

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



**БАЙГИЛЬДИЕВ ТИМУР МУРАТОВИЧ**

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
ЖИДКОСТНОЙ ТАНДЕМНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ  
имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель**

**Родин Игорь Александрович**

доктор химических наук, старший научный сотрудник

**Официальные оппоненты**

**Савельева Елена Игоревна**

доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

**Григорьев Андрей Михайлович**

доктор химических наук, судебный эксперт (химик-эксперт), ГБУЗ МО «Бюро судебно-медицинской экспертизы»

**Апполонова Светлана Александровна**

кандидат химических наук, заведующая лабораторией фармакокинетики и метаболомного анализа института фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ»

Защита состоится 20 декабря 2017 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

E-mail: dissovet02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/83910480>

Автореферат разослан 15 ноября 2017 г.

**Ученый секретарь**

диссертационного совета,  
кандидат химических наук



Ананьева И.А.

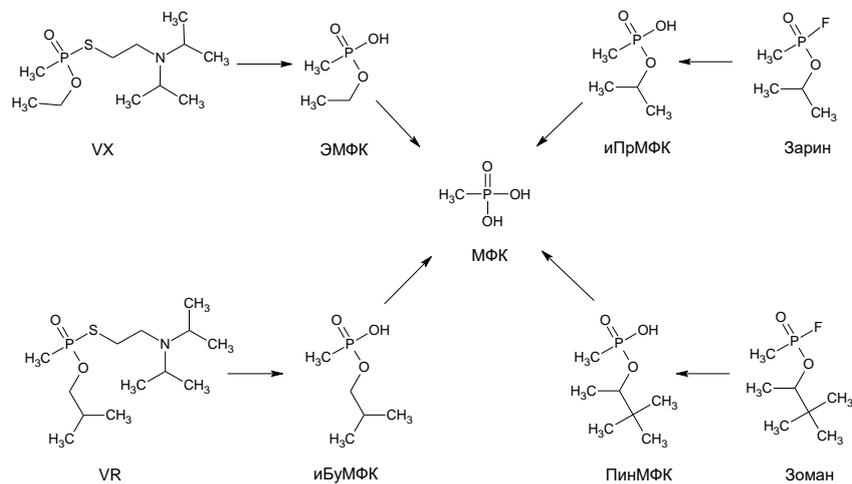
## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в мире существует серьезная угроза применения химического оружия во время локальных вооруженных конфликтов и террористических атак. Химическое оружие – это один из видов оружия массового поражения, действие которого основано на использовании боевых отравляющих веществ, оказывающих поражающее действие на организм человека и животных.

Анализ объектов окружающей среды (различных типов вод, почв и грунто-пылевых смесей) позволяет судить о факте применения химического оружия, его хранении или утилизации, а анализ биологических образцов (крови и мочи) позволяет фиксировать степень воздействия на персонал, вовлеченный в мероприятия по ликвидации запасов химического оружия, а также людей, пострадавших во время террористических атак или локальных вооруженных конфликтов. Анализ биологических образцов становится особенно важным в условиях, когда доступ к месту предполагаемого применения химического оружия задерживается или невозможен, и результаты, полученные при проведении данного анализа, могут оказаться единственным источником информации для подтверждения или опровержения факта воздействия отравляющих веществ (ОВ).

Зарин, зоман, VX и российский (советский) VX (VR), относятся к классу нервно-паралитических отравляющих веществ (НПОВ). НПОВ необратимо связываются с ферментом ацетилхолинэстеразой, который отвечает за метаболизм ацетилхолина - медиатора, регулирующего работу нервной системы. В результате воздействия НПОВ на живые организмы вначале появляется сильное возбуждение, а затем паралич внутренних органов, что приводит к смерти. В объектах окружающей среды и живых организмах фосфорорганические НПОВ быстро гидролизуются с образованием характеристичных для данных отравляющих веществ алкилметилфосфоновых кислот (АМФК). АМФК, в свою очередь, медленно превращаются в конечный продукт гидролиза всех фосфорорганических НПОВ (Рис. 1) – метилфосфоновую кислоту (МФК). Данные вещества принято рассматривать в качестве биомаркеров воздействия НПОВ на организм.

МФК является наиболее стабильным продуктом деструкции фосфорорганических НПОВ. Период полураспада МФК в реакции с гидроксильными радикалами в воде составляет 18 лет. МФК является кислотой средней силы ( $pK_{a1} 2.12$ ,  $pK_{a2} 7.29$ ). При  $pH > 5$  в водных растворах МФК существует преимущественно в диссоциированной форме. МФК - малолетучее соединение, устойчивое к биоразложению, так как соединения, содержащие С-Р связь, не подвергаются расщеплению в процессе обмена веществ у млекопитающих и растений. Высокая стабильность МФК приводит к тому, что она может быть обнаружена в природных объектах или биологических образцах по прошествии длительного времени после воздействия НПОВ, что позволяет уверенно судить о факте применения, хранения и разработки химического оружия.



**Рис. 1.** Схема гидролиза НПОВ с образованием МФК (ЭМФК – этилметилфосфоновая кислота, иПрМФК – изопропилметилфосфоновая кислота, иБуМФК – изобутилметилфосфоновая кислота, ПинМФК – пинаколилметилфосфоновая кислота).

МФК является высокополярным соединением с низкой молекулярной массой ( $M=96$  а.е.м.) и значительно отличается по свойствам от хорошо изученного класса алкилметилфосфоновых кислот. Высокая полярность и низкая молекулярная масса затрудняют определение МФК традиционными хроматографическими методами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ), высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим или tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС-(МС)), газовая хроматография с масс-спектрометрическим или tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС-(МС)). Актуальная задача определения МФК на ультранизких (0.1 – 1 нг/мл) и низких (1 – 10 нг/мл) уровнях в объектах окружающей среды и биологических образцах ранее не была решена.

Цель работы состояла в разработке новых подходов к хроматомасс-спектрометрическому определению МФК с пределами обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл в объектах окружающей среды и биологических образцах для надежного установления факта воздействия нервно-паралитических отравляющих веществ.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Выбор реагентов для дериватизации, увеличивающих чувствительность хроматомасс-спектрометрического определения МФК в форме производного. Изучение закономерностей протекания реакции МФК с дериватирующими агентами в водно-органических растворах и выбор условий проведения реакции.
2. Изучение особенностей удерживания МФК и производных МФК в условиях различных вариантов жидкостной хроматографии (обращенно-фазовая, гидрофильная, анионообменная).
3. Изучение ионизации и фрагментации МФК, а также производных МФК в условиях масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

4. Выбор условий пробоподготовки, обеспечивающих высокую степень извлечения МФК, а также эффективную очистку от мешающих определению компонентов в исследуемых объектах.
5. Разработка способов хроматомасс-спектрометрического обнаружения и определения МФК методом ВЭЖХ-МС/МС в объектах окружающей среды (природных водах и грунто-пылевых смесях) и биологических жидкостях (плазме крови и моче) с пределами обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл.
6. Апробация разработанных способов при анализе реальных образцов объектов окружающей среды и биологических жидкостей, в том числе изучение процессов выведения МФК после интоксикации лабораторных крыс несмертельными дозами ОВ.

#### Научная новизна.

Установлены особенности удерживания метилфосфоновой кислоты (МФК) в условиях обращенно-фазовой, гидрофильной и анионообменной жидкостной хроматографии.

Изучены реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом, позволяющей увеличить чувствительность масс-спектрометрического детектирования и минимизировать эффект подавления ионизации МФК, показана возможность проведения реакции дериватизации с п-метоксифенацилбромидом напрямую в водных объектах, установлены особенности масс-спектров первого и второго порядка производного МФК с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом в условиях электрораспылительной ионизации, позволяющие выбирать характеристичные переходы для детектирования.

Установлены особенности удерживания производных МФК с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии. Выбраны условия хроматографического анализа объектов, позволяющие в режиме гидрофильной хроматографии создать условия для ионизации электрораспылением, которые предполагают повышенное содержание органического растворителя в подвижной фазе для достижения высокой чувствительности масс-спектрометрического детектирования МФК.

Разработаны схемы пробоподготовки, позволяющие достичь высоких значений степени извлечения и/или обеспечивающие снижение матричных эффектов при определении МФК в природных водах, грунто-пылевых смесях, плазме крови и моче.

Показана возможность определения МФК в варианте гидрофильной и обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС в виде производного с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом в природных водах, грунто-пылевых смесях и плазме крови. Установлены критерии применения дериватизации п-бромфенацилбромидом или п-метоксифенацилбромидом в зависимости от объекта, способа пробоподготовки и необходимой экспрессности анализа.

Для определения МФК в моче предложен способ, основанный на применении анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Выбрана подвижная фаза, обеспечивающая высокий коэффициент емкости МФК в рамках анионообменной жидкостной хроматографии и совместимая с масс-спектрометрическим детектированием.

Показана высокая селективность определения МФК в природных водах, грунто-пылевых смесях и моче в присутствии алкилметилфосфоновых кислот и этилфосфоновой кислоты.

Установлены особенности выведения МФК у крыс после получения несмертельных доз ОВ.

Практическая значимость. Предложены способы высокочувствительного определения МФК в различных сложных объектах с пределами обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл. При разработке способов особое внимание уделено повышению чувствительности, селективности и воспроизводимости определения МФК.

Разработан высокочувствительный способ определения МФК в виде производного с п-бромфенацилбромидом, позволяющий методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием определять МФК в природных водах на уровне 0.1 нг/мл.

Разработан быстрый способ определения МФК в виде производного с п-метоксифенацилбромидом, позволяющий методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием определять МФК в природных водах на уровне 2 нг/мл.

Разработан способ высокочувствительного определения МФК и алкилметилфосфоновых кислот с применением дериватизации методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в грунто-пылевых смесях, собранных с территории бывшего завода по производству химического оружия. Предел обнаружения аналитов находился в диапазоне от 0.005 до 0.2 нг/мл.

Разработан способ определения МФК в виде производного с п-бромфенацилбромидом методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в образцах плазмы крови. Предел обнаружения составил 3 нг/мл.

Разработан способ прямого определения МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в образцах мочи. Предел обнаружения составил 4 нг/мл.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Результаты исследования особенностей хроматографического удерживания МФК и производных МФК в условиях обращенно-фазовой, гидрофильной и анионообменной жидкостной хроматографии.

2. Условия пробоподготовки при определении МФК в природных водах, грунто-пылевых смесях, плазме крови и моче.
3. Результаты оценки возможности использования реакций дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом.
4. Способы, позволяющие проводить надежное обнаружение и определение МФК в образцах природных вод, грунто-пылевых смесей, плазмы крови, моче и обеспечивающие достижение пределов обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл.
5. Результаты применения разработанных способов при анализе реальных образцов природных вод в рамках профессиональных тестов Организации по запрещению химического оружия, грунто-пылевых смесей, собранных с территории ликвидированного завода по производству химического оружия, а также результаты выявления закономерностей выведения МФК из организма крыс после их интоксикации несмертельными дозами ОВ.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на международном симпозиуме «Congress on clinical mass spectrometry MSACL EU-2017» (2017, Зальцбург, Австрия), III Всероссийской конференции с международным участием "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез" (2017, Краснодар, Россия), международном симпозиуме «Congress on clinical mass spectrometry MSACL US-2017» (2017, Палм-Спрингс, США), 5м Всероссийском симпозиуме с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» (2016, Сочи, Россия), международном симпозиуме «Congress on clinical mass spectrometry MSACL EU-2016» (2016, Зальцбург, Австрия), Всероссийской конференции "Экоаналитика-2016" (2016, Углич, Россия), международном симпозиуме 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (2015, Шиофок, Венгрия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в российских и зарубежных журналах, и 7 тезисов докладов.

Личный вклад автора состоял в общей постановке задач, систематизации литературных данных, подготовке и проведении всех экспериментальных этапов исследования, обработке, интерпретации и оформлении полученных экспериментальных данных, подготовке материалов к публикации и представлении полученных результатов на конференциях. Все исследования, описанные в диссертации, выполнены лично автором или в сотрудничестве с коллегами.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, главы обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы, изложена на 142 страницах машинописного текста и включает 51 рисунок, 29 таблиц и список цитируемой литературы из 138 наименований.

# ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Введение

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель исследования и поставленные задачи, показаны научная новизна работы и ее практическая значимость.

## Литературный обзор

В литературном обзоре, представленном в **первой главе**, рассмотрены и систематизированы способы определения метилфосфоновой кислоты (МФК) в объектах окружающей среды, плазме крови и моче человека и животных. Рассмотрены свойства и состав данных объектов, позволяющие правильно подойти к выбору способа пробоподготовки и метода анализа.

Во **второй главе** перечислены оборудование, реагенты и материалы, использованные в работе, а также описаны схемы (методики) экспериментов.

В работе использовали следующее аналитическое оборудование:

- ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из гибридного тандемного квадрупольного масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200 (Канада) с линейной ионной ловушкой, оснащенного источником электрораспылительной ионизации; и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (США). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst 1.5.1 (Канада).
- ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из тандемного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6460 Triple Quadrupole (США), оснащенного электрораспылительной ионизацией Jet Stream; и жидкостного хроматографа Agilent 1290 (США). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Mass Hunter (США).

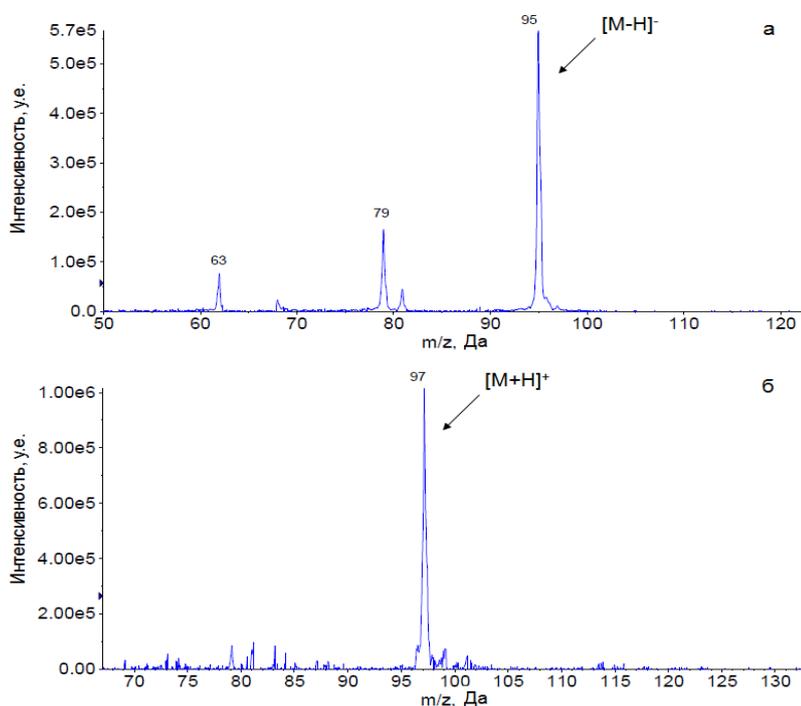
Разделение проводили на следующих хроматографических колонках:

Acclaim RSLC C18 120 Å (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США), Luna HILIC 200 Å (150 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Phenomenex, США), разработанные в лаборатории МГУ анионообменные колонки на основе сополимера стирола и дивинилбензола с ковалентно-пришитыми четвертично-аммонийными группами (50 × 4 мм) и (100 × 4 мм), диаметр зерна сорбента 5.5 мкм, степень сшивки 50%, площадь поверхности 670 м<sup>2</sup>/г, средний размер пор 10 нм.

**Третья глава** диссертации посвящена разработке способов определения МФК в воде, грунто-пылевых смесях, плазме крови и моче. Описан выбор условий дериватизации и пробоподготовки, позволяющих достичь высоких значений степени извлечения МФК.

Рассмотрены условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования МФК и производных МФК, позволяющие избежать влияния матричных компонентов. Представлена процедура проверки и приведены результаты апробации разработанных способов при анализе воды, грунто-пылевых смесей и мочи крыс на содержание МФК.

В разделе “Изучение возможности прямого определения МФК в водных объектах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС” описан подбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования МФК в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных ионов были получены масс-спектры МФК (Рис. 2).



**Рис. 2.** Масс-спектры 10 мкг/мл МФК, полученные в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (а) и в режиме регистрации положительно заряженных ионов (б).

Для режима регистрации отрицательно заряженных ионов ион-продукт с  $m/z$  79 был выбран для определения, а ион-продукт с  $m/z$  63 для подтверждения. Для режима регистрации положительно заряженных ионов ион-продукт с  $m/z$  79 был выбран для определения, а ион-продукт с  $m/z$  65 для подтверждения.

Подбирали условия хроматографического разделения. Так как МФК является высокополярным соединением, то в качестве подвижной фазы использовали смесь, состоящую из воды с добавками и ацетонитрила в соотношении 99:1 по объему, которую подавали в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин. Применение в качестве водных добавок муравьиной, уксусной кислот, а также ацетата аммония не привело к сколько-нибудь значимому увеличению коэффициента емкости МФК ( $k'$ =0.3), однако наилучшая форма пика и отношение сигнал/шум были достигнуты при использовании в качестве водной добавки

0.1% муравьиной кислоты в режиме регистрации как отрицательно, так и положительно заряженных ионов. Отношение сигнал/шум в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов ( $S/\text{Ш}=3000$ ) значительно превышало отношение сигнал/шум в режиме регистрации положительно заряженных ионов ( $S/\text{Ш}=1952$ ). Таким образом, для определения МФК была выбрана подвижная фаза, состоящая из 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила, а также режим регистрации отрицательно заряженных ионов.

Изучали влияние матричных компонентов природных вод на масс-спектрометрическое детектирование МФК. Для этого делали одинаковые добавки МФК в деионизованную воду, колодезную воду, речную и водопроводную воду и проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ. Матричный эффект (МЭ) рассчитывали по следующей формуле:  $\text{МЭ, \%} = 100 \times \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$ , где  $S_1$  – площадь пика МФК в реальных водах, а  $S_2$  – площадь пика МФК в деионизованной воде. Значение матричного эффекта, близкое к 0%, указывает на практически полное отсутствие влияния матричного эффекта, большее 0% указывает на усиление сигнала, а значение, меньшее 0%, на подавление сигнала. Результаты определения матричного эффекта при прямом определении МФК представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Матричный эффект при прямом определении МФК в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Образец	Матричный эффект ( $n = 3, p = 0.95$ ), %
Колодезная вода	-83±1
Речная вода	-81±2
Водопроводная вода	-81±1

Из представленных данных видно, что при прямом определении МФК наблюдался довольно сильный матричный эффект, что легко объясняется слабым удерживанием

МФК, которая элюируется со временем удерживания, почти равным мертвому времени колонки ( $k'=0.3$ ). В реальных образцах, в отличие от растворов МФК в деионизованной воде, присутствует большое количество матричных компонентов, в том числе полярных, которые находятся в большом избытке по отношению к МФК, также не удерживаются в условиях обращенно-фазовой хроматографии и могут оказывать влияние на масс-спектрометрический сигнал МФК. Поэтому для увеличения надежности определения МФК в водных и более сложных объектах необходимо применение подходов, позволяющих определять МФК с высоким коэффициентом емкости в диапазоне от 1 до 4.

В разделе *“Изучение возможности прямого определения МФК методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием”* описан подбор условий хроматографического разделения в условиях гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.

В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил. Подвижную фазу подавали со скоростью 1.5 мл/мин, использовали градиентный

режим элюирования (Табл. 2). Масс-спектрометрическое определение проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов по ранее выбранным реакциям:  $m/z$  95→79 (определение),  $m/z$  95→63 (подтверждение).

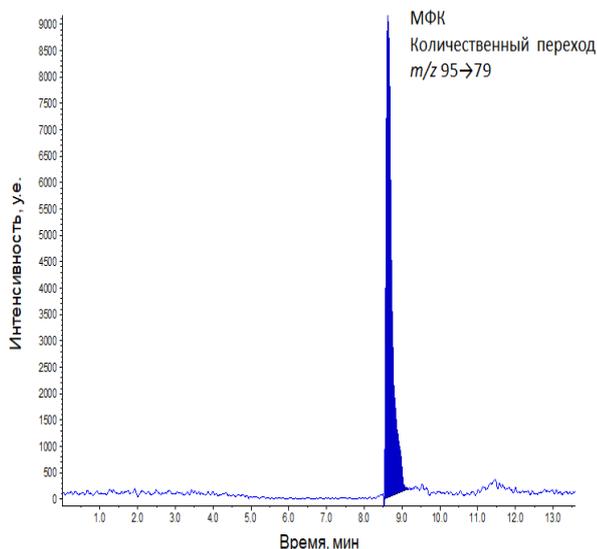
Известно, что высокое содержание ацетонитрила в подвижной фазе (от 90 до 95%) приводит к увеличению чувствительности масс-спектрометрического детектирования. В режиме градиентного элюирования МФК имела высокий кажущийся коэффициент емкости, равный 9 (Рис. 3).

**Таблица 2.** Программа градиентного элюирования в режиме гидрофильной ВЭЖХ

Время, мин	0	1.5	7	7.5	8.5	8.6	13.6
Содержание ацетонитрила, %	93	93	80	10	10	93	93

Также, как видно из программы градиентного элюирования (Табл. 2), время

удерживания МФК (Рис. 3) соответствовало низкому содержанию ацетонитрила и высокому содержанию 10 мМ водного раствора ацетата аммония в подвижной фазе. Таким образом, не



задействуется наиболее полезная для масс-спектрометрического детектирования область содержания ацетонитрила (90-95%) и значительно увеличивается время анализа. В результате, МФК имеет низкое значение коэффициента емкости ( $k'=0.3$ ) в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии и очень высокое значение – в условиях гидрофильной хроматографии, даже при использовании режима градиентного элюирования ( $k'=9$ , кажущийся коэффициент емкости).

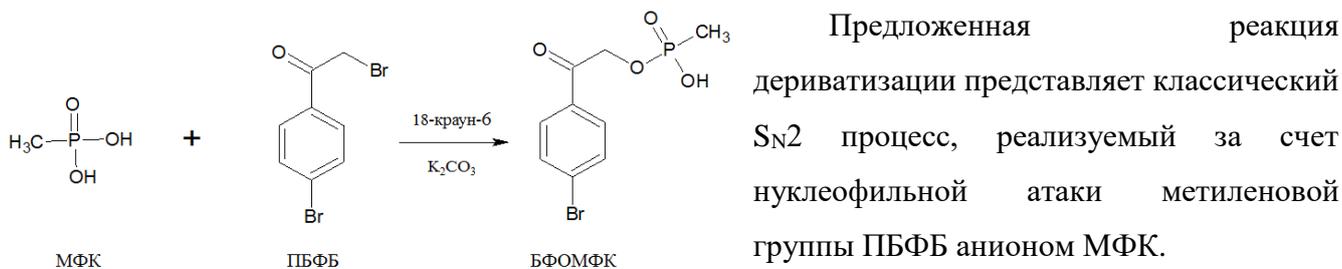
**Рис. 3.** Хроматограмма 1 мкг/мл МФК (раствор в ацетонитриле) по выбранной реакции  $m/z$  95→79 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 2.

Для решения данной проблемы был предложен способ, включающий применение дериватирующего агента, переводящего МФК в менее полярное соединение, пригодное для определения как в условиях обращенно-фазовой, так и гидрофильной хроматографии.

В разделе “Изучение реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом” предложен реагент для дериватизации МФК – п-бромфенацилбромид (ПБФБ), а также описан подбор условий реакции дериватизации МФК: температуры, времени проведения реакции, концентраций карбоната калия, 18-краун-6 и ПБФБ.

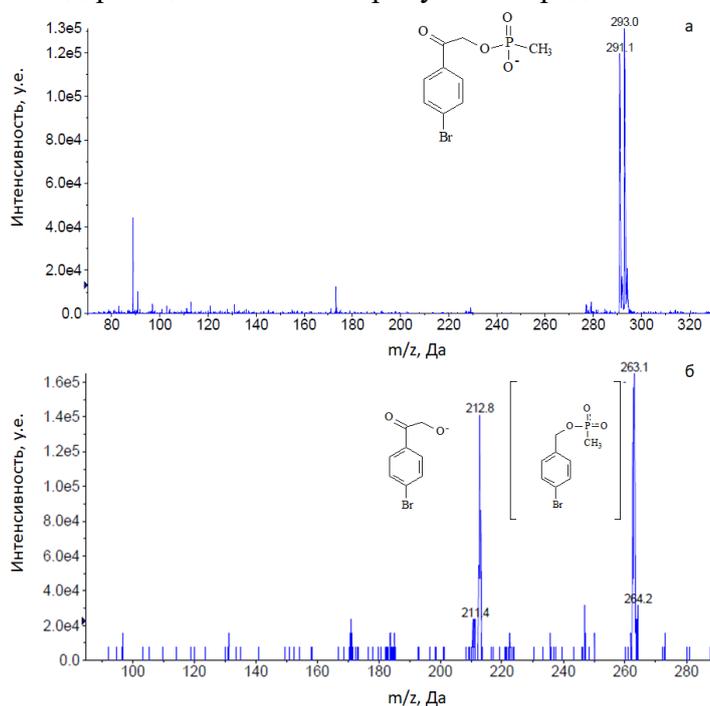
Реакцию дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом изучали при помощи гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием, так как

реакция протекает преимущественно в ацетонитриле. В полипропиленовых пробирках объемом 1.5 мл готовили 1 мл раствора МФК с концентрацией 500 нг/мл в смеси ацетонитрил-вода (93:7, по объему). К раствору добавляли 20 мкл раствора 18-краун-6 в ацетонитриле (20 мг/мл), 20 мкл водного раствора карбоната калия (20 мг/мл) и 100 мкл раствора ПБФБ в ацетонитриле. Пробирки помещали в термостат и выдерживали при 80 °С в течение 30 минут. В результате реакции дериватизации (Рис. 4) МФК превращается в 2-(4-бромфенил)-2-оксоэтилметилфосфовую кислоту (БФОМФК).



**Рис. 4.** Схема реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом с образованием БФОМФК.

Слабощелочная среда за счет присутствия карбоната калия приводит к диссоциации МФК с образованием активного аниона. Поскольку известно, что α-позиция карбонильной группы является предпочтительной для S<sub>N</sub>2 процессов, то замещение брома протекает эффективно и выход реакции высок. На рисунке 5 представлен масс-спектр БФОМФК, а также масс-спектр

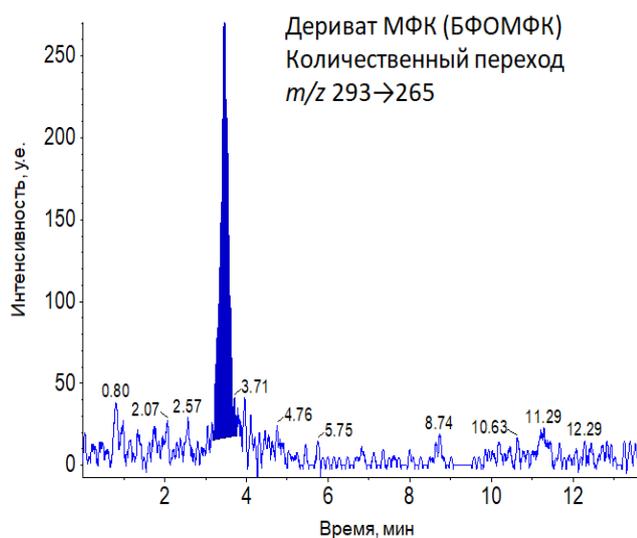


фрагментных ионов депротонированной молекулы БФОМФК в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. В режиме регистрации положительно заряженных ионов протонированные молекулы БФОМФК практически не образуются. Для масс-спектрометрического определения нами были выбраны 4 перехода: наиболее интенсивный переход  $m/z$  293→265 для определения и переходы  $m/z$  291→263,  $m/z$  291→213,  $m/z$  293→215 для качественного подтверждения.

**Рис. 5.** а) Масс-спектр производного МФК с ПБФБ (БФОМФК) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, б) Масс-спектр ионов-продуктов, образующихся в ячейке соударений масс-спектрометра из депротонированной молекулы БФОМФК.

В разделе “Разработка способа определения МФК в виде производного с ПБФБ в водных объектах методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен разработанный способ определения МФК с применением

дериватизации и метода гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ раствор ацетата аммония в



воде и ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы 1.5 мл/мин. Были выбраны условия хроматографического разделения (Рис. б), позволяющие достичь приемлемого значения кажущегося коэффициента емкости ( $k'=2.4$ ), кажущейся эффективности и формы хроматографического пика (3840 ТТ/м) при высоком содержании ацетонитрила в подвижной фазе. Использованная программа градиентного элюирования представлена в таблице 2.

**Рис. 6.** Хроматограмма 3 нг/мл МФК в виде БФОМФК (раствор в смеси ацетонитрил – вода, 93:7 по объему) без применения концентрирования, полученная в режиме мониторинга выбранных реакций. Подвижная фаза – 10 мМ водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 2.

Применение концентрирования, реакции дериватизации, гидрофильной хроматографии, выбранных условий хроматографического разделения с повышенным содержанием ацетонитрила в подвижной фазе, а также tandemного масс-спектрометрического детектирования привело к достижению ультра-низкого предела обнаружения МФК в водных объектах. Достигнутый предел обнаружения вместе с другими аналитическими характеристиками представлен в таблице 3.

**Таблица 3.** Метрологические характеристики при определении МФК в виде БФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии

Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	R <sup>2</sup>	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл
БФОМФК	0.3 – 60	0.997	0.3	0.1

Оценивали матричный эффект, прецизионность и внутрилабораторную прецизионность. Матричные компоненты практически не влияли на масс-спектрометрический сигнал производного МФК (среднее значение матричного эффекта не превышало 2%), значения относительного стандартного отклонения при оценке прецизионности и внутрилабораторной прецизионности составили 6% и 25%, соответственно. Разработанный способ применяли к анализу реальных образцов воды, полученных в рамках официального теста, проводимого лабораторией Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО). Один образец воды

выступал в качестве тестового, второй образец представлял из себя холостую пробу, не содержащую МФК. Образцы воды анализировали согласно разработанному способу. По результатам анализа в тестовом образце воды была обнаружена и определена МФК, концентрация которой составила 10.6 нг/мл, в холостой пробе воды подтверждено отсутствие МФК.

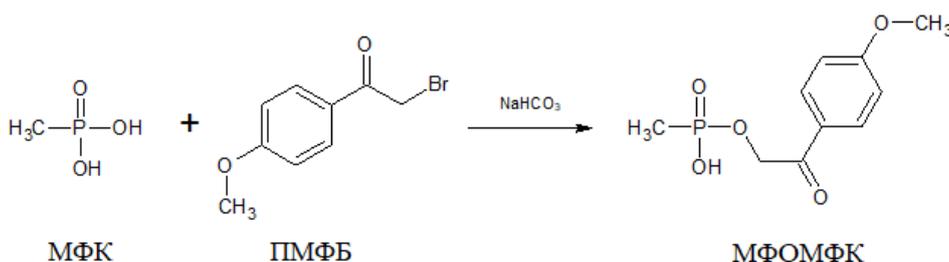
В разделе “Разработка способа определения МФК в виде производного с ПБФБ в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен способ определения МФК в виде производного с ПБФБ совместно с алкилметилфосфоновыми кислотами (АМФК) в грунто-пылевых смесях при помощи метода гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Было обнаружено, что в выбранных условиях дериватизации МФК, АМФК не реагируют с ПБФБ. В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ раствор ацетата аммония в воде и ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы 1.5 мл/мин. Применяли режим градиентного элюирования. Условия разделения подбирали таким образом, чтобы достичь приемлемой кажущейся эффективности разделения ( $N$  от 3840 до 16753 ТТ/м), а также значения кажущихся коэффициентов емкости определяемых соединений в диапазоне от 1 до 5. МФК и АМФК извлекали из измельченных грунто-пылевых смесей при помощи ультразвукового экстрагирования водой. Полученные водные экстракты упаривали на ротационном испарителе, остаток растворяли в ацетонитриле и проводили реакцию дериватизации. Разработанная процедура прошла проверку, в таблице 4 представлены некоторые аналитические характеристики разработанного способа.

**Таблица 4.** Сводные данные по аналитическим характеристиками при определении МФК и АМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии

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
Среднее значение матричного эффекта (n=3), %	-40	-12	-6	-1	-2
Прецизионность (%ОСО, n=5), %	6	9	5	8	12
Внутрилабораторная прецизионность (%ОСО, n=15), %	25	15	18	22	22
Диапазон линейности, нг/мл	0.6 – 60	0.18 – 50	0.024 – 50	0.024 – 50	0.015 – 50
ПО, нг/мл (нг/г)	0.2 (2)	0.06 (0.72)	0.008 (0.078)	0.008 (0.083)	0.005 (0.049)

Разработанный способ применяли к четырем реальным образцам грунто-пылевых смесей, собранных в различных местах с территории бывшего завода по производству химического оружия, расположенного в городе Волгограде (закрит более 25 лет назад). В реальных образцах грунто-пылевых смесей были обнаружены МФК и АМФК. Большие количества ПинМФК и иПрМФК свидетельствуют о том, что данные образцы в малой степени подвергались гидролизу из-за засушливого климата местности. Однако в некоторых образцах иПрМФК и ПинМФК не были обнаружены, либо были обнаружены на очень низком уровне. МФК была обнаружена во всех образцах, что свидетельствует о том, что она, как конечный продукт гидролиза всех АМФК, является наиболее универсальным маркером нервно-паралитических отравляющих веществ.

В разделе “Изучение реакции дериватизации МФК *p*-метоксифенацилбромидом” описан новый реагент для дериватизации МФК – *p*-метоксифенацилбромид (ПМФБ), позволяющий проводить реакцию дериватизации в водной фазе. При взаимодействии МФК и ПМФБ протекает реакция, представленная на рисунке 7, в результате которой образуется 2-(4-метоксифенил)-2-оксоэтилметилфосфоновая кислота (МФОМФК).



**Рис. 7.** Схема реакции дериватизации МФК пара-метоксифенацилбромидом.

Так как реакция протекает в однофазной среде, то использование 18-краун-6 не требуется. Действительно, площадь пика производного МФК в присутствии и в отсутствие 18-краун-6 одинакова. Таким образом, реакцию дериватизации проводили следующим образом: в полипропиленовых пробирках на 1.5 мл готовили 1 мл раствора МФК с концентрацией 200 нг/мл в деионизованной воде. К раствору добавляли 20 мкл водного раствора гидрокарбоната натрия (40 мг/мл) и 100 мкл раствора ПМФБ в ацетонитриле. Полипропиленовые пробирки термостатировали при 95 °С в течение 45 минут.

Для масс-спектрометрического определения были выбраны 2 реакции:  $m/z$  243→150 для определения и  $m/z$  243→215 для качественного подтверждения.

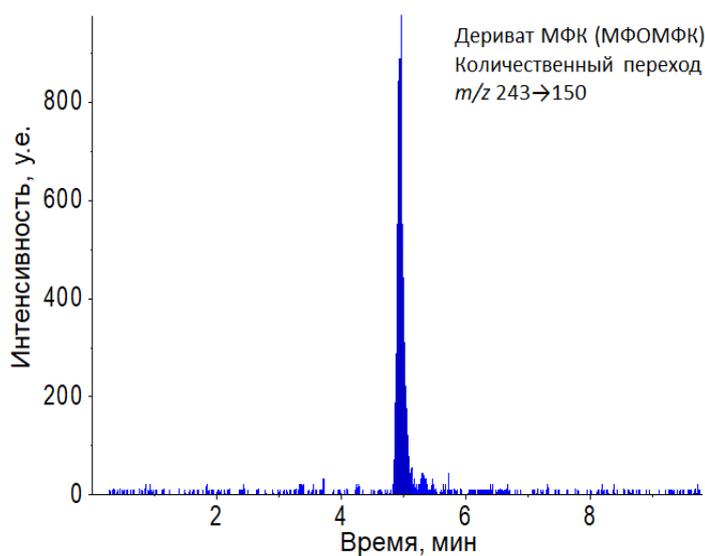
В разделе “Разработка способа определения МФК в водных объектах в виде производного с ПМФБ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен способ определения МФК напрямую в водных объектах в виде производного с ПМФБ методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложенная реакция дериватизации МФК с ПМФБ, позволяющая проводить дериватизацию МФК напрямую в водных объектах, открыла возможность создания экспрессного, надежного и чувствительного ВЭЖХ-

МС/МС способа определения МФК. Данный способ включает в себя дериватизацию МФК в водной фазе после минимальной пробоподготовки, применение ОФЖХ, так как производное МФК находится в водной фазе, и tandemное масс-спектрометрическое детектирование. В качестве подвижной фазы использовали 0.1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы составила 0.4 мл/мин в режиме градиентного элюирования. Подбирали хроматографические условия для достижения приемлемого значения кажущегося коэффициента емкости ( $k'$  от 1.5 до 4), а также высокого значения числа теоретических тарелок.

**Таблица 5.** Программа градиентного элюирования в режиме обращенно-фазового разделения

<b>Время, мин</b>	0	2	4.7	6.7	6.8	10
<b>Содержание ацетонитрила, %</b>	10	10	80	80	10	10

В подобранных условиях (Табл. 5) для пика МФОМФК (Рис. 8) была достигнута высокая кажущаяся эффективность хроматографического разделения (109682 ТТ/м) и кажущийся коэффициент емкости ( $k' = 3.8$ ), удовлетворяющий рекомендуемому в литературе значению.



Было изучено влияние матричного эффекта в 5 различных типах воды: вода из колодца, из скважины, из родника и два образца водопроводной воды, отобранные на Химическом факультете МГУ и в Главном Здании МГУ. При использовании раствора гидрокарбоната натрия в качестве катализатора вместо раствора карбоната калия удалось полностью избежать влияния матричного эффекта и в несколько раз увеличить выход реакции дериватизации.

**Рис. 8.** Хроматограмма 20 нг/мл МФК в виде МФОМФК в деионизованной воде по выбранной реакции  $m/z$  243→150. Подвижная фаза – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил. Скорость потока 0.4 мл/мин. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 5.

Разработанная процедура прошла проверку, полученные метрологические характеристики представлены в таблице 6.

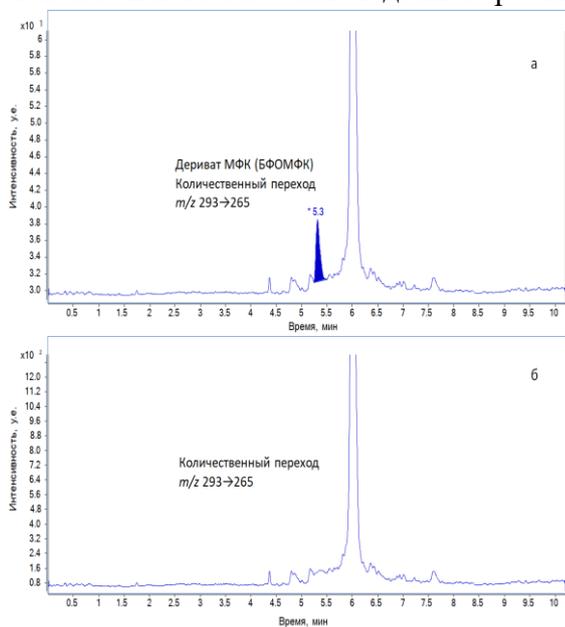
**Таблица 6.** Метрологические характеристики при определении МФК в виде МФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме обращенно-фазового разделения

Линейная область градуировочного графика, нг/мл	$R^2$	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность* (n=5), ОСО %	Внутрилабораторная прецизионность* (n=15), ОСО %
5 – 500	0.9995	5	2	9	14

\*Значения ОСО были близки на трех уровнях концентраций

Разработанный способ применяли к анализу реальных образцов воды, полученных в рамках официального теста, проводимого лабораторией ОЗХО. Один образец воды выступал в качестве тестового, второй образец представлял из себя холостую пробу, не содержащую МФК. Образцы воды анализировали согласно разработанному способу. По результатам анализа в тестовом образце воды была обнаружена и определена МФК, концентрация которой составила 9.5 нг/мл, в холостой пробе воды подтверждено отсутствие МФК.

В разделе “Разработка способа определения МФК в плазме крови в виде производного с ПБФБ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен способ определения МФК в образцах плазмы человека с применением дериватизации и метода ВЭЖХ-МС/МС. Для дериватизации был выбран ПБФБ, так как при работе с образцами плазмы необходимой стадией пробоподготовки является осаждение белков. После осаждения белков имеется возможность проведения дериватизации напрямую в осаждающем органическом растворителе. Осаждение проводили при помощи 10 мМ хлорной кислоты и 1,4-диоксана, в котором после отделения осажденных белков проводили реакцию дериватизации МФК. Плазма является более сложной матрицей по сравнению с природными водами и грунто-пылевой смесью, часть реагента вступала в реакцию с матричными компонентами, тем самым снижая выход целевой реакции. Увеличение концентрации ПБФБ в десять раз позволило увеличить выход реакции и достичь его максимального значения в данном растворителе. Дальнейшее увеличение концентрации ПБФБ



не привело к изменению площади пика производного. Также было установлено, что реакцию целесообразно проводить в среде 1,4-диоксана, а не ацетонитрила. В среде 1,4-диоксана в выбранных условиях удалось в полтора раза увеличить выход реакции дериватизации. Реакция дериватизации протекает в экстракте плазмы, которая является сложной и многокомпонентной матрицей. Поэтому очень важной задачей является выбор подходящих условий разделения пика производного с матричными компонентами и возможными продуктами их реакции с ПБФБ (Рис. 9).

**Рис. 9.** Хроматограммы по выбранной реакции  $m/z$  293→265 образца плазмы с добавкой 10 нг/мл МФК (а) и холостой пробы плазмы без добавок МФК (б).

Разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Подбирали наиболее подходящую программу. Критерием выбора программы являлось достижение высокой эффективности хроматографического разделения и кажущегося коэффициента емкости в диапазоне от 1.5 до 5. Полученный хроматографический пик производного (Рис. 9а)

характеризуется высоким значением кажущейся эффективности разделения ( $N=48000$  ТТ/м) и кажущегося коэффициента емкости ( $k'=4.9$ ), мешающие пики с близким временем удерживания отсутствуют (Рис. 9б). Полученные метрологические характеристики представлены в таблице 7.

**Таблица 7.** Метрологические характеристики при определении МФК в виде БФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС

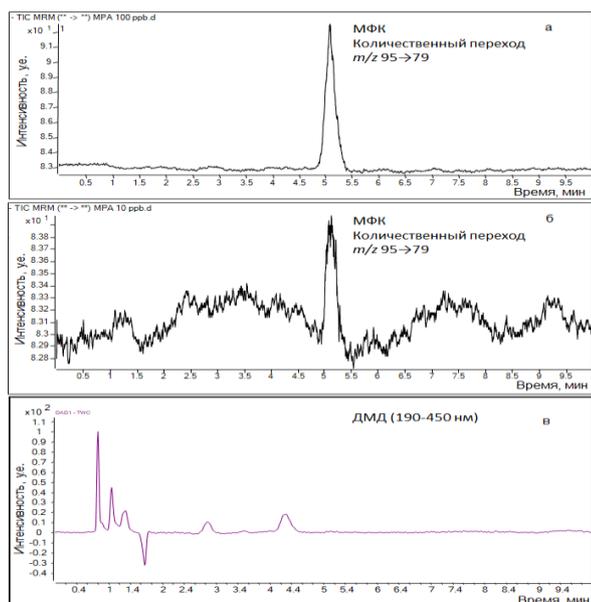
Диапазон линейности, нг/мл	$R^2$	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность* (n=5), ОСО %	Внутрилабораторная прецизионность* (n=15), ОСО %
10 – 500	0.9998	10	3	7	10

\*Значения ОСО были близки на двух уровнях концентраций

В разделе “Разработка способа определения МФК в образцах мочи методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен способ, позволяющий проводить определение МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. При нейтральном или слабокислом рН МФК находится в растворе в виде аниона ( $pK_{a1}=2.12$ ), поэтому применение анионообменной жидкостной хроматографии для определения МФК является перспективным. Достоинствами анионообменной жидкостной хроматографии, по сравнению с гидрофильной, являются отсутствие необходимости перевода образца в органический растворитель и уменьшение количества мешающих компонентов матрицы, способных повлиять на разделение. Данный факт приводит к снижению требований к процедуре пробоподготовки и позволяет разрабатывать более экспрессные способы определения МФК. Ионную хроматографию и tandemное масс-спектрометрическое детектирование для

анализа МФК в образцах мочи ранее не применяли.

В качестве неподвижной фазы использовали синтезированный в лаборатории МГУ анионообменник на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитыми четвертично-аммониевыми группами. Подбирали различные варианты подвижных фаз, способных выступать в качестве элюентов в ионной хроматографии и совместимых с масс-спектрометрическим детектированием. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании 200 мМ муравьиной кислоты в воде и изократического режима (Рис. 10).

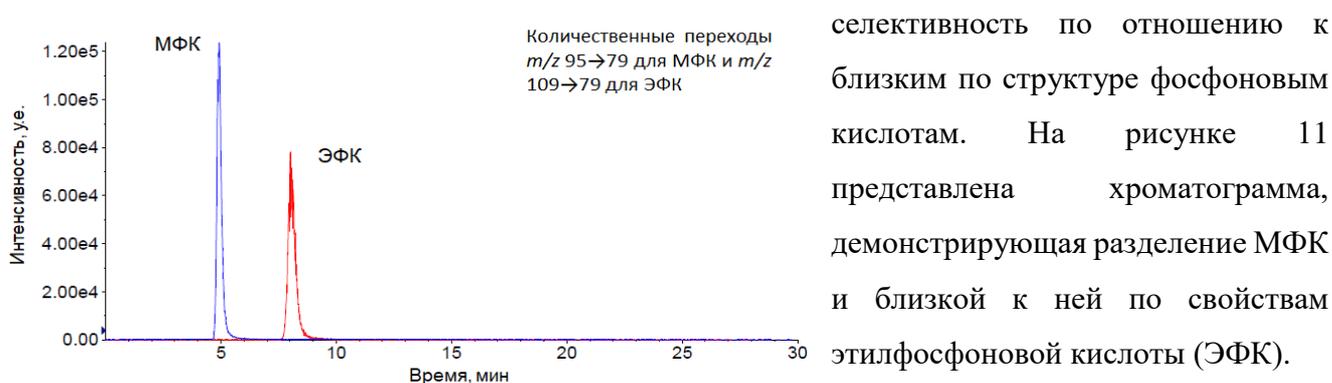


**Рис. 10.** а) Хроматограмма по выбранной реакции  $m/z$  95→79 образца холостой мочи крысы с добавкой МФК до концентрации 100 нг/мл; б) хроматограмма по выбранной реакции  $m/z$  95→79 образца холостой мочи крысы с добавкой МФК до концентрации 10 нг/мл; в) хроматограмма по диодно-матричному детектору в диапазоне длин волн от 190 до 450 нм.

Подвижную фазу подавали со скоростью потока 0.95 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов по выбранным реакциям:  $m/z$  95→79 и  $m/z$  95→63. Применение выбранных условий элюирования обеспечило приемлемый коэффициент емкости ( $k' = 4,1$ ), что позволило отделить МФК от основных матричных компонентов мочи, видимых при использовании диодно-матричного детектирования (Рис. 10в).

Так как приготовленный анионообменник оказался высокоселективным по отношению к МФК и обеспечивал хорошее разделение с матричными макрокомпонентами, то предварительное удаление матричных компонентов из анализируемого раствора перестало быть необходимым. Таким образом, процедура анализа образцов мочи не требовала применения трудоемкой и длительной стадии пробоподготовки.

Показано, что центрифугирование, фильтрование и двукратное разбавление образцов мочи достаточно для полного преодоления влияния матричного эффекта, который на трех уровнях концентраций находился в диапазоне от -2 до 1%. Разработанный способ также показал высокую



селективность по отношению к близким по структуре фосфоновым кислотам. На рисунке 11 представлена хроматограмма, демонстрирующая разделение МФК и близкой к ней по свойствам этилфосфоновой кислоты (ЭФК).

**Рис. 11.** Хроматограмма в режиме мониторинга выбранных реакций:  $m/z$  95→79 для МФК и  $m/z$  109→79 для ЭФК. Подвижная фаза – водный раствор 200 мМ муравьиной кислоты. Скорость потока 0.95 мл/мин.

Как видно из рисунка 11, с ЭФК достигнуто хорошее разделение ( $R_s = 6.4$ ). Некоторые аналитические характеристики при определении МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием представлены в таблице 8.

**Таблица 8.** Метрологические характеристики при определении МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с МС/МС детектированием

Линейная область градуировочного графика, нг/мл	$R^2$	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность* (n=5), ОСО %	Внутрилабораторная прецизионность* (n=15), ОСО %
10 – 500	0.9998	10	4	8	12

\*для прецизионности и внутрилабораторной прецизионности приведены значения, соответствующие 20 нг/мл МФК.

Разработанный способ применяли к анализу мочи крыс, которым подкожно вводили НПОВ в дозе  $\frac{1}{2}$  LD<sub>50</sub>. Наибольшая концентрация МФК, определенная в моче, составила 40 нг/мл, тогда как при воздействии более низких доз НПОВ и/или в более отдаленных по времени от момента воздействия точках отбора ожидаются существенно более низкие концентрации МФК, что еще раз указывает на важность разработки высокочувствительных способов определения МФК в биопробах.

Суммарные данные, отражающие характеристики разработанных способов, представлены в сводной таблице 9.

**Таблица 9.** Сводные данные по характеристикам разработанных способов

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) 10 (ВЭЖХ-МС/МС)
Водные объекты	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-метоксифенацилбромидом	2	9.4 (ГХ-ПИД) 10 (ВЭЖХ-МС/МС)
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 жидкостная хроматография с МС/МС детектированием	3	10 (ГХ-ПИД)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Общие выводы

1. Изучены масс-спектры электрораспылительной ионизации МФК и ее производных в режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных ионов. Показано, что более высокая чувствительность масс-спектрометрического детектирования достигается в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.

2. Установлены хроматографические параметры и особенности удерживания МФК в условиях обращенно-фазовой, гидрофильной и анионообменной жидкостной хроматографии. Показано, что приемлемый коэффициент емкости МФК ( $k' = 4.1$ ) достигается только в условиях

анионообменной жидкостной хроматографии. Предложена неподвижная фаза на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитыми четвертично-аммониевыми группами, позволяющая полностью избежать влияния матричных компонентов мочи. В качестве подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометрическим детектированием и обеспечивающей достижение высоких коэффициентов емкости МФК в условиях анионообменной жидкостной хроматографии, использовали водный раствор муравьиной кислоты.

3. Предложены реагенты для дериватизации МФК – п-бромфенацилбромид и п-метоксифенацилбромид, выбраны условия ее проведения. Реагент п-метоксифенацилбромид позволяет проводить дериватизацию МФК непосредственно в водных средах.

4. Установлены хроматографические параметры и особенности удерживания производных МФК в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной жидкостной хроматографии. Получены приемлемые значения кажущихся коэффициентов емкости производных МФК ( $k'$  от 2.4 до 4.9) и выбраны условия хроматографического анализа образцов. Показано, что повышенное содержание органического растворителя в подвижной фазе увеличивает чувствительность масс-спектрометрического детектирования производного МФК в режиме гидрофильной хроматографии и ионизации электрораспылением.

5. Разработаны способы хроматомасс-спектрометрического определения МФК в водных объектах, грунто-пылевых смесях и плазме крови в виде производных с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом методами ОФЖХ и гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Разработан способ определения МФК в моче методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. За счет применения оригинальных способов пробоподготовки, дериватизации п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом, создания подходящих условий ионизации электрораспылением, а также сочетания анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием достигнуты пределы обнаружения МФК в диапазоне от 0.1 нг/мл до 10 нг/мл.

6. Разработанные способы успешно апробированы при анализе образцов воды, полученных в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО, грунто-пылевых смесей, собранных с территории бывшего завода по производству химического оружия в г. Волгограде, мочи крыс, подвергшихся воздействию несмертельных доз НПОВ. Получены данные о выведении МФК из организма лабораторных крыс.

**Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:**

1. **Baygildiev T.M.** Hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry methylphosphonic acid determination in water samples after derivatization with p-bromophenacyl bromide / Rodin I.A., **Baygildiev T.M.**, Stavrianidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // **Chromatographia**. – 2015. – V. 78. № 7 – 8. – P. 585 – 591.
2. **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.
3. **Байгильдиев Т.М.** Определение метилфосфоновой кислоты в образцах плазмы крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / **Байгильдиев Т.М.**, Родин И.А., Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В // **Масс-спектрометрия**. – 2016. – Т. 13. № 4. – С. 241 – 246.
4. **Baygildiev T.M.** Rapid IC-MS/MS determination of methylphosphonic acid in urine of rats exposed to organophosphorus nerve agents / **Baygildiev T.M.**, Zatirakha A.V., Rodin I.A., Braun A.V., Stavrianidi A.N., Koryagina N.L., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // **Journal of Chromatography B**. – 2017. – V. 1058. – P. 32 – 39.
5. **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>
6. **Baygildiev T.M.** Simultaneous hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination after derivatization with p-bromophenacyl bromide in environmental samples / **Baygildiev T.M.**, Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. – Siofok, Hungary, 2-4 September 2015, – P. 79.
7. **Байгильдиев Т.М.** Определение метилфосфоновой кислоты в природных водах при помощи анионообменной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / **Байгильдиев Т.М.**, Родин И.А., Затираха А.В., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. // Тезисы докладов X Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2016". – Углич, Россия, 26 июня – 2 июля 2016. – С. 14.
8. **Байгильдиев Т.М.** Anion-exchange LC-MS/MS analysis of the most stable nerve agent biomarker in urine / **Байгильдиев Т.М.**, Родин И.А., Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Рыбальченко

И.В., Ананьева И.А., Шпигун О.А. // MSACL 2016 EU congress on clinical mass spectrometry. Long Abstracts. – Salzburg, Austria, 12-15 September 2016. – P. 180.

9. **Байгильдиев Т.М.** Определение полярных биомаркеров боевых отравляющих веществ с применением ВЭЖХ / Ставрианиди А.Н., Браун А.В., **Байгильдиев Т.М.**, Родин И.А., Рыбальченко И.В. // Тезисы докладов 5 Всероссийского симпозиума с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов». – Сочи, Россия, 30 октября – 6 ноября 2016. – С.268 – 269.

10. **Байгильдиев Т.М.** Новые подходы к определению МФК различными видами высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием / **Байгильдиев Т.М.**, Родин И.А., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. // Материалы III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар, Россия, 21 – 27 мая 2017. – С. 61.

11. **Baygildiev T.M.** Novel approaches for methylphosphonic acid determination by various LC-MS/MS techniques / **Baygildiev T.M.**, Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // MSACL 2017 US book of abstracts. – Palm Springs, USA, 22 – 27 January 2017.

12. **Baygildiev T.M.** Determination of organophosphorus nerve agents biomarkers in urine by ion chromatography tandem mass spectrometry / **Baygildiev T.M.**, Rodin I.A., Zatirakha A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // MSACL 2017 EU congress on clinical mass spectrometry. Long Abstracts. – Salzburg, Austria, 10-14 September 2017.

*Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.х.н. Родину И.А., а также чл.-корр. РАН, проф. д.х.н. Шпигуну О.А., проф., д.х.н. Рыбальченко И.В., к.х.н. Ставрианиди А.Н., к.х.н. Брауну А.В., к.х.н. Затирахе А.В. и Байгильдиевой Д.И. за помощь в работе и обсуждении результатов.*