

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В БИМЕДИЦИНСКИХ ПРОБАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Берзин И.А., Романов В.С., Савельева Е.И. \*,  
Рыбальченко И.В. \*\*, Новиков С.В. \*\*,  
Василевский С.В. \*\*, Гончаров В.М. \*\*

*Научно-технический центр Федерального управления по безопасному хранению и  
уничтожению химического оружия,*

*119160, Москва, ул. Садовники, д.4а, +7(495)6455499, e-mail: snovik@yandex.ru*

*\* Научно-исследовательский институт «Гигиены, профпатологии и экологии  
человека» ФМБА России, Санкт-Петербург*

*\*\* ФГУ «27 Научный центр МО РФ», Москва*

### Резюме

В обобщенном виде представлены результаты разработки методики определения метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в биомедицинских пробах хромато-масс-спектрометрическим методом с использованием твердофазной экстракции.

**Ключевые слова:** фосфорорганические отравляющие вещества, метаболит, биомедицинская проба

### DETERMINATION OF METABOLITES OF NERVE AGENTS IN BIOMEDICAL SAMPLES USING SOLID-PHASE EXTRACTION

Berzin I.A., Romanov V.S., Savelieva E.I., Rybalchenko I.V., Novikov S.V.,  
Vasilevsky S.V., Goncharov V.M.

### Abstract

The results of development of analytical procedure for determination of metabolites of nerve agents in biomedical samples using GC-MS and solid-phase extraction are presented in generalized form.

**Keywords:** nerve agents, metabolite, biomedical sample.

## **Введение**

В последние годы вопросам анализа биомедицинских проб на наличие метаболитов отравляющих веществ (ОВ) уделяется все большее внимание. Так, анализ биомедицинских проб позволяет получать важную информацию, доказывающую факты отсутствия (или наличия) интоксикации и степень воздействия ОВ на персонал, занятый в работах с химическим оружием (ХО), и население, проживающее в районах размещения объектов по хранению и уничтожению ХО, а так же в случае применения ХО в локальных конфликтах и террористических акциях.

Особое внимание анализу биомедицинских проб уделяется и международной Организацией по запрещению ХО (ОЗХО). Так, в записке Технического секретариата ОЗХО (ЕС-42/S/4), указывается, что согласно Конвенции о запрещении ХО (Конвенция) [1] при проведении расследований предполагаемого применения ХО предусматривается отбор и анализ биомедицинских проб, источником которых являются люди и животные (пробы крови, мочи, кала, тканей и др.) [2]. Анализ этих проб имеет целью установить, действительно ли люди или животные в ходе возможного применения ХО, подверглись воздействию ОВ и, если подверглись, то какими были эти ОВ.

В случае быстрого доступа к месту предполагаемого применения ХО соответствующая информация может быть получена посредством наблюдения за клиническими симптомами у пораженных и проведения анализа проб из объектов окружающей среды. Однако, в тех случаях, когда доступ к месту предполагаемого применения ХО задерживается или невозможен, анализ биомедицинских проб, взятых у подвергшихся воздействию ОВ людей или животных, может оказаться единственным источником информации.

## **Требования к методикам определения отравляющих веществ и их метаболитов**

Вопросам анализа биомедицинских проб было посвящено специальное

заседание (2006 г.) рабочей группы при Научно-консультационном совете ОЗХО, на котором обсуждался облик перспективной системы аккредитованных ОЗХО лабораторий в качестве назначенных для анализа биомедицинских проб. В ходе заседания было отмечено, в требованиях, предъявляемых к анализу проб из объектов окружающей и техногенной среды и биомедицинских проб, существуют большие различия. Так, например, нижний предел обнаружения ОВ и продуктов их деградации в пробах из объектов окружающей и техногенной среды должен быть не менее 1-10 ppm, тогда как биомедицинских пробах на три, четыре десятичных порядка ниже. Кроме того, биомедицинские пробы имеют очень малые объемы, что ограничивает степень их концентрирования. Наличие подобных различий, по мнению участников заседания, требует особого подхода к процедурам подготовки проб к анализу и разработки специальных высокочувствительных методик определения биомаркеров факта воздействия ОВ в биомедицинских пробах.

#### **Биомаркеры фосфорорганических отравляющих веществ**

В качестве биомаркеров, подтверждающих факт воздействия фосфорорганических ОВ (ФОВ) на людей или животных, рабочей группой при Научно-консультационном совете ОЗХО рекомендуется рассматривать как свободные метаболиты этих ОВ, так и их аддукты с протеинами и ДНК. По нашему мнению в разных биомедицинских пробах в качестве биомаркеров ФОВ, таких как зарин, зоман, вещество типа VX и, могут выступать следующие их метаболиты, представленные в обобщенном виде в таблице 1.

Контроль наличия в биомедицинских пробах свободных метаболитов ФОВ, определение которых можно проводить по операционным процедурам, рекомендуемым ОЗХО для проб из объектов окружающей и техногенной среды, характеризуется меньшей ретроспективностью. Ковалентно связанные с протеинами и ДНК метаболиты ФОВ являются долгоживущими, однако их анализ требует применения сложных многостадийных процедур пробоподготовки.

Таблица 1 - Перечень биомаркеров фосфорорганических отравляющих веществ

ФОВ	Проба	Биомаркер
Зарин	Моча, кровь	О-изопропилметилфосфонат
	Моча, кровь	Метилфосфоновая кислота
	Кровь – бутирилхолинэстераза/ ацетилхолинэстераза	Аддукт О-изопропилметилфосфонат - серин
	Кровь-альбумин	Аддукт О-изопропилметилфосфонат - тирозин
Зоман	Моча, кровь	О-пинаколилметилфосфонат
	Моча, кровь	Метилфосфоновая кислота
	Кровь – бутирилхолинэстераза/ ацетилхолинэстераза	Аддукт О-пинаколилметилфосфонат - серин
	Кровь-альбумин	Аддукт О-пинаколилметилфосфонат - тирозин
Вещество VX	Моча, кровь	О-этилметилфосфонат
	Моча, кровь	Метилфосфоновая кислота
	Кровь	Диизопропиламиноэтилтиометан
	Кровь – бутирилхолинэстераза/ ацетилхолинэстераза	Аддукт О-этилметилфосфонат - серин

Считается, что начальная (быстрая) стадия выведения из организма свободных метаболитов ФОВ составляет порядка 48 – 72 ч после экспозиции и в этот период требования к пределам их обнаружения являются вполне выполнимыми и составляют десятки нг/см<sup>3</sup>, что подтверждено результатами [2-7] исследований жертв отравления заринном в Токийском метро.

После начальной стадии быстрого выведения следует медленный продолжительный процесс, который длится около 2 недель и требует применения для контроля сложных методов и приборов с пределом обнаружения на уровне единиц нг/см<sup>3</sup> [8-10]. Поскольку, согласно принятым сценариям инспектирования мест возможного применения ХО, пробы с наибольшей вероятностью будут отобраны только через несколько дней или даже недель после применения, именно уровни пределов обнаружения 0,1 – 10 нг/см<sup>3</sup> являются наиболее актуальными [10,11].

Для выявления низких, нанограммовых, уровней О-алкилметилфосфонатов в биопробах многие лаборатории применяют методы газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией или тандем-масс-спектрометрией с предварительной конверсией их в летучие производные.

Триметилсилилирующие (ТМС), трет-бутилдиметилсилилирующие (ТБДМС) и метилирующие агенты широко применяются для получения летучих производных кислот при газохроматографическом анализе проб из окружающей среды [11,12]. Оба типа силилирующих агентов были эффективно применены при анализе биомедицинских проб, взятых у жертв токийского инцидента [3-5,7,8], правда, большинство проб было отобрано в пределах нескольких часов после воздействия.

Наибольшую чувствительность позволяет добиться способ конверсии О-алкилметилфосфонатов в пентафторбензиловые эфиры с последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом их с использованием химической ионизации с регистрацией отрицательных ионов [12,13]. При этом, в работе [14] предлагается отказаться от попыток разработать высокочувствительные методики обнаружения метилфосфоновой кислоты, в отличие от О-алкилметилфосфонатов, которая рассматривается как недостаточно информативный метаболит и, кроме того, является весьма неудобным объектом для хроматографического анализа.

### **Основные проблемы пробоподготовки биологических образцов**

При анализе биологических образцов возникает проблема чрезвычайно сильного проявления матричного эффекта. Он проявляется в снижении чувствительности хроматографического определения за счёт ухудшения соотношений сигнал/шум, а так же за счет снижения эффективности детектирования (происходит перегрузка детектирующих каналов). Наблюдается нестабильность времен удерживания вследствие перегрузки хроматографической колонки компонентами пробы, сильное размывание хроматографических пиков и

нестабильность времени удерживания. В некоторых случаях, влияние матричного эффекта столь велико, что проведение анализа становится просто невозможным.

Наиболее эффективный способ борьбы с нежелательным матричным эффектом - это проведение селективной процедуры пробоподготовки. На этой стадии анализа удается заметно снизить содержание мешающих компонентов матрицы, а так же удается одновременно провести групповое концентрирование интересующих исследователя компонентов.

При проведении пробоподготовки плазмы крови в первую очередь необходимо отделить содержащиеся в ней в больших количествах белки. Эта процедура является хорошо отработанной в практике современной аналитической химии. Для депротенизации (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 степени их извлечения различаются. При оптимизации данной стадии следует учитывать такие факторы, как плотность образующегося осадка (насколько легко происходит отделение надосадочной жидкости), потери аналита при коагуляции белков (какая часть жидкой фазы осаждается при агрегации белковых молекул), эффективность удаления белков из анализируемой пробы.

Для извлечения аналитов из депротенизированной плазмы крови в последнее время все чаще стала использоваться процедура твердофазной экстракции с применением полимерных сорбентов. Отличительной особенностью именно этого варианта экстракции является избирательная способность в отношении определенной группы веществ, как на стадии сорбции, так и при десорбции [15].

**Пробоподготовка плазмы крови с использованием твердофазной экстракции**

По результатам предварительных исследований нами было сделано предположение, что повышение чувствительности анализа до уровня не хуже  $10 \text{ нг/см}^3$  возможно за счет совершенствования процедуры пробоподготовки и использования хромато-масс-спектрометрической системы. Поэтому одним из основных направлений исследований являлась экспериментальная оценка целесообразности твердофазной экстракции при подготовке плазмы крови к проведению инструментального анализа на наличие метилфосфоновой кислоты и О-алкилметилфосфонатов.

Нами были составлены варианты пробоподготовки, включающие варьирование процедур депротеинизации плазмы крови, кондиционирования сорбционных патронов перед их использованием. Было отработано пять схем пробоподготовки с различными сорбентами, характеристики которых представлены в таблице 2. Содержание сорбента в сорбционном патроне составляло 500 мг.

Таблица 2 - Используемые в работе сорбенты

Наименование сорбента	Тип сорбента
Диапак П	Полимерный сорбент на основе дивинилбензола
Диапак С16	Обращеннофазный сорбент. Внешняя поверхность $C_{16}$ , внутренняя - гидрофильный полимер
Диапак ТА	Сильноосновный анионообменник с привитыми четвертичными аммонийными группами
Диапак Амин	Слабоосновный анионообменник с привитыми аминогруппами

По каждой из схем готовились по две серии проб включающих по три образца. В одну серию проб искусственно вносили добавки метилфосфоновой кислоты и ее эфиров. Добавки вносили так, чтобы их содержание в аликвоте плазмы составляло  $10 \text{ нг/см}^3$ . Вторая серия проб, так называемая бланковая проба, этих веществ не содержала и служила для сравнения. Краткое описание схем пробоподготовки приведено в таблице 3.

Таблица 3 - Описание схем пробоподготовки плазмы крови с использованием твердофазной экстракции

Схема	Сорбент	Описание процедуры
-------	---------	--------------------

1	Диапак П	Активация сорбента. Депротенизация плазмы 0,5 см <sup>3</sup> 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугирование, пропускание надосадочной жидкости через сорбционный патрон. Элюирование смесью ацетон/метанол. Концентрирование до сухого остатка в токе азота. Дериватизация пентафторбензилбромидом.
2	Диапак П	Активация сорбента. Депротенизация плазмы 0,5 см <sup>3</sup> 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугирование, пропускание надосадочной жидкости через сорбционный патрон. Элюирование смесью ацетон/метанол. Концентрирование до сухого остатка в роторном испарителе. Дериватизация пентафторбензилбромидом.
3	Диапак С16	Активация сорбента. Депротенизация плазмы 0,5 см <sup>3</sup> 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугирование, пропускание надосадочной жидкости через сорбционный патрон. Элюирование смесью ацетон/метанол. Концентрирование до сухого остатка в токе азота. Дериватизация пентафторбензилбромидом.
4	Диапак ТА	Активация сорбента. Депротенизация плазмы 0,5 см <sup>3</sup> 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугирование, пропускание надосадочной жидкости через сорбционный патрон. Элюирование смесью ацетон/метанол. Концентрирование до сухого остатка в токе азота. Дериватизация пентафторбензилбромидом.
5	Диапак Амин	Активация сорбента. Депротенизация плазмы 0,5 см <sup>3</sup> 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугирование, пропускание надосадочной жидкости через сорбционный патрон. Элюирование смесью ацетон/метанол. Концентрирование до сухого остатка в токе азота. Дериватизация пентафторбензилбромидом.

Исследования проводились с использованием хромато-масс-спектрометрического аналитического комплекса: газовый хроматограф HP 5890 серии 2, оснащенный капиллярной колонкой DB-5MS длиной 30м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм с масс-селективным детектором HP 5989В, позволяющим проводить как ионизацию электронным ударом, так и химическую ионизацию.

Применение хромато-масс-спектрометрических аналитических комплексов, в которых в качестве разделительной системы используется газовый хроматограф, не позволяет напрямую определять алкилфосфоновые кислоты и их кислые эфиры вследствие крайне низкой летучести этих соединений. Для газохроматографического определения этих соединений на этапе подготовки проб проводят стадию их дериватизации – получение летучих производных.



Для получения летучих производных метаболитов ФОВ на основе анализа литературных данных [3-5,8,9,15-18] нами был выбран способ пентафторбензилирования.

Для проведения стадии пентафторбензилирования в хроматографическую виалу, вместимостью 1,8 см<sup>3</sup>, помещали 1 см<sup>3</sup> рабочего раствора смеси О-алкилметилфосфонатов с концентрацией 0,01 мг/см<sup>3</sup> каждого аналита. Добавляли 50 мг карбоната калия, 0,01 см<sup>3</sup> пентафторбензилбромида. Виалу герметизировали, перемешивали на ультразвуковой бане в течение 2 мин и выдерживали в термостате в течение 60 мин при температуре 90-95<sup>0</sup>С. После остывания, полученную смесь анализировали.

Хроматографическое разделение проводили при следующих условиях: при начальной температуре термостата колонки 40<sup>0</sup>С выдерживали 1 мин, подъем температуры со скоростью 10<sup>0</sup>С/мин до 270<sup>0</sup>С и выдерживание при этой температуре 5 мин, объемная скорость газа-носителя гелия 1 см<sup>3</sup>/мин, ввод пробы объемом 1 мм<sup>3</sup> без деления при постоянном давлении, температура испарителя 260<sup>0</sup>С. Масс-спектрометрическое детектирование с отрицательной химической ионизацией проводили в режиме сканирования (SCAN) диапазона масс от 60 до 460, давление газа-реагента (метан) 1 мм рт.ст., выдерживалась температура интерфейса 260<sup>0</sup>С, источника ионов - 200<sup>0</sup>С и масс-фильтра - 100<sup>0</sup>С.

### **Результаты и их обсуждение**

Анализ экспериментальных данных, представленных в таблице 4, показал, что наименьшие площади хроматографических пиков производных биомаркеров, за исключением метилфосфоновой кислоты, наблюдаются при подготовке проб по схеме 2, отличительной особенностью которой является концентрирование до сухого остатка в роторном испарителе. По всей видимости О-алкилметилфосфонаты, несмотря на свою относительно низкую летучесть, отгонялись вместе с экстрагентом. Это предположение подтверждается тем фактом, что площади хроматографических пиков производных

О-алкилметилфосфонатов при пробоподготовке по схеме 2 примерно на десятичный порядок меньше, чем при концентрировании в токе азота (схема 1), а производного метилфосфоновой кислоты всего в два раза.

Таблица 4 - Площади хроматографических пиков производных биомаркеров, полученных при различных схемах пробоподготовки

Соединение	Площадь хроматографического пика производного биомаркера в экстракте (тыс. усл. ед.) при пробоподготовке по схеме				
	1	2	3	4	5
Метилфосфоновая кислота	920	480	350	540	95
О-этилметилфосфонат	2200	120	1100	1000	150
О-изопропилметилфосфонат	7000	790	2800	1200	210
О-пинаколилметилфосфонат	2400	120	1200	1500	300

При использовании сорбента Диапак ТА площади хроматографических пиков аналитов больше, чем при использовании Диапак Амин, что объясняется силой основности этих анионообменников.

Результаты использования сорбента Диапак С16 соизмеримы с вариантом пробоподготовки по схеме 4, однако значительно уступают другому обращенофазному сорбенту – Диапак П. Это связано, по видимому, с тем, что часть исследуемых веществ сорбируется на гидрофильной основе сорбента Диапак С16, а элюирующей силы смеси ацетона и метанола недостаточно для разрыва образующихся связей

В практике жидкостной хроматографии для получения стабильного результата известен прием, когда в случае обращенофазного анализа кислот активные центры сорбента, имеющего гидрофильную основу, предварительно блокируют этими же веществами или аналогичными. При необратимой сорбции аналита предпочтительней использовать полимерный сорбент, не имеющий в своей структуре гидрофильных групп. К такому типу сорбентов относится Диапак П, пробоподготовка по схеме 1 с которым показала наилучший результат. Однако, в отношении метилфосфоновой кислоты этот сорбент не является оптимальным,

что обусловлено структурой этой кислоты, имеющей всего один алкильный фрагмент, да и тот метильный.

Необходимо отметить, что измерения площадей хроматографических пиков производных метилфосфоновой кислоты и О-этилметилфосфоната на масс-хроматограмме затруднены вследствие сильного матричного эффекта, от влияния которого не смогли полностью избавиться, применяя все предложенные схемы пробоподготовки.

Таким образом, обобщение и оценка экспериментальных данных позволил нам отдать предпочтение твердофазной экстракции с использованием сорбента Диапак П и концентрированием в токе азота (схема 1). В этом случае достигаются приемлемые значения степеней извлечения аналитов, а влияние мешающих примесей матрицы минимально по сравнению с другими вариантами пробоподготовки.

### **Заключение**

На основе полученных результатов исследований разработана методика определения метилфосфоновой кислоты, О-этилметилфосфоната, О-изопропилметилфосфоната и О-пинаколилметилфосфоната в плазме крови хромато-масс-спектрометрическим методом с твердофазной экстракцией с пределом обнаружения от 10 нг/см<sup>3</sup>.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1 Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. GE. 92-61926, Париж, 1993. - 133 с.

2 Black, R.M. Application of gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their

degradation products / R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read, M.T.J. Reid // J. Chromatogr. – 1994. – A 662. – P. 301–321.

3 Noort, D. Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review / D. Noort, H.P. Benschop, R.M. Black // Toxicol. appl. pharmacol. – 2002. – №184. – P. 116–126.

4 Polhuijs, M. A new method to detect organophosphate exposure: serum analysis of victims of Japanese terrorists / M. Polhuijs, J.P. Langenberg, H.P. Benschop // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1997. – №146 – P. 156-161.

5 Nagao, M. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway / M. Nagao, T. Takatori, Y. Matsuda, M. Nakajima, H. Iwase, K. Iwadate // Toxicol. appl. pharmacol. – 1997. – №144 – P. 198–203.

6 Minami, M. Method for the analysis of the methylphosphonic acid metabolites of sarin and its ethanol-substituted analogue in urine as applied to the victims of the Tokyo sarin disaster / M. Minami, D.M. Hui, M. Katsumata, H. Inagaki, C.A. Boulet, // J. Chromatogr. – 1997. – B 695. – P. 237–244.

7 Noort, D. Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage / D. Noort, A.G. Hulst, H.J.M. Platenburg, M. Polhuijs, H.P. Benschop // Arch. toxicol. – 1998. – №72. – P. 671–675.

8 Matsuda, Y. Detection of the sarin hydrolysis product in formalin-fixed brain tissues of victims of the Tokyo subway terrorist attack / Y. Matsuda, M. Nagao, T. Takatori, H. Niijima, M. Nakajima, H. Iwase, M. Kobayashi, K. Iwadate // Toxicol. and App. Pharm. – 1998. – 150. – P. 310-320.

9 Katagi, M., Determination of the main hydrolysis product of Oethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate, ethyl methylphosphonic acid, in human serum / M. Katagi, M. Nishikawa, M. Tatsuno, H. Tsuchihashi // J. Chromatogr. – 1997. – B 689. – P. 327–333.

10 Jakubowski, E.M. Quantitation of thiodiglycol in human urine after an accidental sulfur mustard exposure / E.M. Jakubowski, F.R. Sidell, R.A. Evans, M.A. // Toxicol Methods. – 2000. – №10 – P. 143–150.

11 Black, R.M. Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry / R.M. Black, R.W. Read // J. Chromatogr. B – 1995. – 665. – P. 97-105.

12 Shih, M.L. Detection of metabolites of toxic alkyl methylphosphonates in biological samples / M.L. Shih, J.R. Smith, J.D. McMonagle, T.W. Dolzine, V.C. Gresham // Biol mass spectrom. – 1991. – №20. – P.717–723.

13 Fredriksson, S.-A. Trace determination of alkyl methylphosphonic acids in environmental and biological samples using gas chromatography/negative-ion chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry / S.-A. Fredriksson, L.-G. Hammarstrom, L. Henriksson, H.-A. Lakso // J. Mass Spectrom. – 1995. – 30. – P. 1133-1143.

14 Miki, A. Determination of alkylmethylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-solid-phase-transfer-catalyzed pentafluorobenzoylation / A. Miki, M. Katagi, H. Tsuchihashi, M. Yamashita // J Anal Tox. – 1999. – №23. – P. 86–93.

15 Рыбальченко, И.В. Газохроматографический анализ биологических проб. Определение метаболитов токсичных химикатов / И.В. Рыбальченко, Н.С. Хлебникова, Е.И. Савельева, А.С. Радиков, В.Р. Рембовский // Росс. Хим. ж. (Ж.Росс. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева) – 2005. – т.49, № 2. – с. 26-30.