1 – Оптимальные параметры газохроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения сверхнизких концентраций маркеров серного иприта в биоорганических пробах (моча и кровь) для хроматографа «Agilent 7890A» и трехквадрупольного масс-селективного детектора «Agilent 7000B GC/MS Triple Quad» в режимах биполярной метановой химической ионизации

Параметр хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования	Значение параметра для определяемых аналитов 1–3		
	TDGPFB (1)	TDGHFB (2)	SBMTE (3)
Ввод пробы	Программируемый, с помощью автосамплера «Agilent 7693A»		
Объем вводимого раствора аналита, мкл	1,0		
Режим ввода пробы	Без разделения потока (Splitless)		
Температура ввода пробы (испаритель), °C	250	200	250
Время задержки растворителя, мин	4,0	3,5	3,5
Тип ввода пробы	Вертикальный		
Тип и неподвижная фаза хроматографической колонки	Agilent DB-5MS Ultra Inert / (5% фенил 95% диметилариленилсилоксан), 30 м x 0.25 мм x 0.25 мк		
Режим программирования температуры термостата колонки	80 °C (1 мин), 30 °C/мин 225 °C (11 мин) 50 °C/мин 300 °C (2 мин)	80 °C (1 мин) 20 °C/мин 280 °C (4 мин)	90 °C (2 мин) 20 °C/мин 290 °C (4 мин)
Газ-носитель	Гелий сжатый газообразный высокой чистоты марки «7.0», чистота не менее 99,99999% (по ТУ 0271-001-45905715-02)		
Скорость потока гелия через колонку, 1 мл/мин	Постоянная		
Скорость и время потока гелия после разгонки	60 мл/мин в течение 2 мин	60 мл/мин в течение 3 мин	50 мл/мин в течение 2 мин
Вакуум внешнего насоса, мм рт. ст.	(2,18–2,23)·10 ⁻¹		
Вакуум внутреннего турбонасоса, мм рт. ст.	(7,78–7,79)·10 ⁻⁵		
Скорость потока гелия через септу, мл/мин	3,0		
Число промываний иглы шприца абсолютным хлористым метилом (до ввода пробы и после)	6		
Тип масс-селективного детектора	фирмы «Agilent» – проприетарный кварцевый гексапольный анализатор с гиперболической поверхностью электродов и многослойным композитно-золотым покрытием		
Режим масс-селективного детектирования	«SRM» (мониторинг множественных реакций)		
Определяемые основные масс-энергетические переходы,	m/z 510 → 211, 167	m/z 301 → 241, 169	m/z 215, 167 → 75
Энергия ячейки соударений для масс-энергетических переходов	4 эВ (m/z 510 → 211); 10 эВ (m/z 510 → 167)	6 эВ (m/z 301 → 241); 14 эВ (m/z 301 → 169)	10 эВ (m/z 215 → 75); 15 эВ (m/z 167 → 75)
Полярность химической ионизации	Отрицательная	Положительная	Положительная
Внутренний калибровочный стандарт для химической ионизации	Перфтор-5,8-диметил-3,6,9-триоксидодекан (ПФДТД)		
Газ-реагент для химической ионизации	Метан газообразный марки «4.0», чистота не менее 99,99 % (по ТУ 51-841-87)		
Газ ячейки соударений	Азот сжатый газообразный высокой чистоты, чистота не менее 99,9999% (по ТУ 2114-009-45905715-2011)		
Скорость потока метана в ячейке соударений, мл/мин	2,0 мл/мин	1,0 мл/мин	1,0 мл/мин
Скорость потока гелия в ячейке соударений, мл/мин	2,25		
Время удерживания максимальной высоты сигнала (пика) хроматограммы, мин	12,46	5,44	9,60
Скорость потока азота в ячейке соударений, мл/мин	1,5		
Температура источника ионов, °C	150	190	250
Температура переднего квадруполя, °C	200	150	150
Температура заднего квадруполя, °C	200	150	150

Параметр хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования	Значение параметра для определяемых аналитов 1-3		
	TDGPFB (1)	TDGHFB (2)	SBMTE (3)
Диапазон сканируемых масс, m/z	42-550	42-750	35-500
Время сканирования, циклов/с	5,2-9,8 (35-51 мс/цикл)	5,2-9,8 (35-51 мс/цикл)	5,2-9,8 (35-51 мс/цикл)
Масс-разрешение	Unit	Unit	Unit
Ширина щели пучка ионов, условных ед.	100	150	150
Шаг сканирования, а.е.м.	0,1		
Порог детектирования, условных ед.	100		
Коэффициент усиления сигнала (Gain)	10		
Энергия эмиссии электронов, эВ	200	225	225
Сила тока эмиссии электронов, мкА	150	135	180
Ширина детектируемого пика, с	0,7		

Математическая зависимость при этом фактически должна быть всегда дифференцированная (степенная), а вторая координата точки экстремума получаемой функции (шкалы ординат) должна являться оптимальным показателем энергии ячейки соударений.

Расчеты зависимости интенсивности сигнала (Int) от показателя энергии ячейки соударений (CE) проводили для значений концентрации проб $C=100,0$ нг/мл (100 ppb) для биомаркеров (1-3) с использованием лицензионного программного обеспечения для математической и статистической обработки данных^{8,9}.

Полученные экспериментальные зависимости интенсивности сигнала (Int) от показателя

энергии ячейки соударений (CE) для биомаркеров (1-3) для основных масс-энергетических переходов представлены на рисунках 1-3.

Проведенная математическая (статистическая) обработка данных с использованием ПЭВМ и стандартизированного программного обеспечения позволила оценить полученные результаты, получить следующую зависимость и вывести уравнение:

$$\text{Int} (m/z (510 \rightarrow 167)) = -38,194(CE)^2 + 786,41 (CE) + 1684,3,$$

где:

Int – интенсивность сигнала основного масс-энергетического перехода $m/z (510 \rightarrow 167)$, отн. ед.;

CE – энергия ячейки соударений, эВ.

⁸ Руководство пользователя работы с газовым хроматографом «Agilent 7890A» и масс-селективным детектором «Agilent 7000B GC/MS Triple Quad». Программное обеспечение для управления и обработки данных «Mass Hunter Workstation Software, Qualitative and Quantitative Analysis, version B.04.00 build 4.0.479.0», фирма «Agilent Technologies», США, 2013.

⁹ Программное обеспечение для математических расчетов «Mathcad», Add-In for Excel, ver. 15.0.8 for Windows 7,8,XP, Microsoft&Co, 2015.

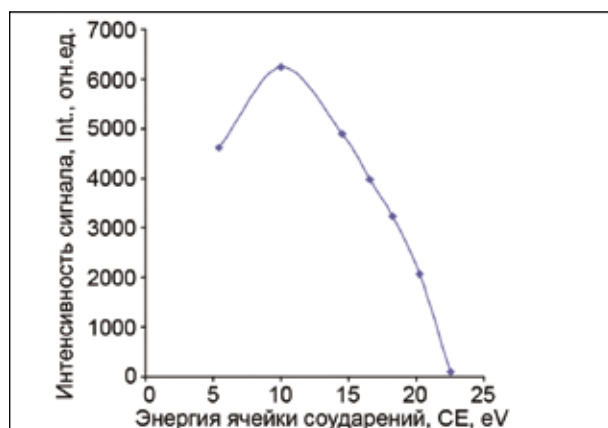


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности сигнала (Int) хроматографического пика от показателя энергии ячейки соударений (CE) для биомаркера TDGPFB (1) для основного масс-энергетического перехода $m/z 510 \rightarrow 167$ (концентрация пробы 100,0 нг/мл)

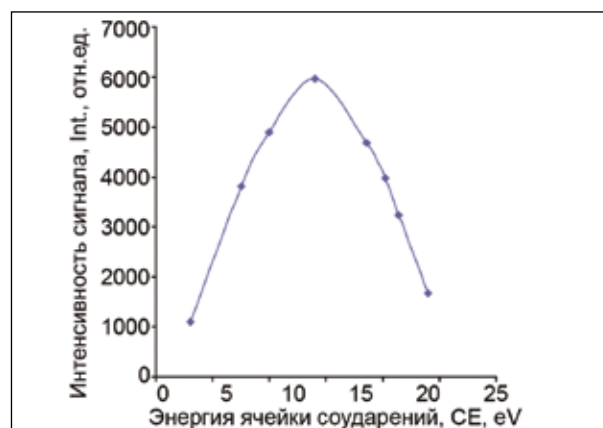


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности сигнала (Int) хроматографического пика от показателя энергии ячейки соударений (CE) для биомаркера TDGHFB (2) для основного масс-энергетического перехода $m/z 301 \rightarrow 169$ (концентрация пробы 100,0 нг/мл)

Математическая обработка данных и линии тренда данного графика позволила определить следующие основные статистические показатели полученной зависимости:

$R^2=0,9893$; $R=0,98$; $\beta=-0,947$; $F=529,9$; $df=1,93$; $P=0$; $B=12,89$; $Std.error=0,127$.

Полученные показатели зависимости свидетельствуют о валидности полученной математической модели. Точка экстремума полученной функции соответствует максимальному значению интенсивности сигнала при наиболее оптимальной энергии ячейки соударений ($CE = 10,0$ эВ), что соответствует экспериментальным данным.

Наложенная линия тренда на экспериментальную кривую коррелирует с полученной зависимостью с вероятностью более 0,98.

Аналогичное исследование было проведено с биомаркером (2), рисунок 2.

Как и в предыдущих двух случаях, проведенная математическая (статистическая) обработка данных с использованием ПЭВМ и стандартизированного программного обеспечения позволила оценить полученные результаты, получить следующую зависимость и вывести уравнение:

$Int(m/z(167 \rightarrow 75)) = -24,09(CE)^2 + 715,1(CE) - 1196,3$,

где:

Int – интенсивность сигнала основного масс-энергетического перехода $m/z(167 \rightarrow 75)$, отн. ед;

CE – энергия ячейки соударений, эВ.

Дальнейшая математическая обработка данных и линии тренда данного графика позволила определить следующие основные статистические показатели полученной зависимости:

$R^2=0,9828$; $R=0,962$; $\beta=-0,96$; $F=563$; $df=1,82$; $P=0$; $B=12,00$; $Std.error=0,14$.

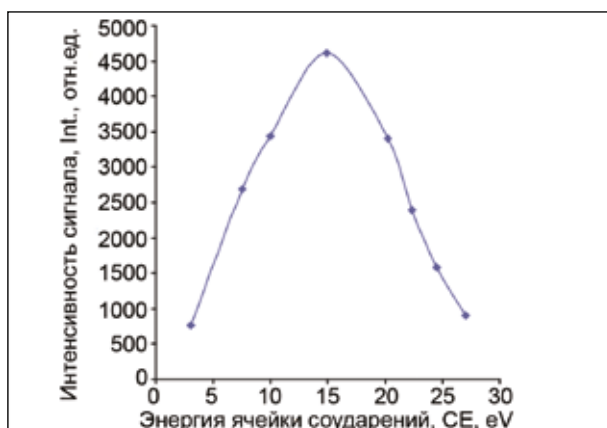


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности сигнала (Int) хроматографического пика от показателя энергии ячейки соударений (CE) для биомаркера SBMT (3) для основного масс-энергетического перехода $m/z 167 \rightarrow 75$ (концентрация пробы 100,0 нг/мл)

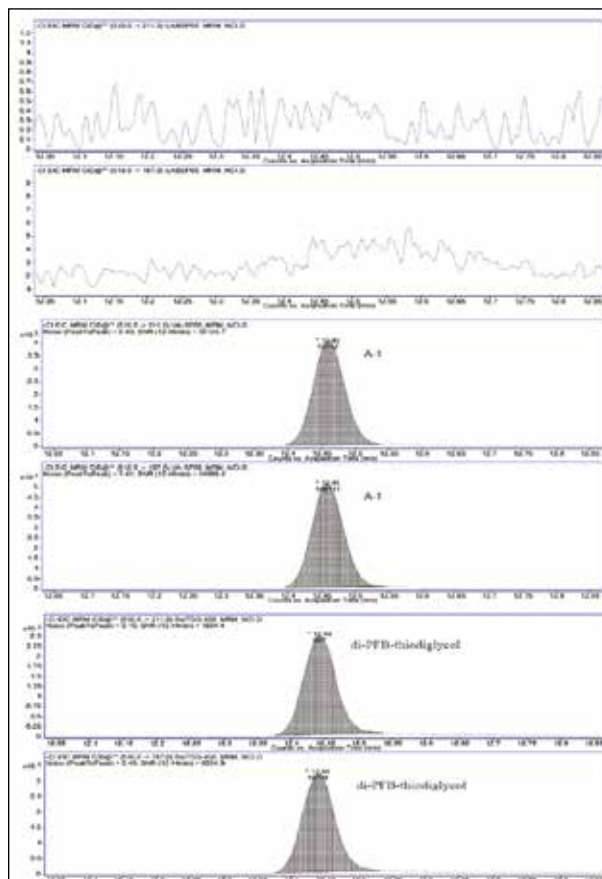


Рисунок 4 – MRM-хроматограммы бланка, пробы определяемого биомаркера TDGPFB (1) и стандарта исследуемого аналита по основным масс-энергетическим переходам $m/z 510 \rightarrow 211, 167$

Полученные показатели зависимости свидетельствуют о валидности полученной математической модели. Точка экстремума полученной функции соответствует максимальному значению интенсивности сигнала при наиболее оптимальной энергии ячейки соударений ($CE = 15,0$ эВ), что соответствует экспериментальным данным.

Наложенная линия тренда на экспериментальную кривую коррелирует с полученной зависимостью с вероятностью более 0,98.

Таким образом, в данном подразделе исследований были определены оптимальные значения энергии ячейки соударений для исследуемых биомаркеров (1–3).

Результаты хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования биомаркеров

Хроматографическое разделение и масс-спектрометрическое детектирование в режиме МС/МС-сканирования для биомаркеров (1–3) проводили в соответствии с настройками прибора, указанными в таблице 1. В целях достоверности результатов перед каждым введением

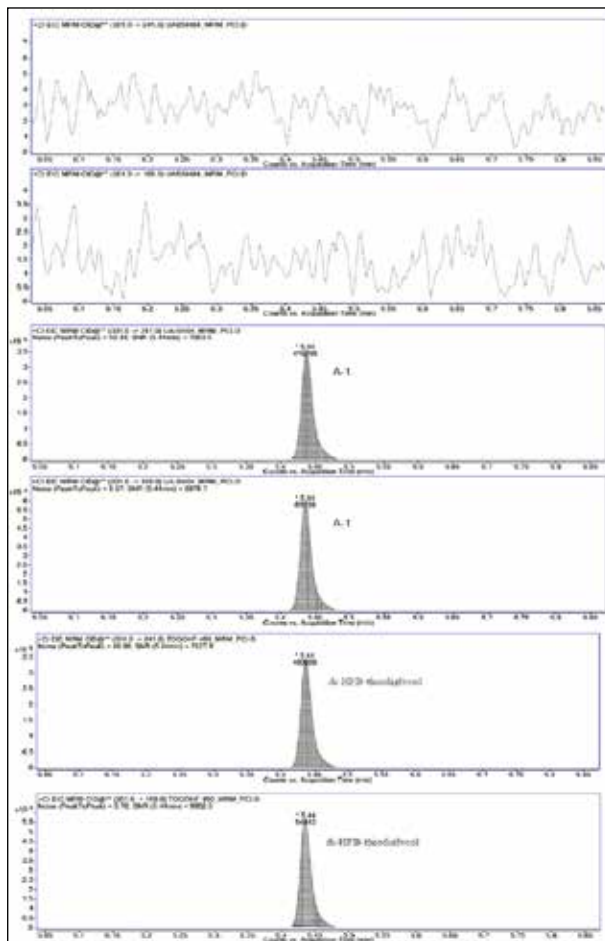


Рисунок 5 – MRM-хроматограммы бланка, пробы определяемого биомаркера TDGHFB (2) и стандарта исследуемого аналита по основным масс-энергетическим переходам m/z 301 $\rightarrow$ 241, 169

(вкол) растворов определяемых биомаркеров (1–3) вводили холостую (бланковую) пробу соответствующего растворителя. На каждом последующем шаге в целях сравнительного анализа проводили анализ стандартов исследуемых проб, которые были синтезированы по известным методикам^{10, 11}.

На рисунках 4–6 представлены MRM-хроматограммы бланков, определяемых биомаркеров (1–3) и соответствующих им стандартов по двум основным масс-энергетическим переходам.

Определение пределов обнаружения биомаркеров в моче и в плазме крови

После проведенной пробоподготовки очередным этапом исследования явилось определение пределов обнаружения минимальных значений сверхнизких концентраций анали-

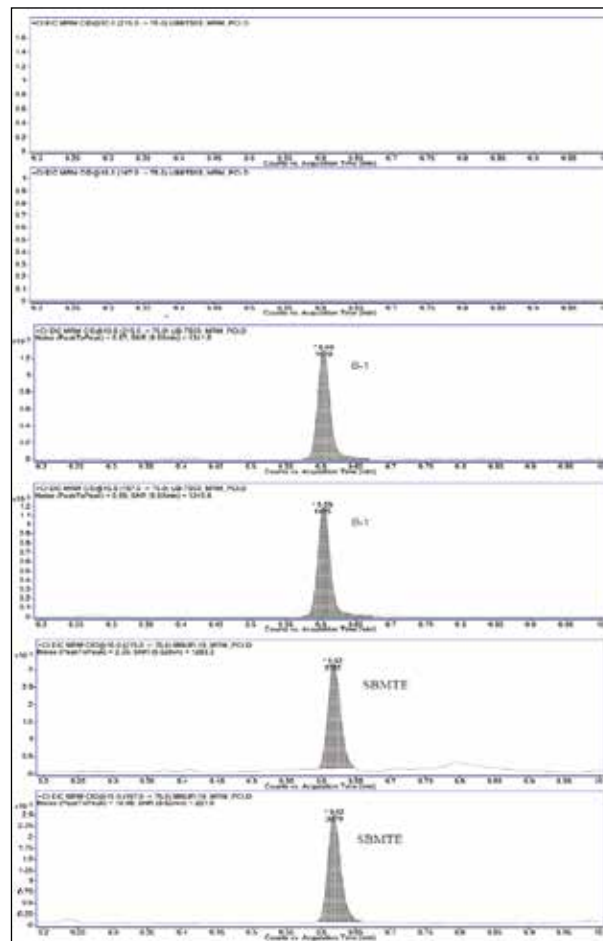


Рисунок 6 – MRM-хроматограммы бланка, пробы определяемого биомаркера SBMTE (3) и стандарта исследуемого аналита по основным масс-энергетическим переходам m/z 215, 167 $\rightarrow$ 75

зируемых биомаркеров серного иприта (1–3) в моче и плазме крови.

В экспериментах использовались только сертифицированные ОЗХО моча и плазма крови.

В качестве минимального принималось значение интенсивности хроматографического сигнала и шума (SNR), равное 5. При меньшем значении данного показателя идентификация вещества не является достоверной в связи с сопоставимостью величин интенсивностей нанопримесей (шум) и самого определяемого вещества. Соотношение сигнал/шум (SNR) и площади хроматографических пиков биомаркеров серного иприта (1–3) рассчитывались с помощью соответствующего программного обеспечения¹², и приведены в таблице 2. Во всех случаях оценивались TIC-MRM-хроматограммы, включающие в себя два основных масс-энергетических перехода.

¹⁰ Руководство пользователя...

¹¹ Программное обеспечение...

¹² Там же.

Таблица 2 – Отношение показателей сигнал/шум (SNR) от концентрации исследуемых биомаркеров серного иприта (1–3) в различных биосредах

Биомаркер/биосреда	Концентрация метаболита, С, нг/мл	Площадь хроматографического пика, TIC-MRM (суммарно по двум масс-энергетическим переходам), S, усл. ед.	Отношение сигнал/шум, SNR, усл. ед.
TDGPFB (1) / моча	0,05	5	3,5
	0,1	11	10,3
	0,25	20	94
	0,5	46	119
	1,0	78	128
	2,0	140	156
	5,0	280	218
	10,0	409	276
TDGHFB (2) / моча	0,1	187	5,2
	0,25	359	22,7
	0,5	745	98,3
	1,0	1486	177
	10,0	3597	344
	50,0	9366	2007
	100	28101	30765
	300	85289	47014
	450	169543	66117
TDGHFB(2) / плазма крови	0,25	17,1	6,0
	0,5	38	77
	5,0	205	251
	10,0	416	402
	20,0	944	1276
	50,0	2154	31542
	100,0	3965	37802
SBMTE (3) / моча	0,5	28	5,5
	1,0	454	13
	5,0	2324	39
	10,0	7151	136
	50	17802	259
	100	33147	389
TDGPFB (1) / плазма крови	0,25	18,1	6,3
	0,5	48	69
	5,0	213	278
	10	454	441
	20	898	1273
	50	1892	5432

Проведя анализ полученных выше результатов, представленных в таблице 2, и используя программное обеспечение для математической обработки данных¹³, строили

¹³ Программное обеспечение...

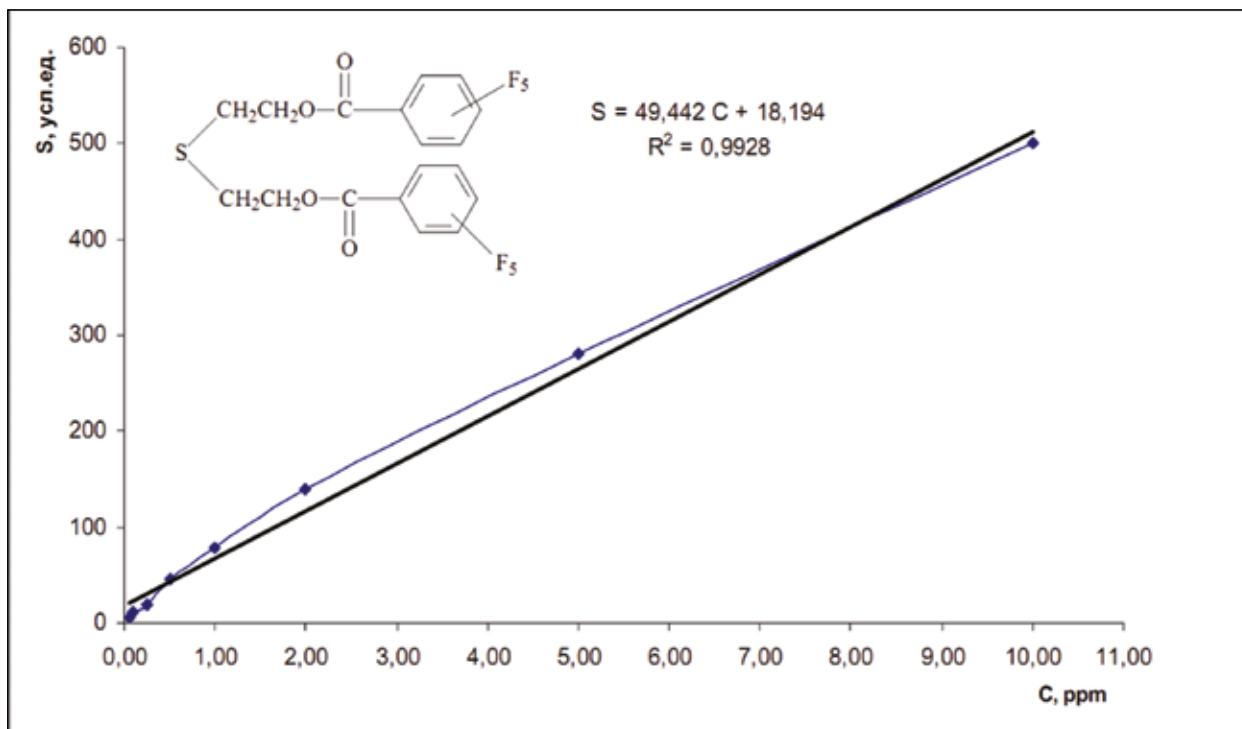


Рисунок 7 – График зависимости показателя площади хроматографического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации TDGPFB (1) в моче (с наложенной линией тренда)

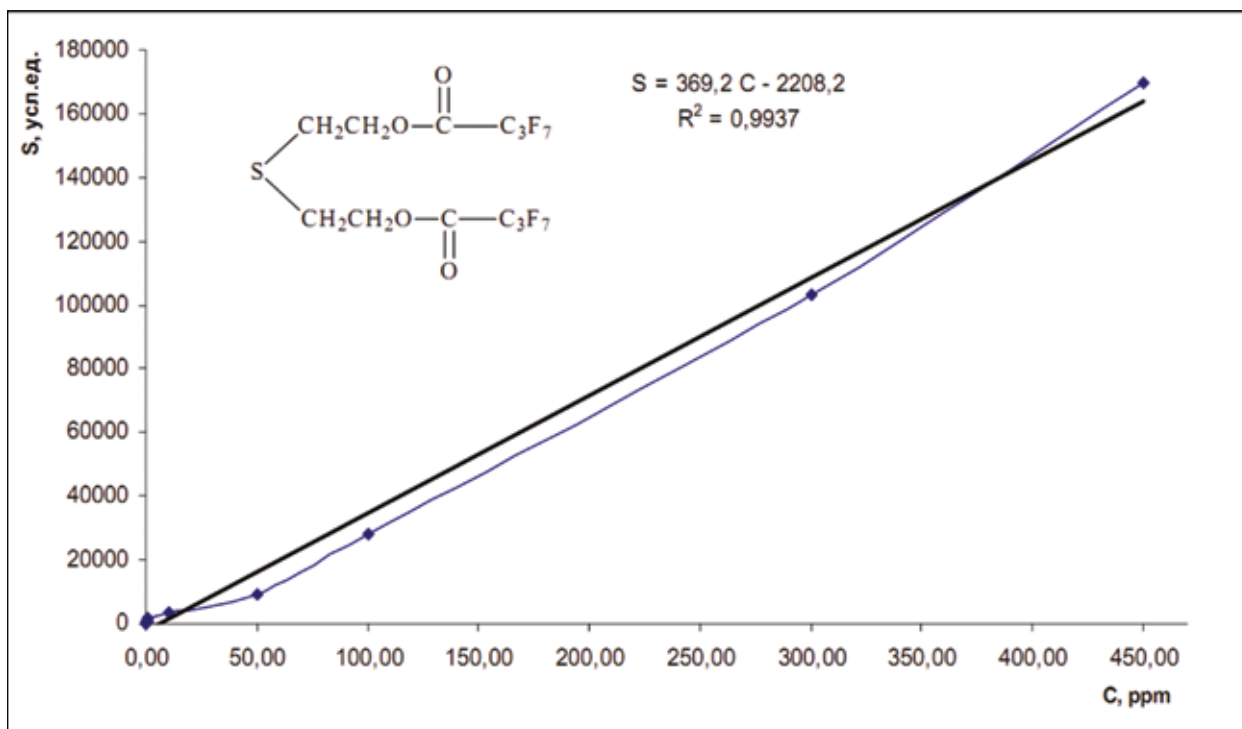


Рисунок 8 – График зависимости показателя площади хроматографического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации TDGHFB (2) в моче (с наложенной линией тренда)

соответствующие графики зависимости показателей площади хроматографического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации исследу-

емых биомаркеров (1–3) в моче и в плазме крови (рисунки 7–11).

Как видно из приведенных выше зависимостей показателей площади хроматогра-

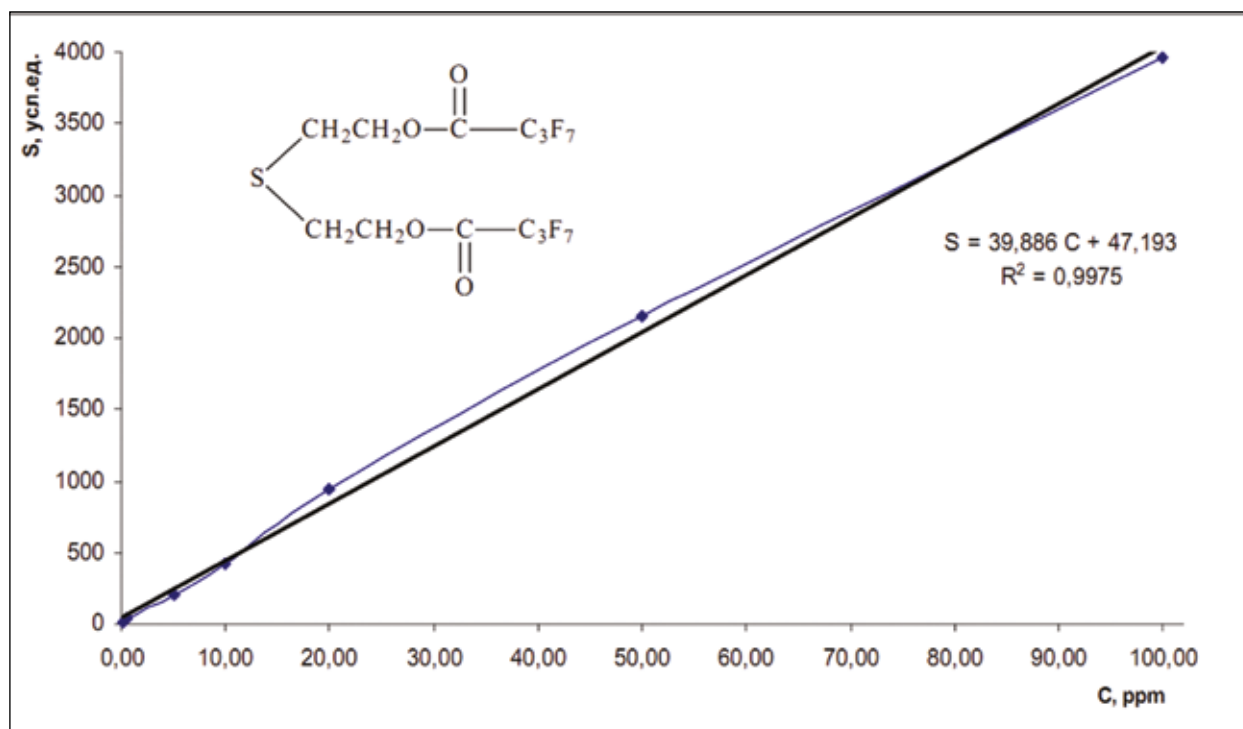


Рисунок 9 – График зависимости показателя площади хроматографического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации TDGHFB (2) в плазме крови (с наложенной линией тренда)

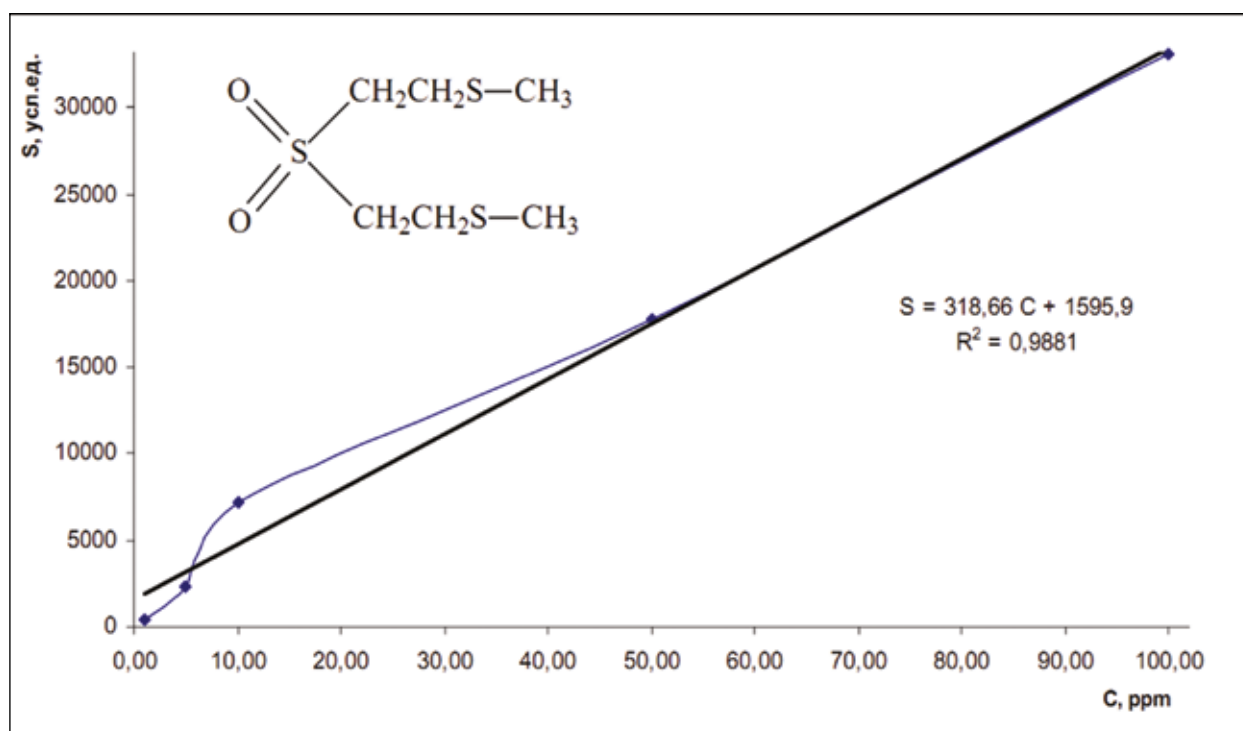


Рисунок 10 – График зависимости показателя площади хроматографического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации SBMTE (3) в моче (с наложенной линией тренда)

фического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации исследуемых биомаркеров (1–3) в моче и в плазме крови, рассчитанные математические модели имеют линейный характер,

среднеквадратичные отклонения ($R^2 > 0,99$) коррелируют по обеим координатам точек и в целом в рассчитанной функции. Это обстоятельство свидетельствует о валидности построенных функциональных зависимостей и

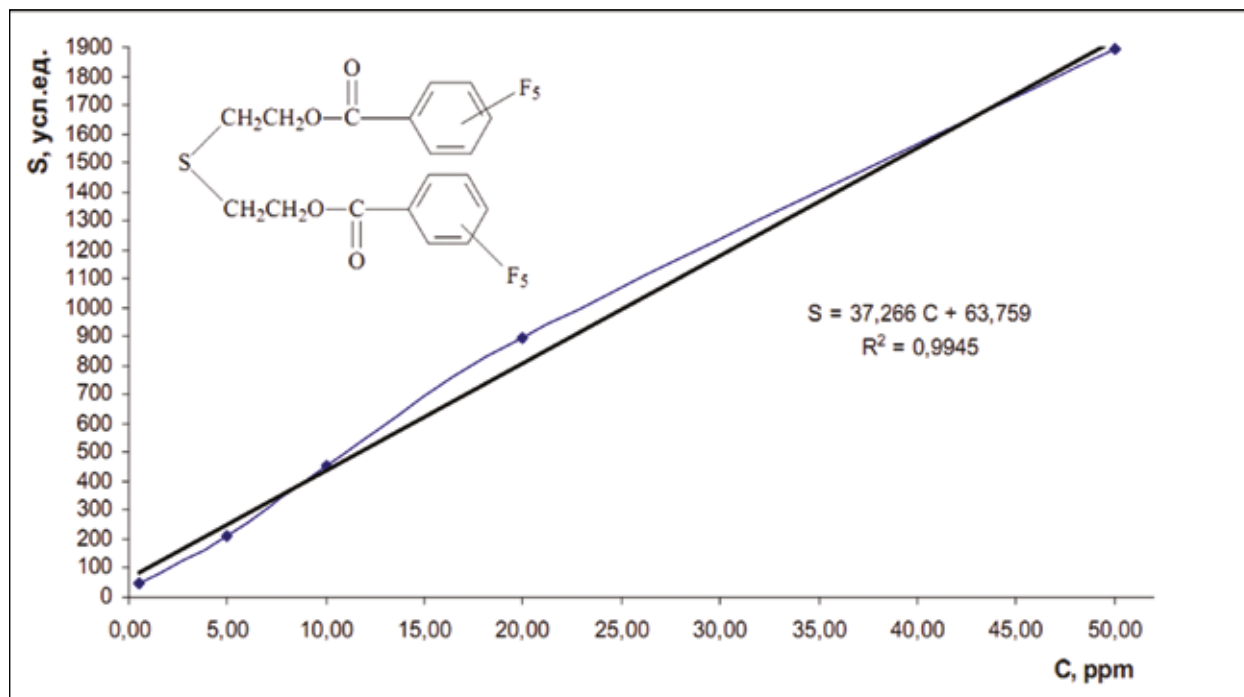


Рисунок 11 – График зависимости показателя площади хроматографического пика TIC-MRM (по двум масс-энергетическим переходам) от концентрации TDGPFB (1) в плазме крови (с наложенной линией тренда)

может быть использовано в дальнейшем для определения биомаркеров серного иприта в моче и в крови человека.

Таблица 3 – Отношение показателей сигнал/шум (SNR) от концентрации исследуемых биомаркеров серного иприта (1–3) в различных биосредах

Биомаркер, номер, формула	Предел обнаружения, С, нг/мл	
	Биосреда	
	Моча	Плазма крови
TDGPFB (1) 	0,08±0,01	0,19±0,01
TDGHFB (2) 	0,096±0,012	0,20±0,02
SBMTE (3) 	0,45±0,01	–

Исходя из полученных значений соотношений сигнал/шум и определенных при этом концентраций обнаруженных биомаркеров, приведенных в таблице 2, были рассчитаны пределы обнаружения данных веществ в моче и в плазме крови в принятых условиях эксперимента (таблица 3).

Необходимо отметить, что полученные пределы обнаружения (в одинаковых условиях хроматографирования и масс-селективного детектирования) биомаркеров серного иприта TDGPFB (1), TDGHFB (2) и SBMTE (3) в стандартных растворах во всех случаях оказались ниже полученных экспериментальных данных

для мочи и плазмы крови на 10 и 15% соответственно. При этом при математической обработке данных полученные среднеквадратичные отклонения в линейной зависимости также коррелируют по отдельным координатам точек и в целом в рассчитанной функции [7, 8].

Полученные выше результаты были использованы при разработке способов определения маркеров серного иприта в биологических пробах с использованием газового хроматографа «Agilent 7890A» и трехквadrupольного масс-селективного детектора «Agilent 7000B GC/MS Triple Quad» в режимах химической ионизации.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла двойное рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction (English version). Printed and distributed by the Technical Secretariat of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, 2005.
2. Barr J.R., Pierce C.L., Smith J.R. et al. Analysis of Urinary Metabolites of Sulfur Mustard in Two individuals after Accidental Exposure // J. Anal. Toxicol. 2008. V. 32, № 1. P. 10–16.
3. Lin Y., Dong Y., Chen J. et al. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of β -lyase metabolites of sulfur mustard adducts with glutathione in urine and its use in a rabbit cutaneous exposure model // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2014. V. 945–946. P. 233–239.
4. Young C.L., Ash D., Driskell W.J. et al. 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. V. 28. № 5. P. 339–345.
5. Xu H., Nie Z., Zhang Y. et al. Four Sulfur Mustard Exposure Cases: Overall Analysis of Four Types of Biomarkers in Clinical Samples Provides Positive Implication for Early Diagnosis and Treatment Monitoring // Toxicol. Rep. 2014. V. 1. P. 533–543.
6. Nie Z., Liu Q., Xie J. Improvements in Monitoring the N-terminal Valine Adduct in Human Globin after Exposure to Sulfur Mustard and Synthesis of Reference Chemicals. Talanta. 2011. V. 85 2. P. 1154–1159.
7. Black R.M., Brewster K., Clarke R.J. et al. Biological Fate of Sulphur Mustard, 1,1'-Thiobis(2-chloroethane): Isolation and identification of Urinary Metabolites Following Intraperitoneal Administration to Rat // Xenobiotica. 1992. V. 22, № 4. P. 405–418.
8. Black R.M. An Overview of Biological Markers of Exposure to Chemical Warfare Agents // J. Anal. Toxicol. 2008. V. 32, № 1. P. 2–9.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 105005, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13.

Корнеев Дмитрий Олегович. Старший научный сотрудник отдела, канд. хим. наук, доц.

Петракова Лидия Васильевна. Научный сотрудник отдела.

Понсов Михаил Александрович. Старший научный сотрудник отдела, канд. хим. наук, доц.

Родионов Александр Анатольевич. Старший научный сотрудник отдела, канд. техн. наук, проф. АВН.

Контактная информация для всех авторов: 27nc_1@mil.ru
Контактное лицо: Корнеев Дмитрий Олегович; 27nc_1@mil.ru

ELABORATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT MUSTARD GAS BIOMARKERS IN BIOLOGICAL SAMPLES

D.O. Korneev, L.V. Petrakova, M.A. Ponsov, A.A. Rodionov

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Brigadirskii Lane 13, Moscow 105005, Russian Federation

The relevance of the development and the improvement of methods for the determination of metabolites (biomarkers) of toxic substances in biological fluids (blood, urine, etc.) is associated with the need to establish facts of humans and animals exposure to toxic chemicals. The need for such analysis arises within the framework of monitoring of the compliance with the provisions of the Chemical Weapons Convention (CWC), when conducting investigations into the alleged use of chemical agents, as well as within the framework of the official proficiency tests carried out by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW). Nowadays there exists the problem of the determination of low-molecular-weight mustard gas biomarkers in biological samples with the use of gas chromatography methods with mass-selective detection. The low-molecular-weight biomarkers of sulfur mustard (SM) are thiodiglycol, oxides and sulfoxides. The identification and quantitative assessment of SM markers in blood and urine is carried out according to the methods, based on the displacement of thiodiglycol and its derivatives from protein conjugates with titanium trichloride, solid-phase extraction, concentration in ethyl acetate solution, derivatization with pentafluorobenzoyl chloride, heptafluorobutyrylimidazole, heptafluorobutyric acid anhydride or chloride, subsequent stripping of the derivative into the appropriate solvent and GH-MS analysis (chemical ionization technique with methane as a reagent gas with the registration of negative ions). After the sample preparation, the limits of detection of the minimum values of ultra-low concentrations of the analyzed biomarkers of SM in urine and blood plasma were determined. After the chromatographic analysis, the corresponding graphs of indicators have been constructed, based on the concentrations of biomarkers in urine and blood plasma. Later on they have been used for the elaboration of the methods for the determination of SM biomarkers in human urine and blood.

Keywords: *biomarkers; beta-lyase metabolites; Convention; nanodashes; poisonous substances; plasma sample preparation; sample preparation; toxic chemicals; chemical weapons; chromatographic separation; chromatographic peak; environmental study.*

For citation: *Korneev D.O., Petrakova L.V., Ponsov M.A., Rodionov A.A. Elaboration of a method for the determination of low-molecular-weight mustard gas biomarkers in biological samples // Journal of NBC Protection Corps. 2018. V. 2. № 3. P. 40–54.*

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

References List see P. 53.

Authors

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Brigadirskii Lane 13, Moscow 105005, Russian Federation.

Korneev Dmitry Olegovich. Senior Researcher of the Department. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor.

Petrakova Lidia Vasilyevna. Researcher of the Department.

Ponsov Mikhail Aleksandrovich. Senior Researcher of the Department. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor.

Rodionov Aleksandr Anatolyevich. Senior Researcher of the Department. Candidate of Technical Sciences, Professor of the Academy of Military Sciences.

Contact information for all authors: 27nc_1@mil.ru

Contact person: Korneev Dmitry Olegovich; 27nc_1@mil.ru