



ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ДЕСТРУКЦИИ БОЕВЫХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ И БИОТОКСИНОВ

И. А. Родин

Байгильдиев Т.М., Болотник Т.А., Браун А.В., Рыбальченко И.В.

Записка технического секретариата Организации по Запрещению Химического Оружия (ЕС-42/S/4)

- Предусматривается отбор и анализ
- биомедицинских проб, источником
- которых являются люди и животные
- при проведении исследований
- предполагаемого применения
- химического оружия
- Цель – подтверждение факта воздействия ОВ,
установление типа конкретного ОВ

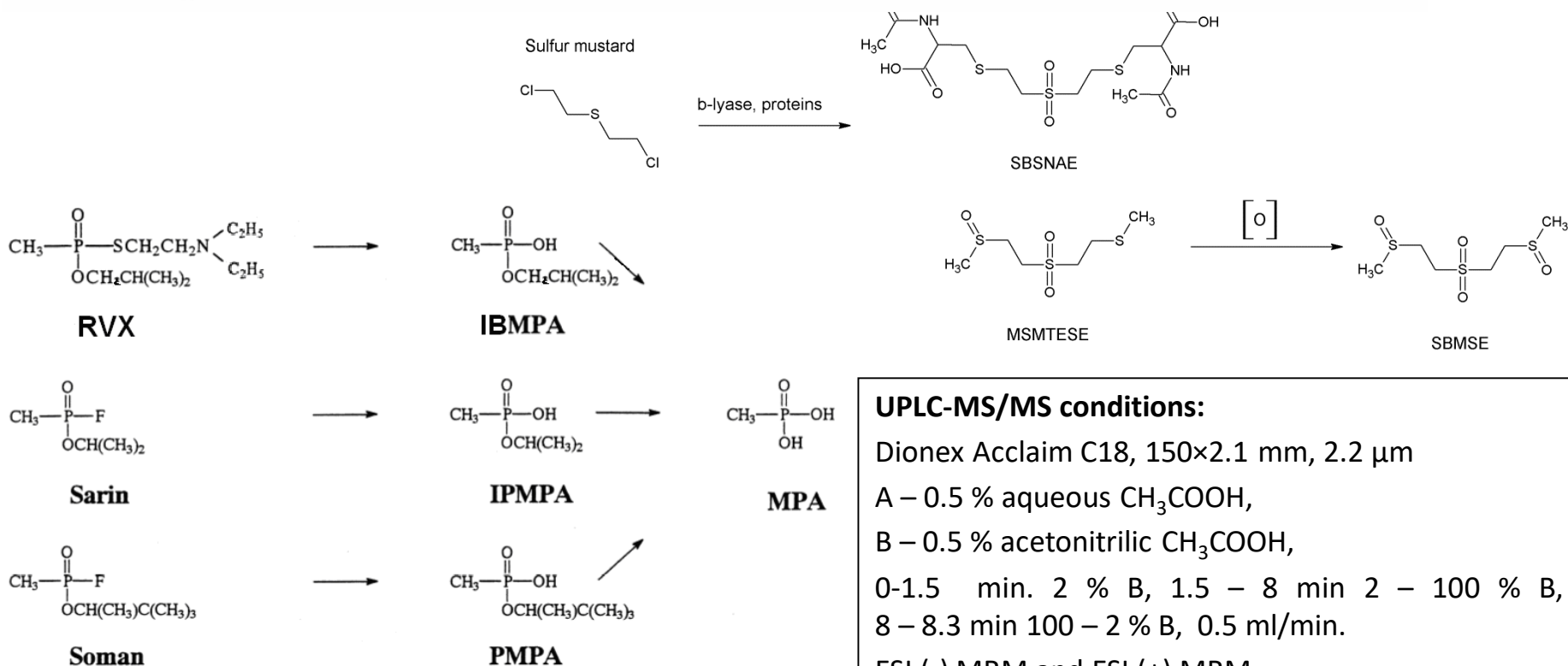


Почему именно продукты деструкции?

Journal of Analytical Toxicology 2015;39:69–74
doi:10.1093/jat/bku119 Advance Access publication October 17, 2014

Short Communication

'Dilute-and-Shoot' RSLC–MS-MS Method for Fast Detection of Nerve and Vesicant Chemical Warfare Agent Metabolites in Urine



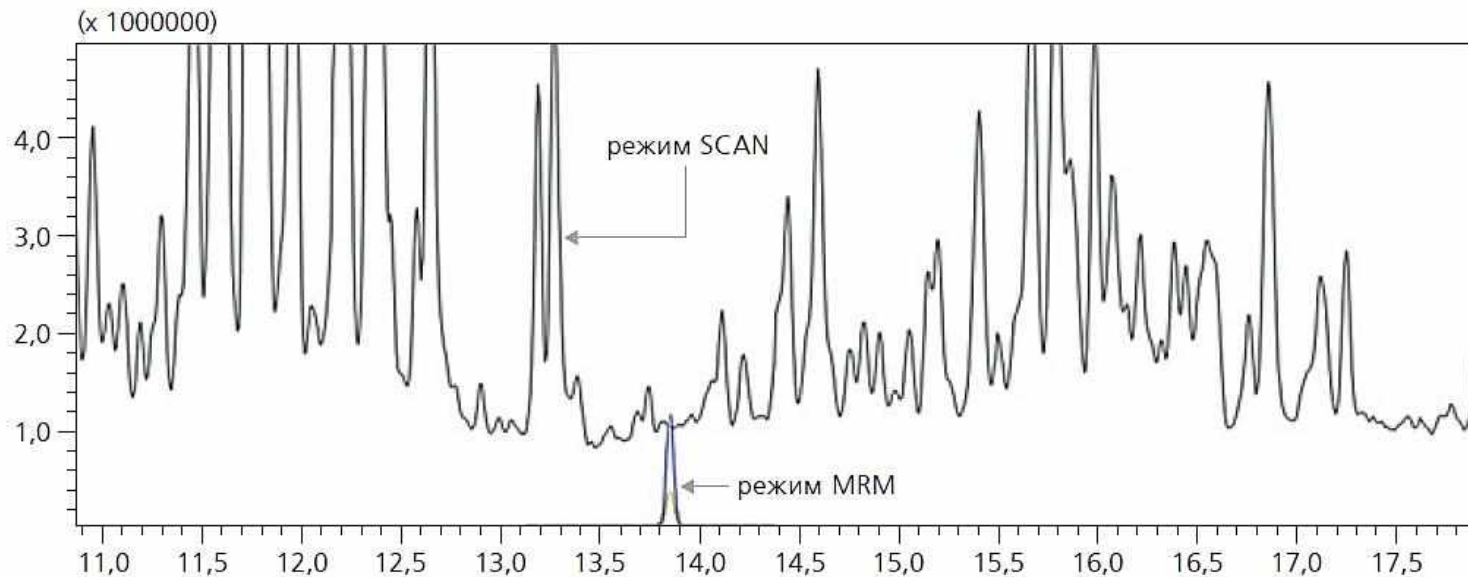
UPLC-MS/MS conditions:
 Dionex Acclaim C18, 150×2.1 mm, 2.2 μm
 A – 0.5 % aqueous CH₃COOH,
 B – 0.5 % acetonitrilic CH₃COOH,
 0-1.5 min. 2 % B, 1.5 – 8 min 2 – 100 % B,
 8 – 8.3 min 100 – 2 % B, 0.5 ml/min.
 ESI (-) MRM and ESI (+) MRM

Принципиальные сложности

- Низкие уровни содержания определяемых веществ
- Высокая полярность и гидрофильность определяемых веществ
- Сильный матричный эффект пробы
- Строгая однозначность полученного результата

Пути решения

Использование высокоселективных и высокочувствительных методов анализа



Гидролиз фосфорорганических нервно-паралитических отравляющих веществ

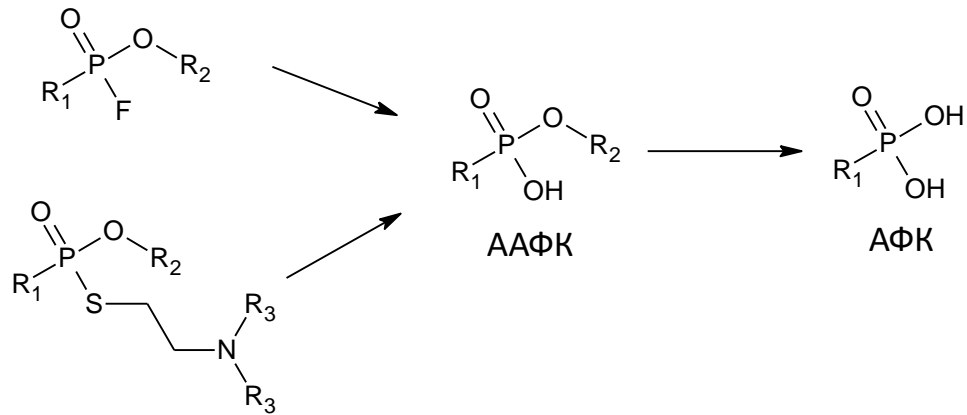


Схема гидролиза двух категорий НПОВ. R₁, R₃ = Me-, Et-, n-Pr- или i-Pr-, R₂ = алкил от C1 до C10

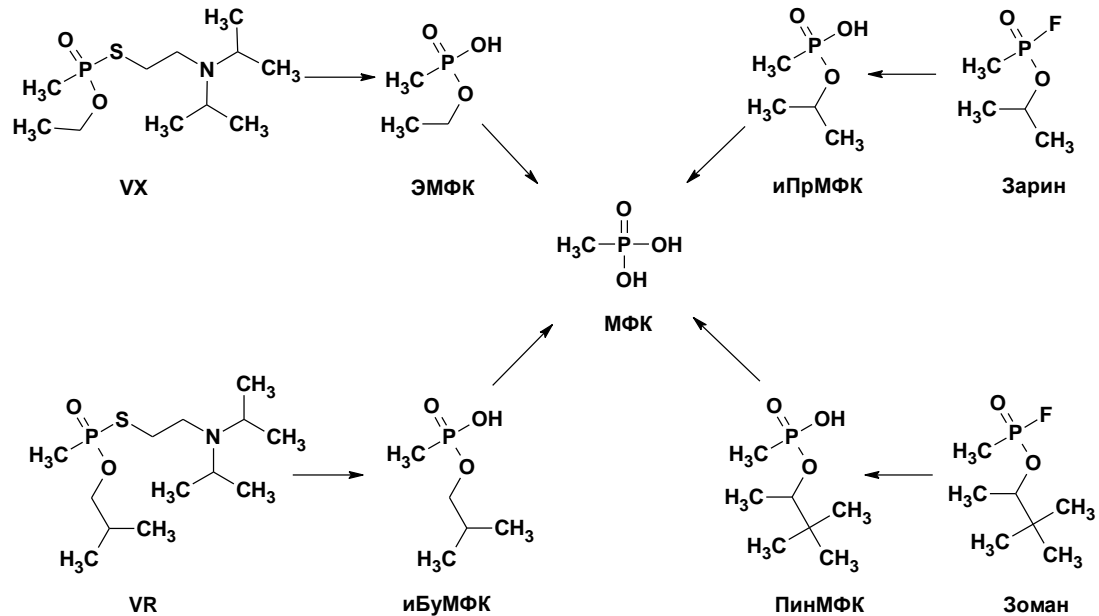
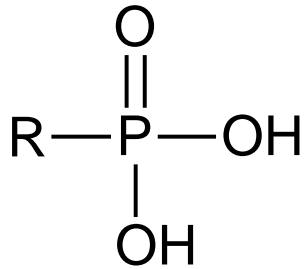


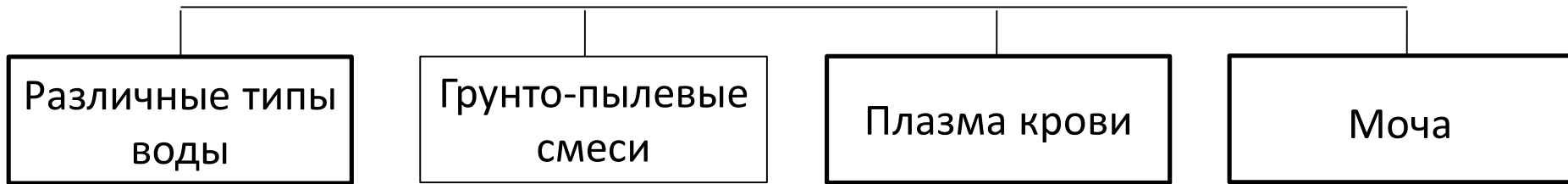
Схема гидролиза наиболее распространенных НПОВ

Алкилфосфоновые кислоты (АФК)



- Низкая молекулярная масса
- Высокая полярность
- Нелетучие
- Не подвергаются гидролизу
- Не подвергаются фотолизу
- Термически стабильны
- Устойчивы к биоразложению

Объекты исследований

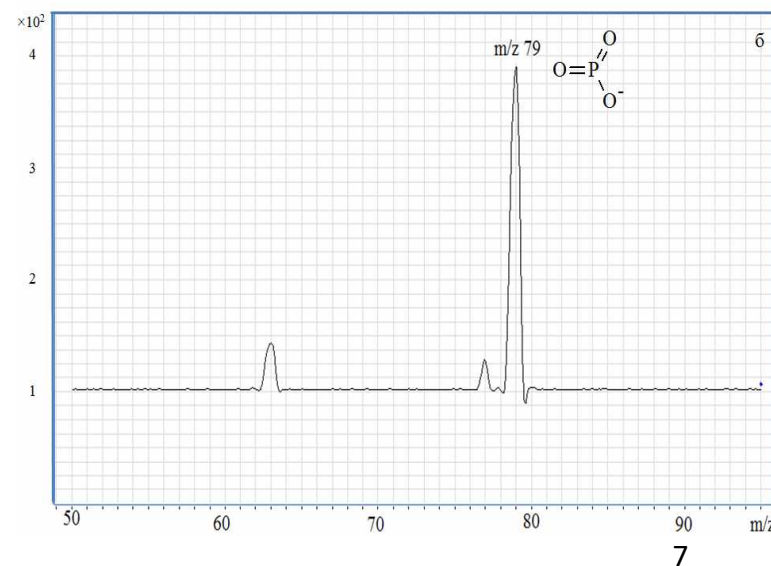
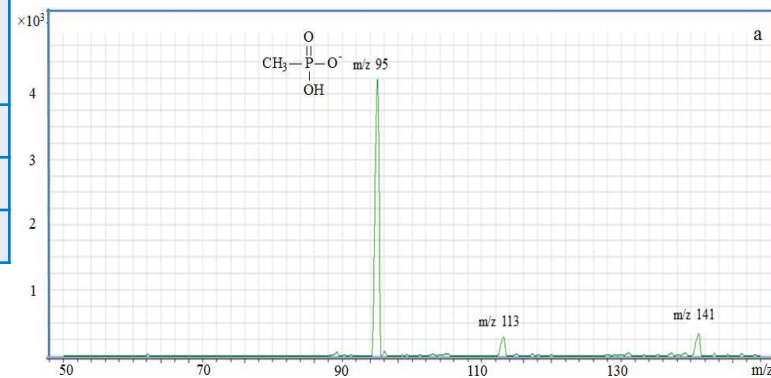
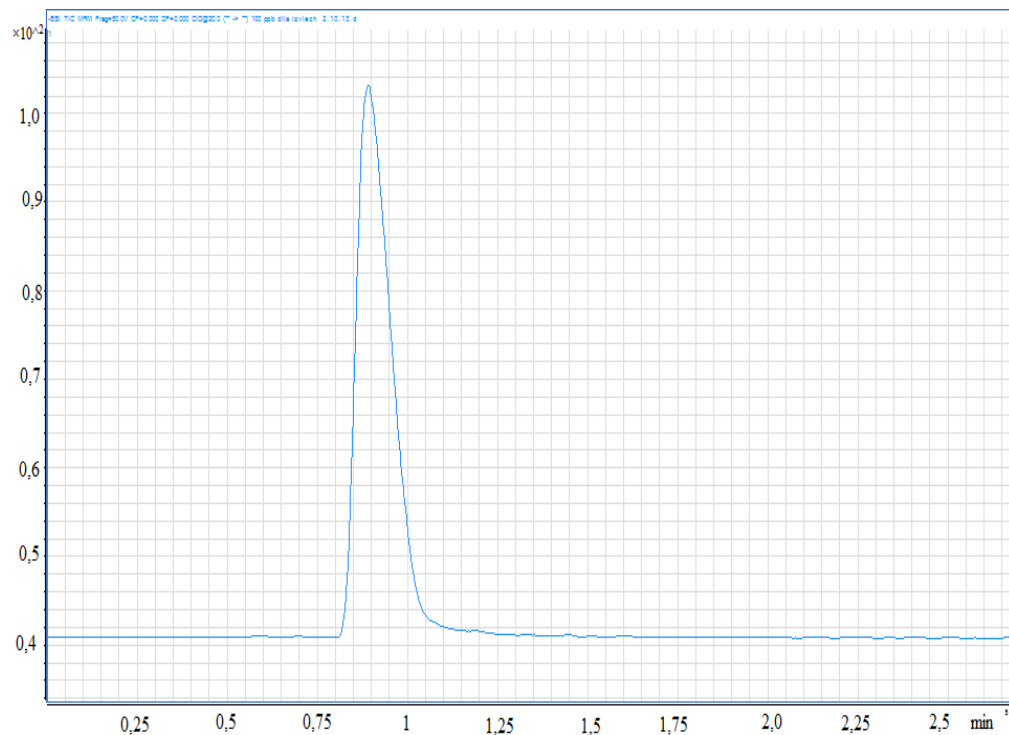


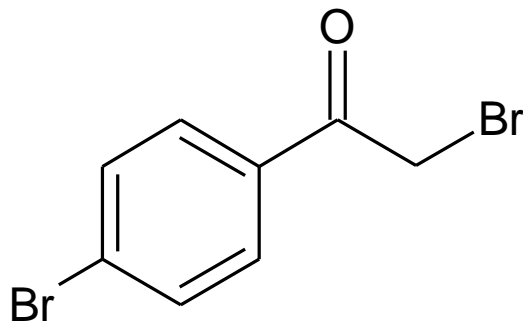
Прямое определение МФК в водных объектах методом ВЭЖХ-МС/МС

Проверка правильности, разработанного подхода методом «введено-найдено» ($n=3$, $p=0,95$)

ПО 10 нг/мл

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

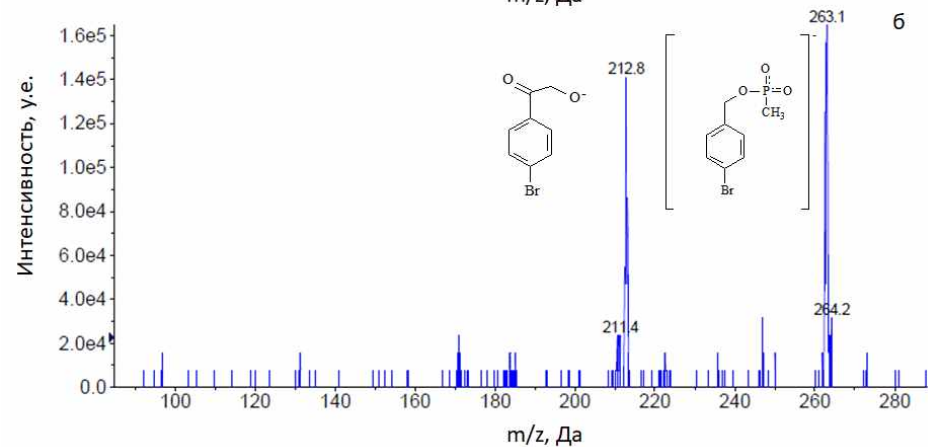
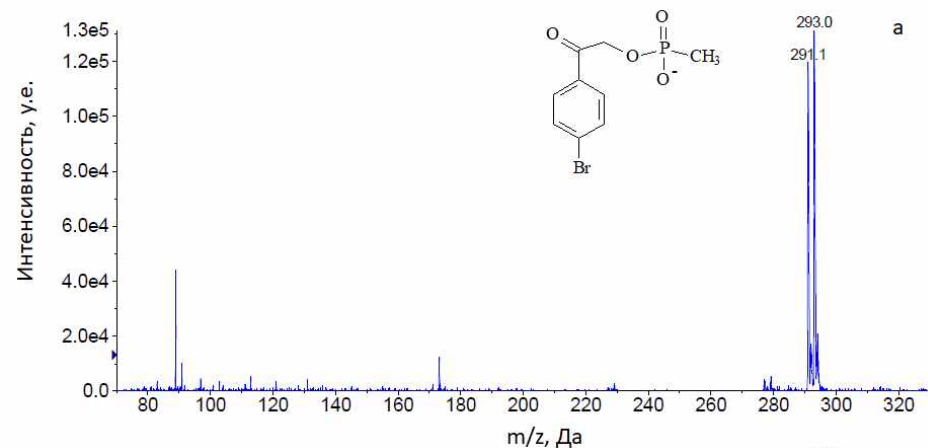




Дериватизация МФК п-бромфенацилбромидом

- Перевод МФК в менее полярное производное, более удобное для анализа
- Возможность определения производного как в условиях обращенно-фазовой, так и гидрофильной жидкостной хроматографии
- Увеличение чувствительности масс-спектрометрического детектирования

Дериватизация МФК п-бромфенацилбромидом



а) Масс-спектр производного МФК с ПБФБ (БФОМФК) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов
 б) Масс-спектр ионов-продуктов, образующихся из депротонированной молекулы БФОМФК.

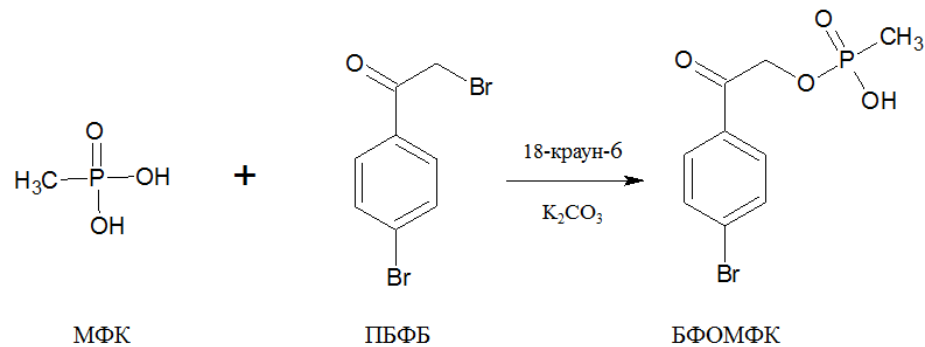


Схема реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом с образованием БФОМФК.

Наиболее подходящие условия МС детектирования БФОМФК в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.

Потенциал декластеризации (ион-предшественник), В	Энергия соударений (ионы-продукты), В
-41 (m/z 291, m/z 293)	-22 (m/z 265)
	-22 (m/z 263)
	-25 (m/z 215)
	-25 (m/z 213)

Пробоподготовка

Проба воды



- 1) Упаривание 10 мл воды до объема менее 100 мкл
- 2) Добавление ацетонитрила до объема 1 мл



Дериватизация



Анализ



Проверка правильности разработанного способа определения МФК в виде производного с ПБФБ методом «введено-найдено» (n=3, p=0.95)

Проба воды	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл
Колодезная вода	0.40	0.43 ± 0.04	6.0	5.9 ± 0.3
Речная вода	0.40	0.38 ± 0.04	6.0	6.0 ± 0.5
Водопроводная вода	0.40	0.42±0.05	6.0	5.8±0.3



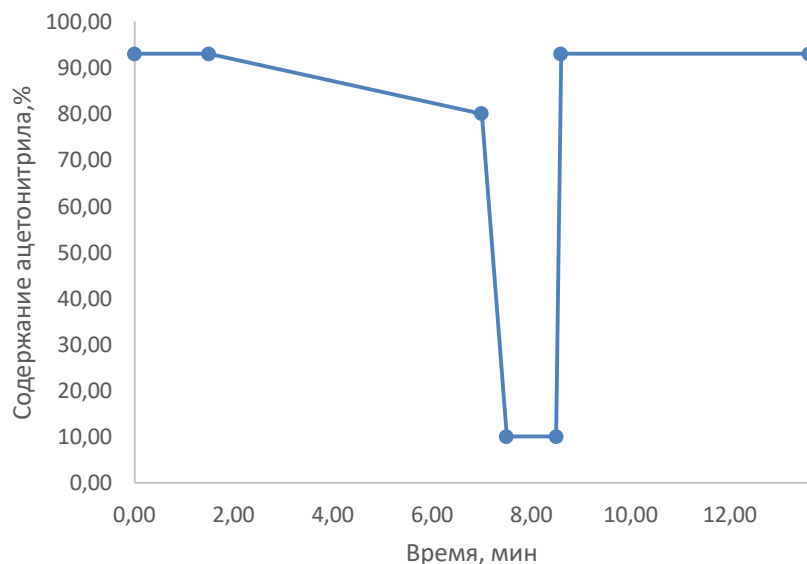
Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Methylphosphonic Acid Determination in Water Samples after Derivatization with *p*-Bromophenacyl Bromide

Authors

Authors and affiliations

Igor Rodin , Timur Baygildiev, Andrey Stavrianidi, Arcady Braun, Igor Rybalchenko, Oleg Shpigun

- Колонка Luna HILIC (150 × 4.6 мм , 5 мкм)
- Подвижная фаза – 10 мМ ацетат аммония в воде (А) и ацетонитрил (Б)
- Скорость потока – 1.5 мл/мин
- Градиентный режим

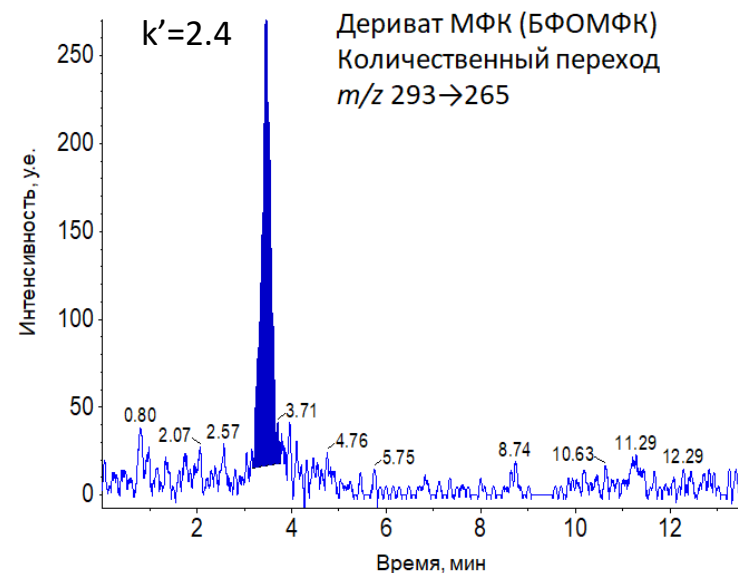


Программа градиентного элюирования

Режим мониторинга выбранных реакций:

m/z 293 → 265 (определение), m/z 291 → 263,

m/z 293 → 215, m/z 291 → 213 (подтверждение)



Хроматограмма 3 нг/мл МФК в виде БФОМФК в смеси ацетонитрил-вода (93:7, по объему), полученная по выбранной реакции m/z 293→265.

Определение МФК в виде производного с ПБФБ в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

- МФК и другие АМФК извлекаются из грунто-пылевых смесей водой
- Реакция дериватизации протекает преимущественно в ацетонитриле
- Необходимо упаривание водной матрицы
- Проба, анализируемая в условиях гидрофильной хроматографии, должна быть растворена преимущественно в органическом растворителе
- Высокое содержание ацетонитрила в подвижной фазе может положительно сказываться на чувствительности масс-спектрометрического детектирования



Journal of Chromatography A

Volume 1442, 15 April 2016, Pages 19–25



Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination in environmental samples after pre-column derivatization with *p*-bromophenacyl bromide

Пробоподготовка

Бывший завод по
производству химического
оружия



Образцы грунто-
пылевой смеси



1) Гомогенизация
2) Экстрагирование 10 мл воды



1) Упаривание 10 мл воды до
объема менее 100 мкл
2) Добавление ацетонитрила
до объема 1 мл



Дериватизация



Сводные данные по валидации процедуры

Вещество	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
Степень извлечения (n=3, p=0.95), %	90 ± 5	92 ± 7	99 ± 8	94 ± 6	94 ± 3
Коэффициент концентрирования (n=3, p=0.95)	9.0 ± 0.3	9.4 ± 0.7	9.7 ± 0.4	9.8 ± 0.9	9.3 ± 0.5
Прецизионность (%ОСО, n=5), %	6	9	5	8	12
ПО, нг/мл (нг/г)	0.2 (2)	0.06 (0.72)	0.008 (0.078)	0.008 (0.083)	0.005 (0.049)



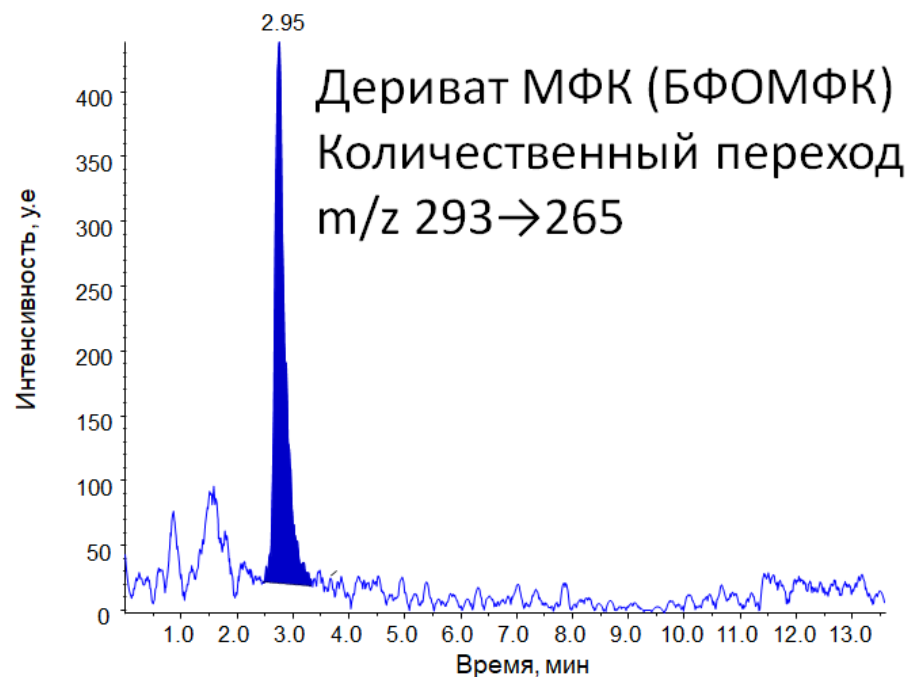
Анализ

Baygildiev T.M. Hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination in environmental samples after pre-column derivatization with p-bromophenacyl bromide / **Baygildiev T.M.**, Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Lebedev A.T., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // **Journal of Chromatography A.** – 2016. – V. 1442. – P. 19 – 25.

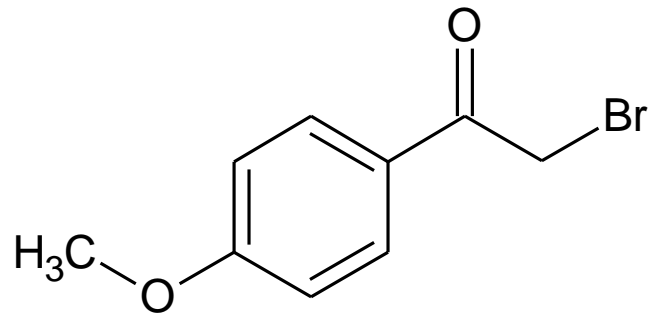
Апробация

Результаты определения содержания МФК и АМФК в образцах грунто-пылевых смесей

Номера образца	Вещество	Концентрация, мкг/г (n=3, p=0.95)
1	МФК	0.091±0.009
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	0.32 ±0.03
	иБуМФК	<ПО
	ПинМФК	<ПО
2	МФК	0.027±0.003
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	0.15 ±0.02
	иБуМФК	<ПО
	ПинМФК	0.18 ± 0.02
3	МФК	0.030±0.003
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	8.7 ± 1.3
	иБуМФК	0.011 ± 0.001
	ПинМФК	2.8 ±0.2
4	МФК	0.040±0.006
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	0.43 ± 0.05
	иБуМФК	<ПО
	ПинМФК	1.6 ± 0.2



Хроматограмма экстракта образца грунто-пылевой смеси по выбранной реакции m/z 293→265, содержащая МФК



Дериватизация МФК п-метоксифенацилбромидом

- Перевод МФК в менее полярное производное, более удобное для анализа
- Реакция дериватизации п-метоксифенацилбромидом может протекать в воде
- Отсутствие необходимости упаривания водной матрицы
- Увеличение чувствительности масс-спектрометрического детектирования

Дериватизация МФК п-метоксифенацилбромидом

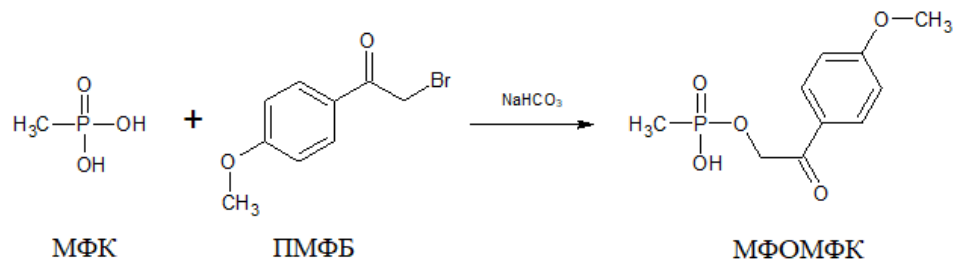
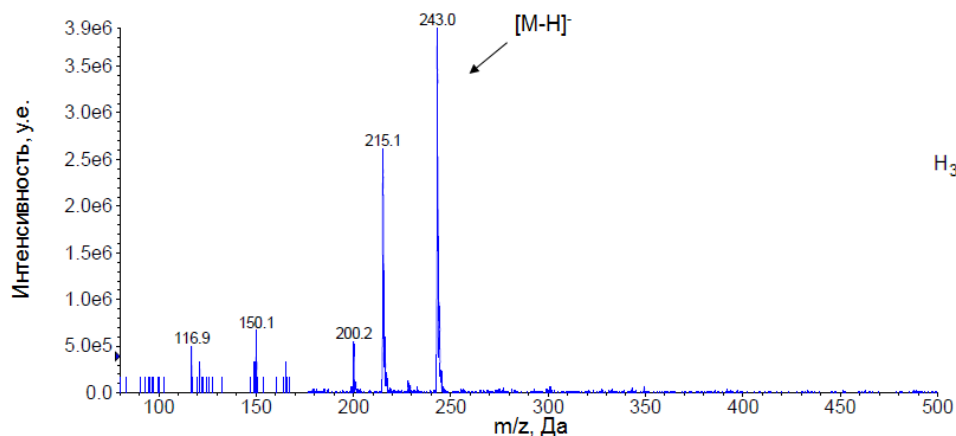
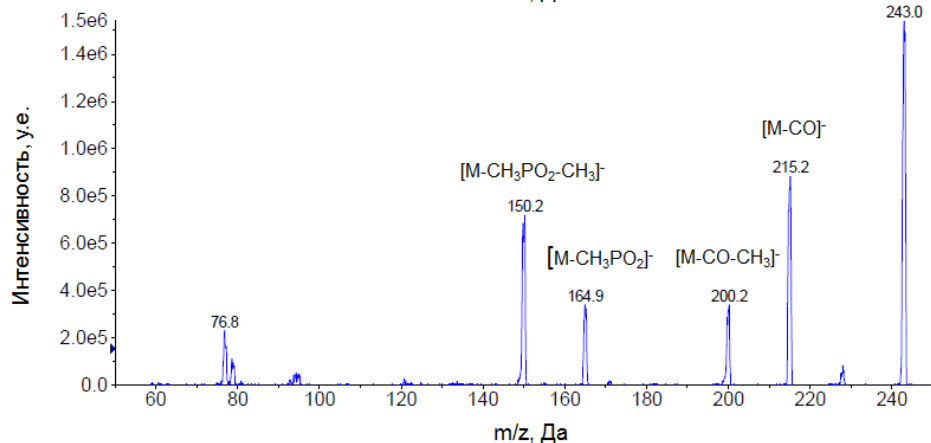


Схема реакции дериватизации МФК п-метоксифенацилбромидом.



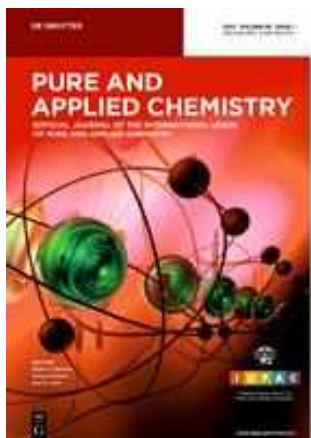
Наиболее подходящие условия МС детектирования МФК в режимах регистрации отрицательно заряженных ионов.

а) Масс-спектр производного МФК с МФБ (МФОМФК) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов б) Масс-спектр ионов-продуктов, образующихся из депротонированной молекулы МФОМФК.

Потенциал декластеризации (ион-предшественник), В	Энергия соударений (ионы-продукты), В
-48 (<i>m/z</i> 243)	-30 (<i>m/z</i> 150)
	-21 (<i>m/z</i> 215)

Сводная таблица по разработанным процедурам анализа

Объект	Процедура определения МФК	Предел обнаружения, нг/мл	Пределы обнаружения, описанные в литературе, нг/мл
Водные объекты	Гидрофильная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	0.1	9.4 (ГХ-ПИД)
Водные объекты	Гидрофильная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-метоксифенацилбромидом	1	9.4 (ГХ-ПИД)
Экстракты грунто-пылевых смесей	Гидрофильная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	0.2	90 (ГХ-МС)
Плазма крови	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	4	6 (ГХ-МС)
Моча	Анионообменная жидкостной хроматография с МС/МС детектированием	3	10 (ГХ-ПИД)



Baygildiev T.M. Novel analytical approaches to determination of chemical warfare agents and related compounds for verification of nonproliferation of chemical weapons / Rybalchenko I.V., **Rodin I.A.**, Baygildiev T.M., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Morozik Y.I., Shpigun O.A. // **Pure and Applied Chemistry**. – 2017. doi: <https://doi.org/10.1515/pac-2016-1208>

Определение метилфосфоновой кислоты и ее кислых эфиров в растениях после аккумуляции



Journal of Chromatography

A

Available online 12 April 2019

In Press, Corrected Proof



Short communication

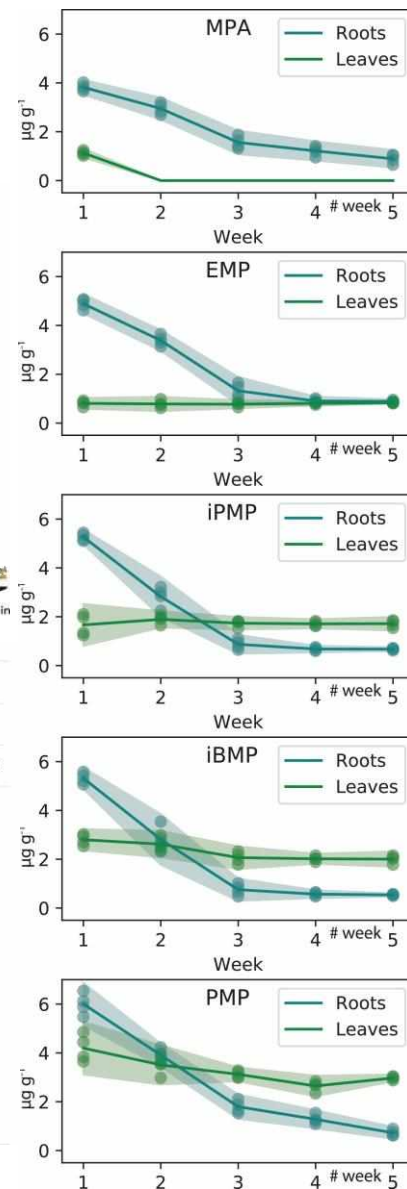
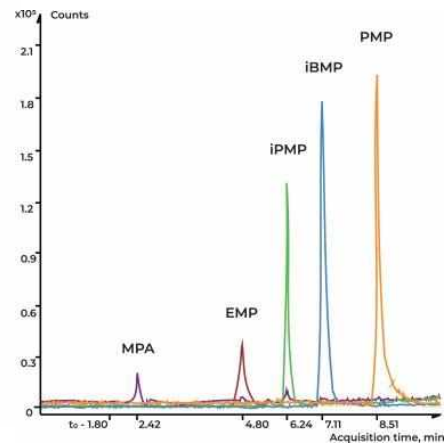
Nerve agent markers screening after accumulation in garden cress (*Lepidium sativum*) used as a model plant object

Boris Sarvin ^{a, b}, Markus Himmelsbach ^c, Timur Baygildiev ^b, Oleg Shpigun ^b, Igor Rodin ^b, Andrey Stavrianidi ^b, Wolfgang Buchberger ^c

Show more

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.025>

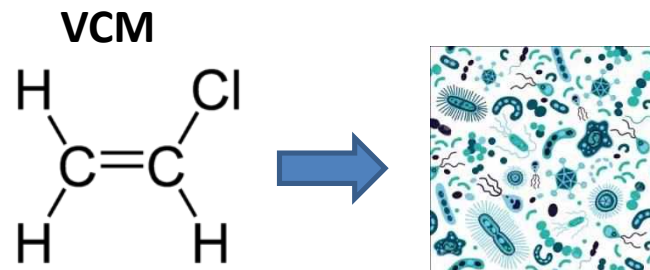
Get rights and content



Analyte	Concentration, ng/mL									
	Week 1		Week 2		Week 3		Week 4		Week 5	
	Roots	Leaves	Roots	Leaves	Roots	Leaves	Roots	Leaves	Roots	Leaves
MPA	960 ± 60	280 ± 40	750 ± 90	n/d	390 ± 90	n/d	300 ± 80	n/d	220 ± 70	n/d
EMP	1220 ± 80	200 ± 50	850 ± 90	195 ± 60	330 ± 120	195 ± 30	225 ± 35	200 ± 20	220 ± 20	205 ± 10
iPMP	1320 ± 60	400 ± 150	700 ± 150	470 ± 70	220 ± 50	430 ± 30	170 ± 40	430 ± 20	170 ± 20	430 ± 60
iBMP	1330 ± 90	700 ± 90	700 ± 200	650 ± 100	200 ± 100	520 ± 80	140 ± 30	510 ± 40	130 ± 15	500 ± 60
PMP	1500 ± 150	1050 ± 200	1000 ± 100	900 ± 150	450 ± 100	780 ± 60	320 ± 80	670 ± 90	180 ± 50	750 ± 30

Тиодигликолевая кислота

1) PVC polymerisation plants

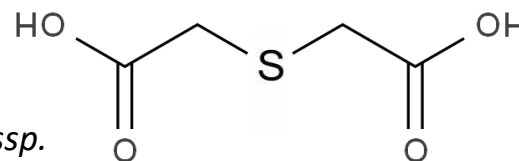
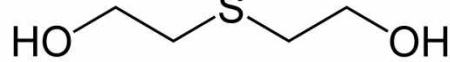
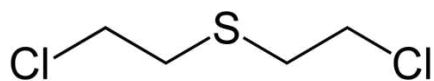


2) CWA degradation

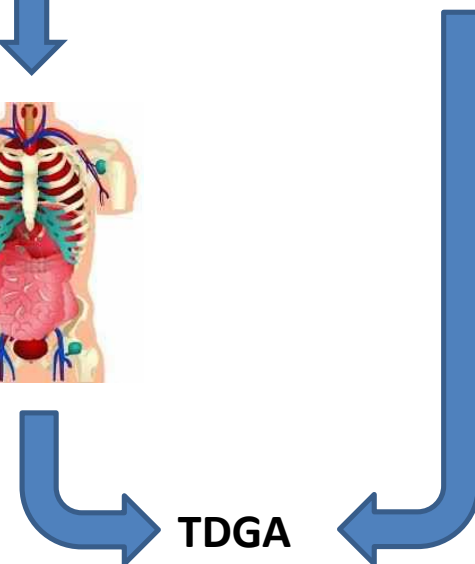
Sulfur mustard

TDG

TDGA



Alcaligenes xylosoxydans ssp.



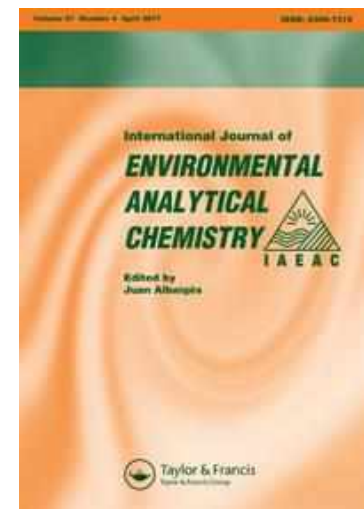
Определение тиодигликолевой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС

ВЭЖХ-МС условия:

Acclaim RSLC 120 C18 column (Thermo Scientific, США) А – 0.1 % HCOOH в воде, В – ацетонитрил, 0 мин (2 % В), 0–2 мин (2 % В), 2–6 мин (95 % В), 6–7 мин (95 % В), 7–7.2 мин (2 % В), 7.2–11.2 мин (2 % В), Объем ввода пробы 20 мкл, поток 0,4 мл/мин. ЭРИ (-); Напряжение: 4500 В MRM (149/105, 149/61)

Пробоподготовка

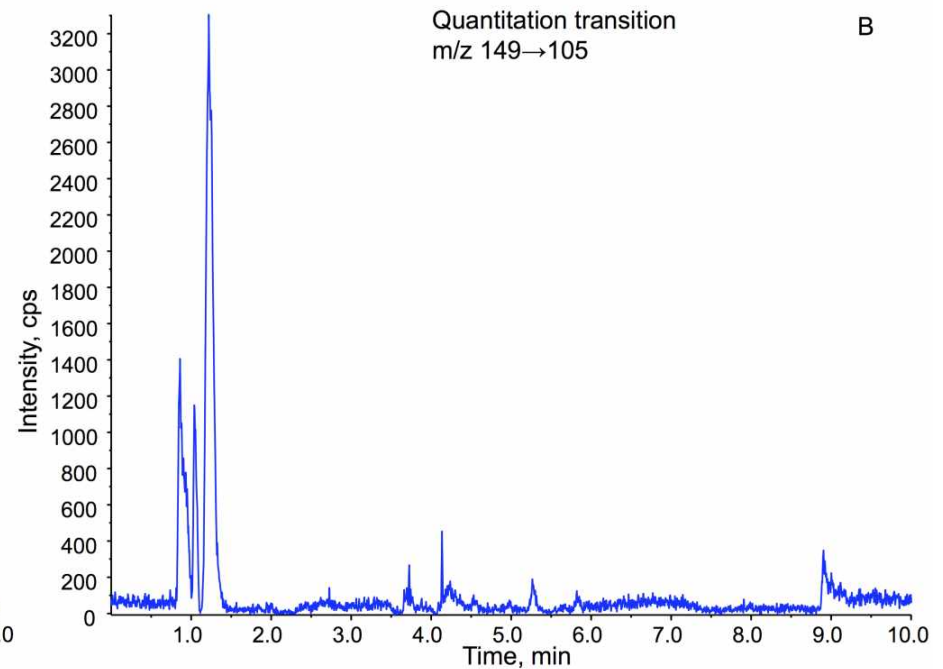
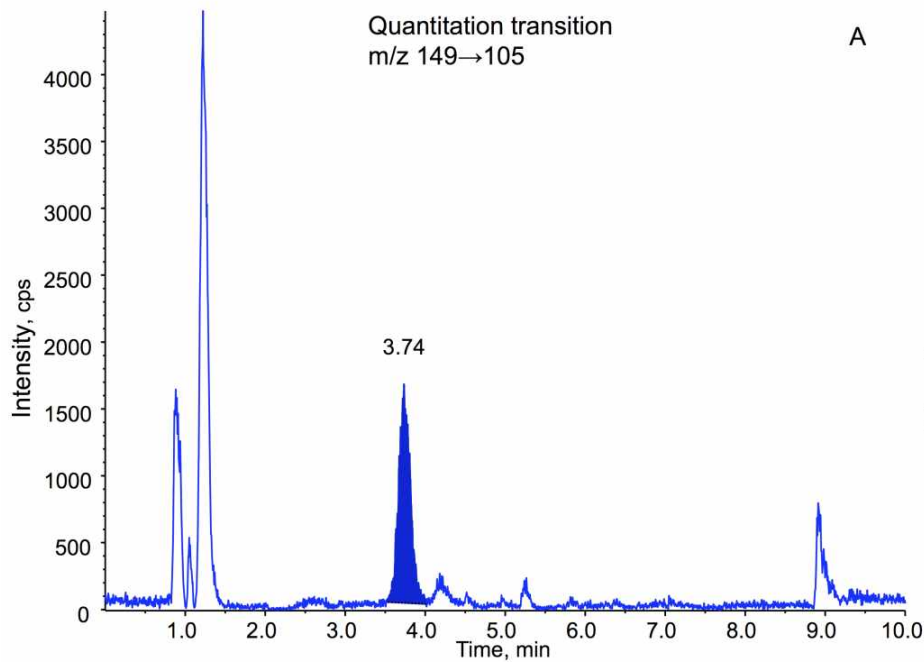
1. Ультразвуковая экстракция образцов почв



Timur Baygildiev, Arcady Braun, Andrey Stavrianidi, Igor Rodin, Oleg Shpigun, Igor Rybalchenko
“Dilute-and-Shoot” RSLC-MS/MS method for fast detection of thiodyglycolic acid in urine // *European Journal of Mass Spectrometry*. 2015. V. 21, p. 733 - 738

Igor Rodin, Arcady Braun, Andrey Stavrianidi, Timur Baygildiev, Igor Rybalchenko, Oleg Shpigun
A validated LC-MS/MS method for fast detection of thiodyglycolic acid in aqueous samples//*International J. Environm. Analyt. Chem.* V. 96. 5. p. 436 – 444.

Определение тридигликолиевой кислоты методом быстрой ВЭЖХ-МС/МС



Благодарность

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-13-00057.