

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

д.х.н., с.н.с. Родин И.А.

Москва 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	12
1.1    Определение метилфосфоновой кислоты в объектах окружающей среды .....	12
1.2    Определение метилфосфоновой кислоты в плазме крови людей и животных .....	36
1.3    Определение метилфосфоновой кислоты в образцах мочи человека и животных .....	42
ГЛАВА 2. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА .....	49
2.1    Оборудование и материалы .....	49
2.2    Схема экспериментов по экспрессному определению метилфосфоновой кислоты в водных объектах методом ВЭЖХ-МС/МС .....	51
2.3    Схема экспериментов по определению метилфосфоновой кислоты в виде производного с п-бромфенацилбромидом в водных объектах методом гидрофильной хроматографии с МС/МС детектированием .....	52
2.4    Схема экспериментов по определению метилфосфоновой кислоты в виде производного с п-бромфенацилбромидом в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с МС/МС детектированием.....	54
2.5    Схема экспериментов по определению метилфосфоновой кислоты в виде производного с п-метоксифенацилбромидом в водных объектах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС.....	57
2.6    Схема экспериментов по определению метилфосфоновой кислоты в виде производного с п-бромфенацилбромидом в плазме крови методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС.....	58
2.7    Схема экспериментов по определению метилфосфоновой кислоты в образцах мочи методом анионообменной жидкостной хроматографии с МС/МС детектированием .....	60
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ.....	63
3.1    Изучение возможности прямого определения метилфосфоновой кислоты в водных объектах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС.....	63
3.2    Изучение возможности прямого определения метилфосфоновой кислоты методом гидрофильной хроматографии с МС/МС детектированием.....	72
3.3    Изучение реакции дериватизации метилфосфоновой кислоты п-бромфенацилбромидом .....	74

3.4	Разработка способа определения метилфосфоновой кислоты в виде производного с п-бромфенацилбромидом в водных объектах методом гидрофильной хроматографии с МС/МС детектированием .....	80
3.5	Разработка способа определения метилфосфоновой кислоты в виде производного с п-бромфенацилбромидом в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с МС/МС детектированием .....	88
3.6	Изучение реакции дериватизации метилфосфоновой кислоты п-метоксифенацилбромидом .....	95
3.7	Разработка способа определения метилфосфоновой кислоты в водных объектах в виде производного с п-метоксифенацилбромидом методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС .....	99
3.8	Разработка способа определения метилфосфоновой кислоты в плазме крови в виде производного с п-бромфенацилбромидом методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС.. .....	107
3.9	Разработка способа определения метилфосфоновой кислоты в образцах мочи методом анионообменной жидкостной хроматографии с МС/МС детектированием ....	112
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	124
	ЛИТЕРАТУРА .....	126

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМФК	алкилметилфосфовые кислоты
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЛП	внутрилабораторная прецизионность
ГХ	газовая хроматография
ДМД	диодноматричное детектирование
ИК	инфракрасный
ИХ	ионная хроматография
КЗЭ	капиллярный зонный электрофорез
КЭ	капиллярный электрофорез
МС	масс-спектрометрия
МС/МС	тандемная масс-спектрометрия
МФК	метилфосфовая кислота
НПОВ	нервно-паралитические отравляющие вещества
ОВ	отравляющие вещества
ОЗХО	Организация по запрещению химического оружия
ПБФБ	п-бромфенацилбромид
ПМФБ	п-метоксифенацилбромид
ПД	потенциал декластеризации
ЭС	энергия соударений
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

## ВВЕДЕНИЕ

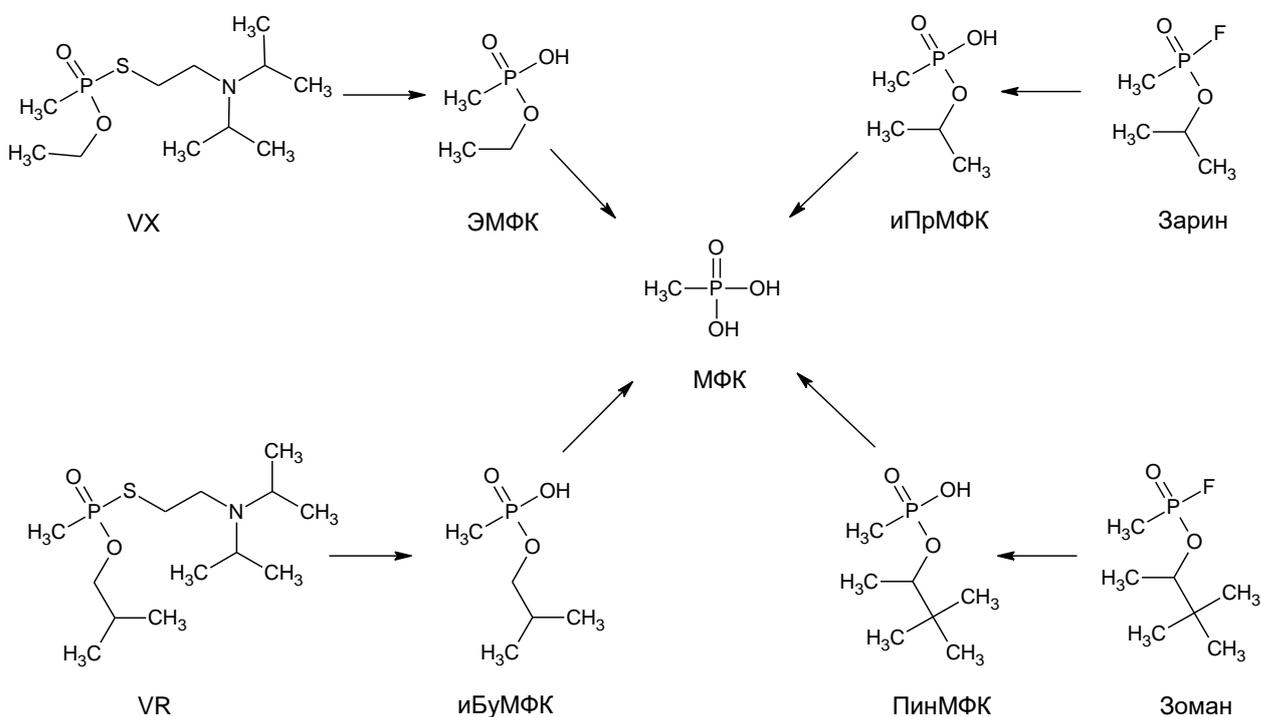
Актуальность темы. В настоящее время в мире существует серьезная угроза применения химического оружия во время локальных вооруженных конфликтов и террористических атак. Химическое оружие – это один из видов оружия массового поражения, действие которого основано на использовании боевых отравляющих веществ, оказывающих поражающее действие на организм человека и животных [1].

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) [2].

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 [3]. 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) [4]. Данные вещества принято рассматривать в качестве биомаркеров воздействия НПОВ на организм [5].

МФК является наиболее стабильным продуктом деструкции фосфорорганических НПОВ. Период полураспада МФК в реакции с

гидроксильными радикалами в воде составляет 18 лет [6]. МФК является кислотой средней силы ( $pK_{a1}$  2.12,  $pK_{a2}$  7.29) [7]. 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 [8-11]. 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 тандемным 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 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 тандемным 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 тандемным 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 тандемным 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 тандемным 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 тандемным масс-спектрометрическим детектированием в образцах плазмы крови. Предел обнаружения составил 3 нг/мл.

Разработан способ прямого определения МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с тандемным 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-2016» (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.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

К объектам окружающей среды, которые могут быть заражены НПОВ во время ненадлежащей транспортировки, хранения, утилизации либо по злему умыслу относятся природные воды, питьевая вода, водопроводная вода, почвы, грунто-пылевые смеси. Личный состав вооруженных сил либо специально обученные сотрудники организаций, занимающихся утилизацией запасов химического оружия, могут быть заражены по трагической случайности, халатности либо вследствие аварии или чрезвычайного происшествия. Человек и животные могут подвергаться воздействию НПОВ во время террористических актов злоумышленников. В организме человека НПОВ быстро гидролизуются с образованием АМФК, которые в дальнейшем превращаются в МФК и выводятся из организма человека с мочой. Наиболее вероятными биологическими жидкостями, в которых может быть обнаружена МФК являются кровь и моча человека. Опубликовано довольно большое количество работ, посвященных определению АМФК в объектах окружающей среды и биологических объектах [12-72], однако существенно меньшее количество работ, посвящено определению МФК. Данный факт напрямую связан со сложностью определения МФК наиболее популярными методами газовой и жидкостной хроматографии. Соответствующие работы по определению МФК отдельно либо совместно с АМФК в объектах окружающей среды и биологических объектах рассмотрены ниже.

### 1.1 Определение МФК в объектах окружающей среды

Объекты окружающей среды являются важными объектами исследований, так как могут быть загрязнены ОВ в процессе их транспортировки, хранения, разработки или применения. Обнаружение МФК в окружающей среде считается доказательством факта воздействия фосфорорганических ОВ, в том числе и по прошествии длительного времени, когда определение АМФК будет невозможным по причине их полного разложения [3, 4]. Таким образом, создание способов высокочувствительного определения МФК на ультранизких уровнях (0.1–1 нг/мл) является важной в практическом плане задачей.

Химический состав различных типов вод сильно варьируется [73, 74]. В качестве основных макрокомпонентов выступают гидрокарбонат, хлорид и сульфат-

анионы, а также катионы кальция, магния, натрия и калия. Также в воде содержатся органические вещества, мезо- и микроэлементы, растворенные газы [75].

В состав почв входят практически все элементы периодической системы Менделеева, однако наиболее распространены кремний, алюминий, железо, кальций, магний, калий, натрий, марганец, сера, углерод, азот и фосфор, которые находятся в форме различных минеральных и органических соединений, а также в форме почвенного раствора. Органическое вещество почвы состоит из сложного комплекса соединений, которые образуются в процессе разложения органических остатков высших и низших растений, микроорганизмов и животных, обитающих в почве, а также из специфических соединений, которых не было в первичных органических остатках. Эти специфические соединения представляют важнейшую часть почвы – гумус. Он составляет от 60 до 90 % органического вещества почвы.

Грунт представляет собой любые горные породы, почвы, осадки и техногенные образования, рассматриваемые как многокомпонентные динамичные системы и как часть геологической среды [76]. Грунт часто используют в качестве оснований зданий и различных сооружений, а также материалов для строительства дорог. К пыли относят мелкие (до 0.1 мм) твердые частицы органического и минерального происхождения.

Исходя из описанного выше, можно заключить, что природные воды, почвы, грунт или грунто-пылевые смеси являются сложными объектами, содержащими большое число компонентов, которые могут влиять на хроматографическое разделение и детектирование МФК. Поэтому для определения МФК первостепенной задачей является выбор метода определения и способа пробоподготовки, позволяющих избежать либо минимизировать влияние основных компонентов химического состава данных объектов.

Исторически наиболее распространенным способом определения МФК и АМФК является дериватизация в сочетании с газовой хроматографией и масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Применение дериватизации необходимо, так как МФК и другие АМФК не обладает летучестью. У данного способа есть преимущество, связанное с высокой чувствительностью детектирования за счет образования производных. Однако есть и ряд недостатков, связанных с высокими требованиями, предъявляемыми к чистоте экстракта из-за

малой емкости капиллярных колонок, гарантированно меньшим объемом ввода по сравнению с жидкостной хроматографией, а также нестабильностью образующихся производных с течением времени.

В работе [77] для определения МФК, некоторых алкилфосфоновых кислот и АМФК в воде применяли дериватизацию в среде микроэмульсии с последующим газохроматографическим разделением и масс-спектрометрическим детектированием. Были оптимизированы условия экстракции и дериватизации аналитов (выбор реагента для дериватизации, растворителя, времени реакции и температуры реакционной среды). В качестве наиболее подходящего реагента был выбран пентилбромид, позволяющий эффективно дериватизировать выбранные вещества в присутствии карбоната калия и диизопропиламина при 100 °С. Для максимального выхода реакции дериватизации МФК и иПрМФК потребовалось 140-150 мин. Было доказано, что данный способ может быть применен даже в присутствии мешающих катионов кальция и магния, которые, как известно, могут влиять на дериватизацию и последующее ГХ-МС определение [78, 79]. Достоинством способа является возможность одновременной экстракции и последующей дериватизации. Для МФК и других соединений был достигнут довольно высокий предел обнаружения, равный 1 мкг/мл. В качестве одной из причин высоких пределов обнаружения стоит отметить низкое значение степени извлечения МФК (42-46%).

Авторы цикла работ [80, 81, 82] изучали экстракцию алкилфосфоновых кислот из различных почв, морской воды и напитков, используя силилирование трет-бутилдиметилхлорсиланом (ТБДМС) и метод ГХ-МС. В работе [81] применяли макропористую сильную анионообменную смолу для экстрагирования МФК и ряда АМФК, которые далее определяли в виде трет-бутилдиметилсилильных производных в образцах воды, различных почвах и напитках методом ГХ-МС. Образцы воды, напитков и морской воды, разбавленной в 2 и 4 раза, а также водные экстракты из почв пропускали через активированные смолы. Элюирование определяемых соединений проводили 0.1 М раствором соляной кислоты. Далее полученные растворы нейтрализовали до рН 7 карбонатом натрия, упаривали на ротационном вакуумном испарителе и проводили дериватизацию с получением трет-бутилдиметилсилильных производных. Также проводили экстрагирование с

использованием катионообменного картриджа. Экстрагирование МФК и АМФК при помощи макропористой анионообменной смолы оказалось предпочтительным. Однако в отличие от АМФК, для МФК хорошие результаты были достигнуты только при экстрагировании из образцов воды (степень извлечения 93.9%). Для образцов сладких напитков и морской воды при экстрагировании МФК были достигнуты очень низкие степени извлечения. В работе также изучали извлечение МФК из 3 типов почв. При пропускании водного экстракта первого типа почвы через анионообменную смолу получили степень извлечения МФК, равную 45%, при пропускании экстракта второго и третьего типа почвы степени извлечения оказались еще ниже и составили всего 16.7 и 2.3%, соответственно. Степени извлечения МФК из кока-колы и кофе также оказались невысоки и составили 26.6 и 5.2%, соответственно. Даже двух- и четырехкратное разбавление морской воды не позволило повысить степень извлечения МФК из морской воды (65%). Достигнутый предел обнаружения не отличался низким значениям и составил 0.18 мкг на 1 г почвы, что в пересчете на объем экстракта составляет 90 нг/мл. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что совместное определение МФК и других АМФК является чрезвычайно сложной задачей, требующей применение нестандартных подходов в силу различия в свойствах данных соединений.

Та же группа авторов провела исследования для более полного изучения процесса экстракции МФК и АМФК из различных типов почв [82]. В работе анализировали 21 тип почв, разделенных на 5 классов по происхождению и свойствам. За исключением 3 типов почв, во всех остальных были получены очень низкие степени извлечения МФК. Из 7 почв извлечь МФК не удалось. В более ранней работе [8] также было показано, что 95% МФК и только 33% АМФК сорбируется на подзолистой почве. Для объяснения этого факта был предложен ионообменный механизм сорбции МФК и выдвинуто предположение, что гуминовые кислоты за счет образования водородных связей могут дополнительно участвовать в сорбции МФК. В работе также рассматривалось влияние щелочных и щелочноземельных металлов на выход реакции дериватизации. Было доказано, что удаление катионов щелочноземельных металлов за счет применения анионообменной смолы положительно сказывается на выходе реакции дериватизации. Однако катионы натрия поступают в анализируемые образцы после

нейтрализации полученного элюата карбонатом натрия, что оказывает отрицательное влияние на выход реакции дериватизации. Также было показано, что кроме катионов металлов, на выход реакции дериватизации в некоторых случаях сильно влияют экстрагируемые из почвы соединения органической природы.

Отрицательные результаты при экстрагировании МФК с применением коммерчески доступных сильных анионообменных картриджей на основе силикагеля также были представлены в более ранних работах американских авторов [83-86]. В ходе эксперимента не возникало трудностей с экстрагированием АМФК из воды, однако степени извлечения из почв были низки. Для МФК помимо очень низкой степени извлечения из почв (4%), низкое значение степени извлечения (13%) было достигнуто и для образцов воды.

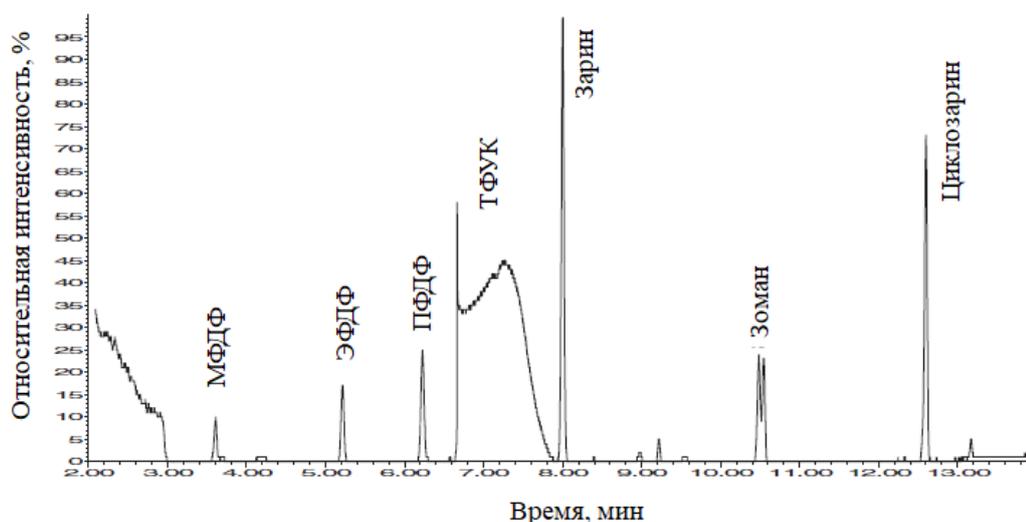
Для определения МФК и ряда маркеров различных отравляющих веществ в образцах воды применяли метод твердофазной микроэкстракции в сочетании с газовой хроматографией и масс-спектрометрическим детектированием [87]. Для извлечения МФК из образцов воды использовали 4 типа волокна: полидиметилсилоксановое волокно диаметром 100 мкм, полиакрилатное волокно диаметром 85 мкм, полидиметилсилоксановое/дивинилбензоловое волокно диаметром 65 мкм и карбоксеновое волокно (углеродные молекулярные сита) диаметром 75 мкм. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании карбоксенового волокна. На стадии пробоподготовки на 5 минут опускали волокно в пробирку с *N*-метил-*N*-*трет*-бутилдиметилсилил-трифторацетамидом (МТБСТФА), помещенную в устройство для анализа с вводом равновесной паровой фазы. Далее волокно выдерживали в воде (3 мл) с добавкой МФК в течение 15 минут. После этого волокно снова помещали в пробирку, содержащую пары МТБСТФА (15 минут) и вводили в инжектор газового хроматографа. Авторы исследовали влияние рН раствора и количества высаливающего агента на процесс экстрагирования. Было выяснено, что наиболее полно МФК извлекается при рН 1.5 и содержании хлорида натрия в водном растворе до состояния насыщения. Также авторы изучали влияние температуры на реакцию дериватизации. Пятнадцатиминутную стадию дериватизации проводили при комнатной температуре, 40 °С и 60 °С. Показано, что при увеличении температуры площадь пика производного МФК и других определяемых соединений снижается, что может быть связано с их термодесорбцией

с поверхности волокна. Воспроизводимость результатов при определении МФК на уровне 1 мкг/мл была довольно низка и составила 21.9%, что не помешало получить предел обнаружения МФК, равный 10 нг/мл. Авторы отмечают простоту и экспрессность разработанного способа, а также указывают на возможность его применения для исследования загрязнения местности в полевых условиях. Однако также авторы отмечают, что способ не совсем подходит для определения МФК из-за возможных различий в скорости реакции на разных уровнях концентраций, сохраняя свою актуальность при условии ограничения по времени.

Помимо масс-спектрометрических детекторов, хорошие результаты были получены при применении пламенно-фотометрического детектора. Например, в работе [88] представлен способ определению МФК, ЭМФК и иПрМФК при помощи ГХ и пламенно-фотометрического детектора в образцах грунтовых вод. Для извлечения МФК из образцов грунтовых вод использовали анионообменные твердофазные картриджи с четвертичными аммониевыми группами. МФК и другие АМФК одновременно элюировали и дериватизировали при помощи метанольного раствора гидроксида триметилфениламмония. Степень извлечения МФК составила 53%. Полное разделение и определение проходило за 7 минут, предел обнаружения МФК составил 9.4 нг/мл.

В работе [89] впервые для дериватизации МФК и АМФК была использована реакция фторирования в инжекторе газового хроматографа. Детектирование полученных производных осуществляли при помощи масс-спектрометрического детектора. В работе исследовали возможность фторирования МФК и АМФК различными фторирующими агентами: трифторуксусным ангидридом, пентафторпропионовым ангидридом, гексафторбутировым ангидридом, трифторуксусной кислотой, трифторэтанолом и трипропилфосфатом. Наилучшие результаты были получены при использовании трифторуксусного ангидрида, который, как предполагают авторы, под воздействием высокой температуры в инжекторе газового хроматографа превращается во фторид-трифторацетатный и дифторацетатный бирадикал, которые и являются источниками фторид-ионов. Авторы изучали влияние температуры инжектора и количества трифторуксусного ангидрида на реакцию дериватизации. Наивысшую площадь пика производного МФК достигали при 350 °С и 1 мкл трифторуксусного ангидрида.

Хроматографическое разделение занимало менее чем 15 минут (Рис. 2). Для МФК был достигнут предел обнаружения, равный 500 нг/мл. Разработанный способ не был применен к реальным образам.

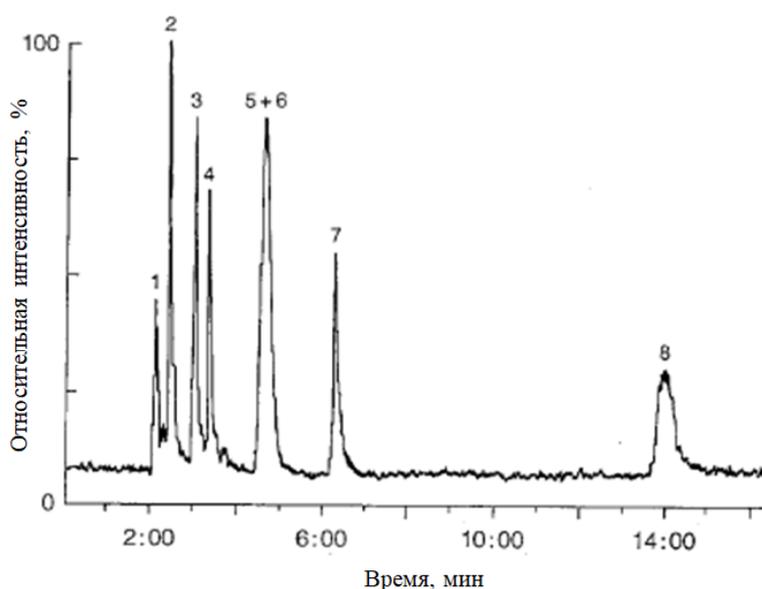


**Рис. 2.** Хроматограмма по полному ионному току смеси МФК, АФК и АМФК с трифторуксусным ангидридом при температуре инжектора 230 °С (МФДФ – метилфосфонодифторид, ЭФДФ – этилфосфонодифторид, ПФДФ – пропилфосфонодифторид, ТФУК- трифторуксусная кислота, Зарин – изопропил метилфосфонодифторид, Зоман – пинаколил метилфосфонодифторид, циклозарин – циклогексил метилфосфонодифторид) [89].

Вторым по популярности методом анализа продуктов деструкции нервнопаралитических отравляющих веществ в водных объектах является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. У метода ВЭЖХ-МС перед методом ГХ-МС есть ряд преимуществ. При анализе МФК в водных объектах отпадает необходимость упаривания и смены растворителя, предъявляется меньше требований к чистоте экстрактов, а также снижается время подготовки образцов к анализу. Однако, как будет показано ниже, при прямом определении в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, МФК имеет низкие значения коэффициента емкости, что приводит к высокому значению матричного эффекта и к низкой чувствительности масс-спектрометрического детектирования.

Первое применение метода ВЭЖХ-МС для определения фосфорорганических ОВ описано в работе [90]. В данной работе было определено 13 фосфорорганических соединений, в числе которых была МФК, с применением ион-парной хроматографии и ионизации при термораспылении (ИТР). Ацетат аммония и три

тетраалкиламмониевые соли (метил, этил и н-бутил) использовали в качестве ион-парных реагентов. Все вещества удалось элюировать, используя воду и водно-метанольные смеси. В работе рассматривали влияние ацетата аммония и тетраалкиламмониевых солей на хроматографическое поведение и масс-спектры фосфорорганических кислот. Хроматографическое разделение проводили на колонке размером 250 мм × 5 мм, наполненной 5 мкм сорбентом LiChrosorb C18. Разделение проводили в изократическом режиме. Ацетат аммония добавляли постколоночно со скоростью 0.3 мл/мин, скорость потока через колонку составила 1.2 мл/мин, суммарная скорость потока составила 1.5 мл/мин. При использовании только ацетата аммония наиболее интенсивные сигналы, соответствующие заряженным молекулам определяемых соединений, наблюдались при концентрации ацетата аммония, равной 0.1 М. Несмотря на то, что гидрофильные кислоты имели низкие коэффициенты емкости, удалось добиться их разделения. Для уменьшения времени удерживания фосфорорганических кислот с высокой гидрофобностью, таких как ПинМФК, была необходима добавка метанола в подвижную фазу. На рисунке 3 представлены хроматограммы смеси фосфорорганических кислот при использовании ацетата аммония в качестве компонента подвижной фазы.



**Рис. 3.** Хроматограмма в режиме мониторинга выбранных положительно заряженных ионов смеси фосфоновых кислот: 1 – МФК, 2 – диметилфосфорная кислота, 3 – ЭМФК, 4 – диметилтиофосфорная кислота 5 – этилметилтиофосфоновая кислота, 6 – иПрМФК, 7 – диэтилфосфорная кислота, 8 – диэтилтиофосфорная кислота. Элюент – 0.1 М ацетат аммония (рН 6.8) [90].

Главным недостатком использования ацетата аммония являлись низкие коэффициенты емкости гидрофильных алкилфосфоновых кислот. Добавление тетраалкиламмониевых солей привело к увеличению коэффициентов емкости соответствующих кислот. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании тетрабутиламмониевых солей.

Масс-спектры определяемых фосфорорганических кислот получали при помощи ионизации при термораспылении. Определение проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов. При использовании ацетата аммония в масс-спектре наблюдались интенсивные сигналы, соответствующие катионированным молекулам  $[M+NH_4]^+$ , которые использовали для детектирования. При использовании тетрабутиламмониевой соли в масс-спектре наблюдались сигналы, соответствующие двум аддуктным ионам  $[M+C]^+$  и  $[(A)(C)_2]^+$  (A - анион, C - катион), и чувствительность падала в 50 раз. Поэтому было решено использовать смесь ацетата аммония и тетрабутиламмониевой соли. Ацетат аммония добавляли постколоночно, а через колонку пропускали раствор тетрабутиламмониевой соли с концентрацией 0.1 мМ. При данной концентрации тетрабутиламмониевая соль сохранила свои ион-парные свойства, а в масс-спектре наиболее интенсивными были сигналы, соответствующие катионированным молекулам  $[M+NH_4]^+$ .

В дальнейшем по этой теме авторами была опубликована работа [91], в которой демонстрируется различие масс-спектров VХ, полученных в вариантах электронной ионизации, ионизации при термораспылении и химической ионизации с аммиаком в качестве газа-реагента. Было выяснено, что вид масс-спектров зависит от элюента. Так как ионизация при термораспылении является мягкой, то в масс-спектрах практически не наблюдалось сигналов, соответствующих фрагментным ионам. Было показано, что ионизация при термораспылении имеют низкую ценность для целей идентификации. Данные работы были направлены на скрининговое определение большого числа соединений, поэтому достигнутые пределы обнаружения МФК имели довольно высокие значения на уровне нескольких мкг в мл.

Tognes с соавторами [92] разработали способ идентификации МФК совместно с АМФК в водных объектах методом ВЭЖХ-МС/МС в варианте ионизации при термораспылении. Разделение проводили на колонке LC-18 DB Supelco (250×2.1 мм,

5 мкм) в изократическом режиме при скорости потока 1.2 мл/мин. Использовали подвижную фазу, состоящую из смеси 0.1 М ацетата аммония в воде и метанола в соотношении 70:30 по объему. Масс-спектры были получены в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Авторы изучали масс-спектры второго порядка МФК и АМФК и выбирали характеристичные ионы-продукты. Использование МС/МС детектирования позволило существенно увеличить отношение сигнал/шум и в результате предел обнаружения составил 100 нг/мл. Для достоверной идентификации при МС/МС детектировании выбирали несколько переходов и в качестве параметра идентификации использовали величину отношения интенсивностей этих переходов в масс-спектре.

Первыми масс-спектры электрораспылительной ионизации МФК как в режиме регистрации положительно, так и отрицательно заряженных ионов продемонстрировал Borrett V.T. с соавторами [93]. Для эфиров алкилметилфосфоновых кислот были получены информативные, легко интерпретируемые масс-спектры. Для метилфосфоновой кислоты в режиме сканирования положительно заряженных ионов наблюдался сложный, зависящий от ряда параметров масс-спектр с существенной долей аддуктных ионов молекулы метилфосфоновой кислоты с катионами металлов, кислот, метанола и ацетонитрила, присутствующими в подвижной фазе (Рис. 4). В режиме сканирования отрицательно заряженных ионов в масс-спектре преобладала депротонированная молекула метилфосфоновой кислоты.

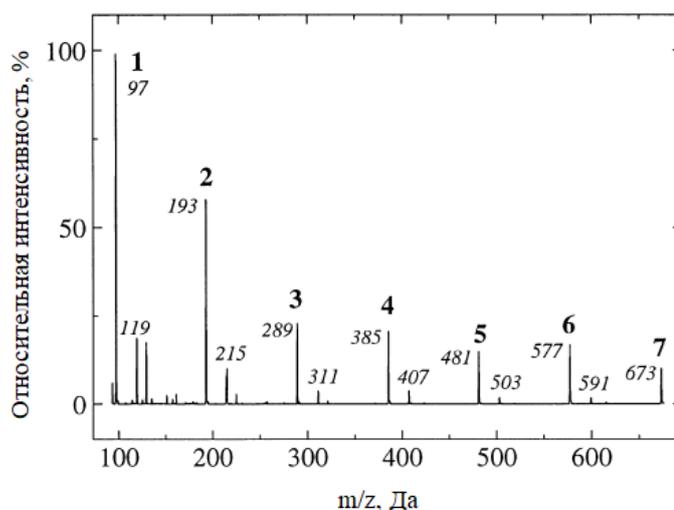


Рис. 4. Масс-спектр МФК в режиме сканирования положительно заряженных ионов [93].

Основополагающие работы [94, 95] по определению продуктов гидролиза фосфорорганических ОВ методом ВЭЖХ-МС с использованием электрораспылительной ионизации провели Robin M. Black и Robert W. Read.

В работе [94] метод ВЭЖХ-МС с электрораспылительной ионизацией применялся для скрининга 19 продуктов метаболизма различных ОВ. Разделение проводили на смешанной обращенно-фазовой колонке с привитыми группами C8/C18. В качестве подвижной фазы использовали смесь воды и ацетонитрила с добавкой 0.05% трифторуксусной кислоты. Применяли режим градиентного элюирования. Пределы обнаружения в водных растворах (в отсутствии влияния матрицы реальной пробы) в режиме сканирования положительно заряженных ионов находились в диапазоне от 50 до 100 нг/мл для алкилметилфосфоновых кислот и равнялись 400 нг/мл для метилфосфоновой и этилфосфоновой кислот.

В работе [95] авторы пытались добиться более низких пределов обнаружения и провели сравнение электрораспылительной ионизации с химической ионизацией при атмосферном давлении. Разделение проводили на колонке Nichrom RPВ column (Nichrom, Theale, UK, 250 мм × 2.1 мм, 5 мкм). В качестве подвижных фаз выступали смеси, состоящие из 0.1% муравьиной кислоты, 0.05 % трифторуксусной кислоты либо формиата аммония в воде (А) и в ацетонитриле и метаноле (Б). Добивались разделения смеси МФК и других АМФК. Наилучшую чувствительность определения наблюдали при использовании 0.1% муравьиной кислоты в воде и метаноле. Применяли режим градиентного элюирования: 0-5 мин. 5% Б, с 5-15 мин. 5-80% Б, 15-22 мин. 80% Б при скорости потока 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы – 5 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной и химической ионизации при атмосферном давлении в варианте регистрации положительно заряженных ионов. Определение проводили в режиме мониторинга выбранных ионов. Для МФК был выбран ион с  $m/z$  97, ЭФК –  $m/z$  111, ЭМФК –  $m/z$  125, ЭЭФК  $m/z$  139, ПрФК –  $m/z$  125, иПрМФК –  $m/z$  139, ЦГМФК –  $m/z$  179 и  $m/z$  181 для ПинМФК.

При использовании подвижной фазы, состоящей из 0.05% трифторуксусной кислоты в воде и ацетонитриле, электрораспылительная ионизация оказалась более предпочтительной, чем химическая ионизация при атмосферном давлении.

Наиболее значительное, десятикратное, увеличение чувствительности происходило при использовании 0.1% муравьиной кислоты в качестве добавки к подвижной фазе. В качестве второго компонента подвижной фазы, наилучшие результаты достигали при использовании метанола, так как практически не наблюдалось образование аддуктов, в отличие от ацетонитрила. При использовании 0.05 М формиата аммония детектировали отрицательно заряженные ионы. Но чувствительность оказалась хуже, чем в случае муравьиной кислоты.

В данном исследовании также проводили изучение фрагментации соответствующих алкилфосфоновых кислот. Была показана возможность их дальнейшего МС/МС определения при этом для всех водных стандартных растворов были достигнуты пределы обнаружения на уровне 50 нг/мл.

МФК совместно с АМФК определяли в пяти различных напитках методом ВЭЖХ-МС/МС [60]. Извлечение МФК и АМФК из анализируемых напитков проводили при помощи твердофазной экстракции. Для увеличения извлечения МФК и ЭМФК использовали два последовательно соединенных картриджа Strata-X с обращенно-фазовым сорбентом. Несмотря на это, степени извлечения из образцов воды, яблочного сока, лимонада и кока-колы были очень низки (16.4-31%), а из образцов молока извлечь МФК вовсе не удалось. Для других АМФК были достигнуты высокие степени извлечения из всех анализируемых образцов (более 80%). Хроматографическое разделение проводили на колонке Atlantis C18 (150 мм × 2.1 мм, 3.5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали 0.1% муравьиновую кислоту в воде (А) и 0.1% муравьиновую кислоту в ацетонитриле (Б). Скорость потока составила 0.2 мл/мин. Применяли режим градиентного элюирования для сокращения времени удерживания гидрофобных АМФК, МФК элюировали при 100% содержании фазы А. Несмотря на это, МФК имела время удерживания близкое к мертвому времени колонки. Авторы отмечают сильное влияние матричного эффекта на определение МФК и ЭМФК. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме мониторинга выбранных реакций. Для МФК был достигнут предел обнаружения, равный 10 нг/мл. Однако данное значение было получено для модельного раствора МФК в смеси ацетонитрил/метанол/вода (20/50/30, по объему).

Группа канадских исследователей под руководством D'Agostino широко применяла метод микро-колоночной высокоэффективной жидкостной

хроматографии – микроВЭЖХ с электрораспылительной ионизацией и масс-спектрометрическим детектированием для анализа водных проб с внесенными добавками фосфорорганических НПОВ и проб, содержащих продукты метаболизма фосфорорганических НПОВ [96, 97]. Микро-колоночное хроматографическое разделение осуществляли на колонке Zorbax размером 150 мм\*0.32 мм заполненной сорбентом SB-C18 с диаметром частиц 5 мкм. Объем вводимой пробы составлял 5 мкл. Использовали градиентное элюирование в системе вода-ацетонитрил с постоянным содержанием в подвижной фазе 0.1 % об. трифторуксусной кислоты и увеличением содержания ацетонитрила от 1 % до 70 % в течение 30 мин. Объемная скорость подачи подвижной фазы составляла 5 мкл/мин. Использование микро-колоночного варианта ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [96] позволило снизить пределы обнаружения продуктов трансформации фосфорорганических НПОВ в чистых водных растворах до 10-100 нг/мл и найти ряд новых неидентифицированных ранее метаболитов, так как при использовании колонок с внутренним диаметром на уровне десятых долей миллиметра размывание зоны определяемого соединения в колонке существенно уменьшается. Однако при анализе реальных водных проб емкости колонок диаметром меньше 2 мм было недостаточно для удовлетворительного разделения и устойчивого значения времени удерживания определяемых соединений. В образцах снега, загрязненных заринном в ходе уничтожения боеприпасов химического оружия, была обнаружена МФК [97].

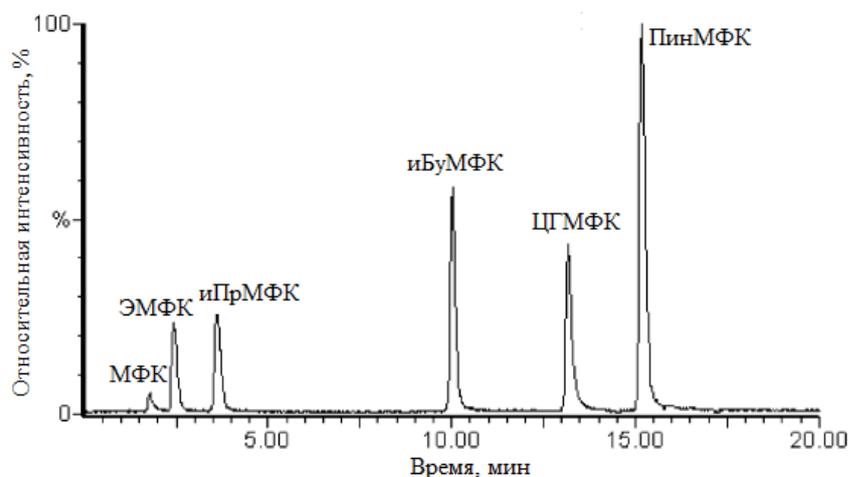
Creasy использовал метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием и химическую ионизацию при атмосферном давлении с постколоночной дериватизацией гидроксидом триметилфениламмония для увеличения чувствительности определения ряда производных ОВ, включая МФК и S-[2-(диизопропиламино)этил]метилфосфонотиовую кислоту, которые являются наименее токсичными продуктами гидролиза VX [98]. Данный реагент также использовали в работах [88, 99] при определении МФК методом ГХ-МС. Дериватирующий агент добавляли послеколоночно в подвижную фазу, реакция дериватизации проходила в источнике ионов. Разделение проводили на колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 мм × 2.1 мм), подвижная фаза состояла из 100% водного раствора ацетата аммония с концентрацией 0.001-0.05 М. Скорость потока подвижной фазы составляла 0.25 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование

проводили с помощью химической ионизации при атмосферном давлении в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Предложенная методика была применена к продуктам гидролиза VX, в частности метилфосфоновой кислоте. В масс-спектре МФК после проведения реакции наблюдалось 2 сигнала с  $m/z$  111 и 125, которые соответствовали производным МФК по одной и двум гидроксильным группам. Исследовали зависимость выхода реакции дериватизации от концентрации гидроксида триметилфениламмония. При малых концентрациях дериватизация происходила не полностью ( $<10^{-4}$  М), а при слишком высоких ( $>2 \times 10^{-3}$  М) сигналы с соответствующими значениями массы к заряду полностью исчезали. Также было установлено, что присутствие катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  ослабляет сигналы с  $m/z$  111 и 125. Разработанный способ имеет ряд преимуществ, однако у него существуют и значительные недостатки, такие как подавление ионизации, загрязнение источника ионов реагентом и высокий уровень фонового сигнала.

В работе [100] был разработан быстрый способ определения МФК и пяти алкилметилфосфоновых кислот (иПрМФК, ПинМФК, циклогексил метилфосфоновая кислота (ЦГМФК), ЭМФК, иБуМФК) в образцах природных вод и почвах при помощи жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием.

Разделение проводили на колонке Zorbax C18 SB (150 мм  $\times$  2.1 мм, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из смеси 10 мМ формиата аммония в воде (А) и 10 мМ формиата аммония в метаноле (В). Для хорошего разделения было применено градиентное элюирование. Градиент был задан следующим образом: 0-2 мин. 100% А, 2-17 мин. 100 – 30% А, 17-20 мин. 30 % А. Скорость потока подвижной фазы составила 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы 5 мкл. В работе изучали зависимость сигнала депротонированных молекул определяемых соединений в масс-спектре от состава подвижной фазы и концентрации буферного раствора. Максимальную интенсивность сигналов всех определяемых кислот получали при концентрациях формиата аммония не превышающих значение 10 мМ. Концентрация 10 мМ была выбрана из соображений лучшей формы хроматографического пика. Снижение рН подвижной фазы от 6.4 до 4 приводило к ухудшению формы пиков. Объем вводимой пробы, равный 5 мкл, приводил к лучшему разрешению, по сравнению с большими

объемами. На рисунке 5 представлена хроматограмма, демонстрирующая разделение шести определяемых соединений.



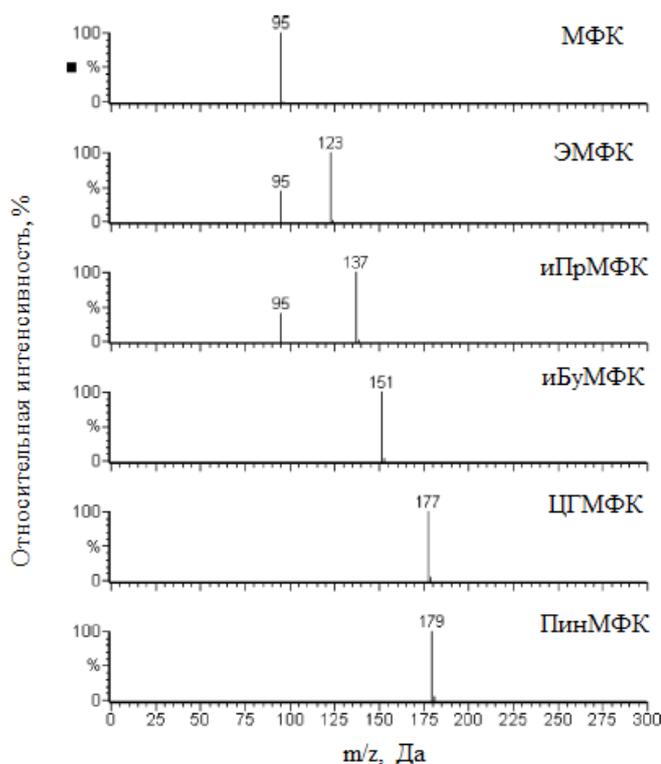
**Рис. 5.** Хроматограмма в режиме мониторинга выбранных ионов смеси 5 мкг/мл алкилметилфосфоновых кислот в воде [100].

Масс-спектрометрическое детектирование осуществляли при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации отрицательно заряженных ионов. Определение проводили в режиме мониторинга выбранных ионов. В режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, по сравнению с режимом положительно заряженных ионов, наблюдались лучшие пределы обнаружения, а также отношение сигнал/шум. Из-за отсутствия аддуктных ионов, режим регистрации отрицательно заряженных ионов был более предпочтительным. Изменение входного напряжения от 15 до 40 В, оказывало влияние на чувствительность. Оптимальная чувствительность была достигнута при значении напряжения 20 В. При этом значении наблюдалась максимальная интенсивность сигнала депротонированной молекулы  $[M-H]^-$ . Единственный фрагментный ион с  $m/z$  95 наблюдался только в спектрах ЭМФК и иПрМФК. Определение проводили по следующим выбранным ионам:  $m/z$  95 для МФК,  $m/z$  123 и  $m/z$  95 для ЭМФК,  $m/z$  137 и 95 для иПрМФК,  $m/z$  151 для иБуМФК,  $m/z$  177 для ЦГМФК,  $m/z$  179 для ПинМФК. Для МФК был достигнут достаточно высокий предел обнаружения, равный 1000 нг/мл, для АМФК 50-80 нг/мл. Также в работе проводили оценку точности, используя результаты 7 измерений каждого из 3 стандартных растворов. Концентрации стандартов соответствовали 3 уровням градуировочной зависимости: низкому – 1 мкг/мл, среднему 5 мкг/мл и высокому 10 мкг/мл. Точность измеряли

путем вычисления значения относительного стандартного отклонения. Для всех анализов относительное стандартное отклонение не превышало 8.8%.

Для получения дополнительной структурной информации проводили фрагментацию в источнике ионизации. Структурная информация была получена путем увеличения входного напряжения в диапазоне от 20-50 В. Чем больше напряжение, тем выше относительная интенсивность фрагментных ионов. При 40 В в спектре можно было получить информацию как о ионах-предшественниках, так и о фрагментных ионах. Все соединения давали одинаковые фрагментные ионы с  $m/z$  95 и 79, соответствующие структурам  $[\text{MeP}(\text{O})(\text{OH})_2\text{-H}]^-$  и  $[\text{P}(\text{O})_2\text{OH-H}]^-$ . Масс-спектры ионов-предшественников и фрагментных ионов представлены на рисунке 6.

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



**Рис. 6.** Масс-спектры в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов продуктов деградации фосфорорганических ОВ и их фрагментных ионов, полученные при входном напряжении равном 40 В [100].

Авторами работы [101] была предложена методика определения МФК, АМФК и алкилфосфоновых кислот при помощи ион-парной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В работе определяли следующие кислоты: МФК, ЭФК, ПФК, иПрМФК, иПрПФК, ПеМФК, ПинМФК и ГМФК.

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

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации. Определение проводили в режиме мониторинга выбранных отрицательно заряженных ионов. Обычно алкилфосфоновые и алкилалкилфосфоновые кислоты образуют интенсивные сигналы депротонированных молекул  $[M-H]^-$ . Неожиданно для авторов, им удалось зафиксировать молекулярные ион-радикалы при использовании трибутиламина в качестве ион-парного реагента. Авторы предполагают, что это связано либо с химическим восстановлением, вызванным особенностью подвижной фазы, либо с

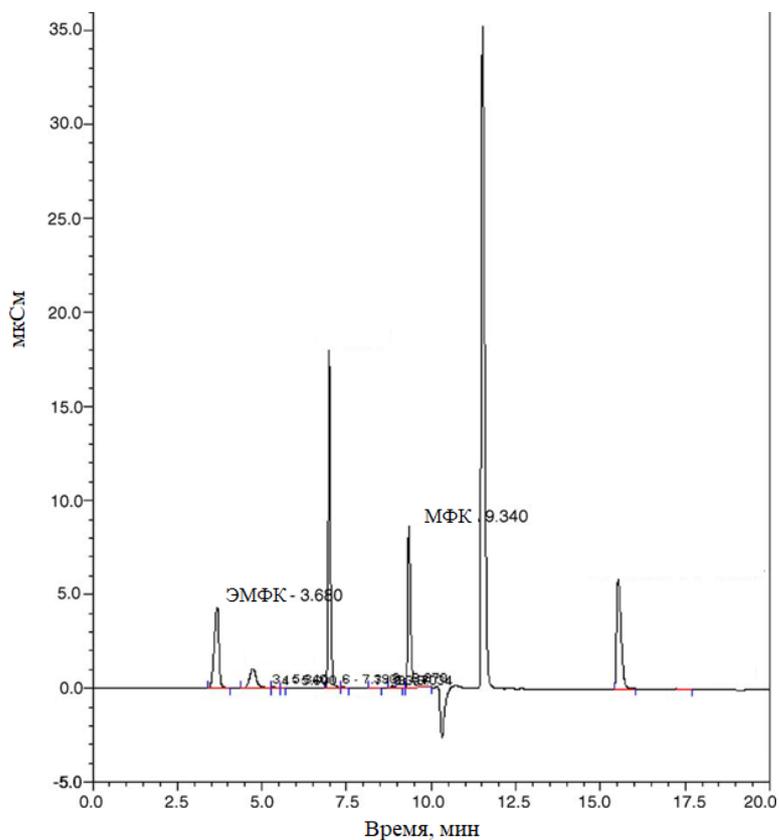
электрохимическим восстановлением, протекающим в игле источника ионизации. Переход протона возможен как из протонированного трибутиламина, так и из растворителей. Был применен подход, под названием Doehlert design, целью которого был подбор оптимальных условий, для увеличения интенсивности сигнала молекулярного ион-радикала фосфоновых кислот. В рамках этого подхода, подбирали оптимальные значения потока обдувающего газа, рН подвижной фазы и напряжения на игле. В результате были выбраны оптимальные значения этих параметров: поток обдувающего газа – 32 мл/мин, напряжение на игле – 6.2 кВ, рН подвижной фазы – 6.8. Метод был применен к анализу образцов почвы. Пределы обнаружения, достигнутые данным методом для АМФК – 0.5 мкг/мл и 10 мкг/мл для МФК и алкилфосфоновых кислот.

Так как МФК в водных объектах при нейтральном рН находится в виде аниона ( $pK_{a1}=2.12$ ,  $pK_{a2}=7.29$ ), то для ее хроматографического разделения и определения возможно применение анионообменной хроматографии и капиллярного электрофореза. В работе бразильских авторов проводили определение МФК, ЭФК, ПФК и БуФК при помощи ионной хроматографии с косвенным спектрофотометрическим детектированием [102]. В качестве внутреннего стандарта использовали фенилфосфовую кислоту (ФФК). В работе проводили сравнение 4 хромофорных анионов-элюентов: фталата, бензоата, фенилфосфоната и п-толуолсульфата. При использовании фталат-аниона в качестве элюента было достигнуто лучшее разделение и получен более широкий диапазон линейности градуировочного графика.

Разделение проводили на колонке IC-Pak Anion LC column (50 мм × 4.6 мм) с емкостью 30 мэкв/мл. Оптимальное значение концентрации фталата натрия составило 0.4 мМ (рН 8.5). Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Разделение было достигнуто за 13 минут с временами удерживания для: МФК – 8.6; ЭФК – 8.0; ПФК – 8.4; БуФК – 9.1 и 13.2 минуты для ФФК. Детектирование проводили при длине волны 272 нм. Для исследуемых веществ были получены следующие пределы обнаружения: для МФК – 400 нг/мл, для ЭФК – 200 нг/мл, ПФК – 450 нг/мл и БуФК – 1000 нг/мл.

В работе [103] МФК совместно с ЭМФК и 2-диизопропиламиноэтантолом (ДИАЭТ) определяли в сточных водах методом ионной хроматографии с

кондуктометрическим и амперометрическим детектированием. Кондуктометрическое детектирование использовали для определения МФК и ЭФМК, для ДИАЭТ использовали амперометрическое детектирование и дополнительную колонку. Для хроматографического разделения МФК и ЭФМК использовали анионообменную колонку IonPac AS 11 при температуре 30 °С и скорости потока 1 мл/мин. Подвижная фаза состояла из электрогенерируемого гидроксида калия. Для апробации способа использовали различные типы сточных вод, подвергшихся химическому и биологическому воздействию. Применение анионообменной хроматографии привело к значительному увеличению времени удерживания МФК (Рис. 7). Однако авторами работы было выяснено, что лишь 100 кратное разбавление позволяет максимально снизить влияние матричных компонентов и придать удерживание ЭФМК, которая без разбавления элюировалась с мертвым временем, по причине перегруза колонки, присутствующими в образце анионами солей. Таким образом, все присутствующие в системе неорганические и органические ионы могут влиять на детектирование и разделение. Для МФК был достигнут предел обнаружения равный 200 нг/мл.



**Рис. 7.** Хроматограмма биологически обработанной сточной воды (разбавленная в 100 раз) с добавками 1000 мкг/мл МФК и ЭФМК, полученная при помощи кондуктометрического детектора [103].

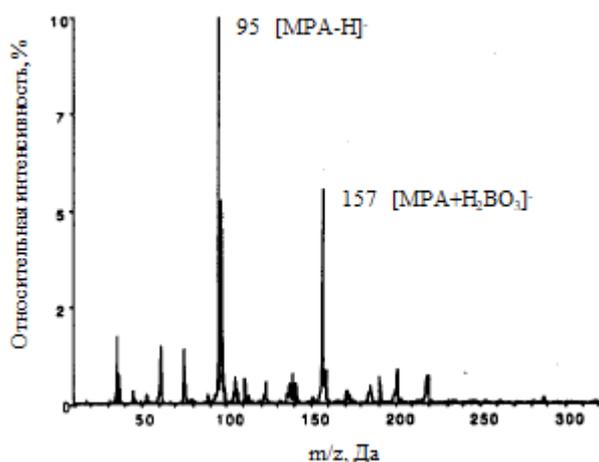
Влияние матричных компонентов при использовании кондуктометрического детектирования было хорошо продемонстрировано в работе [86], посвященной определению МФК и иПрМФК в экстрактах из почв при помощи ионной хроматографии. Авторам пришлось использовать последовательно две анионообменные колонки Serasep AN 300 и сложный элюент, состоящий из гидроксида и тетрабората натрия для достижения разделения анализируемых соединений с неорганическими анионами (фторид, хлорид, нитрат, сульфат, фосфат и карбонат) также присутствующими в образцах. Экстракцию МФК и иПрМФК из почв проводили водой и растворами со смесью карбоната и гидрокарбоната калия при различных значениях pH. Наилучшие результаты были получены при использовании смеси карбоната и гидрокарбоната калия при высоком значении pH, для иПрМФК было достигнуто практически 100% извлечение, в то время как МФК удалось извлечь всего на 60%. Предел обнаружения определяемых соединений составил 160 нг/мл, а полное разделение было достигнуто за 40 минут, что не приемлемо для современной ионной хроматографии.

Для определения МФК и ряда АМФК в образцах почвы также применяли метод ион-парной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии и кондуктометрическое детектирование с подавлением [104]. Для разделения применили сложную подвижную фазу, состоящую из смеси гидроксида тетрабутиламмония, карбоната натрия и ацетонитрила. Авторы исследовали влияние состава подвижной фазы и содержания ацетонитрила на разделение МФК и других АМФК. Экстрагирование МФК и других АМФК проводили водой, наиболее популярным способом экстрагирования МФК из почв. Однако метрологические характеристики процедуры экстрагирования и определения практически не были рассмотрены. Для МФК в водных растворах был достигнут предел обнаружения, равный 200 нг/мл.

В работе [105] МФК определяли методом капиллярного электрофореза (КЭ) с прямым спектрофотометрическим детектированием. МФК и другие АМФК не поглощают в УФ диапазоне, что делает невозможным их определение при помощи наиболее распространенного для КЭ - спектрофотометрического детектора. Проблема решалась путем перевода алкилфосфоновых кислот в комплекс с боратом натрия, который поглощает УФ излучение в диапазоне от 220 до 280 нм. Борат

натрия использовался также в качестве буферного раствора. Для подтверждения структуры комплекса применяли ИК спектроскопию, ЯМР и масс-спектрометрию (Рис.8). Для алкилфосфоновых кислот была достигнута высокая эффективность разделения от 229000 ТТ для МФК и 1740000 ТТ для ЭФК, что в среднем на порядок превышает значение эффективности при использовании косвенного УФ детектирования. Для водных растворов МФК были достигнуты пределы обнаружения на уровне 300 нг/мл.

Несмотря на полученный в предыдущей работе вывод о превосходстве прямого УФ детектирования над косвенным позднее была опубликована работа [106] по определению МФК и некоторых других АМФК при помощи капиллярного электрофореза и косвенного УФ детектирования (254 нм). Преимуществом работы, по-видимому, являлось только быстрое разделение, которое проходило за 5 минут, так как пределы обнаружения были на уровне всего нескольких мкг/мл. В качестве ведущего электролита использовали хромат-ион с добавками модификатора, обращающего электроосмотический поток. Для удаления мешающего влияния карбонат-ионов, элюирующихся вместе с МФК, образцы пропускали через картридж Milli-Trap H<sup>+</sup>. Образцы воды богатые хлоридами, пропускали через смолу с привитыми ионами Ag<sup>+</sup>. После данных стадий пробоподготовки удалось добиться полного удаления мешающего влияния матричных компонентов.



**Рис. 8.** Масс-спектр образующегося комплекса МФК с борат-ионами [105].

Позднее круг анализируемых АМФК и алкилфосфоновых кислот был расширен в работе [107], в которой проводилось одновременное определение девяти продуктов гидролиза фосфорорганических НПОВ, среди которых была МФК. Алкилфосфоновые кислоты и эфиры алкилфосфоновых кислот определяли методом

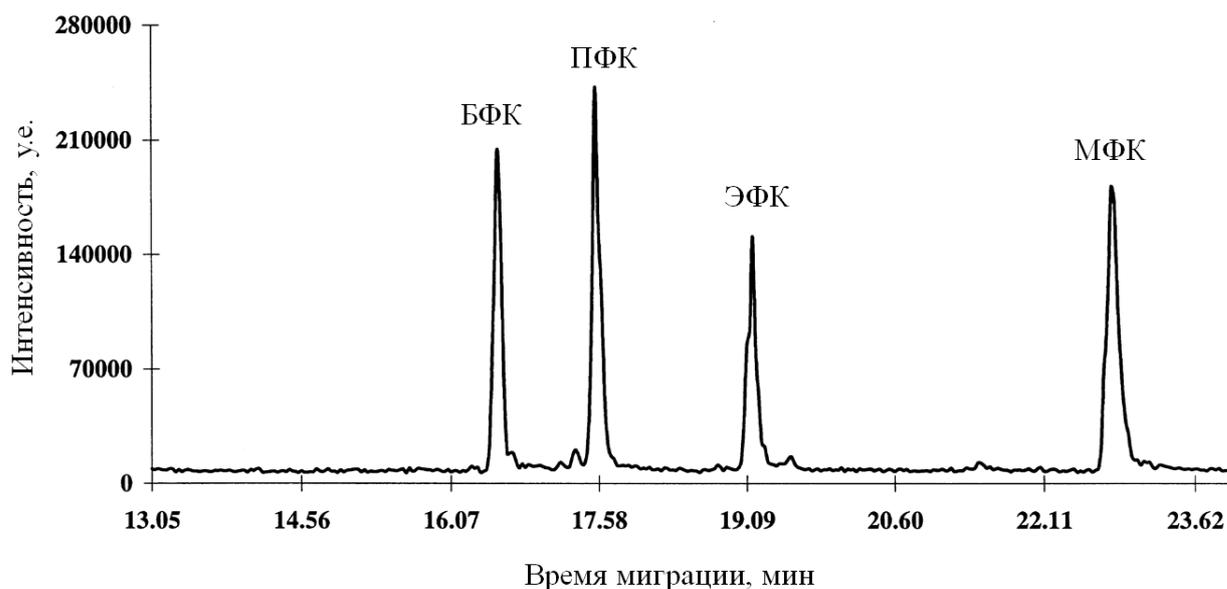
капиллярного зонного электрофореза и косвенного спектрофотометрического детектирования. Сорбат-анион был выбран в качестве хромофорного соединения из-за его высокого коэффициента молярного поглощения, а декаметонийбромид для снижения электроосмотического потока. При оптимальном составе электролита (5 mM сорбиновая кислота, 0.1 mM декаметоний бромид и pH 6) удалось добиться разделения определяемых соединений менее чем за 15 минут. Экстрагирование МФК и других кислот проводили при помощи добавки 4 мл дистиллированной воды в течение 5 раз, таким образом, конечный объем экстракта составил 20 мл. Градуировочный график в экстрактах из почв был линеен в диапазоне от 5-50 мкг/мл. Эксперименты по проверке процедуры не были приведены и планировались в качестве дальнейших исследований.

В следующей работе [108] задачей авторов было снижение времени, требуемого для одновременно определения алкилалкилфосфоновых кислот при помощи капиллярного зонного электрофореза с косвенным УФ детектированием. Для уменьшения времени анализа и увеличения эффективности, авторы обращали электроосмотический поток за счет промывки кварцевого капилляра 0.2% водным раствором полибрена. В работе были исследованы и подобраны значения напряжения на концах капилляра и температура капилляра. Для исследования отношения сигнал/шум и воспроизводимости электроосмотического потока в систему был добавлен гидроксилламин, увеличивающий емкость ведущего электролита. Электролит, состоящий из 5 mM сорбат-аниона (pH 6) и 1.6 mM гидроксилламина позволял провести анализ алкилфосфоновых кислот всего за 6 минут.

В работе [109] впервые определяли МФК и некоторые АМФК методом капиллярного зонного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием (КЗЭ-МС) и электрораспылительной ионизацией. В работе использовали 20 mM ацетат аммония (pH 9) в качестве буферного раствора из соображений его летучести, так как только летучие соединения могут быть использованы без загрязнения источника ионов. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. В масс-спектрах наблюдались интенсивные сигналы депротонированных молекул  $[M-H]^-$ , практически без фрагментации, а также сигналы, соответствующие димерам, тримерам, а в случае

МФК даже тетрамерам. Фрагментные ионы получали при помощи повышения входного напряжения. По мнению авторов, наличие димеров, тримеров и тетрамеров связано с довольно высокими концентрациями МФК и других АМФК. Данным методом удается достичь очень хорошего хроматографического разрешения МФК и алкилфосфоновых кислот, а также повысить достоверность определения за счет масс-спектрометрического детектирования. Детектирование проводили в режиме мониторинга выбранных ионов. Для МФК был выбран ион с  $m/z$  95, соответствующий депротонированной молекуле МФК. Градуировочный график был линеен в диапазоне от 5-100 мкг/мл. Авторы также указывают на превосходство электрораспылительной ионизации перед используемым ранее методом ионизации при термораспылении. Однако отмечают, что для применения данного способа к реальным образам воды, необходимо концентрирование, так как полученный предел обнаружения довольно высок, что связано с невозможностью введения больших объемов пробы в систему.

Позднее была опубликована работа [110] по определению МФК и широкого круга АМФК, алкилэтилфосфоновых кислот (АЭФК) и алкилфосфоновых кислот (АФК) методом КЗЭ-МС с электрораспылительной ионизацией. Применение сорбата аммония (рН 6.5) в качестве электролита и разбавление потока элюента пентанолом перед источником ионов позволило одновременно проводить как косвенное УФ, так и масс-спектрометрическое детектирование (Рис. 9).



**Рис. 9.** КЗЭ-МС хроматограмма смеси алкилфосфоновых кислот с концентрацией 5 мкг/мл (БФК – бутилфосфоновая кислота, ПФК – пропилфосфоновая кислота, ЭФК – этилфосфоновая кислота, МФК – метилфосфоновая кислота) [110].

Авторы подробно исследовали влияние рН электролита на разрешение пиков веществ и значение сигнал/шум при масс-спектрометрическом детектировании. Также исследовали влияние скорости потока пентанола, разбавляющего перед источником ионов ведущий электролит, на отношение сигнал/шум масс-спектрометрического отклика определяемых соединений. Масс-спектры получали в варианте регистрации отрицательно заряженных ионов. В масс-спектрах всех определяемых соединений наблюдались интенсивные сигналы, соответствующие депротонированным молекулам  $[M-H]^-$  и характеристичные ионы-продукты в режиме МС/МС. Авторы детально не исследовали предел обнаружения МФК и заявляют среднее значение для всех аналитов равное 100 нг/мл. Разработанный способ применяли к реальному образцу воды, полученному в рамках официального теста, проводимого лабораторией Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО). Осуществив масс-спектрометрические исследования фрагментации полученных пиков на электроферогамме, авторы идентифицировали этилгексилметилфосфовую и изопропилметилфосфовую кислоты. Результаты определения содержания найденных веществ были подтверждены в более поздней работе этих же авторов методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором и испарительным детектором по светорассеянию [111].

В следующей работе [112] капиллярный электрофорез с масс-спектрометрическим детектированием и ионной ловушкой применяли для определения алкилфосфовых и алкилалкилфосфовых кислот, среди которых была МФК. В качестве электролита использовали 15 мМ ацетат аммония (рН 8.8). Для улучшения ионизации веществ до источника ионов электролит разбавляли смесью метанол-вода-аммиак (75:25:2 по объему). Авторы также исследовали влияние рН электролита и оптимального соотношения разбавляющей смеси для достижения высоких значений сигнал/шум масс-спектрометрического отклика определяемых соединений. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, в масс-спектрах преобладали сигналы депротонированных молекул, а в масс-спектрах второго поколения характеристичные сигналы фрагментных ионов. Использование тандемной масс-спектрометрии привело к однозначному определению каждой изомерной алкилалкилфосфоновой кислоты, благодаря хорошему разделению. Разработанный

метод был применен к анализу экстрактов из почв и природных вод. Для МФК были получены довольно высокие пределы обнаружения в природной воде и почве - 100 мкг/мл и 110 мкг/мл.

Таким образом, для решения задачи определения МФК в природных водах и почвах в литературе применялось большое количество методов анализа, наиболее популярными из которых являются ГХ-МС (-МС), ВЭЖХ-МС (-МС), ИХ с УФ и кондуктометрическим детектированием, капиллярный электрофорез с УФ и МС детектированием. Для сравнения разработанных способов определения МФК по чувствительности, работы с наилучшими пределами обнаружения в водных объектах и почвах представлены в сводной таблице 1.

**Таблица 1.** Результаты определения МФК в образцах природных вод и почвах, полученные различными методами анализа

Метод анализа	Объект	Предел обнаружения, нг/мл - литературная ссылка
ГХ-МС	Вода	10 – [87]
ГХ-ПВД	Вода	9.4 – [88]
ГХ-МС	Почва	90 – [81]
ВЭЖХ-МС/МС	Вода	100- [92]
ВЭЖХ-МС/МС	Модельный водный раствор	50 – [95]
ВЭЖХ-МС/МС	Модельный водный раствор	10 – [60]
ВЭЖХ-ИП-МС	Почва	3000 – [100]
ИХ-КД	Вода	230 – [103]
ИХ-КД	Почва	160 – [86]
КЭ-прямое УФ	Вода	300 – [105]
КЭ-МС	Вода	100 – [110]

Согласно обобщенным литературным данным и сводной таблице 1 можно сделать вывод, что актуальная задача определения МФК в природных объектах, таких как вода и почвы, на следовом уровне содержаний (0.1 - 1 нг/мл) до сих пор не была решена. Для решения поставленной задачи требуется применение нестандартных подходов, позволяющих выйти за пределы, описанных в литературе.

## 1.2 Определение МФК в плазме крови людей и животных

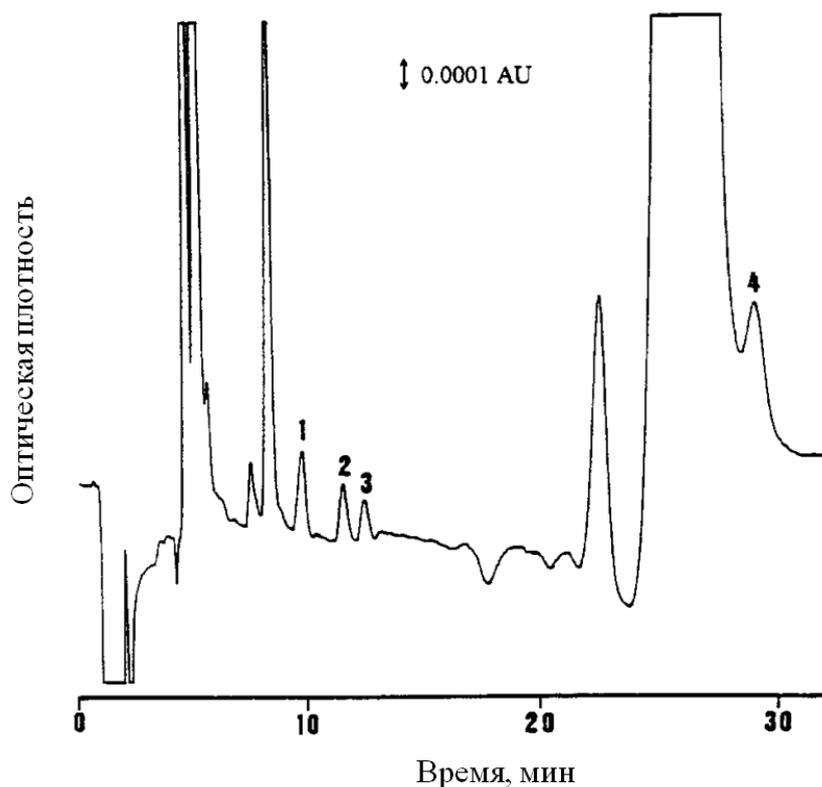
Кровь состоит из жидкой среды – плазмы и взвешенных в ней клеток и клеточных фрагментов: клеток лейкоцитов, постклеточных структур – эритроцитов, а также тромбоцитов [113]. Плазма крови является водным раствором питательных веществ, электролитов, белков, метаболитов, следовых элементов, витаминов и сигнальных веществ. Плазма состоит на 90-94% из воды и 6-10% сухого вещества, из которого 6-8% составляют белковые вещества и 2-4% другие минеральные и органические соединения.

Исходя из описанного выше состава плазмы крови видно, что данный объект является очень сложной и многокомпонентной матрицей. Плазма содержит как большое количество низкомолекулярных, так и высокомолекулярных соединений, таких как белки, которые в основном определяют способ пробоподготовки образцов, как правило, требующий осаждения и удаления белков, попадание, которых в хроматографическую систему недопустимо. Таким образом, определения МФК в плазме крови является очень сложной задачей, требующей применения подходящего метода анализа и способа пробоподготовки, позволяющего избежать влияния многочисленных матричных компонентов и удалять белки из анализируемого раствора.

Опубликовано небольшое количество работ, посвященных определению МФК в плазме крови. В работе [114] авторы определяли МФК в образцах плазмы крыс при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ) при длине волны 280 нм. Хроматографическое разделение проводили на обращенно-фазовой колонке  $\mu$ Bondapak C18 (300×3.9 мм, 10 мкм). В качестве подвижной фазы выступала смесь 1М раствора уксусной кислоты в воде (А) и ацетонитрила (Б). Подвижная фаза подавалась при скорости потока 0.9 мл/мин. Был применен градиентный режим подачи подвижной фазы. Градиент начинался с 1% ацетонитрила, дальнейшее увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе до 15% проходило в течение 5 минут и далее до 55% к 12 минуте. После этого содержание ацетонитрила быстро уменьшали до первоначального 1% и уравнивали в течение 2 минут. Образцы плазмы с добавками МФК подкисляли уксусной кислотой до pH 5.0 и пропускали через обращенно-фазовый картридж для твердофазной экстракции C18 Sep-Pak Vac 3cc (500 мг). Далее картридж промывали водой и десорбировали МФК

двумя порциями метанола. Полученный раствор упаривали в токе азота до 500 мкл и 10 мкл раствора вводили в хроматограф. Была достигнута высокая степень извлечения МФК равная 86.5%. Однако результаты вызывают сомнения, так как МФК является полярным соединением и на обращенно-фазовых сорбентах без применения дериватизации или ион-парных реагентов не удерживается. Был достигнут весьма высокий предел обнаружения 10 мкг/мл. Для апробации методики крысам вводили зарин внутримышечно. Лишь в некоторых из исследованных образцов плазмы были найдены следовые количества МФК, что свидетельствует о недостаточно низком пределе обнаружения разработанной методики.

Метод ИХ с косвенным фотометрическим детектированием применяли для определения МФК и некоторых других АМФК в сыворотке крови человека [115]. Хроматографическое разделение проводили на анионообменной колонке Shim-pack IC-A3 (150 × 4.6 мм, 5 мкм) подвижной фазой, состоящей из 0.5 мМ фталиевой кислоты, 0.1 мМ Трис и 5% ацетонитрила при скорости потока 1 мл/мин (Рис. 10).



**Рис. 10.** Хроматограмма концентрированной сыворотки крови, содержащей добавки МФК и АМФК с концентрацией 250 нг/мл (1-МФК, 2- ЭМФК, 3- иПрМФК, 4 – ПинМФК) [115].

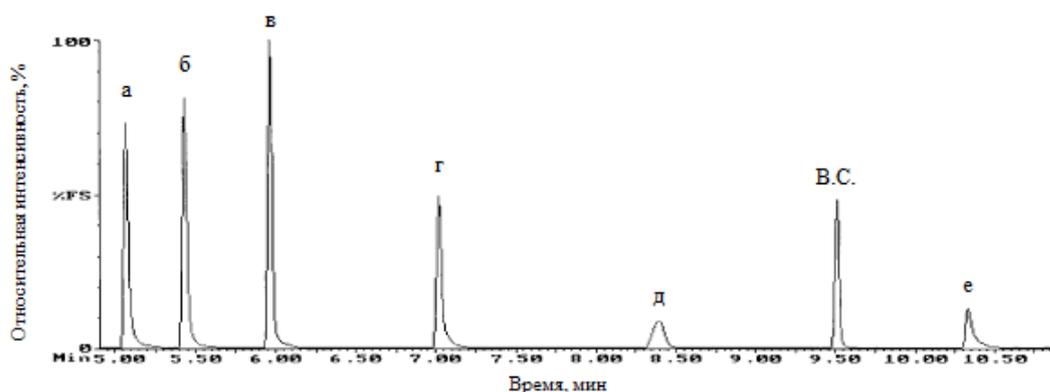
Для пробоподготовки образцов сыворотки крови сравнивали несколько способов экстракции. Первый включал в себя удаление белков при помощи микроультрафильтрации, фильтрат экстрагировали дихлорметаном и водный слой

пропускали через катионообменный картридж в форме  $\text{Ag}^+$  для удаления хлорид-ионов, элюат упаривали досуха в токе азота и остаток растворяли в деионизованной воде. Таким образом, достигался коэффициент концентрирования равный 10. Также применяли метод твердофазной экстракции с использованием трех различных картриджей и экстракцию ацетонитрилом. Первый описанный способ показал максимальную степень извлечения МФК из концентрированной сыворотки крови - 78.1%, а предел обнаружения с учетом концентрирования составил 40 нг/мл.

Газовая хроматография с применением дериватизации является одним из первых и наиболее описанных методов анализа МФК. Так в работе [116] МФК и некоторые другие АМФК определяли в образцах плазмы человека в виде производного с трет-бутилдиметилхлорсиланом (ТБДМС) при помощи метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. В работе использовали несколько способов извлечения МФК и АМФК из образцов плазмы. Сначала авторы пробовали провести дериватизацию напрямую в образцах плазмы без применения процедуры экстракции МФК и АМФК, однако степени извлечения не превышали 0.4%, что обусловлено мешающим влиянием матрицы. Первый способ экстракции заключался в добавке четырехкратного количества ацетонитрила к 1 мл плазмы, к полученному экстракту добавляли дериватирующий агент. Для того, чтобы оценить истинное значение степени извлечения, до стадии дериватизации, параллельно экстракты анализировали методом КЭ с косвенным УФ детектированием. Преимуществом КЭ является высокая эффективность разделения целевых компонентов и компонентов матрицы, при этом чувствительность метода невысока. Для МФК методом КЭ-УФ было получено низкое значение степени извлечения – 30%, АМФК извлекались с более высоким значением – выше 80%. Данный факт связан с различием свойств МФК и АМФК, так как МФК является более полярным соединением и во время осаждения белков не полностью от них отделяется. Степени извлечения, полученные методом ГХ-МС были еще ниже и составили 1.5 % для МФК и 26% для АМФК, что связано с низким выходом реакции дериватизации из-за неполного удаления мешающего влияния матричных компонентов. Во втором способе экстракции полученный ацетонитрильный экстракт плазмы концентрировали до объема 1 мл и пропускали через анионообменный картридж для твердофазной экстракции Bond Elute SAX.

Картридж промывали водой и метанолом, а МФК и АМФК десорбировали 5 мл 3% раствора аммиака в метаноле. Далее экстракт высушивали на ротационном испарителе и проводили реакцию трет-бутилдиметилсилилирования. Степени извлечения, полученные методом КЭ-УФ были немного меньше, чем в предыдущем способе и составили 20% для МФК и 70% для АМФК, что связано с возможными потерями при упаривании образца. Степени извлечения, полученные методом ГХ-МС для АМФК были значительно выше, чем в предыдущем способе экстракции – (выше 70%), однако степень извлечения МФК все равно была очень низкой – 7.5%. Результаты свидетельствуют о том, что применение твердофазной экстракции эффективно помогает удалить мешающее влияние матричных компонентов в случае АМФК и позволяет проводить их успешное определение. Однако в случае МФК органический растворитель недостаточно хорошо разрушает ее связи с осажденными белками и необходимо применение иного подхода для экстракции МФК. Третий способ был разработан непосредственно для МФК и заключался в осаждении белков при помощи добавки к 1 мл плазмы 0.5 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Полученный супернатант отделяли и дважды экстрагировали 4 мл диэтилового эфира, который отделяли от водного слоя. Водный слой подогревали для удаления оставшихся количеств диэтилового эфира. Далее водный слой пропускали через картридж для твердофазной экстракции, промывали водой, метанолом и 0.5% раствором аммиака в метаноле для удаления остатков трихлоруксусной кислоты. МФК десорбировали 4 мл 3% раствора аммиака в метаноле, упаривали на ротационном испарителе и проводили реакцию дериватизации. Данный способ не применим для АМФК, так как они успешно экстрагируются в диэтиловый эфир. МФК количественно экстрагировалась из плазмы, степень извлечения, полученная методом ГХ-МС составила 114%. В результате для МФК был получен предел обнаружения, равный 33 нг/мл. Однако примененная процедура пробоподготовки является очень трудоёмкой и включает в себя несколько стадий упаривания образца, жидкость-жидкостную и твердофазную экстракцию.

Более низкий предел обнаружения для МФК в плазме крови, равный 6 нг/мл, был достигнут также при помощи метода ГХ-МС [117]. Хроматографическое разделение МФК и АМФК занимало 11 минут (Рис. 11).



**Рис. 11.** Хроматограмма смеси МФК (в), АМФК (а-е) и внутреннего стандарта (В.С.) по выбранным ионам [117].

Для извлечения МФК и некоторых АМФК из образцов плазмы применяли метод твердофазной экстракции. Для этого изучали экстракцию водных растворов МФК и АМФК на 4 различных типах сорбентов:  $C_2$ , CN,  $C_{18}$  и SAX. Было обнаружено, что для экстрагирования АМФК лучше всего подходят картридж с обращенно-фазовым сорбентом  $C_{18}$  (степени извлечения  $>60\%$ ), однако степень извлечения МФК была очень низка –  $9\%$ . На картриджах  $C_2$  и CN удерживание как МФК, так и АМФК было слабым. Наилучшие результаты были достигнуты на анионообменном картридже SAX. Степени извлечения как МФК, так и АМФК превышали  $60\%$ . Далее экстрагирование МФК и АМФК с использованием данных типов картриджей проводили из образцов плазмы без осаждения белков. Степени извлечения существенно уменьшались, за счет мешающего влияния белков, таким образом, было решено до применения твердофазной экстракции проводить осаждение белков. В литературе было описано, что экстракции АМФК на анионообменных картриджах сильно мешает наличие хлорид ионов в образцах [85]. Так как в плазме содержится большое количество хлорид ионов (порядка  $100\text{ мМ}$ ) [118], то хлорид ионы было решено осаждать при помощи ацетата ртути, за счет очень слабой диссоциации образующегося хлорида ртути [119]. Также известно, что двухзарядные ионы металлов эффективно осаждают белки из плазмы. Таким образом, ацетат ртути выполнял функции осадителя хлорид ионов и белков плазмы. К  $1\text{ мл}$  плазмы с добавками МФК и АМФК добавляли  $2\text{ мл}$   $0.5\text{ мМ}$  ацетата ртути и после  $2\text{ минут}$  перемешивания и  $20\text{ минут}$  центрифугирования отбирали супернатант, который пропускали через анионообменный картридж. Десорбцию проводили  $5\text{ мл}$   $20\%$  раствора аммиака в метаноле. Полученный раствор упаривали на ротационном испарителе и проводили дериватизацию N,O-

бис(триметилсилил)трифторацетамидом, содержащим 5% триметилхлорсилана. Были получены довольно средние степени извлечения для МФК – 50% и АМФК – от 45-80%.

Таким образом, для определения МФК в образцах плазмы крови в литературе применяли методы ВЭЖХ-УФ, ИХ-с косвенным УФ детектированием и метод ГХ-МС с применением дериватизации. Результаты по определению МФК в образцах плазмы крови, описанные в литературе представлены в сводной таблице 2.

**Таблица 2.** Результаты определения МФК в образцах плазмы крови, полученные различными методами

Метод анализа	Объект	Предел обнаружения, нг/мл - литературная ссылка
ВЭЖХ-УФ	Плазма крови крыс	10000 –[114]
ИХ-УФ	Сыворотка крови	40 –[115]
ГХ-МС	Плазма крови человека	33 –[116]
ГХ-МС	Плазма крови человека	6 –[117]

Методами ВЭЖХ-УФ и ИХ с косвенным УФ детектированием были получены довольно высокие пределы обнаружения, не позволяющие решить задачу определения МФК в биологических объектах на уровне нескольких нг/мл. ГХ-МС является более чувствительным методом, однако требует применения очень сложной и длительной процедуры пробоподготовки, описанной выше.

Таким образом, из описанного выше видно, что задача определения МФК в образцах плазмы крови на низком уровне (1-10 нг/мл) не решена и требует разработки новых альтернативных подходов, позволяющих улучшить и упростить существующие.

### **1.3 Определение МФК в образцах мочи человека и животных**

Моча представляет из себя продукт жизнедеятельности животных и человека, который выделяется почками. Вместе с мочой из организма выводится вода и растворимые вещества. Моча имеет слабокислое значение рН, приблизительно 5.8, однако величина рН зависит от обмена веществ и может находиться в диапазоне рН от 4.8 до 7.5 [113].

Моча на 95% состоит из воды, остальные 5% можно разделить на органические и неорганические составляющие. Основную часть органической фракции мочи

составляют азотистые вещества, которые являются конечными продуктами азотистого обмена. В моче могут присутствовать продукты метаболической трансформации многих ксенобиотиков. Содержание белка в норме не должно превышать значения 0.12 г/л мочи [113].

Нервнопаралитические ОВ поступив в организм человека, подвергаются ферментативному гидролизу с образованием АМФК которые в итоге превращаются в МФК.

Задача определения МФК в моче является очень сложной, требует применения подходящих способов пробоподготовки и методов анализа, позволяющих устранять либо максимально нивелировать мешающее влияние матричных компонентов.

В работе [114] авторы определяли МФК в образцах мочи крыс при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ) при длине волны 280 нм. Разделение проводили на обращенно-фазовой колонке  $\mu$ Bondapak C18 125 A° (300×3.9 мм, 10 мкм). В качестве подвижной фазы выступала смесь 1M раствора уксусной кислоты в воде (А) и ацетонитрила (Б). Подвижная фаза подавалась при скорости потока 0.9 мл/мин. Был применен градиентный режим подачи подвижной фазы. Градиент начинался с 1% ацетонитрила, дальнейшее увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе до 15% проходило в течение 5 минут и далее до 55% к 12 минуте. После этого содержание ацетонитрила быстро уменьшали до первоначального 1% и уравнивали в течение 2 минут. Образцы мочи с добавками МФК (1 мл) подкисляли уксусной кислотой до pH 5.0 и пропускали через обращенно-фазовый картридж для твердофазной экстракции C18 Sep-Pak Vac 3cc (500 мг). Далее картридж промывали водой и десорбировали МФК двумя порциями метанола. Полученный раствор упаривали в токе азота до 500 мкл и вводили 10 мкл раствора в хроматограф. Была достигнута высокая степень извлечения МФК, равная в среднем 75% и весьма высокий предел обнаружения, равный 10 мкг/мл с учетом концентрирования. Для апробации методики крысам вводили зарин внутримышечно. Лишь в некоторых образцах плазмы были найдены следовые количества МФК, что свидетельствует о недостаточно низком пределе обнаружения разработанной методики.

В работе [116] МФК и некоторые АМФК определяли в образцах мочи человека в виде трет-бутилдиметилсилильных (ТБДМС) производных методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Для извлечения МФК 0.5 мл мочи с добавками МФК и некоторых других АМФК пропускали через анионообменный картридж, который предварительно промывали и активировали метанолом, водой и фторидом натрия. После пропускания образцов мочи, картридж промывали водой и метанолом. Десорбцию МФК и АМФК проводили при помощи 5 мл 3% раствора аммиака в метаноле. Поэтому требовалось последующее концентрирование и упаривание образцов досуха, которое проводили на ротационном испарителе. Полученный остаток растворяли в 50 мкл реагента, 50 мкл ацетонитрила и проводили реакцию дериватизации в течение часа при 60 °С. Таким образом, авторы осуществляли пятикратное концентрирование МФК в образцах мочи. Для МФК было достигнуто высокое значение степени извлечения, близкое к количественному – 96.8%. Однако авторы отмечают, что в образцах мочи человека присутствуют большие количества сульфат- и фосфат-ионов, которые также подвергаются дериватизации выбранным реагентом. Производное МФК детектировали по иону с  $m/z$  267, а трет-бутилдиметилсилильное производное сульфат-иона имеет интенсивный сигнал с  $m/z$  269. Проблема состояла в том, что помимо ионов с близким  $m/z$ , трет-бутилдиметилсилильное производное МФК и сульфат-иона имели близкие времена удерживания, в связи с чем, сигнал производного МФК в масс-спектре подавлялся сигналом производного сульфат-иона, перекрывающим часть хроматографической зоны МФК, что привело к ухудшению предела обнаружения МФК в моче, который составил 700 нг/мл.

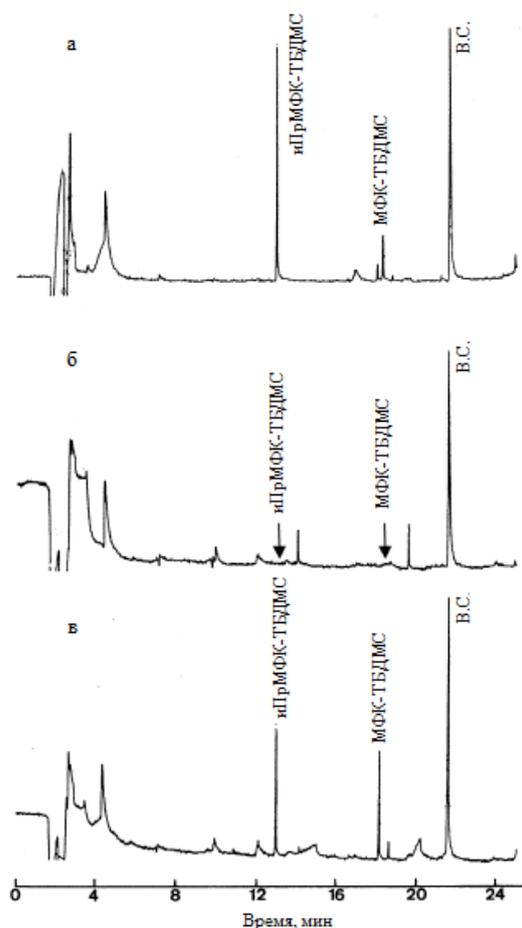
Исходя из описанного выше видно, что несмотря на высокую степень извлечения, не удастся добиться хорошего разделения с матричными компонентами мочи.

Более низкие пределы обнаружения для МФК в образцах мочи были достигнуты с применением метода ГХ-ПВД [120]. Авторы отбирали 20 образцов мочи сотрудников университета в возрастном диапазоне от 22 до 50 лет. Полученные образцы перемешивали между собой в целях их усреднения по составу матричных компонентов. Образцы мочи с добавками МФК и АМФК (500 мкл) пропускали через колонку, заполненную катионообменной смолой Dowex,

состоящей из сополимера стирола и дивинилбензола с сульфокислотными функциональными группами. Колонку со смолой последовательно заполняли слоями ионов бария ( $Ba^{2+}$ , при помощи 0.1 М  $BaCl_2$ ) и серебра ( $Ag^+$ , при помощи  $AgNO_3$ ) для сорбции хлорид- и сульфат- ионов, а также пигментов, окрашивающих мочу. После пропускания мочи через колонку элюат доводили до pH 3.85 при помощи буферного раствора, состоящего из гидроксида натрия и хлорацетата натрия перед лиофильной сушкой с помощью системы SpeedVac. Остаток дериватизировали при помощи 200 мкл смеси бис-(триметилсилил)трифторацетамида и триметилхлорсилана в соотношении 10:1 по объему в течение 1 часа при температуре 60 °С. После этого 1 мкл полученного раствора вводили в газовый хроматограф. Авторы исследовали влияние pH на реакцию дериватизации и подбирали оптимальное соотношение реагентов. Также исследовали влияние мочевины и глюкозы в модельных смесях на реакцию дериватизации и устанавливали их пороговые концентрации. Степень извлечения МФК из образцов мочи лежала в диапазоне от 94 до 98%. Градуировочные зависимости для МФК в моче и стандартном растворе практически не отличались, что в купе с высокой степенью извлечения свидетельствовало о эффективности предложенного способа пробоподготовки. Предел обнаружения МФК в моче составил 60 нг/мл. Разработанный способ применяли к образцам мочи двух пациентов, подвергшихся воздействию зарина. Данные по выведению МФК не были представлены, однако авторы утверждали, что максимум выведения лежал в диапазоне 10 - 18 часов после применения зарина.

В работе [121] авторы изучали мочу человека, зараженного заринном во время террористической атаки в городе Матсумото. МФК и иПрМФК также определяли методом ГХ-ПИД. Мочу пациента, сравнивали с мочой здорового человека и образцами воды из пруда, подвергшегося воздействию зарина (Рис. 12). Мочу здорового человека анализировали для исключения ложноположительных результатов, а воду из пруда, для сравнения времен удерживания метаболитов с аналогичными в моче. Для извлечения МФК и иПрМФК из образцов мочи применяли очень сложную процедуру пробоподготовки. Два миллилитра мочи разбавляли 2 мл воды и пропускали через картридж с обращенно-фазовым сорбентом C18 и короткую колонку, заполненную катионообменной смолой Dowex

для удаления гидрофобных матричных компонентов и ионов металлов. Полученный элюат концентрировали до 0.5 мл на ротационном испарителе при 40 °С. Далее раствор переносили в колбу на 25 мл, промывали колбу для упаривания небольшим объемом тетрагидрофурана и объединяли растворы. После этого полученный раствор снова упаривали в токе азота досуха. Остаток растворяли в 1 мл тетрагидрофурана, к которому добавляли 20 мкл пиридина и 100 мкл метил-третбутилтрифторацетамида (МТБТФА). Смесь нагревали до 90 °С в течение 45 минут. После этого к раствору добавляли 10 мл 5% NaCl и 1 мл гексана с внутренним стандартом и встряхивали смесь в течение 1 минуты. Слой гексана обезвоживали безводным сульфатом натрия и вводили выбранную аликвоту в газовый хроматограф.



**Рис. 12.** ГХ хроматограммы производных МФК и иПрМФК в моче жертвы заражения заринном (а), в моче здорового человека (б) и в моче здорового человека, разбавленной водой из пруда, загрязненного заринном (в) [121].

Для МФК в моче был достигнут низкий предел обнаружения равный 10 нг/мл. МФК обнаружили в образцах мочи пациента на 1 и 3 день в концентрациях 140 и 20

нг/мл, соответственно. Авторы, исходя из допущения что весь зарин вывелся через мочу в течение недели, и приняв во внимание найденные концентрации МФК и иПрМФК предположили, что потерпевший выжил чудом, получив дозу зарина равную 0.05 мг/кг, превышающую летальную дозу внутривенного введения зарина (0.03 мг/кг) и составляющую половину летальной дозы перорального введения зарина (0.14 мг/кг) [122].

Авторами работы [123] был разработан способ определения МФК и АМФК на низких уровнях в моче и слюне при помощи метода ВЭЖХ-МС/МС. Целью данной работы было показать возможность определения МФК и АМФК в моче и слюне напрямую, с минимальной пробоподготовкой, без применения реакции дериватизации.

Пробоподготовка слюны включала в себя подкисление образцов несколькими каплями муравьиной кислоты, центрифугирование при 2000 оборотах в течение 10 минут для осаждения белков и пропускание через мембранный фильтр. В хроматограф вводили 100 мкл пробы. Пробоподготовку мочи проводили двумя способами. Первый способ ничем не отличался от пробоподготовки слюны. Вторым способом заключался в добавке к 5 мл подкисленной мочи 2 мл ацетонитрила. После этого вещества высаливали добавлением NaCl и центрифугировали для отделения белков. Затем отбирали ацетонитрильный слой для анализа.

Разделение проводили на колонке HIRB-150AM (150 мм × 2.1 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы выступала смесь 0.1% уксусной кислоты в воде (А) и 0.1% уксусной кислоты в метаноле (Б). Было применено градиентное элюирование для уменьшения времени удерживания кислот с длинным углеводородным радикалом. Градиентное элюирование было задано следующим образом: 0-5 мин 2% Б, 5-15 мин 2-95% Б, 15-20 мин 95% Б, 20-20.1 95-2% Б, 20.1-30 мин 2% Б. Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в варианте регистрации положительно заряженных ионов. Определение проводили в режиме мониторинга выбранных реакций. Степени извлечения в слюне для МФК и алкилфосфоновых кислот лежали в диапазоне от 95 до 211%. Для мочи в случае подкисленных алкилфосфоновых кислот степень извлечения лежала в диапазоне от 55% для МФК и до 155% для остальных АМФК. В случае экстракции ацетонитрилом не удалось добиться

улучшения степени извлечения для МФК и ЭМФК, наоборот наблюдалось ее уменьшение. Степень извлечения возросла только в случае ПинМФК. Низкие степени извлечения МФК из мочи легко объясняются, если принять во внимание, что МФК имела время удерживание равное мертвому времени, что связано с ее высокой полярностью. Таким образом, большое количество полярных матричных компонентов мочи, также элюирующихся с мертвым временем колонки подавляли ионизацию МФК в источнике ионов масс-спектрометра. Для МФК с учетом низкой степени извлечения был достигнут предел обнаружения равный 91 нг/мл.

Как видно из обзора литературных данных, для определения МФК в моче использовали методы ГХ-МС, ГХ-ПВД, ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Однако метод газовой хроматографии преобладал. Результаты по определению МФК в образцах мочи, описанные в литературе, представлены в сводной таблице 3.

**Таблица 3.** Результаты определения МФК в образцах мочи, полученные различными методами

Метод анализа	Объект	Предел обнаружения, нг/мл – литературная ссылка
ВЭЖХ-УФ	Моча крыс	10000-[114]
ГХ-МС	Моча человека	700 – [116]
ВЭЖХ-МС/МС	Моча человека	91 – [123]
ГХ-ПВД	Моча человека	60 – [120]
ГХ-ПВД	Моча человека	10 – [121]

Исходя из таблицы 3 видно, что наилучшие результаты по определению МФК в моче были достигнуты с помощью метода газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Однако большим недостатком данных работ является очень длительная и сложная процедура пробоподготовки [121], а также дополнительная необходимость проведения реакции дериватизации, которая занимала в среднем 1 час. Описанные ВЭЖХ подходы быстрые, однако достигнутые коэффициенты емкости МФК очень низкие, в следствие чего на детектирование МФК оказывают влияние матричные компоненты, что приводит к недостаточно низким пределам обнаружения. Таким образом, видно, что для МФК до сих пор не решена задача ее экспрессного и высокочувствительного определения в образцах мочи на уровне нескольких нг в мл.

## ГЛАВА 2. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

### 2.1 Оборудование и материалы

В работе использовали следующее аналитическое оборудование:

- ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из гибридного tandemного 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 tandemного 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)
- Разработанная анионообменная колонка на основе сополимера стирола и дивинилбензола с ковалентно-пришитыми четвертично-аммониевыми группами (50 × 4 мм), диаметр зерна сорбента 5.5 мкм, степень сшивки 50%, площадь поверхности 670 м<sup>2</sup>/г, средний размер пор 10 нм.
- Разработанная анионообменная колонка на основе сополимера стирола и дивинилбензола с ковалентно-пришитыми четвертично-аммонийными группами (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.

Также в работе использовали следующее оборудование для пробоподготовки и проведения реакции дериватизации:

- Для проведения реакции дериватизации использовали термостат Thermo Block TDB-120 (Biosan, Латвия).
- Для перемешивания растворов и более полного растворения применяли ультразвуковую ванну «Branson 2210 E-DTC» (Bransonic», США).
- Взвешивание точных навесок проводили на весах Explorer Pro (Ohaus Corporation, США).
- Для центрифугирования образцов использовали центрифугу CM-50 (Elmi, Латвия).
- Для упаривания растворов использовали ротационный испаритель с автоматизированной вакуумной станцией (Buchi, Швейцария).
- Для измерения pH использовали ионметр «SartoriusPB-11» (Sartorius, Германия).
- Для отбора точной аликвоты использовали автоматические дозаторы 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более  $\pm 5\%$  (LABMATE, Польша) и наконечники необходимых объемов.

В работе использовали следующие растворы и реагенты:

МФК с чистотой > 98% (Sigma Aldrich, США), ПБФБ с чистотой > 98% (Sigma Aldrich, США), п-метоксифенацилбромид (ПМФБ) с чистотой > 98% (Sigma Aldrich, США), 18-краун-6 с чистотой > 98% (Sigma Aldrich, США), карбонат калия и гидрокарбонат натрия с чистотой > 99% (Merck, Германия), хлорная кислота 60% (Panreac, Испания), хлороводородная кислота 37% (Panreac, Испания), ледяная уксусная кислота (Panreac, Испания), 1,4-диоксан > 99% (Sigma Aldrich, США), ацетонитрил (Panreac, HPLC grade, Испания), кислота муравьиная с чистотой > 98% (Panreac, Испания), ацетат и формиат аммония с чистотой >98% (Roth, Германия), трифторуксусная кислота (Fluka, США), деионизованная вода (после очистки системой Milli-Q (Millipore, США)). Рабочие растворы и другие необходимые растворы готовили растворением точных навесок в соответствующих растворителях в день проведения анализа.

## 2.2 Схема экспериментов по экспрессному определению МФК в водных объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

*Приготовление исходных растворов МФК.* Исходный раствор МФК (1 мг/мл) был приготовлен растворением 10 мг МФК в 10 мл ацетонитрила. Раствор хранили при -20 °С. Дальнейшие разбавления исходного раствора МФК осуществляли при помощи деионизованной воды в день эксперимента. Для определения предела обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и построения градуировочной зависимости готовили водные растворы МФК с концентрацией 2, 6, 10, 20, 50, 100, 200, 500 нг/мл. Для определения матричного эффекта в образцы реальных водных объектов вносили МФК до концентраций 20 и 200 нг/мл.

*Образцы вод.* Для изучения влияния матричного эффекта использовали 3 различных типа воды: колодезную, речную и водопроводную, некоторые характеристики которых представлены в таблице 4.

*Пробоподготовка.* Исследуемые образцы вод фильтровали через мембранный пористый фильтр для устранения механических примесей. Вносили МФК, используя ее концентрированный раствор. Полученные растворы центрифугировали 2 мин при 16000 об./мин и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

*Условия ВЭЖХ-МС/МС определения.* В работе использовали ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200. Разделение проводили на колонке Acclaim RSLC C18 120 Å (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 0.1% муравьиная кислота в воде и (Б) ацетонитрил. Разделение проводили в изократическом режиме при отношении растворителей А : Б - 99:1 (по объему) и скорости потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Объем вводимой пробы составил 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили с использованием электрораспылительной ионизации, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов при следующих параметрах: температура переходного капилляра 350°С, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для

распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi. Для детектирования использовали режим мониторинга выбранных реакций:  $m/z$  95→79 (определение),  $m/z$  95→63 (качественное подтверждение). Максимальную интенсивность сигнала с  $m/z$  95, соответствующего иону-предшественнику, достигали при потенциале декластеризации -34 В. Максимальную интенсивность сигналов с  $m/z$  79 и 63, соответствующих ионам-продуктам, достигали при энергиях соударения -20 и -55 В, соответственно. Время регистрации каждой выбранных реакций составило 30 мс.

**Таблица 4.** Химический состав различных образцов воды

Параметр	Колодезная вода	Речная вода	Водопроводная
Цветность в градусах	9	15	2
Мутность, ЕМФ, мг/л	2	9	0
Водородный показатель (рН)	7.00	7.47	7.34
Общая жесткость, мг/л /мг.-экв/л	/4.6	/5.0	/6.0
Хлориды (Cl), мг/л	3.1	40.0	9.2
Сульфаты, мг/л	7.2	11.6	13.0
Марганец, мг/л	0.009	0.005	0.002
Фториды, мг/л	1.3	0.4	0.6
Железо общ., мг/л	0.08	0.03	0.01
Медь, мкг/л	40	≥10	≥10
Окисляемость перманганатная, мгО <sub>2</sub> /л	0.4	4.8	1.3
Нитраты, мг/л	3.1	28.6	12.0

### 2.3 Схема экспериментов по определению МФК в виде производного с ПБФБ в водных объектах методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

*Приготовление исходных растворов.* Исходный раствор МФК (1 мг/мл) получали растворением 10 мг МФК в 10 мл ацетонитрила и хранили при -20 °С. Исходный раствор ПБФБ (10 мг/мл) получали растворением 100 мг ПБФБ в 10 мл

ацетонитрила и хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Растворы 18-краун-6 и карбоната калия с концентрацией 20 мг/мл получали растворением 200 мг 18-краун-6 и 200 мг карбоната калия в 10 мл ацетонитрила и воды, соответственно. Эти растворы также хранили при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Для установления предела обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и построения градуировочной зависимости исходный раствор МФК разбавляли до концентраций 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 и 60 нг/мл водой, полученные растворы упаривали, добавляли ацетонитрил до объема 1 мл и проводили реакцию дериватизации. Для оценки прецизионности и внутрилабораторной прецизионности (ВЛП) готовили растворы МФК с концентрациями 0.3 и 6 нг/мл. Для расчета коэффициента концентрирования при упаривании готовили растворы МФК с концентрацией 0.4 и 6 нг/мл.

*Образцы вод.* Для изучения влияния матричного эффекта использовали 3 различных типа воды: колодезную, речную и водопроводную, некоторые характеристики которых представлены в таблице 4. Для апробации разработанного способа исследовали образцы воды, полученные в ходе ежегодного тестирования, проводимого лабораторией ОЗХО.

*Пробоподготовка.* В образцы анализируемых водных объектов вносили растворы МФК в нужной концентрации. Образцы воды ОЗХО и образцы воды с добавками МФК фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм для устранения механических примесей. Полученные образцы упаривали в ротационном испарителе до объема менее 100 мкл. Доводили до объема 1 мл ацетонитрилом. Колбу с раствором помещали в ультразвуковую ванну на 5 минут. Раствор переносили в полипропиленовые пробирки на 1.5 мл и проводили реакцию дериватизации ПБФБ.

*Дериватизация.* К 1 мл раствора добавляли 20 мкл раствора 18-краун-6 (20 мг/мл), 20 мкл раствора  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (20 мг/мл) и 100 мкл раствора ПБФБ (10 мг/мл). Раствор встряхивали и помещали в термостат. Реакцию проводили при  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут.

*Условия ВЭЖХ-МС/МС определения.* В работе использовали ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200. Хроматографическое

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

**Таблица 5.** Программа градиентного элюирования в режиме гидрофильной хроматографии

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

Масс-спектрометрическое детектирование проводили с использованием электрораспылительной ионизации, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов при следующих параметрах: температура переходного капилляра 350°C, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi. Для детектирования использовали следующие выбранные реакции:  $m/z$  293→265 (определение),  $m/z$  291→263,  $m/z$  293→215,  $m/z$  291→213 (качественное подтверждение). Максимальную интенсивность сигналов с  $m/z$  293 и 291 достигали при потенциале декластеризации -41 В. Максимальную интенсивность сигналов с  $m/z$  265, 263, 215 и 213 достигали при энергиях соударения -22, -22, -25, -25 В, соответственно. Время регистрации каждой выбранной реакции составило 30 мс.

#### **2.4 Схема экспериментов по определению МФК в виде производного с ПБФБ и АМФК в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием**

*Приготовление растворов для анализа.* Исходные растворы МФК, ПБФБ, 18-краун-6 и карбоната калия готовили согласно пункту 2.3. Исходные растворы АМФК готовили при помощи растворения 10 мг соответствующей кислоты в 10 мл ацетонитрила и хранили при -20 °С. Для определения предела обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и построения градуировочной зависимости исходный раствор МФК добавляли к холостым образцам грунто-пылевых смесей и проводили экстрагирование 10 мл воды. Концентрации МФК в

экстракте составили 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 40 и 60 нг/мл. Для остальных кислот аналогично готовили растворы в диапазоне от 0.06-50 нг/мл для ЭМФК и 0.005-50 нг/мл для иПрМФК, иБуМФК и ПинМФК, соответственно. Для оценки степени извлечения МФК и ЭМФК из образцов грунто-пылевых смесей, коэффициента концентрирования при упаривании и матричного эффекта готовили растворы МФК и ЭМФК с концентрациями 1 и 10 нг/мл. Для остальных кислот аналогично готовили растворы с концентрациями 0.04 и 10 нг/мл. Для оценки прецизионности и ВЛП готовили растворы МФК и ЭМФК с концентрациями 1 и 10 нг/мл, для остальных кислот с концентрациями 0.04 и 10 нг/мл.

*Образцы грунто-пылевых смесей.* Были собраны два вида образцов, которые представляли из себя смесь грунта, пыли, почвы и элементов конструкции заброшенного здания. Первый тип образцов представлял из себя образцы грунто-пылевых смесей, собранных на удалении от бывшего завода по производству химического оружия, расположенного в Волгограде, заведомо не содержащих МФК и не подвергавшихся воздействию химического оружия (холостые пробы). Второй тип образцов представлял из себя грунто-пылевые смеси, собранные непосредственно с территории бывшего завода по производству химического оружия. Первый тип образцов использовали для разработки способа определения МФК, а второй для апробации соответствующего способа.

*Пробоподготовка.* Образцы грунто-пылевых смесей измельчали в фарфоровой ступке. К холостым пробам грунто-пылевых смесей добавляли небольшие порции концентрированных растворов МФК, встряхивали и помещали в шейкер на 1 час. К исследуемым образцам и холостым образцам грунто-пылевых смесей добавляли 10 мл деионизованной воды и помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. Полученный раствор фильтровали через мембранный пористый фильтр с диаметром пор 0.45 мкм для устранения механических примесей и переносили в стеклянную колбу. Десять миллилитров раствора упаривали на ротационном испарителе при пониженном давлении до объема менее 100 мкл. Доводили до объема 1 мл ацетонитрилом. Колбу с раствором помещали в ультразвуковую ванну на 5 минут. Раствор переносили в полипропиленовые пробирки на 1.5 мл и проводили реакцию дериватизации с ПБФБ.

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

*Условия ВЭЖХ-МС/МС определения.* В работе использовали ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200. Разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Agilent, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: (А) 10 мМ ацетат аммония в воде и (Б) ацетонитрил. Хроматограммы получали в режиме градиентного элюирования при скорости потока 1.5 мл/мин (Табл. 5). Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов при следующих параметрах: температура переходного капилляра 350°С, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi. Для детектирования МФК использовали следующие выбранные реакции:  $m/z$  293→265 (определение),  $m/z$  291→263,  $m/z$  293→215,  $m/z$  291→213 (качественное подтверждение). Максимальную интенсивность сигналов с  $m/z$  293 и 291 достигали при потенциале декластеризации -41 В. Максимальную интенсивность сигналов с  $m/z$  265, 263, 215 и 213 достигали при энергиях соударения -22, -22, -25, -25 В, соответственно. Время регистрации каждой выбранной реакции составило 30 мс. Условия детектирования АМФК представлены в Табл. 6.

**Таблица 6.** Значения потенциалов декластеризации и энергии соударений алкилметилфосфоновых кислот

Параметр	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПинМФК
ПД, В	-20 ( $m/z$ 123)	-26 ( $m/z$ 137)	-29 ( $m/z$ 151)	-33 ( $m/z$ 179)
ЭС, В	-32 ( $m/z$ 95)	-18 ( $m/z$ 95)	-37 ( $m/z$ 95)	-26 ( $m/z$ 95)
	-15 ( $m/z$ 79)	-37 ( $m/z$ 79)	-21 ( $m/z$ 79)	-45 ( $m/z$ 79)

Время регистрации каждой выбранной реакции составило 30 мс

## **2.5 Схема экспериментов по определению МФК в виде производного с ПМФБ в водных объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием**

*Приготовление растворов для анализа.* Исходные растворы МФК готовили согласно пункту 2.3. Исходный раствор гидрокарбоната натрия (40 мг/мл) готовили при помощи растворения 400 мг гидрокарбоната натрия в 10 мл воды. Исходный раствор ПМФБ (10 мг/мл) готовили при помощи растворения 100 мг ПМФБ в 10 мл ацетонитрила. Для определения предела обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и построения градуировочной зависимости готовили серию растворов МФК в деионизованной воде с концентрациями 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 нг/мл. Для оценки прецизионности и ВЛП готовили растворы МФК в образцах воды на трех уровнях концентраций, равных 10, 50 и 200 нг/мл.

*Образцы вод.* Для изучения влияния матричного эффекта использовали 5 различных типов воды: вода из колодца, расположенного в Калужской области в деревне Павлово; вода из скважины «Заветы Ильича», расположенной в Московской области, в Пушкинском районе; вода из родника «Барский колодец», расположенного в деревне Мураково; две водопроводные воды, отобранные на Химическом факультете (ХФ) и в Главном Здании МГУ (ГЗ МГУ). Для апробации разработанного способа анализировали образцы воды, полученные в ходе ежегодного тестирования, проводимого лабораторией ОЗХО.

*Пробоподготовка.* В образцы анализируемых водных объектов вносили растворы МФК в нужной концентрации. Образцы воды ОЗХО и образцы воды с добавками МФК центрифугировали для удаления возможных механических примесей.

*Дериватизация.* К 1 мл полученного раствора добавляли 20 мкл раствора  $\text{NaHCO}_3$  (40 мг/мл) и 100 мкл раствора ПМФБ (10 мг/мл). Раствор встряхивали и помещали в термостат. Реакцию проводили при 95 °С в течение 45 минут.

*Условия ВЭЖХ-МС/МС определения.* В работе использовали ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 и масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200. Разделение проводили на колонке Acclaim RSLC C18 (150 мм × 2.1 мм, 2.2 мкм) при скорости потока

подвижной фазы 0.4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из смеси растворителей: А – 0.1% муравьиная кислота, Б – ацетонитрил. Применяли режим градиентного элюирования, представленный в таблице 7. Объем ввода пробы составил 20 мкл.

**Таблица 7.** 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

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов при следующих параметрах: температура переходного капилляра 350°C, напряжение на распыляющем капилляре – -4500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 30 psi, давление осушающего газа 40 psi. Для детектирования использовали следующие выбранные реакции:  $m/z$  243→150 (определение) и  $m/z$  243→215 (качественное подтверждение). Максимальную интенсивность сигнала с  $m/z$  243 достигали при потенциале декластеризации -48 В. Максимальную интенсивность сигналов с  $m/z$  150 и 215 достигали при энергии соударений -30 и -21 В, соответственно. Время регистрации каждой выбранной реакции составило 30 мс.

## **2.6 Схема экспериментов по определению МФК в виде производного с ПБФБ в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием**

*Приготовление растворов для анализа.* Исходные растворы МФК, 18-краун-6 и карбоната калия готовили согласно пункту 2.3. Исходный раствор ПБФБ (100 мг/мл) получали растворением 1 г ПБФБ в 10 мл ацетонитрила и хранили при -20 °С. Для определения предела обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и построения градуировочной зависимости делали добавки МФК в образцы плазмы до концентраций 3, 10, 20, 50, 100, 200 и 500 нг/мл. Степень извлечения, правильность разработанного способа, прецизионность и ВЛП оценивали на 2 уровнях концентраций МФК в плазме – 20 и 200 нг/мл.

*Плазма.* Пять различных образцов плазмы человека анализировали отдельно, а также перемешивали между собой для усреднения. Образцы плазмы замораживали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Пробоподготовка.* К 100 мкл плазмы прибавляли 20 мкл 10 мМ хлорной кислоты, интенсивно встряхивали в течение минуты и добавляли 880 мкл 1,4-диоксана. Полученный раствор помещали в шейкер и встряхивали в течение 20 минут. Раствор с осажденными белками центрифугировали в течение 5 минут при 14000 об/мин. Супернатант отделяли от осадка и проводили реакцию дериватизации с ПБФБ. Раствор упаривали досуха при пониженном давлении в термостате при  $80^{\circ}\text{C}$ . Остаток растворяли в 100 мкл деионизованной воды, раствор центрифугировали в течение 3 мин и отделяли от нерастворившегося избытка реагента. В хроматограф вводили 20 мкл полученного раствора.

*Дериватизация.* К супернатанту, полученному после отделения белков, прибавляли 20 мкл раствора 18-краун-6 (20 мг/мл), 20 мкл раствора карбоната калия (20 мг/мл) и 100 мкл раствора ПБФБ (100 мг/мл). Раствор интенсивно встряхивали и помещали в термостат. Реакцию проводили при  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин.

*Условия ВЭЖХ-МС/МС определения.* В работе использовали ВЭЖХ-МС/МС систему Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS system. Хроматографическое разделение проводили на колонке Acclaim RSLC C18 (150 мм  $\times$  2.2 мм, 3 мкм) при скорости потока подвижной фазы 0.4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из смеси растворителей: А – 0.1% муравьиная кислота, Б – ацетонитрил. Применяли режим градиентного элюирования, представленный в таблице 7. Объем ввода пробы составил 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов при следующих параметрах: скорость потока газа распылителя – 12 л/мин, температура газа распылителя –  $300^{\circ}\text{C}$ , скорость потока газа периферийного слоя – 11 л/мин, температура газа периферийного слоя –  $350^{\circ}\text{C}$ , напряжение на капилляре –  $-3500\text{ В}$ . Для детектирования использовали следующие выбранные реакции:  $m/z$  293 $\rightarrow$ 265 (определение),  $m/z$  293 $\rightarrow$ 215,  $m/z$  291 $\rightarrow$ 263,  $m/z$  291 $\rightarrow$ 213 (подтверждение). Для нахождения оптимальных масс-спектрометрических параметров детектирования была использована программа

MassHunter Optimizer Software (Agilent Technologies, США), которая в автоматическом режиме за несколько вводов подбирает оптимальные значения потенциала на входе в масс-анализатор (Fragmentor) и энергии соударений (Collision Energy). Критерием выбора оптимальных значений этих параметров является максимальная интенсивность пиков ионов-предшественников и ионов-продуктов в заданном диапазоне значений данных параметров. Для сигналов с  $m/z$  293 и  $m/z$  291 оптимальным значением потенциала на входе в масс-анализатор было -90 В, для сигналов с  $m/z$  265, 263, 215 и 213 оптимальное значение энергии соударений составило -5В. Время записи каждой ионной реакции – 50 мс.

## **2.7 Схема экспериментов по определению МФК в образцах мочи методом анионообменной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием**

*Приготовление растворов для анализа.* Исходный раствор МФК (1 мг/мл) был приготовлен при помощи растворения 10 мг МФК в 10 мл ацетонитрила. Раствор хранили при -20 °С. Дальнейшие разбавления исходного раствора МФК осуществляли при помощи деионизованной воды. Для определения предела обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и построения градуировочной зависимости готовили растворы МФК в холостой моче с концентрациями 4, 10, 20, 50, 100, 200, 500 нг/мл. Для определения матричного эффекта в образцы холостой мочи вносили МФК до концентраций 20, 100 и 400 нг/мл. Прецизионность и ВЛП оценивали на 3 уровнях концентраций МФК в моче – 20, 100 и 400 нг/мл.

*Образцы мочи крыс и приготовление исходных растворов отравляющих веществ.* В эксперименте были использованы стандартные образцы состава отравляющих веществ: Зоман (ГСО 8247-2003), зарин (ГСО 8246-2003), VR (ГСО 8249-2004). Исходные растворы ГСО готовили в диметилсульфоксиде, последующее разведение растворов проводили с использованием дистиллированной воды. Все растворы готовили непосредственно перед введением животным.

Образцы мочи лабораторных животных получены в эксперименте *in vivo*. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативному документу [124].

*Описание токсикологического эксперимента.* В эксперименте были использованы 4 группы белых беспородных крыс со средней массой тела  $270 \pm 24$  г (12 особей): животным 1-й группы вводили зарин однократно подкожно в дозе 90 мкг/кг ( $0.5 \text{ ЛД}_{50}$ ), 2-й – зоман в дозе 45 мкг/кг ( $0.5 \text{ ЛД}_{50}$ ), 3-й - VR в дозе 6 мкг/кг ( $0.5 \text{ ЛД}_{50}$ ), 4-й - воду (контроль). Отбор мочи проводили через 1, 3, 7 и 13 сутки после начала токсикологического эксперимента. Холостые образцы мочи четвертой группы использовали для разработки условий пробоподготовки, хроматографических условий разделения и экспериментов по проверке процедуры.

Токсикологический эксперимент был проведен в декабре 2013 – январе 2014 гг. Образцы мочи до проведения анализа хранили при температуре минус  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Пробоподготовка.* Образцы мочи размораживали при комнатной температуре, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об./мин. Супернатант отделяли от остатка и фильтровали через одноразовый шприцевый фильтр Chromafil Xtra PET - 45/25. Пятьсот микролитров надосадочной жидкости разбавляли в 2 раза деионизованной водой и 20 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

*Синтез неподвижной фазы анионообменной колонки.* Анионообменный материал на основе поли (стирол-дивинилбензола) (ПС-ДВБ) с ковалентно связанными четвертичными аммониевыми группами был разработан и синтезирован в лаборатории хроматографии МГУ имени М.В. Ломоносова в соответствии с [125]. В качестве субстрата для синтеза использовали микросферические частицы ПС-ДВБ (степень сшивания 50%, размер частиц 5,5 мкм, площадь поверхности  $670 \text{ м}^2 / \text{г}$ , средний размер пор 10 нм). Полученным анионообменным материалом заполняли колонки из нержавеющей стали с различной длиной (50 мм  $\times$  4 мм. (A1) и 100 мм  $\times$  4 мм (A2)) в соответствии с процедурой, описанной в [126].

*Условия определения методом анионообменной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.* В работе использовали ВЭЖХ-МС/МС систему Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS system. Хроматографическое разделение проводили на синтезированных анионообменных колонках A1 и A2 при скорости потока подвижной фазы 0.95 мл/мин, состоящей из 200 мМ муравьиной кислоты в воде. Объем вводимой пробы составил 20 мкл.

Масс-спектрометрическое детектирование проводили при помощи электрораспылительной ионизации в режиме регистрации отрицательно

заряженных ионов при следующих параметрах: скорость потока газа распылителя – 12 л/мин, температура газа распылителя – 300 °С, скорость потока газа периферийного слоя – 11 л/мин, температура газа периферийного слоя – 350 °С, напряжение на капилляре – -3500 В. Для детектирования использовали следующие выбранные реакции:  $m/z$  95→79 (определение),  $m/z$  95→63 (подтверждение). Для нахождения оптимальных масс-спектрометрических параметров детектирования была использована программа MassHunter Optimizer Software (Agilent Technologies, США). Для иона предшественника с  $m/z$  95 оптимальным значением потенциала на входе в масс-анализатор было -44 В, для ионов - продуктов с  $m/z$  79 и 63 оптимальное значение энергии соударений составило -17 и -57 В, соответственно. Время регистрации каждой выбранной реакции – 50 мс.

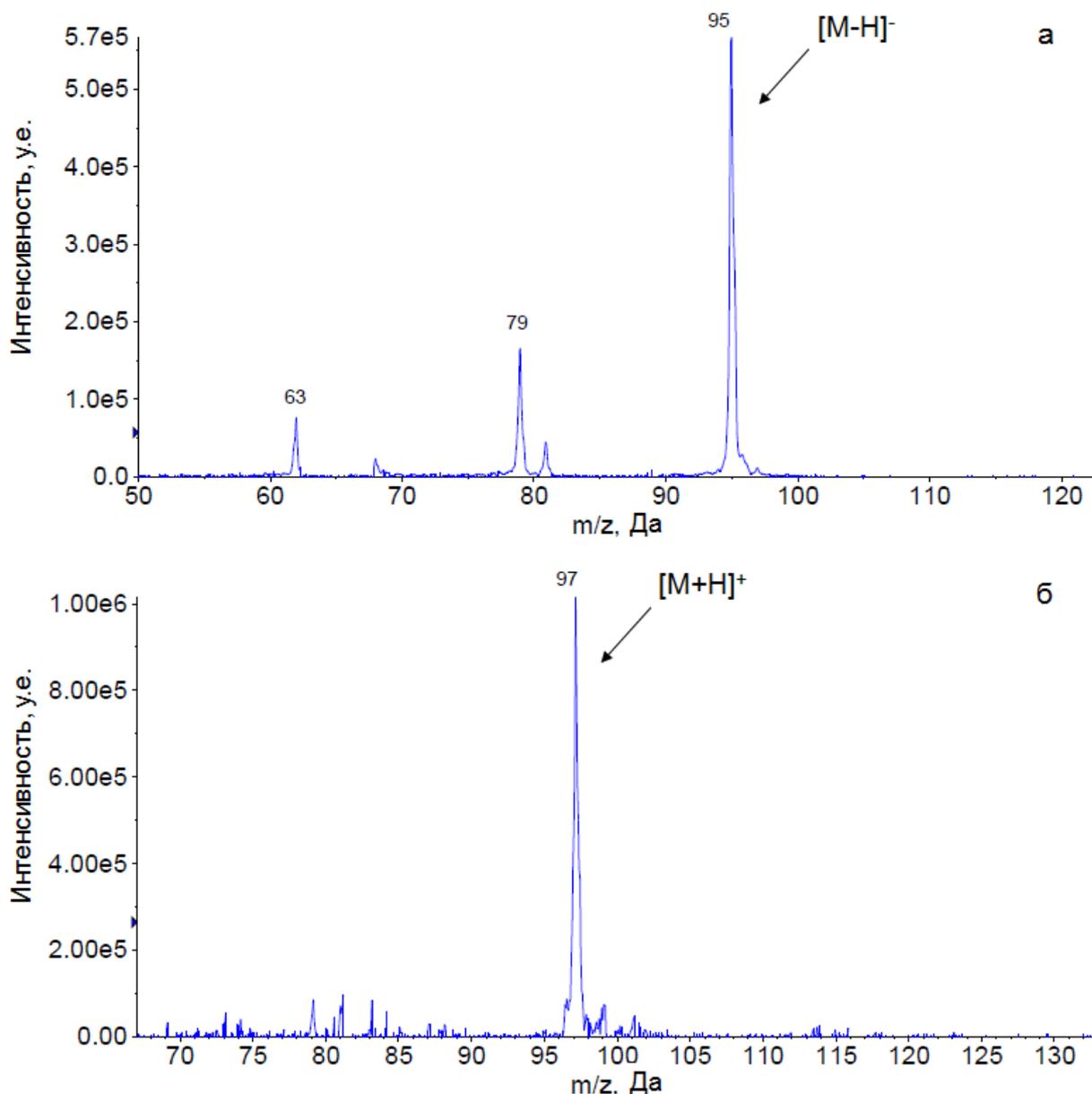
## ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МФК В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ

### 3.1 Изучение возможности прямого определения МФК в водных объектах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

Согласно сводной таблице 1, демонстрирующей описанные в литературе способы определения МФК в объектах окружающей среды, можно сделать вывод, что актуальная задача определения МФК на ультранизких уровнях (0.1 - 1 нг/мл) до сих пор не была решена. Использование tandemного масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций позволяет достичь очень низкие пределы обнаружения благодаря высокому отношению сигнал/шум. Во многих случаях использование tandemного масс-спектрометрического детектирования снижает требования к хроматографическому разделению при условии отсутствия мешающего влияния матричных компонентов. Однако если матричные компоненты влияют на масс-спектрометрический сигнал, то подбор хроматографических условий разделения выходит на первый план.

На первой стадии работы исследовали возможность прямого определения МФК в водных объектах методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием без применения дериватизации или длительной стадии пробоподготовки.

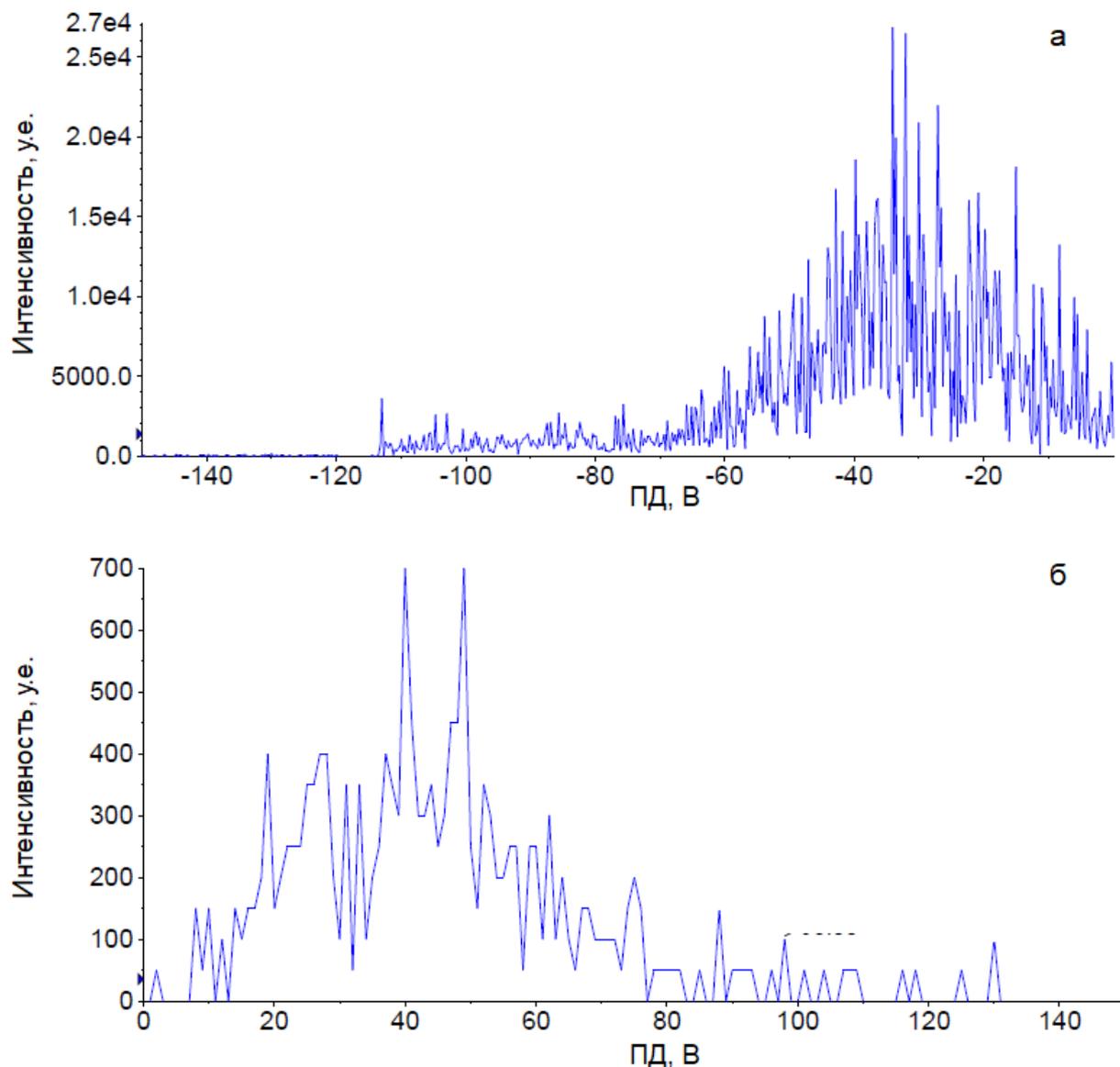
*Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования МФК.* С помощью шприцевого насоса при постоянной скорости 3 мкл/мин вводили раствор МФК с концентрацией 10 мкг/мл в источник ионов масс-спектрометра. Получали масс-спектры МФК в режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных ионов (Рис. 13). В масс-спектре МФК в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов наблюдается интенсивный сигнал депротонированной молекулы МФК с  $m/z$  95 и небольшое количество сигналов фрагментных ионов с  $m/z$  79 и 63, образующихся также при фрагментации депротонированной молекулы МФК (Рис. 13а). В масс-спектре МФК, полученном в режиме регистрации положительно заряженных ионов наблюдается интенсивный сигнал с  $m/z$  97, соответствующий протонированной молекуле МФК и практически не наблюдается фрагментация в источнике ионов (Рис. 13б).



**Рис. 13.** Масс-спектры 10 мкг/мл МФК, полученные в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (а) и в режиме регистрации положительно заряженных ионов (б).

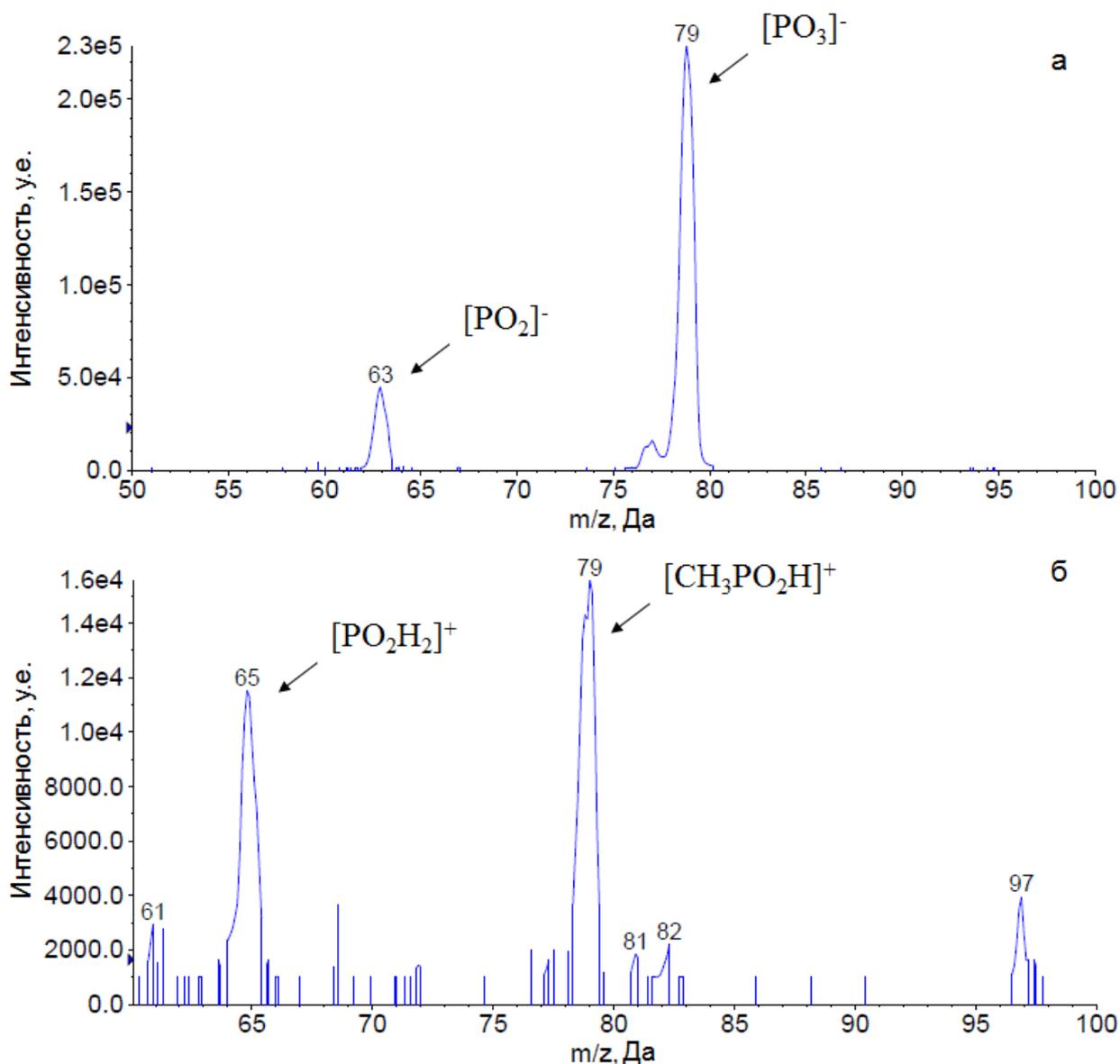
Для оптимизации интенсивности сигналов, соответствующих депротонированной и протонированной молекуле МФК варьировали значение потенциала декластеризации (ПД) (Рис. 14). Критерием выбора наиболее подходящего значения ПД являлась максимальная интенсивность сигнала, соответствующего депротонированной либо протонированной молекуле МФК. Чем выше интенсивность сигнала, соответствующего депротонированной или протонированной молекуле МФК, тем больше ионов-продуктов образуется в ячейке соударений масс-спектрометра. Из рисунка 14 видно, что максимальная интенсивность сигнала, соответствующего депротонированной молекуле МФК,

достигается при значении ПД -34 В, а максимальная интенсивность сигнала, соответствующего протонированной молекуле, при ПД 40 В.



**Рис. 14.** Зависимости интенсивности сигналов, соответствующих депротонированной молекуле МФК [M-H]<sup>-</sup> (а) и протонированной молекуле МФК [M+H]<sup>+</sup> (б), от значений ПД.

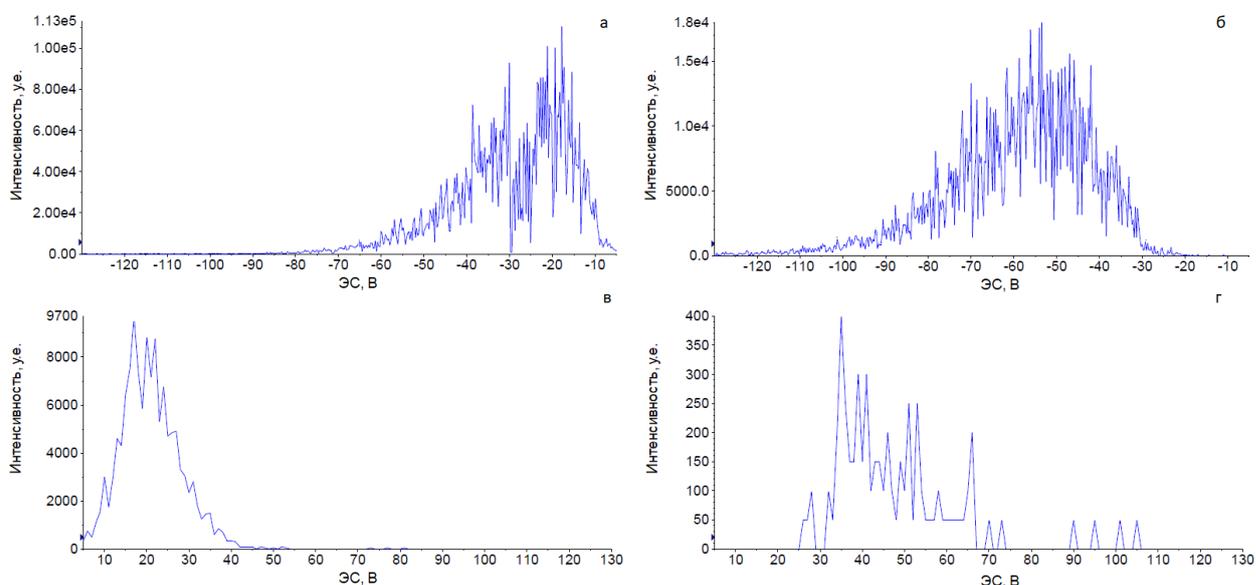
На следующем этапе работы получали масс-спектр ионов-продуктов, образующихся из депротонированной и протонированной молекулы МФК в ячейке соударений масс-спектрометра (Рис. 15). В масс-спектре ионов-продуктов, образующихся из депротонированной молекулы МФК с  $m/z$  95, наблюдаются два сигнала с  $m/z$  79 и 63, которые соответствуют ионам [PO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> и [PO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (Рис. 15а). В масс-спектре ионов-продуктов, образующихся из протонированной молекулы МФК с  $m/z$  97, наблюдаются два сигнала с  $m/z$  79 и 65, которые соответствуют ионам [CH<sub>3</sub>PO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> и [PO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (Рис. 15б).



**Рис. 15.** Масс-спектры ионов-продуктов, образующихся в ячейке соударений масс-спектрометра из депротонированной молекулы МФК  $[M-H]^-$  в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (ЭС -35 В) (а) и протонированной молекулы МФК  $[M+H]^+$  в режиме регистрации положительно заряженных ионов (ЭС 35 В) (б).

Интенсивность сигналов, соответствующих ионам-продуктам, зависит от заданного значения энергии соударений (ЭС). Чем выше значение ЭС, тем сильнее выражена фрагментация иона-предшественника, однако при высоких значениях энергии соударений кроме иона-предшественника начинают фрагментироваться его наиболее интенсивные ионы-продукты. Таким образом, нужно варьировать значение ЭС для получения максимальной интенсивности сигналов, соответствующих ионам-продуктам. Из Рис. 16а, б видно, что в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов максимальная интенсивность сигналов с  $m/z$  79 и 63 достигается при значении ЭС -20 и -55 В, соответственно. Из Рис. 16в, г, видно,

что в режиме регистрации положительно заряженных ионов максимальная интенсивность сигналов с  $m/z$  79 и 65 достигается при значении ЭС 17 и 35 В, соответственно.



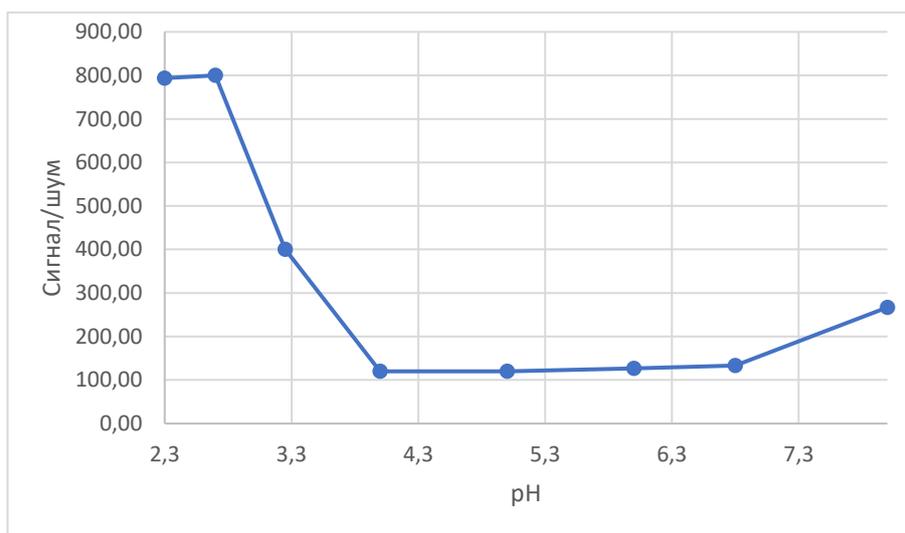
**Рис. 16.** Зависимости интенсивности сигналов с  $m/z$  79 (а) и  $m/z$  63 (б) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, а также сигналов с  $m/z$  79 (в) и  $m/z$  65 (г) в режиме регистрации положительно заряженных ионов от значений ЭС.

Также небольшое влияние на сигналы, соответствующие ионам предшественникам и ионам-продуктам, оказывают такие параметры, как входной потенциал в нулевой квадруполь и потенциал на выходе из ячейки соударений, однако данные параметры практически не зависят от структуры соединения и полярности регистрируемых ионов. В работе был использован входной потенциал, равный -10 В и потенциал на выходе из ячейки соударений, равный -5 В.

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, так как максимальная интенсивность сигнала с  $m/z$  79 выше чем у сигнала с  $m/z$  63 (Рис 16а, б). 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. Как видно из рисунка 16, интенсивность сигналов, соответствующих ионам-продуктам в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов превышает интенсивность сигналов, соответствующих ионам-продуктам в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Однако для выбора наиболее предпочтительного режима регистрации ионов, данное условие не является достаточным, так как более значимым параметром сравнения является отношение интенсивности сигнала

выбранного для определения иона-продукта к величине шума данного сигнала (отношение сигнал/шум).

*Выбор хроматографических условий.* Разделение проводили на обращенно-фазовой колонке Acclaim RSLC (150×2.1 мм, 2.2 мкм). Использовали различные варианты подвижных фаз, совместимых с масс-спектрометрическим детектированием [127]. В качестве первого компонента подвижной фазы использовали 0.1-0.5 % водные растворы муравьиной, уксусной кислот, либо 5 мМ водные растворы ацетата аммония (рН 6.8) и его смеси с уксусной кислотой и гидроксидом аммония для создания различных значений рН. В качестве второго компонента подвижной фазы использовали ацетонитрил. 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 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 - муравьиной кислоты (рН 2.7) в режиме регистрации как отрицательно, так и положительно заряженных ионов (Рис. 17).



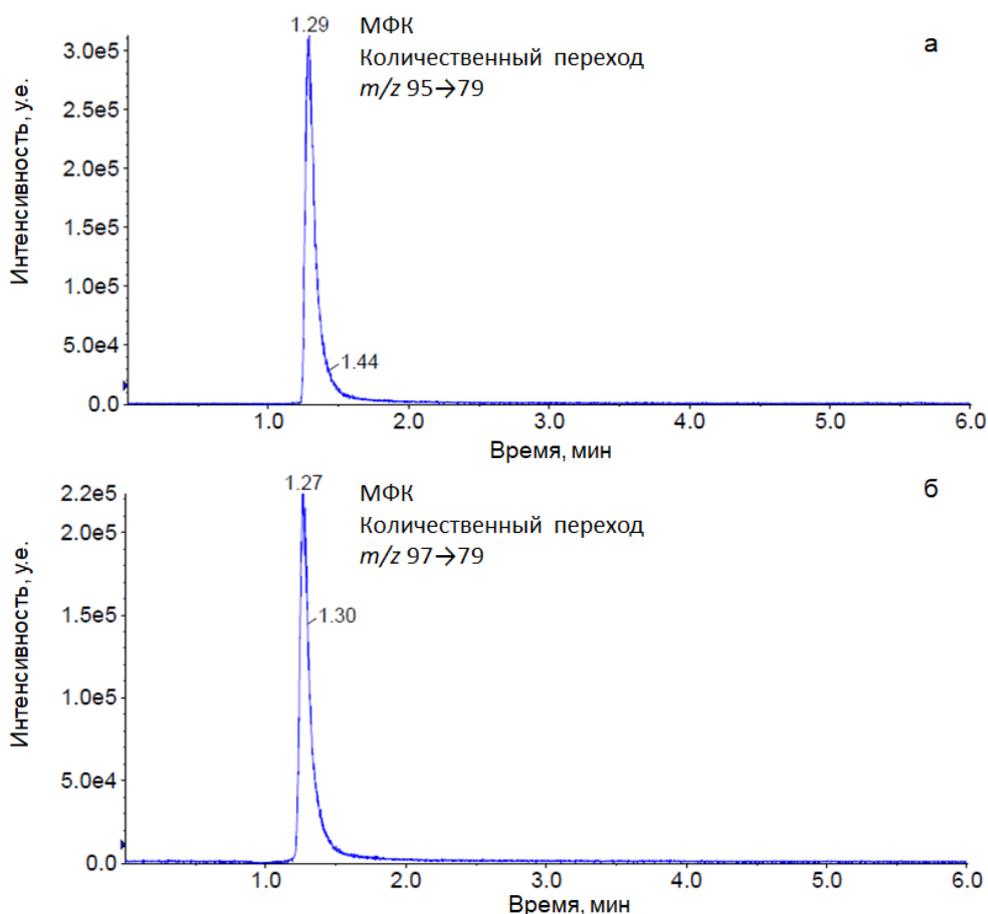
**Рис. 17.** Зависимость отношения сигнал/шум раствора МФК с концентрацией 500 нг/мл от значения рН подвижной фазы. Режим регистрации отрицательно заряженных ионов, детектирование в режиме мониторинга выбранных реакций.

Однако отношение сигнал/шум в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов значительно превышало отношение сигнал/шум в режиме регистрации положительно заряженных ионов (Табл. 8 и Рис. 18).

**Таблица 8.** Отношения сигнал/шум раствора МФК с концентрацией 1.875 мкг/мл, полученные в режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных ионов

Отношение сигнал/шум в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов	Отношение сигнал/шум в режиме регистрации положительно заряженных ионов
3000	1952

Таким образом, для дальнейших экспериментов была выбрана подвижная фаза, состоящая из 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила. Масс-спектрометрическое определение проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, регистрировали выбранные реакции:  $m/z$  95→79 (определение) и  $m/z$  95→63 (подтверждение).



**Рис. 18.** Хроматограммы МФК по выбранным реакциям в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (а) и в режиме регистрации положительно заряженных ионов (б). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты (1:99, по объему). Скорость потока: 0.4 мл/мин.

*Метрологические характеристики разработанного способа.* Готовили растворы МФК в деионизованной воде в диапазоне от 2 до 500 нг/мл и определяли предел обнаружения, наименьшую определяемую концентрацию и линейную область градуировочной зависимости. Предел обнаружения определяли, как концентрацию, при которой достигается отношение сигнала анализируемой пробы к шуму холостой пробы равное 3:1. Наименьшую определяемую концентрацию определяли, как концентрацию, при которой достигается отношение сигнала анализируемой пробы к шуму холостой пробы равное 10:1 [128]. Линейность считалась удовлетворительной, когда коэффициенты корреляции были выше, чем 0.99 с величиной остатков, не превышающих 20% [129]. Полученные метрологические характеристики представлены в таблице 9.

**Таблица 9.** Метрологические характеристики при определении МФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме обращенно-фазового разделения

Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	R <sup>2</sup>	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл
МФК	6 – 500	$Y = 570 \times C$	0.9998	6	2

*Изучение матричного эффекта.* Матричный эффект (МЭ) может оказывать сильное влияние на сигнал анализируемых соединений, вызывая как подавление, так и увеличение сигнала. Данное обстоятельство может привести к некорректным количественным результатам. Для оценки влияния матричного эффекта при определении МФК делали одинаковые добавки МФК в деионизованную воду, колодезную воду, речную и водопроводную воду и проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ. Матричный эффект рассчитывали по следующей формуле:  $МЭ, \% = 100 \times \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$ , 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 [130]. Результаты определения матричного эффекта при прямом определении МФК представлены в таблице 10.

**Таблица 10.** Матричный эффект при прямом определении МФК в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Образец	Матричный эффект ( $n = 3, p = 0,95$ ), %
Колодезная вода	$-83 \pm 1$
Речная вода	$-81 \pm 2$
Водопроводная вода	$-81 \pm 1$

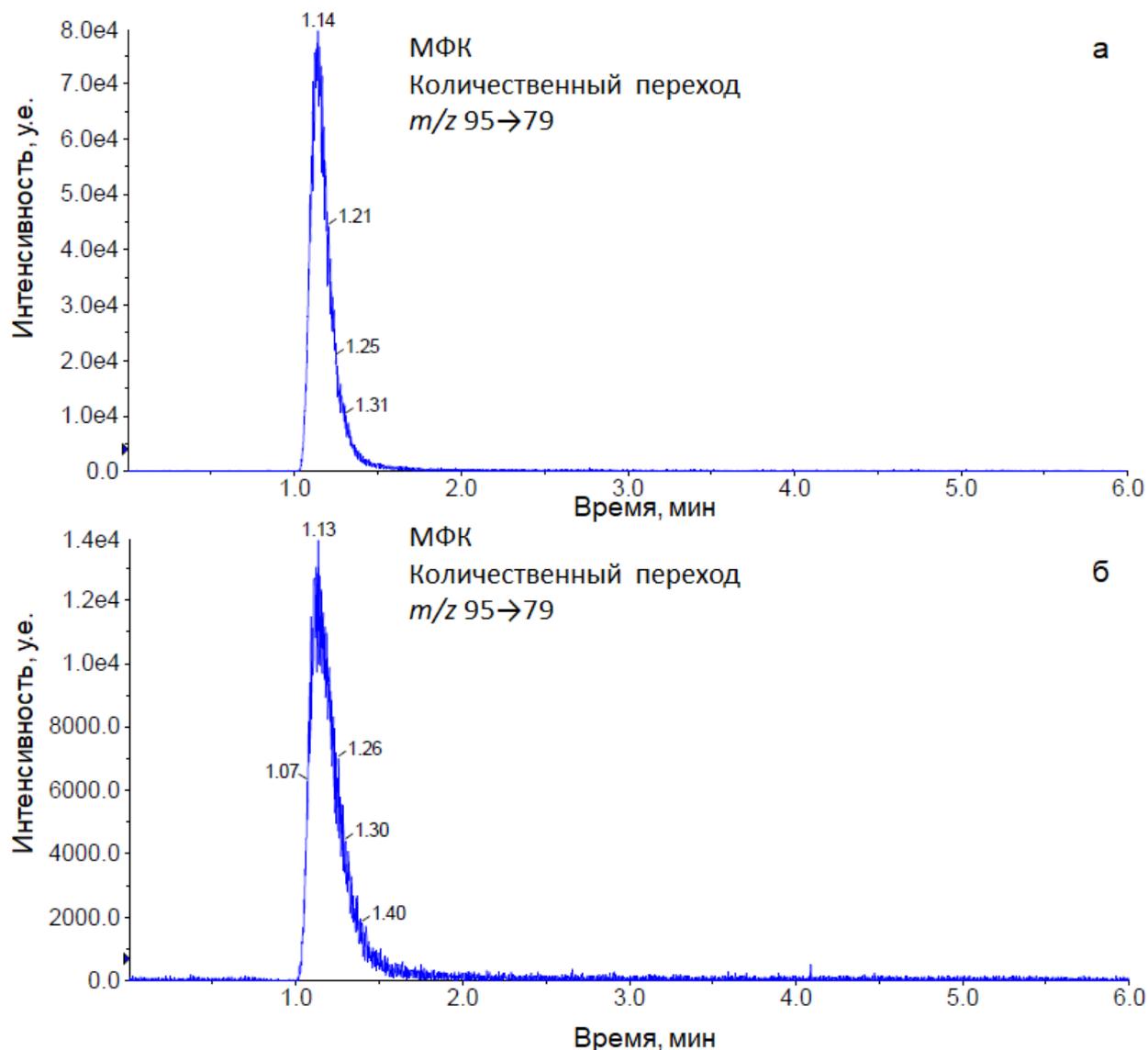
Из представленных данных видно, что при прямом определении МФК наблюдался довольно сильный матричный эффект, что легко объясняется слабым удерживанием МФК, которая элюируется со временем удерживания, почти равным мертвому времени колонки ( $k'=0.3$ ). В реальных образцах, в отличие от растворов МФК в 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 (Рис. 19). Для возможного устранения матричного эффекта проводили пяти- и десятикратное разбавление анализируемых водных объектов и растворов МФК в деионизованной воде и заново оценивали матричный эффект (Табл. 11).

**Таблица 11.** Матричный эффект при прямом определении МФК с разбавлением в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Образец	Матричный эффект ( $n = 3, p = 0.95$ ), %
<b>Разбавление в 5 раз</b>	
Колодезная вода	$-35 \pm 3$
Речная вода	$-34 \pm 2$
Водопроводная вода	$-37 \pm 3$
<b>Разбавление в 10 раз</b>	
Колодезная вода	$-28 \pm 4$
Речная вода	$-30 \pm 3$
Водопроводная вода	$-26 \pm 3$

Как видно из таблицы 11, при разбавлении анализируемых образцов влияние матричного эффекта снижается, однако отрицательный матричный эффект все равно остается. Разбавление приводит к повышению пределов обнаружения, что является дополнительным минусом такого способа определения МФК. Таким образом, с учетом матричного эффекта, без разбавления предел обнаружения разработанного

способа определения МФК в реальных водах повышается до уровня 10 нг/мл. 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 [131].



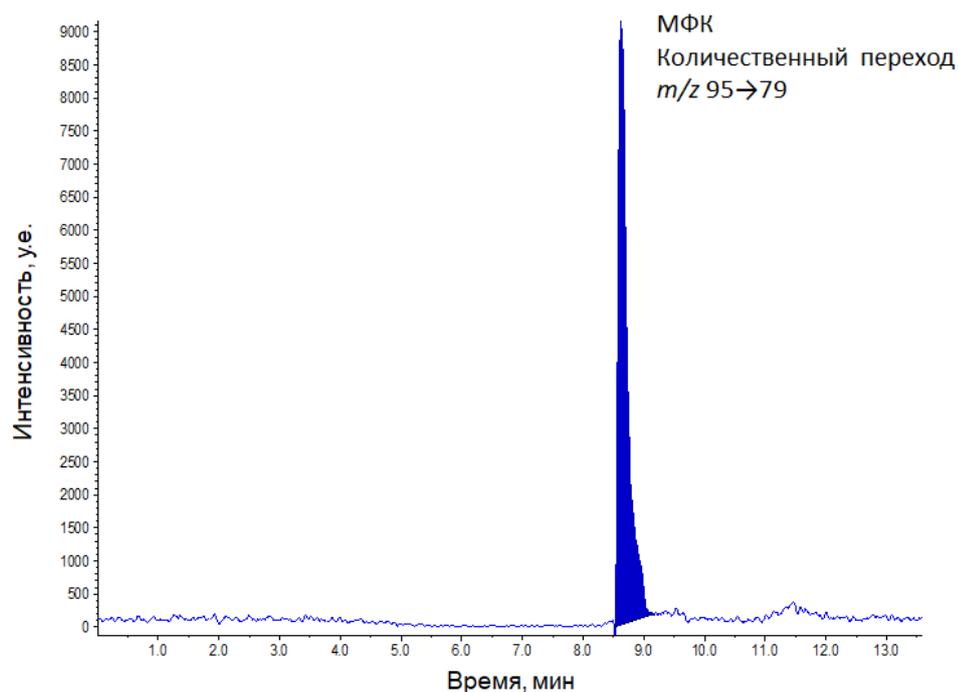
**Рис. 19.** Хроматограммы 500 нг/мл МФК по выбранной реакции  $m/z$  95  $\rightarrow$  79 в деионизованной воде (а) и речной воде (б). Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты (1:99, по объему). Скорость потока: 0.4 мл/мин.

### 3.2 Изучение возможности прямого определения МФК методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

Для увеличения коэффициента емкости МФК применяли метод гидрофильной хроматографии, который в противоположность обращенно-фазовой хроматографии

обладает селективностью к полярным соединениям. Для разделения использовали колонку Luna HILIC 150 × 4.6 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил - наиболее часто используемую подвижную фазу в гидрофильной хроматографии [132]. Подвижную фазу подавали при скорости потока 1.5 мл/мин, использовали как изократический, так и градиентный режим элюирования. Масс-спектрометрическое определение проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов по ранее выбранным реакциям:  $m/z$  95→79 (определение),  $m/z$  95→63 (подтверждение).

Так как в гидрофильной хроматографии другие по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией закономерности удерживания, то в подвижной фазе преобладает менее полярный, чем вода, органический растворитель, например, ацетонитрил. Известно, что высокое содержание ацетонитрила в подвижной фазе приводит к увеличению чувствительности масс-спектрометрического детектирования. Показано [49], что оптимальная концентрация ацетонитрила в подвижной фазе составляет 90-95%. Поэтому в изократическом режиме и в качестве начального соотношения в градиентном режиме нами было выбрано соотношение ацетонитрила к 10 мМ водному раствору ацетата аммония, равное 93:7 (по объему). В изократическом режиме за приемлемое время и с удовлетворительной формой пика МФК зарегистрировать не удалось. В режиме градиентного элюирования (Табл. 5) МФК имела высокий кажущийся коэффициент емкости, равный 9 (Рис. 20). Также, как видно из программы градиентного элюирования (Табл. 5), время удерживания МФК 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. Термины «кажущийся коэффициент емкости» и «кажущаяся эффективность» применяли для описания хроматографических параметров в режиме градиентного элюирования.



**Рис. 20.** 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 5.

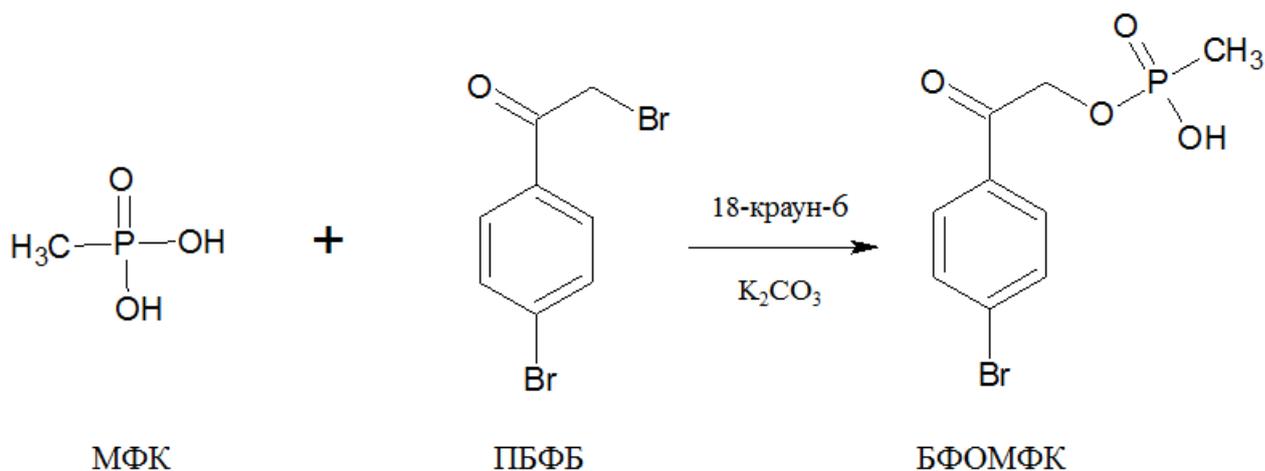
В результате, МФК имеет низкое значение коэффициента емкости ( $k' = 0.3$ ) в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии и очень высокое значение – в условиях гидрофильной хроматографии, даже при использовании режима градиентного элюирования ( $k' = 9$ , кажущийся коэффициент емкости). Для решения данной проблемы был предложен подход, включающий применение дериватирующего агента, переводящего МФК в менее полярное соединение, пригодное для определения как в условиях обращенно-фазовой, так и гидрофильной хроматографии.

### 3.3 Изучение реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом

Для дериватизации МФК применяли ПБФБ, ранее описанный в литературе [56] для дериватизации АМФК, но не применявшийся для дериватизации МФК. Реакцию дериватизации МФК с ПБФБ изучали при помощи гидрофильной хроматографии с tandemным 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. 21) МФК превращается в 2-(4-бромфенил)-2-оксоэтилметилфосфовую кислоту (БФОМФК).

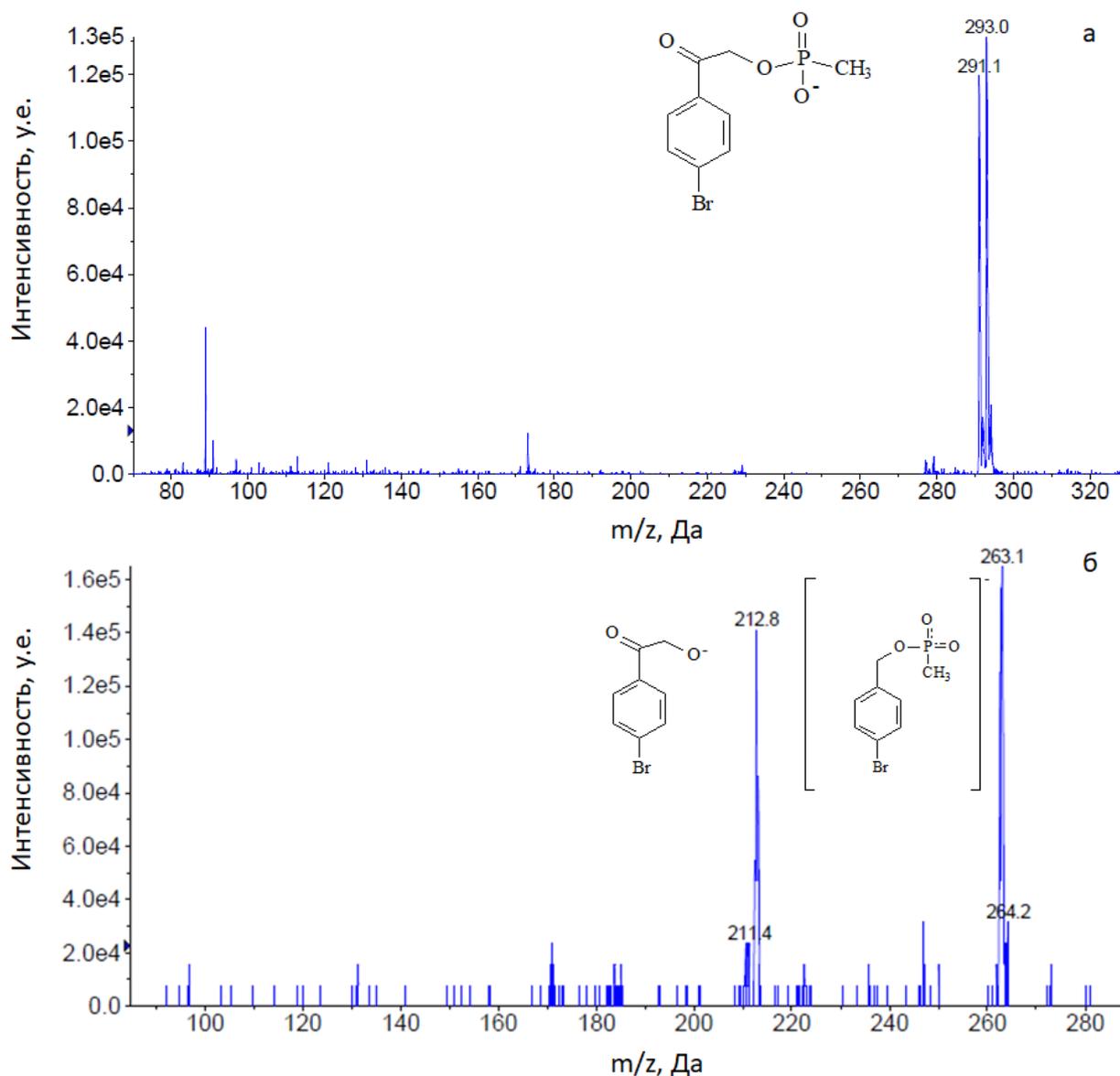
Предложенная реакция дериватизации представляет классический S<sub>N</sub>2 процесс, реализуемый за счет нуклеофильной атаки метиленовой группы ПБФБ анионом МФК. Слабощелочная среда за счет присутствия карбоната калия приводит к диссоциации МФК с образованием активного аниона. Поскольку известно, что α-позиция карбонильной группы является предпочтительной для S<sub>N</sub>2 процессов [133], то замещение брома протекает эффективно и выход реакции высок.



**Рис. 21.** Схема реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом с образованием БФОМФК.

*Подбор условий детектирования БФОМФК.* После окончания реакции дериватизации раствор охлаждали до комнатной температуры и вводили при помощи автоматического шприцевого насоса со скоростью 3 мкл/мин в масс-спектрометр. На рисунке 22 представлены масс-спектр БФОМФК, а также масс-спектр фрагментных ионов депротонированной молекулы БФОМФК в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. В режиме регистрации положительно заряженных ионов протонированная молекула БФОМФК не образуется. В масс-спектре ионов первого поколения производного МФК наблюдается изотопное расщепление из-за наличия в структуре соединения брома (Рис. 22а) и присутствуют два сигнала, соответствующие депротонированной молекуле производного МФК. При фрагментации иона-предшественника с  $m/z$  291 наблюдается образование ионов-продуктов с  $m/z$  213 и 263, а при фрагментации иона-предшественника с  $m/z$  293 образуются ионы-продукты с  $m/z$  215 и 265. Ионы с  $m/z$  213 и 215, а также с  $m/z$

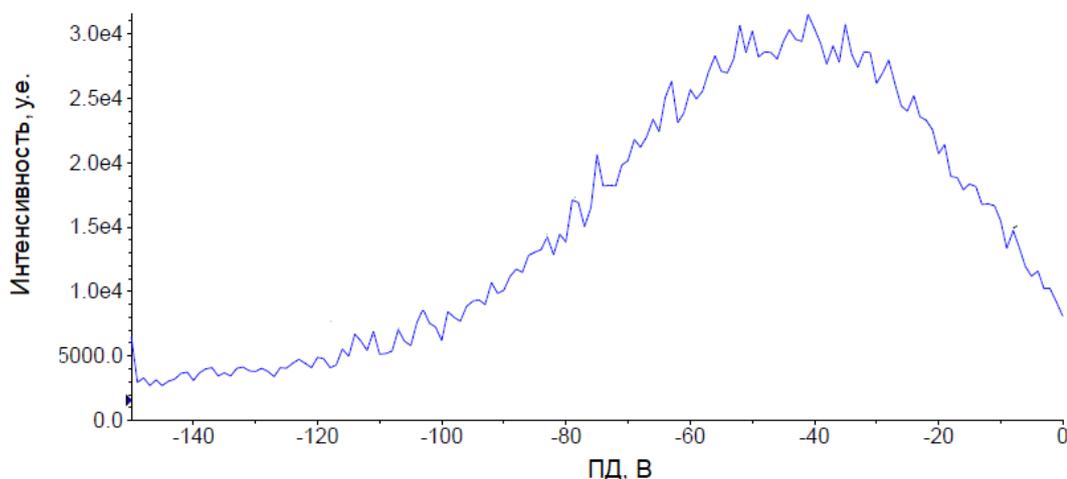
263 и 265 имеют одинаковую структуру и отличаются друг от друга на 2 а.е.м., что свидетельствует о присутствии брома в структуре ионов-продуктов (Рис. 22б).



**Рис. 22.** а) Масс-спектр производного МФК с ПБФБ (БФОМФК) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (ПД -41 В); б) Масс-спектр ионов-продуктов, образующихся в ячейке соударений масс-спектрометра из депротонированной молекулы БФОМФК с  $m/z$  291 (ЭС -23 В).

Для оптимизации условий детектирования варьировали значение потенциала декластеризации (ПД) и получали зависимость интенсивности сигнала, соответствующего депротонированной молекуле БФОМФК, от значений ПД (Рис. 23). Критерием выбора наиболее подходящего значения ПД являлась максимальная интенсивность сигнала депротонированной молекулы БФОМФК. Из рисунка 23 видно, что максимальная интенсивность сигнала, соответствующего

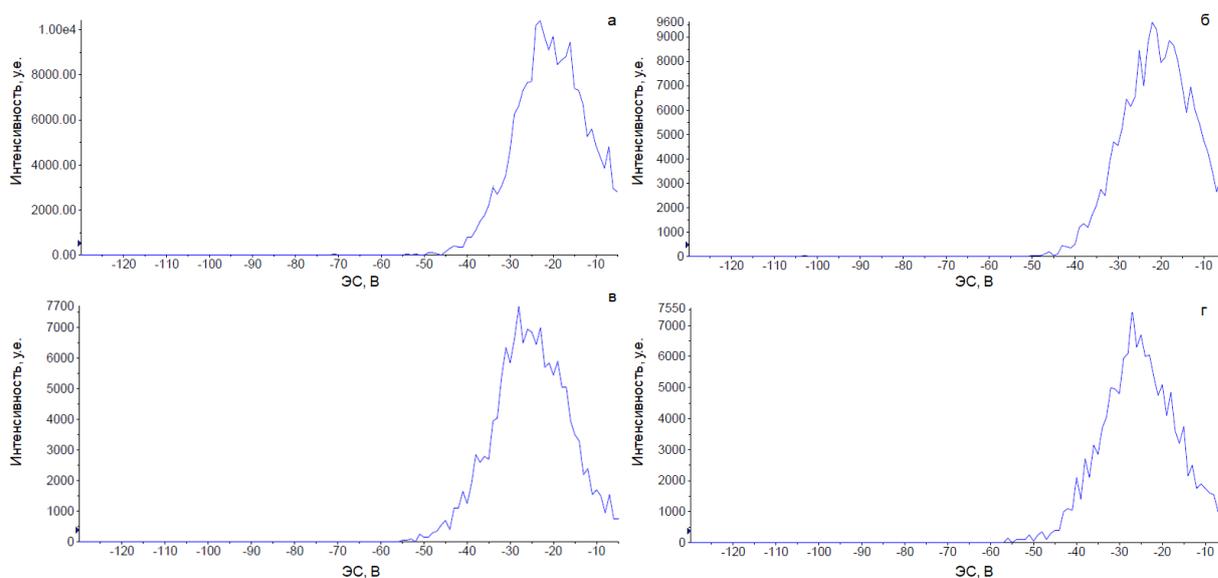
депротонированной молекуле БФОМФК с  $m/z$  291, достигается при значении ПД - 41 В. Аналогичное значение соответствовало сигналу с  $m/z$  293.



**Рис. 23.** Зависимость интенсивности сигнала, соответствующего депротонированной молекуле БФОМФК с  $m/z$  291 [М-Н]<sup>-</sup>, от значений ПД.

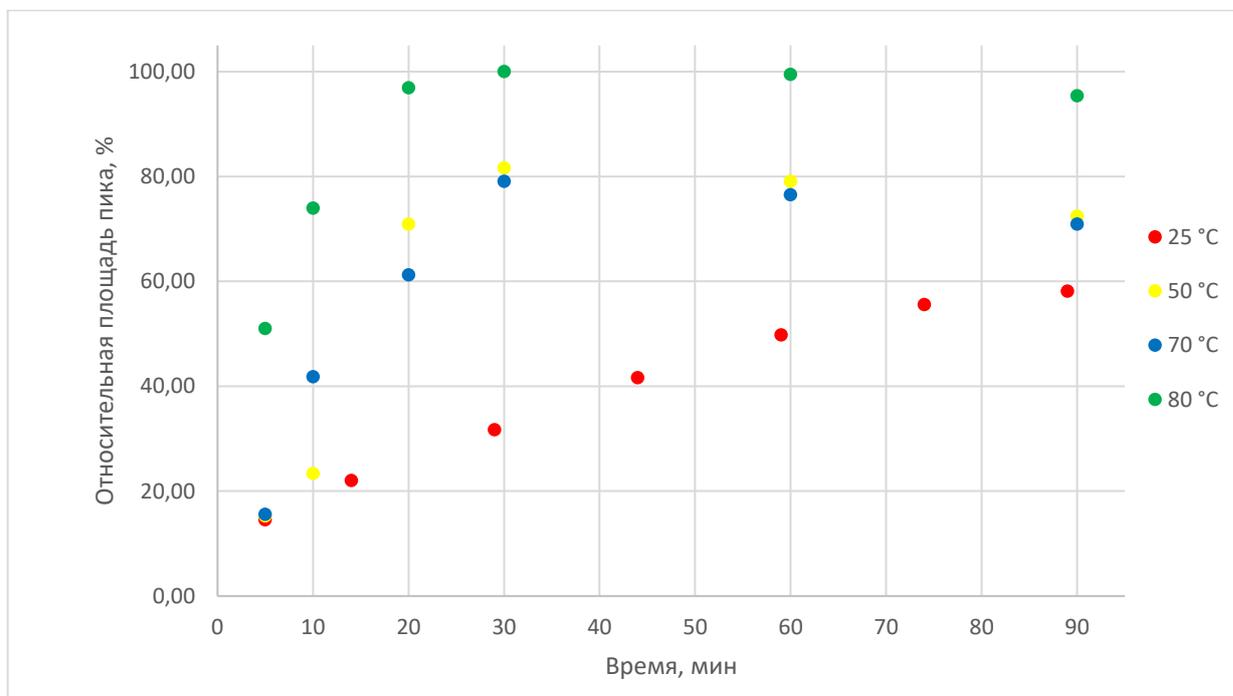
Из рисунка 24 видно, что в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов максимальная интенсивность сигналов с  $m/z$  265, 263 и 215, 213 достигается при значении ЭС -22 и -25 В, соответственно. Входной потенциал составил -10 В, а потенциал на выходе из ячейки соударений -5 В.

Таким образом, 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. 24.** Зависимости интенсивности сигналов с  $m/z$  265 (а),  $m/z$  263 (б),  $m/z$  215 (в) и  $m/z$  213 (г) от значений ЭС.

*Подбор условий проведения реакции дериватизации.* Для выбора наиболее подходящих условий проведения реакции дериватизации, изучали зависимости площади пика БФОМФК при температурах 25, 50, 70 и 80 °С от времени термостатирования (Рис. 25). Реакцию дериватизации изучали согласно условиям, описанным в разд. 2.3.

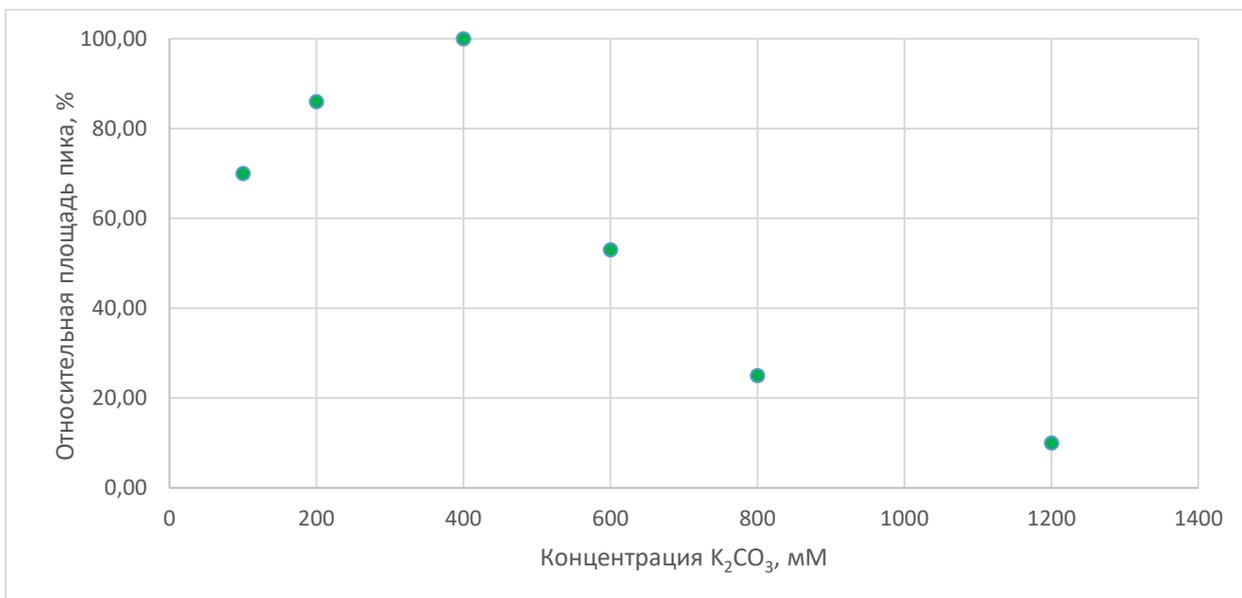


**Рис. 25.** Зависимость площади пика БФОМФК от времени термостатирования при температурах 25, 50, 70 и 80 °С.

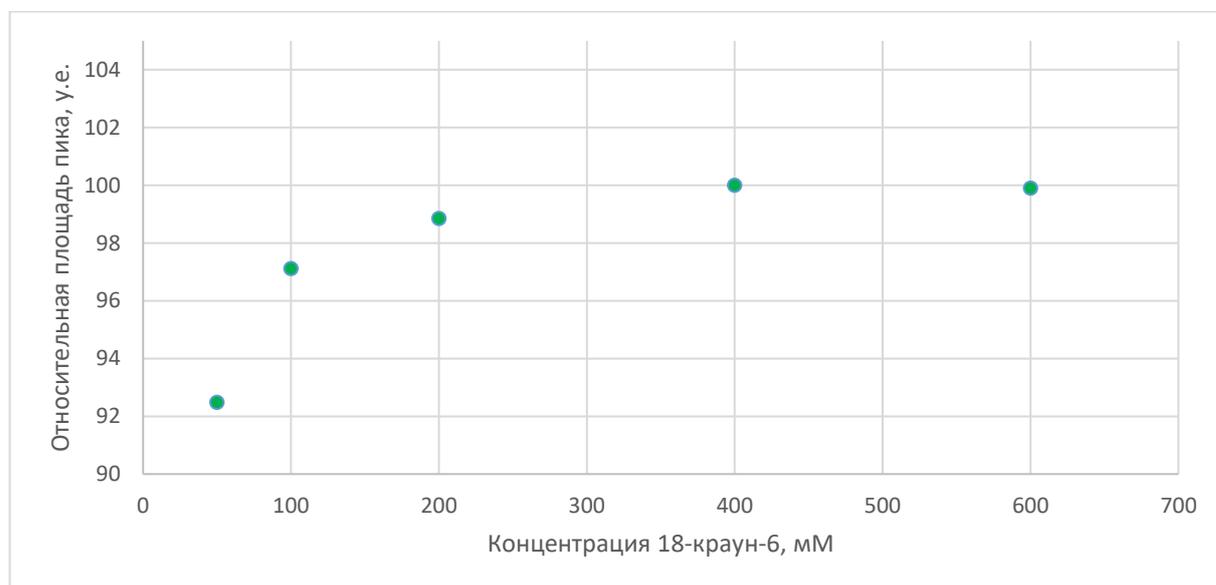
Представленные зависимости, при температурах отличных от комнатной, имеют похожую форму. Отличие формы зависимости при комнатной температуре связано с низкой скоростью реакции без нагревания, однако видно, что площадь пика БФОМФК также стремится к своему максимальному значению. Для зависимостей при нагревании видно, что при термостатировании в течение 30 минут достигается максимум площади пика БФОМФК, при дальнейшем увеличении времени термостатирования наблюдается плато либо небольшое снижение площади пика БФОМФК, что возможно свидетельствует о термодеструкции образующегося производного МФК.

В выбранных условиях проведения реакции варьировали концентрацию раствора 18-краун-6 и  $K_2CO_3$  в диапазоне концентраций от 100 до 1200 мкг/мл. При варьировании концентрации  $K_2CO_3$  добавляли 18-краун-6 и ПБФБ до концентраций 400 мкг/мл и 1000 мкг/мл. При варьировании концентрации 18-краун-6 добавляли

$K_2CO_3$  и ПБФБ до концентрации 400 мкг/мл и 1000 мкг/мл. Полученные зависимости представлены на рисунках 26, 27. Из полученных зависимостей видно, что максимальная площадь пика БФОМФК в выбранном диапазоне концентраций достигается при концентрациях  $K_2CO_3$  и 18-краун-6, равных 400 мкг/мл.



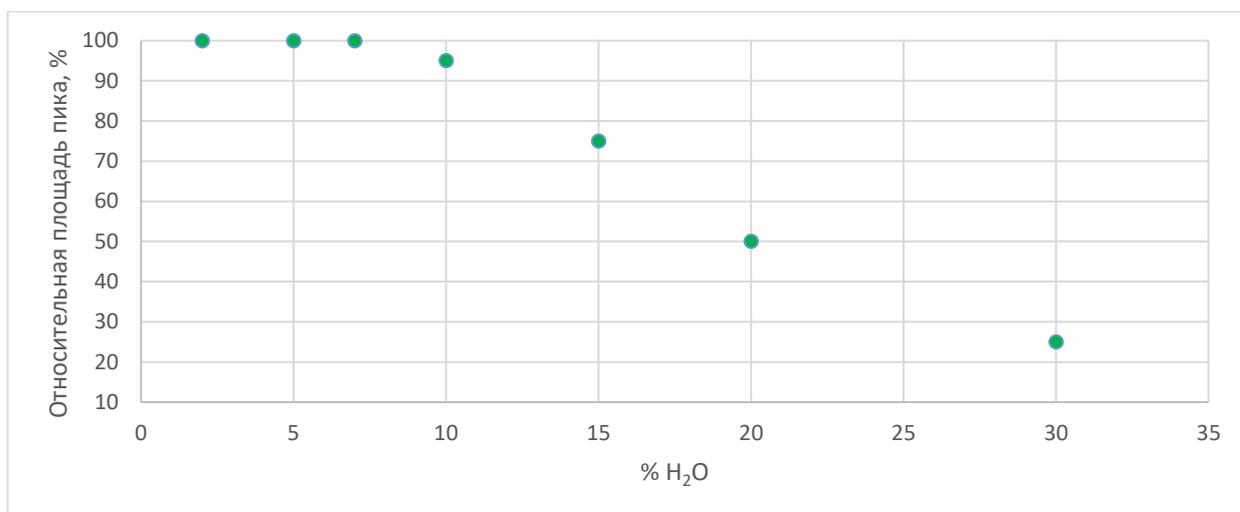
**Рис. 26.** Зависимость площади пика БФОМФК от концентрации раствора  $K_2CO_3$ .



**Рис. 27.** Зависимость площади пика БФОМФК от концентрации раствора 18-краун-6.

Изучали зависимость полноты протекания реакции от содержания воды в водно-ацетонитрильном растворе МФК. Готовили растворы МФК с концентрацией 500 нг/мл в смеси вода-ацетонитрил с различным содержанием воды по объему и проводили реакцию дериватизации при 80 °С в течение 30 минут. Полученные

значения площадей пика сравнивали и строили зависимость относительной площади пика БФОМФК от содержания воды (Рис. 28).



**Рис. 28.** Зависимость площади пика БМОМФК от содержания воды в растворе.

Из полученной зависимости видно, что при содержании воды, не превышающем 10%, реакция протекает с наибольшим выходом в выбранных условиях. При 20% содержании воды площадь пика БФОМФК снижается в 2 раза. Показано, что следует проводить реакцию дериватизации МФК с ПБФБ при содержании воды, не превышающем 10%.

Таким образом, был предложен реагент, переводящий МФК в менее полярное соединение – БФОМФК, позволяющий разработку способов определения МФК как методом гидрофильной хроматографии, так и методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

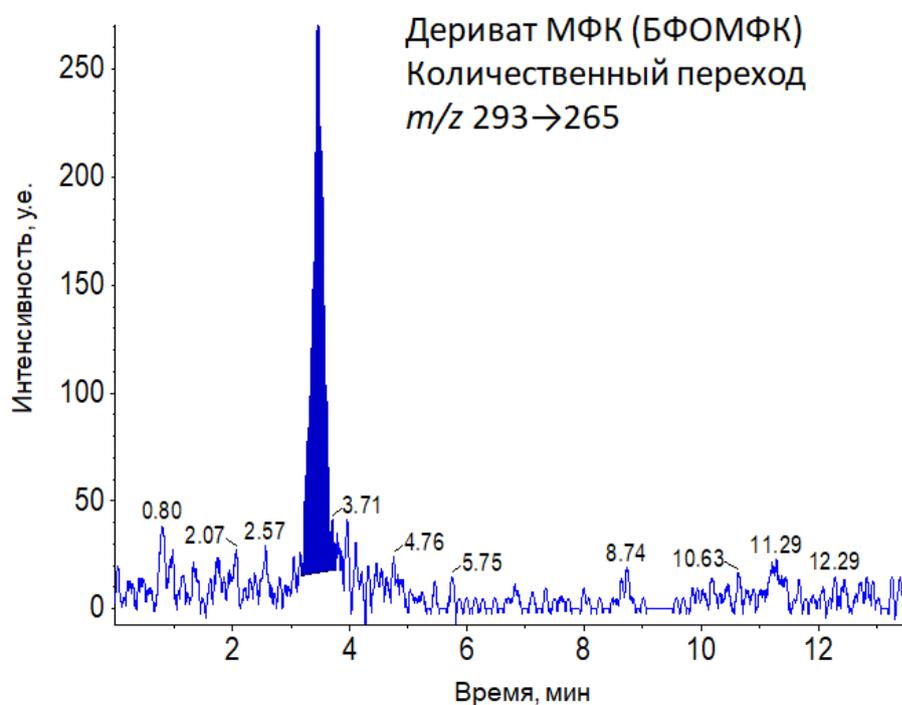
### **3.4 Разработка способа определения МФК в виде производного с ПБФБ в водных объектах методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием**

Для определения МФК в виде производного с ПБФБ в водных объектах на ультранизком уровне применяли метод гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Гидрофильная хроматография была выбрана вместо обращенно-фазовой хроматографии из соображений достижения более высокой чувствительности [49] за счет высокого содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Подбирали условия разделения, процедуру пробоподготовки

водных образцов, проводили проверку разработанного способа и апробацию при анализе реальных образцов воды, полученных в ходе официального теста, проводимого лабораторией ОЗХО.

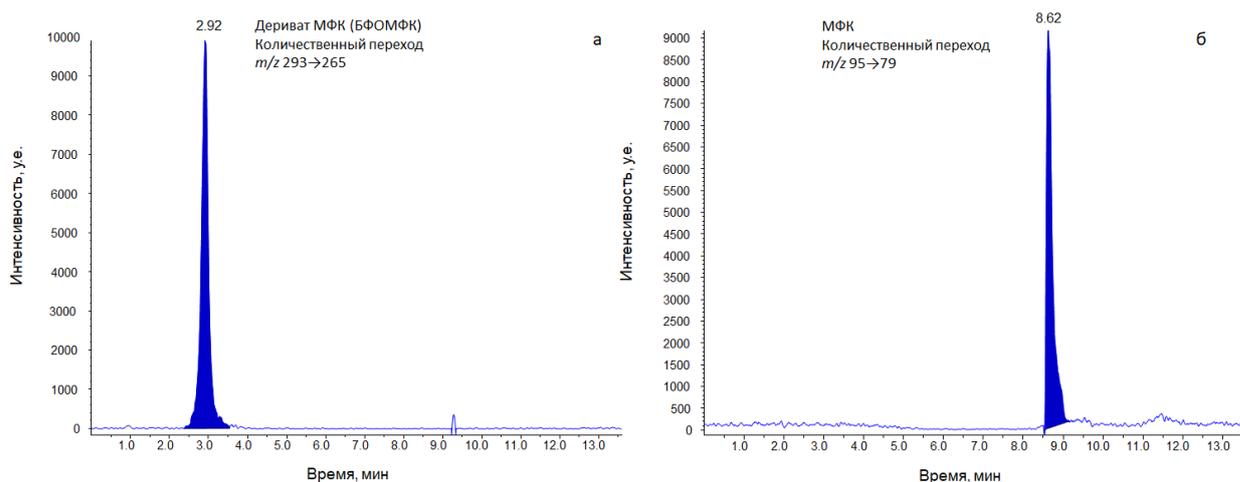
*Подбор хроматографических условий.* Разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 × 4.6 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали водные растворы ацетата аммония и ацетонитрил, наиболее часто используемую подвижную фазу в гидрофильной хроматографии [132]. Подвижную фазу подавали при скорости потока 1.5 мл/мин. Применяли режим градиентного элюирования. Были выбраны условия хроматографического разделения (Рис. 29), позволяющие достичь приемлемого значения кажущегося коэффициента емкости ( $k'=2.4$ ), кажущейся эффективности (3840 ГТ/м) и формы хроматографического пика при высоком содержании ацетонитрила в подвижной фазе (90%). Примененная программа градиентного элюирования представлена в таблице 5.

Изучали влияние концентрации ацетато-аммонийного буферного раствора на эффективность и форму хроматографического пика БФОМФК. Концентрацию ацетата аммония варьировали в диапазоне от 5 до 20 мМ. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании 10 мМ водного раствора ацетата аммония.



**Рис. 29.** 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. Программа градиентного элюирования представлена в таблице 5.

В выбранных условиях БФОМФК имеет время удерживания, соответствующее высокому содержанию ацетонитрила в подвижной фазе (Табл. 5). Полученное значение кажущегося коэффициента емкости - 2.4, удовлетворяет значению (1.5-4) принятому и рекомендуемому в литературе [131]. Коэффициент асимметрии пика БФОМФК составил значение 0.88, свидетельствующее о хорошей форме пика, близкой к идеальной. Кажущаяся эффективность разделения составила 3840 ТТ/м. На рисунке 30 представлены хроматограммы 100 нг/мл раствора МФК в виде БФОМФК и 1000 нг/мл раствора МФК без применения дериватизации. Из рисунка 30 видно, что применение дериватизации с тандемным масс-спектрометрическим детектированием привело к снижению кажущегося коэффициента емкости БФОМФК (2.4 для БФОМФК против 9 для МФК), что делает определение МФК более экспрессным, а также приводит к 11-кратному выигрышу в чувствительности детектирования при определении МФК в виде БФОМФК.



**Рис. 30.** Хроматограммы по выбранным реакциям 100 нг/мл раствора МФК ( $m/z$  293→265) в виде БФОМФК (а) и 1000 нг/мл раствора МФК ( $m/z$  95→79) без применения дериватизации. Подвижная фаза – 10 мМ водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил. Программа градиентного элюирования представлена в таблице 5.

*Выбор условий и способа пробоподготовки.* Затруднением при определении МФК в виде производного является невозможность проведения реакции дериватизации в водной среде. Для анализа образцов природных вод необходимы упаривание водной матрицы и смена растворителя на ацетонитрил. Упаривание проводили двумя методами: первый – азеотропная отгонка при атмосферном давлении, второй – отгонка при пониженном давлении с применением ротационного испарителя.

Вода и ацетонитрил образуют азеотропную смесь при 83.7% ацетонитрила и 26.3% воды [134]. Данная азеотропная смесь имеет температуру кипения 76.5 °С. К 1 мл растворов МФК в деионизованной воде с концентрацией 200 нг/мл добавляли 5.5 и 6.5 мл ацетонитрила. Полученный раствор переносили в 5 полипропиленовых пробирок на 1.5 мл и упаривали досуха в термостате при температуре 85 °С. Образцы, к которым был добавлен пятикратный избыток ацетонитрила, не упарились досуха по прошествии 1.5 часов. Этот факт может быть связан с испарением ацетонитрила до достижения температуры кипения азеотропной смеси. В результате этого образовывался раствор с соотношением компонентов не азеотропного состава. При добавлении 6.5 мл происходило полное испарение смеси в течение часа. Таким образом, дальнейшие эксперименты проводили с добавлением 6.5 мл ацетонитрила. К 5 пробиркам после упаривания досуха было добавлено по 40 мкл ацетонитрила. Растворы подвергали ультразвуковой экстракции в течение 5 минут. Затем 5 растворов объединяли в один. Конечный объем составил 200 мкл (ожидаемый коэффициент концентрирования 5). К 200 мкл ацетонитрильного раствора МФК добавляли 20 мкл раствора п-бромфенацилбромида с концентрацией 10 мг/мл, 4 мкл 18-краун-6 с концентрацией 20 мг/мл и 4 мкл раствора  $K_2CO_3$  с концентрацией 20 мг/мл. Далее регистрировали хроматограммы полученного производного. Коэффициент концентрирования оценивали путем сравнения площади пика образца после упаривания и дериватизации с площадью пика производного, полученного при дериватизации раствора МФК в ацетонитриле с концентрацией 1 мкг/мл. Коэффициент концентрирования оказался ниже 0.5. Таким образом, в процессе упаривания и концентрирования данным методом было потеряно более 90% МФК. Для улучшения коэффициента концентрирования, после упаривания досуха, к пяти пробиркам вместо 40 мкл ацетонитрила добавляли по 5 мкл воды и 35 мкл ацетонитрила. Коэффициент концентрирования оценивали путем сравнения площади пика БФОМФК, полученного после упаривания с площадью пика БФОМФК, полученного из раствора МФК с концентрацией 1 мкг/мл, растворенного в 25 мкл воды и 175 мкл ацетонитрила. Был получен коэффициент концентрирования равный 2, а потери МФК составили 60%.

Были оптимизированы условия упаривания на ротационном испарителе. В круглодонную колбу на 10 мл порциями по 2 мл добавляли 10 мл водных растворов

МФК с концентрацией 20 нг/мл. На насосе, создающем пониженное давление, выставляли минимальное значение 15 мбар. На термостате, обогревающем колбу, выставляли 35 °С для минимизации возможных потерь при более высокой температуре. Так как в предыдущих экспериментах было выяснено, что содержание воды не должно превышать 100 мкл, то упаривание проводили до объема, не превышающего 100 мкл. Доводили ацетонитрилом до объема 1 мл (ожидаемый коэффициент концентрирования 10) и колбу помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. В процессе упаривания данным способом в каплеуловителе конденсировались капли жидкости и давление в системе не снижалось до установленного значения 15 мбар, а держалось на уровне 40 мбар. В результате этого происходили большие потери МФК (97%) и был получен коэффициент концентрирования равный 0.3. Коэффициент концентрирования оценивали при помощи сравнения площади пика БФОМФК, полученного после упаривания и площади пика БФОМФК, полученного в растворе МФК с концентрацией 200 нг/мл, добавленного в колбу после упаривания воды, не содержащей МФК. Во избежание накопления капель жидкости в каплеуловителе был применен способ, включающий в себя обогрев каплеуловителя до и во время упаривания. Применение данного способа привело к снижению давления в системе до установленного значения 15 мбар и в каплеуловителе не наблюдалось накопление капель жидкости. В результате это привело к существенному увеличению коэффициента концентрирования, который составил 9 (коэффициент концентрирования рассчитывали аналогично). Потери МФК данным методом упаривания и концентрирования не превышали 10%.

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

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

*Оценка метрологических характеристик и проверка разработанной процедуры.* Проводили проверку разработанного способа определения МФК в водных объектах. Для этого оценивали селективность, воспроизводимость результатов, матричный эффект, коэффициент концентрирования при упаривании, предел обнаружения, наименьшую определяемую концентрацию, линейную область градуировочной зависимости. Селективность определяли, как способность процедуры измерять содержание аналита в присутствии мешающих компонентов, возможно присутствующих в матрице реальных образцов. На рисунке 31 представлена хроматограмма, демонстрирующая разделение двух образцов: раствора МФК в деионизованной воде с концентрацией 10 нг/мл и реальной воды с добавкой МФК до концентрации 10 нг/мл. Как видно из рисунка 31, МФК в деионизованной воде и в реальном образце воды имеет одинаковое время удерживания и форму хроматографического пика, не искаженную влиянием каких-либо мешающих компонентов, что является первым удовлетворительным критерием, подтверждающим достижение хорошей селективности способа. Более того, далее будет показано, что отсутствие матричного эффекта представляет собой последнюю цель в достижении удовлетворительной селективности.

Определяли предел обнаружения, наименьшую определяемую концентрацию и область линейности градуировочной зависимости. Для этого делали добавки МФК в выбранном диапазоне концентраций (*раздел 2.3*) в образцы деионизованной воды, проводили упаривание 10 мл полученных растворов, добавляли ацетонитрил до объема 1 мл и проводили реакцию дериватизации. Полученные метрологические характеристики представлены в таблице 12.

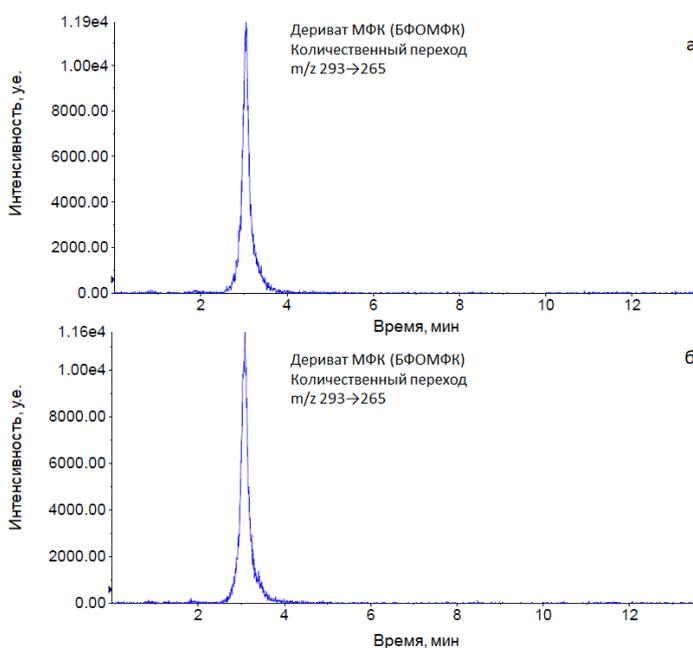
**Таблица 12.** Метрологические характеристики при определении МФК в виде БФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофлюидной хроматографии

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

Достигнутый предел обнаружения МФК в несколько раз превосходит значения, ранее описанные в литературе (Табл. 1).

Получали точное значение коэффициента концентрирования при упаривании на двух уровнях концентраций – 0.4 и 6 нг/мл. Для расчета коэффициента концентрирования делали добавки МФК в образцы деионизированной воды до и после упаривания. Коэффициент концентрирования вычисляли как отношение между средней площадью пика БФОМФК в образцах до и после упаривания. В результате при упаривании коэффициент концентрирования составил значение  $9 \pm 0.5$  на двух уровнях концентрации – 0.4 и 6 нг/мл.

Матричный эффект также определяли на двух уровнях концентраций – 0.4 и 6 нг/мл. Для этого делали добавки МФК в образцы деионизированной воды. Далее образцы упаривали, растворяли в ацетонитриле и проводили реакцию дериватизации. Во второй серии экспериментов делали добавки МФК в образцы речной, колодезной и водопроводной воды и проводили аналогичные стадии. Матричный эффект рассчитывали по следующей формуле:  $MЭ, \% = 100 \times \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$ , где  $S_1$ -средняя площадь пика МФК в реальных водах, а  $S_2$  – средняя площадь пика МФК в деионизированной воде. Полученное значение матричного эффекта, равное -2 %, схожее на двух уровнях концентраций, показывает, что матричные компоненты не влияют на сигнал БФОМФК либо были эффективно устранены при упаривании (Табл. 13).



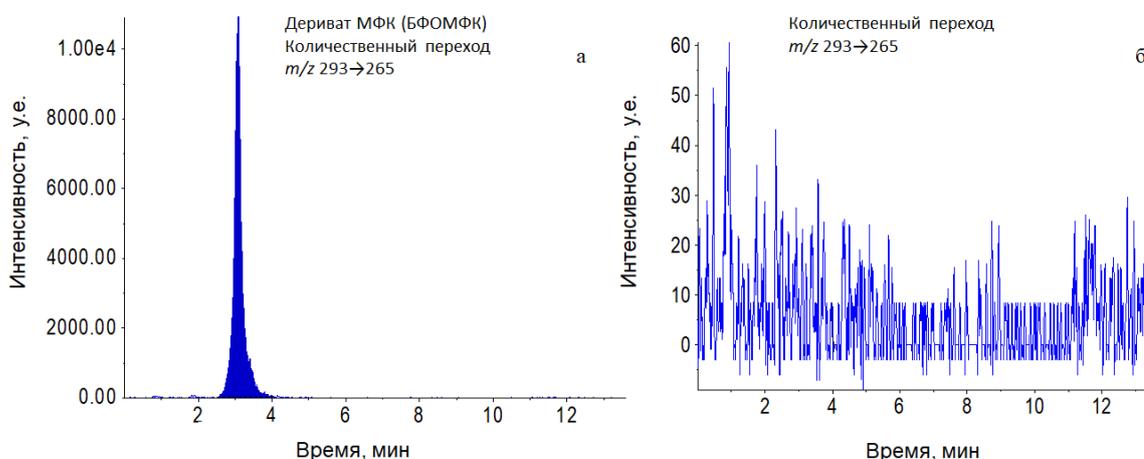
**Рис. 31.** Масс-хроматограммы по выбранной реакции  $m/z$  293→265 раствора МФК в деионизированной воде с концентрацией 10 нг/мл (а) и реальной воды с добавкой МФК до концентрации 10 нг/мл (б). Подвижная фаза – 10 мМ водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил. Программа градиентного элюирования представлена в таблице 5.

Воспроизводимость измерений оценивали в терминах прецизионности и ВЛП. Для определения прецизионности 5 различных образцов МФК с концентрациями 0.3 и 6 нг/мл были проанализированы в один день. Для определения ВЛП вводили растворы МФК с концентрациями 0.3 и 6 нг/мл в течение 2 дней, по 5 повторений в течение дня. Значения относительного стандартного отклонения (ОСО) при оценке прецизионности и ВЛП составили 6% и 25%, соответственно.

**Таблица 13.** Среднее значение матричного эффекта при определении МФК в виде производного с ПБФБ (n=3) в условиях гидрофильной хроматографии

Тип воды	Матричный эффект, %	
	концентрация МФК - 0.4 нг/мл	концентрация МФК - 6 нг/мл
Колодезная вода	-2	-1
Речная вода	-4	-6
Водопроводная вода	-6	-4

*Апробация.* Разработанный способ применяли к образцам воды, полученным 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 10.6 нг/мл, в холостой пробе воды подтверждено отсутствие МФК (Рис. 32).



**Рис. 32.** Хроматограммы по выбранной реакции  $m/z$  293→265 образца тестовой (а) и холостой (б) проб воды, которые были получены в рамках официального теста, проводимого лабораторией ОЗХО.

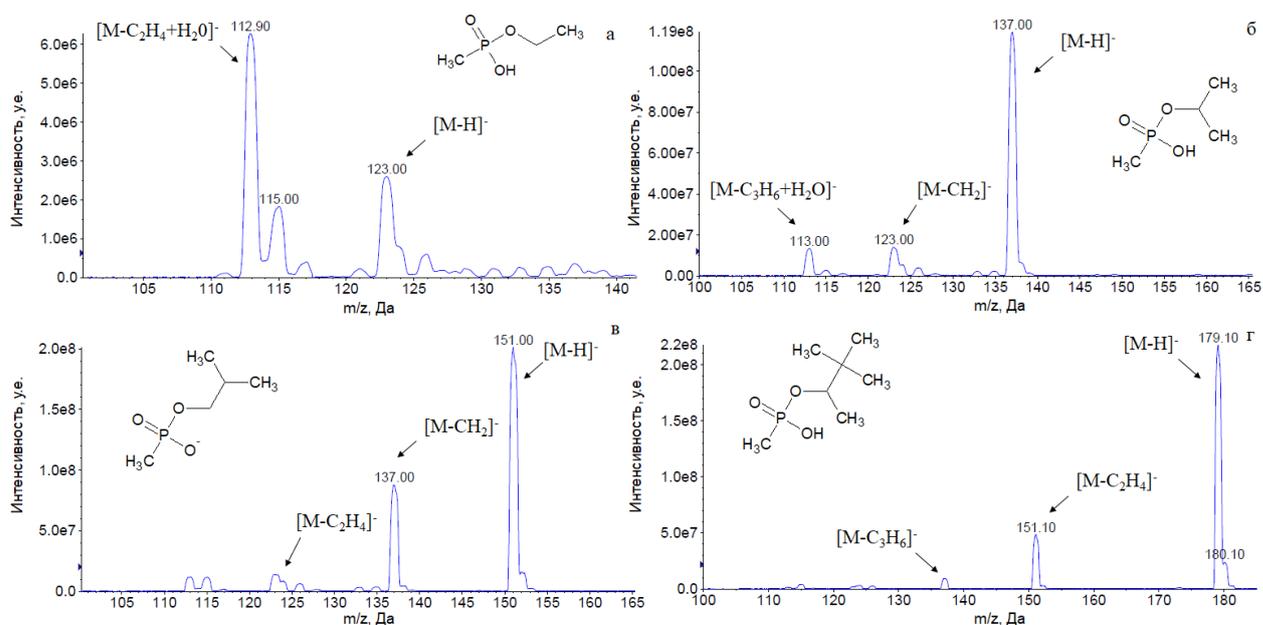
Таким образом, был разработан простой способ высокочувствительного определения МФК на ультранизком уровне (0.1 нг/мл) в водных объектах, не требующий применения твердофазной либо жидкость-жидкостной экстракции. Способ характеризуется высоким коэффициентом концентрирования, отсутствием мешающего влияния матричных компонентов и хорошей воспроизводимостью результатов.

### **3.5 Разработка способа определения МФК в виде производного с ПБФБ в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием**

Разработанный способ определения МФК в водных объектах был применен к анализу грунто-пылевых смесей, собранных с территории ликвидированного завода по производству химического оружия, расположенного в городе Волгограде. Для того, чтобы показать применимость разработанного способа не только для анализа МФК, также совместно с МФК определяли алкилметилфосфоновые кислоты: этилметилфосфоновую кислоту (ЭМФК), изопропилметилфосфоновую кислоту (иПрМФК), изобутилметилфосфоновую кислоту (иБуМФК) и пинаколилметилфосфоновую кислоту (ПинМФК). Было обнаружено, что в выбранных условиях дериватизации МФК, АМФК не реагируют с ПБФБ. Более высокие значения  $pK_a$  АМФК по сравнению с МФК (2.75 для ЭМФК, 2.38 для иПрМФК, 2.50 для ПинМФК [43] против 2.12 для МФК [7]) предотвращают образование требуемых нуклеофилов. По той же причине объясняется отсутствие образования МФК с двумя *p*-бромфенацильными группами. Дериватизация данных молекул может быть достигнута при более высоких значениях  $pH$  с использованием сильных оснований или более высокой концентрации карбоната калия [56]. Подобные результаты, полученные для исследуемых АМФК с различной степенью разветвления, доказывают, что стерические эффекты не оказывают влияния на реакцию дериватизации. Данный факт позволил разработать способ совместного определения МФК в виде производного с ПБФБ и АМФК методом гидрофильной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Для МФК и АМФК были достигнуты ультранизкие пределы обнаружения. Способ применяли к образцам грунто-пылевых смесей с территории ликвидированного завода по производству химического оружия.

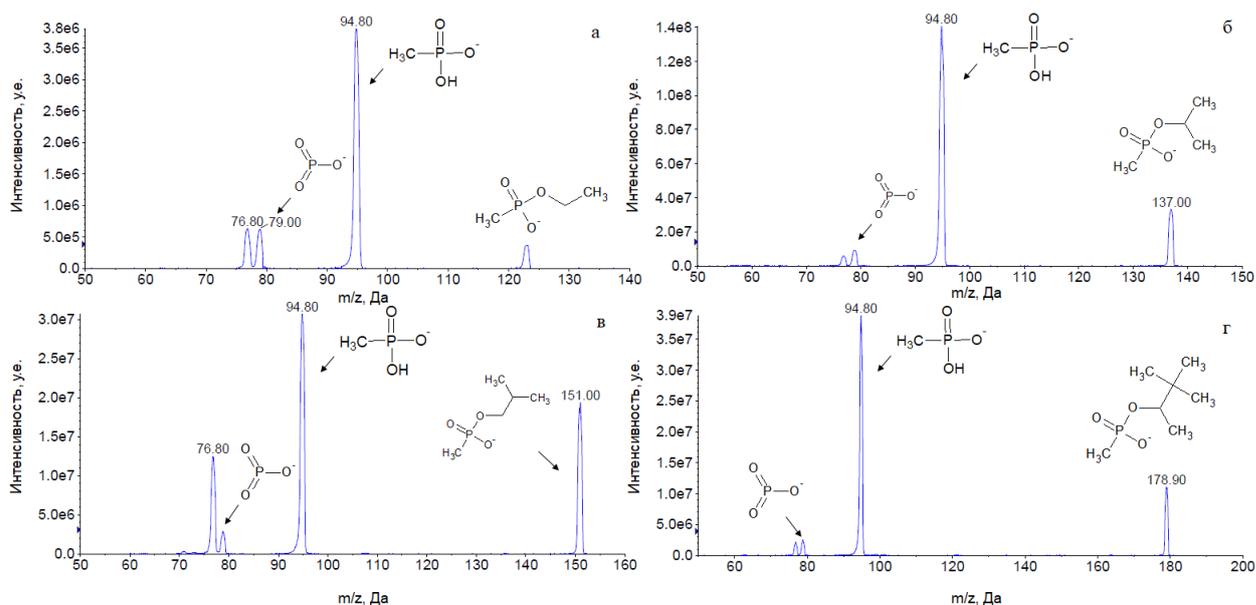
### Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования АМФК.

При помощи шприцевого насоса при постоянной скорости 3 мкл/мин вводили растворы АМФК в источник ионов масс-спектрометра. Получали масс-спектры АМФК только в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (Рис. 33), так как производное МФК практически не ионизируется в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Из рисунка 33 видно, что во всех масс-спектрах присутствуют интенсивные сигналы, соответствующие депротонированным молекулам АМФК, которые в небольшой степени (кроме ЭМФК) характерно фрагментируются с отщеплением алкильных радикалов. Получали масс-спектры ионов продуктов, образующихся из депротонированных молекул АМФК (Рис. 34). Как видно из рисунка 34, все АМФК в ячейке соударений фрагментируются с отщеплением О-алкильных радикалов ( $m/z$  95) и всех алкильных радикалов ( $m/z$  79).



**Рис. 33.** Масс-спектры ЭМФК (а), иПрМФК (б), иБуМФК (в), ПинМФК (г), полученные в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.

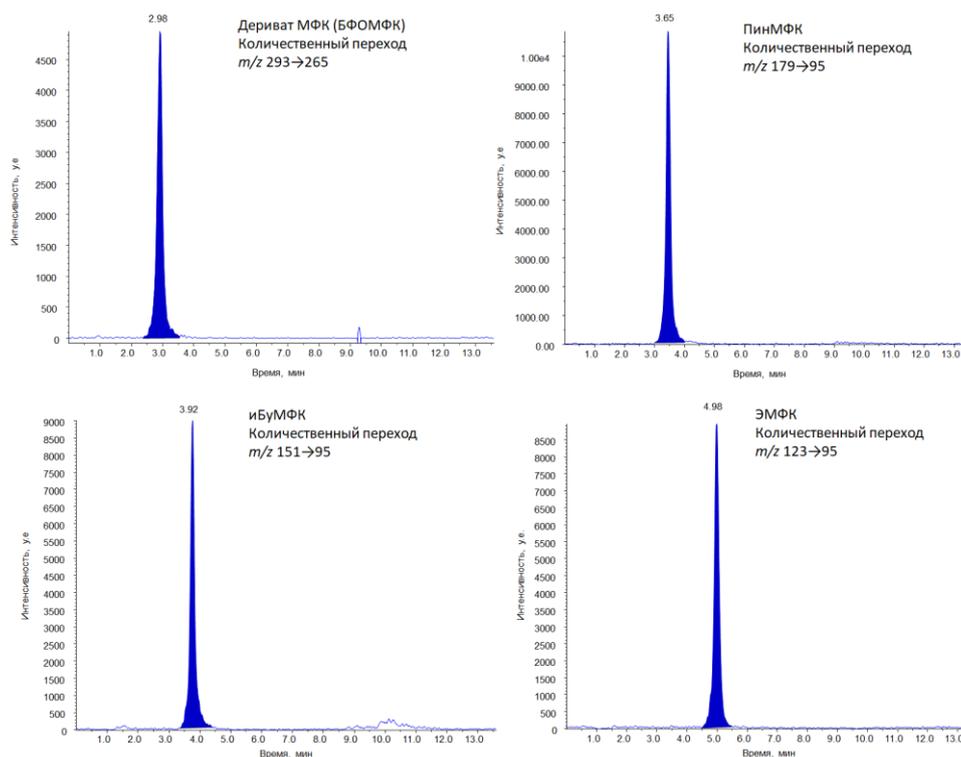
Варьировали значения потенциала декластеризации и энергии соударений для достижения максимальной интенсивности ионов-предшественников и ионов-продуктов. В таблице 6 представлены подобранные значения ПД и ЭС для АМФК. Наиболее интенсивным ионом-продуктом для всех АМФК являлся ион с  $m/z$  95, который использовали для определения, ион с  $m/z$  79 использовали для качественного подтверждения.



**Рис. 34.** Масс-спектры ионов-продуктов ЭМФК (а), иПрМФК (б), иБуМФК (в) и ПинМФК (г).

В работе был использован входной потенциал, равный -10 В и потенциал на выходе из ячейки соударений, равный -5 В.

*Подбор хроматографических условий.* Разделение проводили на колонке Luna HILIC (150 × 4.6, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали водные растворы ацетата аммония и ацетонитрил. Подвижную фазу подавали со скоростью 1.5 мл/мин. Применяли режим градиентного элюирования. Программу градиентного элюирования подбирали таким образом, чтобы достичь приемлемое значение кажущегося коэффициента емкости (1.5-4) БФОМФК и АМФК, кажущейся эффективности и формы хроматографического пика при высоком содержании ацетонитрила в подвижной фазе. Наилучшую кажущуюся эффективность и форму пика БФОМФК получали, используя программу градиентного элюирования, представленную в Табл. 5. В выбранных условиях БФОМФК и АМФК разделялись согласно их полярности: БФОМФК, ПинМФК, иБуМФК, иПрМФК и ЭМФК (Рис. 35).



**Рис. 35.** Хроматограмма смеси МФК, ЭМФК, иБуМФК, ПинМФК по выбранным реакциям (иПрМФК не показана). Подвижная фаза - 10 мМ ацетат аммония и ацетонитрил. Скорость потока 1.5 мл/мин. Программа градиентного элюирования представлена в таблице 5.

В выбранных условиях были получены следующие хроматографические характеристики БФОМФК и АМФК (Табл. 14).

**Таблица 14.** Хроматографические характеристики определения БФОМФК и АМФК

Вещество	Кажущаяся эффективность N, ТТ/м	Кажущийся коэффициент емкости, $k'$	Коэффициент асимметрии, $A_s$
БФОМФК	3840	2.4	0.88
ПинМФК	14107	3.0	1.35
иБуМФК	16753	3.3	0.89
иПрМФК	8737	3.9	0.75
ЭМФК	7346	4.5	0.95

Таким образом из таблицы 14 и рисунка 35 видно, что были получены симметричные пики с хорошей эффективностью и необходимым коэффициентом емкости, лежащим в диапазоне от 2.4 до 4.5, что практически полностью удовлетворяет рекомендуемому в литературе [131] значению (1.5-4). Так же из программы градиентного элюирования (Табл. 5) видно, что хроматографическое разделение происходило в области высокого содержания ацетонитрила, которое

положительно сказывается на чувствительности масс-спектрометрического детектирования.

*Оценка метрологических характеристик и проверка разработанной процедуры.* Определяли предел обнаружения, наименьшую определяемую концентрацию и линейную область градуировочной зависимости. Для этого делали добавки МФК и АМФК в образцы холостных образцов грунто-пылевых смесей, экстрагировали 10 мл воды, упаривали на ротационном испарителе до объема, не превышающего 100 мкл, добавляли ацетонитрил до объема 1 мл и проводили реакцию дериватизации. Разработанная процедура пробоподготовки в комбинации с дериватизацией, гидрофильной хроматографией и масс-спектрометрическим детектированием позволяет определять МФК, ЭМФК, иПрМФК, иБуМФК и ПинМФК с пределами обнаружения 0.2 (2), 0.06 (0.72), 0.008 (0.078), 0.008 (0.083) и 0.005 (0.049) нг/мл (нг/г), соответственно. Градуировочные зависимости были линейны в следующих диапазонах концентраций: 0.6-60 нг/мл для МФК, 0.18-50 нг/мл для ЭМФК, 0.024-50 нг/мл для иПрМФК, иБуМФК и 0.015-50 нг/мл для ПинМФК. Коэффициент корреляции для каждой кислоты превышал значение 0.995.

Степень извлечения кислот и коэффициент концентрирования при упаривании были оценены на двух уровнях концентраций. Экстрагирование аналитов из образцов грунто-пылевых смесей проводили в ультразвуковой ванне в течение 20 минут. Увеличение времени экстрагирования до 30 и 60 минут не привело к увеличению степени извлечения, таким образом, время экстрагирования равное 20 минутам было выбрано как наиболее подходящее. Были достигнуты следующие степени извлечения МФК и АМФК из образцов грунто-пылевых смесей: 90% для МФК и 92, 99, 94 и 94% для ЭМФК, иПрМФК, иБуМФК и ПинМФК, соответственно. Достигнутые коэффициенты концентрирования также были высоки: 9 для МФК и 9.4, 9.7, 9.8, 9.3 для ЭМФК, иПрМФК, иБуМФК и ПинМФК, соответственно. Данные результаты показывают, что предложенная процедура пробоподготовки очень эффективна для экстрагирования МФК и АМФК из грунто-пылевых смесей.

Для оценки матричного эффекта проводили серии экспериментов на двух уровнях концентраций. В первой серии экспериментов делали добавки МФК и АМФК в образцы деионизованной воды, упаривали и проводили реакцию

дериватизации. Во второй серии экспериментов делали добавки МФК и АМФК в образцы экстрактов холостых проб грунто-пылевых смесей, упаривали и проводили реакцию дериватизации. Матричный эффект рассчитывали по следующей формуле:  $MЭ, \% = 100 \times \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$ , где  $S_1$ -площадь пика МФК или АМФК в экстракте из грунто-пылевых смесей, а  $S_2$  – площадь пика МФК или АМФК в деионизованной воде. В результате были получены следующие средние значения матричного эффекта: -40% для МФК и -12, -6, -1 и -2 % для ЭМФК, иПрМФК, иБуМФК и ПинМФК. Результаты свидетельствует о том, что матричные компоненты практически не оказывают влияния на АМФК, но оказывают влияние на МФК, однако данный факт не мешает достичь очень низких пределов обнаружения МФК.

Воспроизводимость измерений оценивали в терминах прецизионности и ВЛП. Для определения прецизионности 5 различных образцов МФК и АМФК на двух уровнях концентраций были проанализированы в один день. Для определения ВЛП вводили растворы МФК и АМФК на двух уровнях концентраций в течение 3 дней, по 5 повторений внутри дня. Сводные данные по проверке процедуры сведены в таблицу 15.

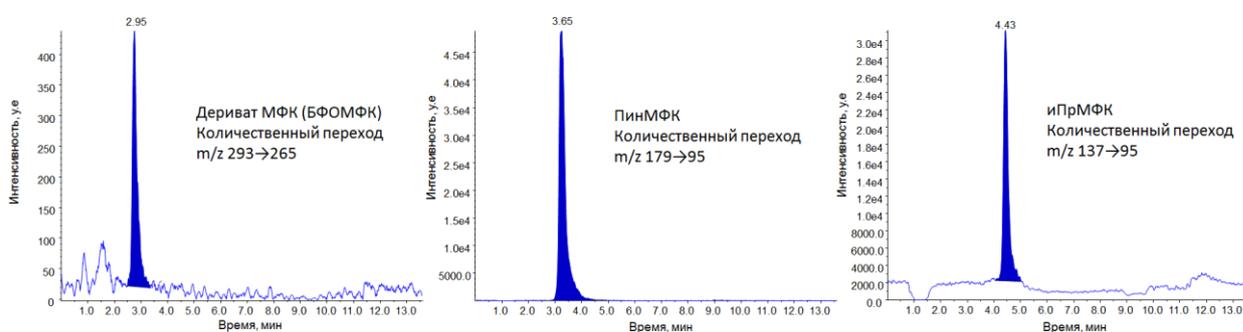
**Таблица 15.** Сводные данные по аналитическим характеристиками разработанного способа определения МФК и АМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии

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
Прецизионность (ОСО, n=5), %	6	9	5	8	12
ВЛП (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)

Как видно из таблицы 15, при сравнении с литературными данными по определению МФК в почвах (Табл. 1) нами был достигнут намного более низкий предел обнаружения МФК, чем описаны в литературе. Кроме того, ультранизкие пределы обнаружения были достигнуты также и для АМФК, что демонстрирует

селективность и применимость разработанного способа к широкому классу аналогичных МФК соединений.

*Апробация.* 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. Завод был закрыт и не функционирует более 25 лет. Образцы грунто-пылевых смесей готовили согласно разработанной схеме пробоподготовки. На рисунке 36 представлена хроматограмма в режиме мониторинга выбранных реакций одного из образцов.



**Рис. 36.** Хроматограмма образца грунто-пылевой смеси, содержащая МФК, ПинМФК и иПрМФК. Подвижная фаза – 10 мМ ацетат аммония и ацетонитрил. Скорость потока 1.5 мл/мин. Программа градиентного элюирования представлена в таблице 5.

Результаты определения содержания МФК и АМФК в грунто-пылевых смесях представлены в таблице 16.

**Таблица 16.** Результаты определения содержания МФК и АМФК в реальных образцах грунто-пылевых смесей

Номера образца	Вещество	Концентрация, мкг/г (n=3, p=0.95)
1	МФК	0.09 ± 0.01
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	0.32 ± 0.03
	иБуМФК	<ПО
	ПинМФК	<ПО
2	МФК	0.027 ± 0.004
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	0.15 ± 0.02
	иБуМФК	<ПО
	ПинМФК	0.18 ± 0.03

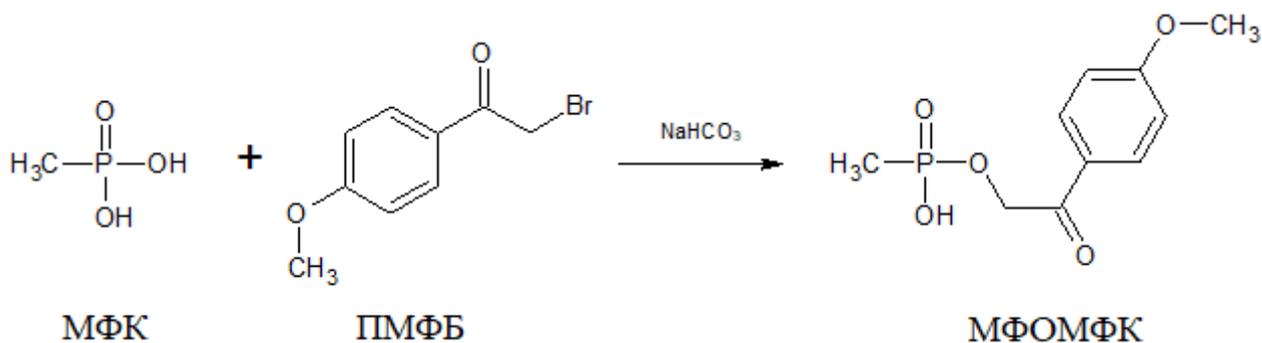
Номера образца	Вещество	Концентрация, мкг/г (n=3, p=0.95)
3	МФК	0.030 ± 0.005
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	8.7 ± 1.3
	иБуМФК	0.011 ± 0.002
	ПинМФК	2.78 ± 0.06
4	МФК	0.040 ± 0.008
	ЭМФК	<ПО
	иПрМФК	0.43 ± 0.07
	иБуМФК	<ПО
	ПинМФК	1.6 ± 0.2

Исходя из результатов, представленных в таблице 16 видно, что в реальных образцах грунто-пылевых смесей были обнаружены большие количества 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.

### **3.6 Изучение реакции дериватизации МФК п-метоксифенацилбромидом**

Недостатком при экспрессном определении МФК в природных водах без дериватизации является матричный эффект, сильно повышающий пределы обнаружения МФК. Применение дериватизации МФК с ПБФБ помогает решить данную проблему и обеспечивает ультранизкие пределы обнаружения МФК, однако недостатком такого подхода является необходимость упаривания водной матрицы и перевод МФК в ацетонитрил для проведения реакции дериватизации, что отрицательно сказывается на времени анализа. Для решения данного затруднения нами был впервые предложен новый реагент для дериватизации МФК – п-метоксифенацилбромид (ПМФБ), позволяющий проводить реакцию дериватизации напрямую в водной среде. У ПБФБ в пара положении бензольного кольца находится бром, который является гидрофобным элементом, снижающим растворимость

ПБФБ в воде, а, следовательно, и выход реакции дериватизации. Метокси фрагмент идеально сочетает в себе слабо неполярный метильный фрагмент и умеренно полярный кислородный фрагмент, за счет чего растворимость ПМФБ в воде намного превышает растворимость ПБФБ (проверено экспериментальным путем). При взаимодействии МФК и ПМФБ протекает реакция, представленная на рисунке 37, в результате которой образуется 2-(4-метоксифенил)-2-оксоэтилметилфосфовая кислота (МФОМФК).



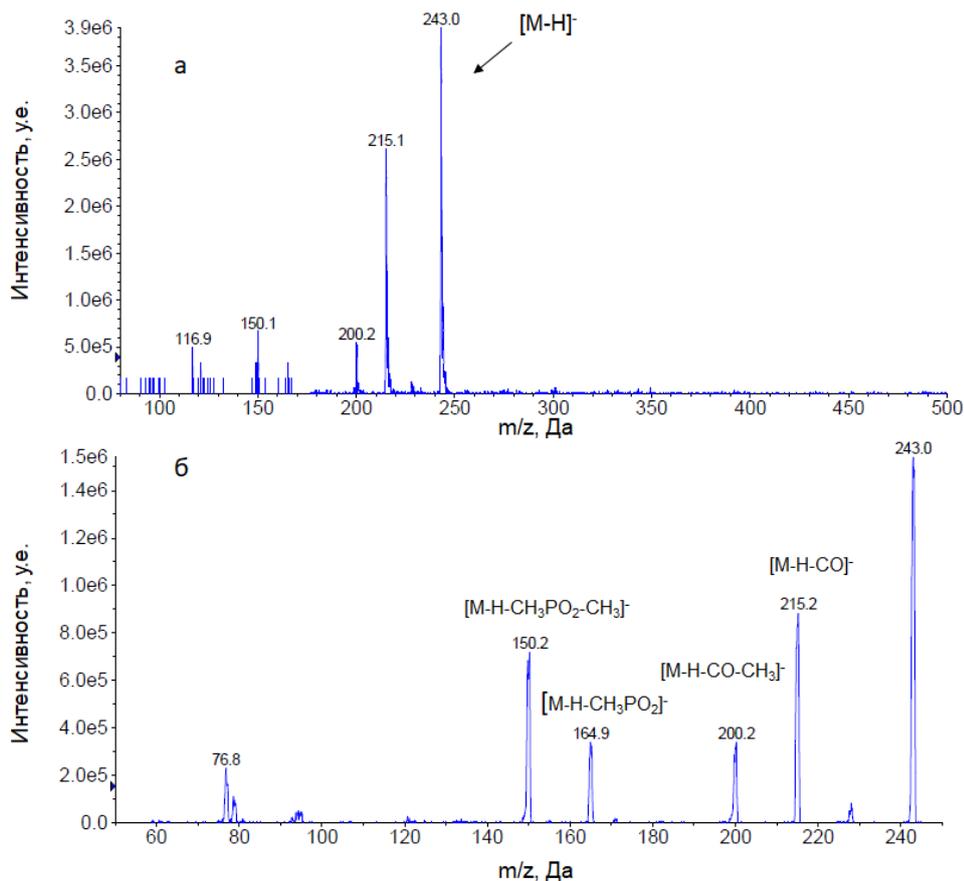
**Рис. 37.** Схема реакции дериватизации МФК п-метоксифенацилбромидом.

Реакцию дериватизации МФК п-метоксифенацилбромидом изучали при помощи обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Для определения МФОМФК была выбрана именно ОФЖХ из соображений экспрессности, так как реакция протекает напрямую в водной среде и нет необходимости упаривания воды и перевода МФК в менее полярный растворитель, необходимый для гидрофильной хроматографии.

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. Пробирки помещали в термостат и дериватизировали при 95 °С в течение 45 минут.

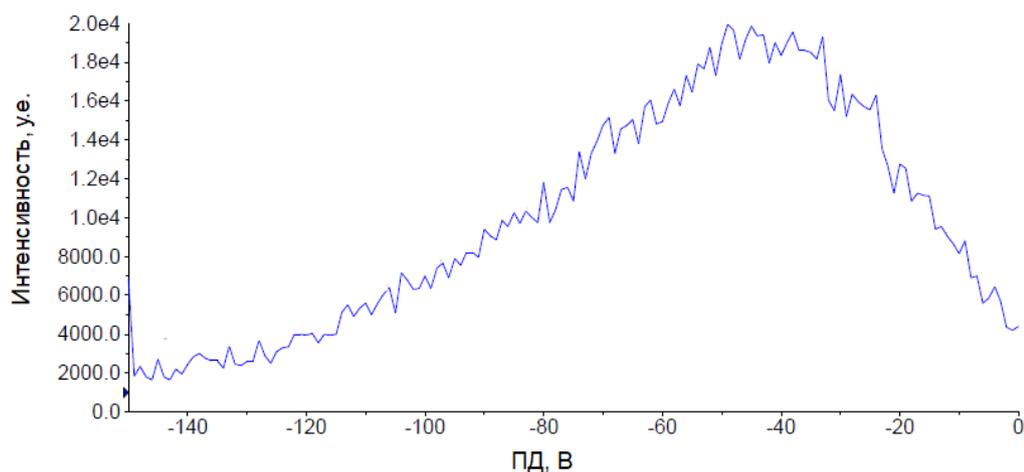
*Подбор масс-спектрометрических условий детектирования МФОМФК.* После окончания реакции дериватизации раствор охлаждали до комнатной температуры и вводили при помощи автоматического шприцевого насоса со скоростью 3 мкл/мин

в масс-спектрометр. Регистрировали масс-спектры МФОМФК и его ионов-продуктов (Рис. 38) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. В режиме регистрации положительно заряженных ионов протонированная молекула МФОМФК не образуется. В масс-спектре производного МФК наблюдается интенсивный сигнал депротонированной молекулы МФОМФК с  $m/z$  243 (Рис. 38а). При фрагментации иона-предшественника с  $m/z$  243 наблюдается образование ионов-продуктов с  $m/z$  150, 165, 200 и 215 (Рис. 38б).



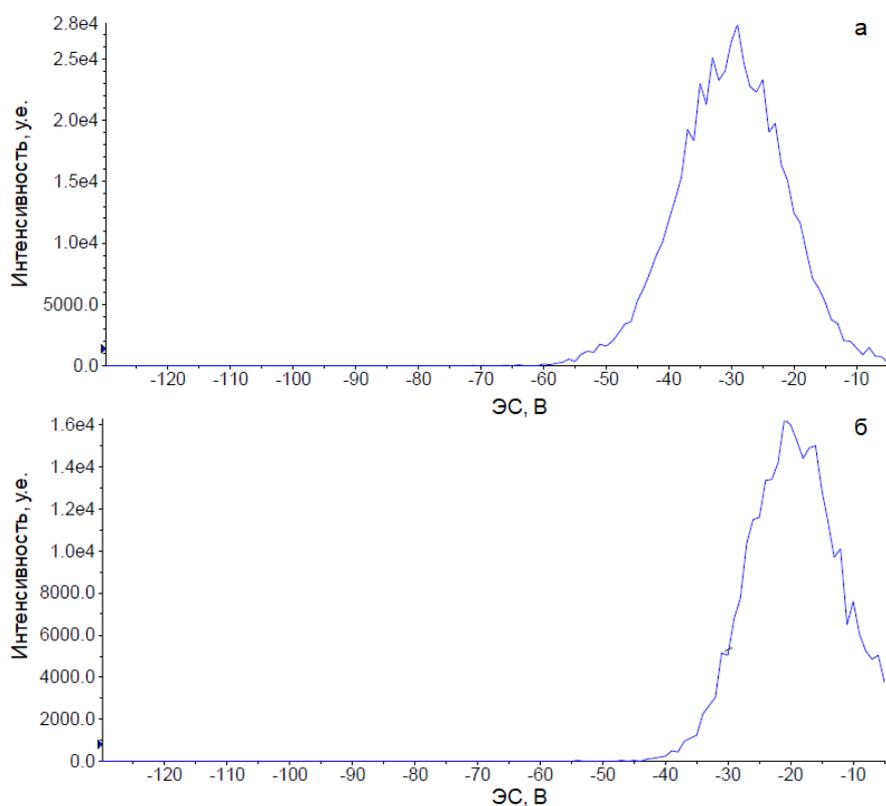
**Рис. 38.** а) Масс-спектр производного МФК с ПМФБ (МФОМФК) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (ПД -48 В) б) Масс-спектр ионов-продуктов, образующихся в ячейке соударений масс-спектрометра из депротонированной молекулы МФОМФК (ЭС -21 В).

Для оптимизации условий детектирования варьировали значение ПД и получали зависимость интенсивности сигнала, соответствующего депротонированной молекуле МФОМФК, от значений ПД (Рис. 39). Критерием выбора наиболее подходящего значения ПД являлась максимальная интенсивность сигнала депротонированной молекулы МФОМФК. Из рисунка 39 видно, что максимальная интенсивность депротонированной молекулы МФОМФК с  $m/z$  243 достигается при значении ПД - 48 В.



**Рис. 39.** Зависимость интенсивности сигнала, соответствующего депротонированной молекуле МФОМФК с  $m/z$  243  $[M-H]^-$ , от значений ПД.

Из рисунка 40 видно, что сигналы с  $m/z$  150 и 215 являются наиболее интенсивными среди остальных сигналов. Максимальная интенсивность сигналов, соответствующих данным ионам-продуктам, достигается при значениях ЭС, равных -30 и -21 В, соответственно (Рис. 40). Значения входного потенциала и потенциала на выходе из ячейки соударений равнялись -10 и -5 В, соответственно.



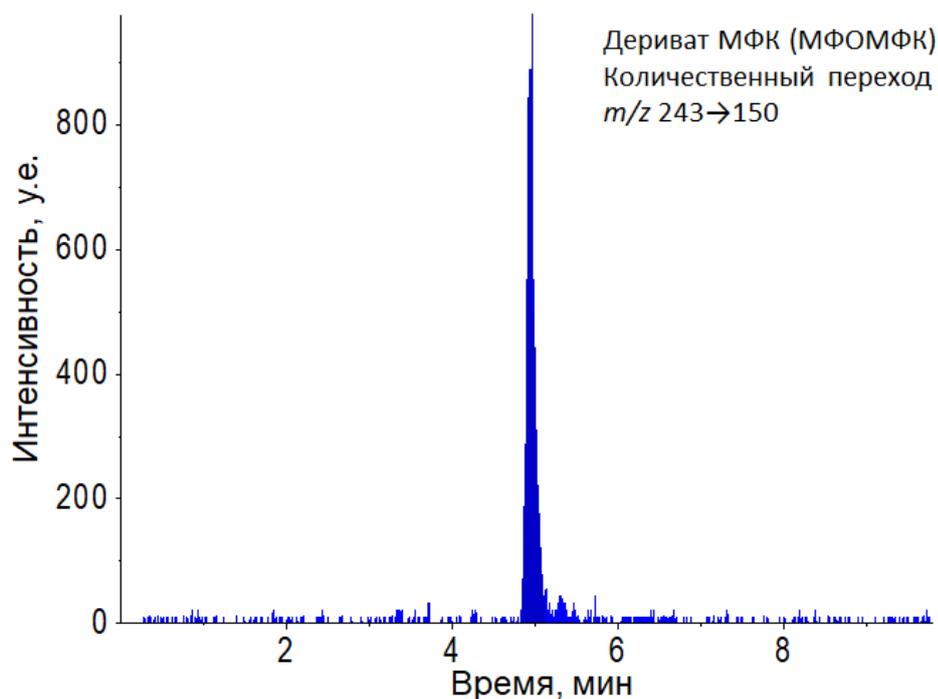
**Рис. 40.** Зависимость интенсивности сигналов с  $m/z$  150 (а) и  $m/z$  215 от значений ЭС.

Таким образом, для масс-спектрометрического определения нами были выбраны 2 перехода: наиболее интенсивный переход  $m/z$  243→150 для определения и переход  $m/z$  243→215 для качественного подтверждения.

### **3.7 Разработка способа определения МФК в водных объектах в виде производного с ПМФБ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием**

Предложенная реакция дериватизации МФК с ПМФБ, позволяющая проводить дериватизацию МФК напрямую в водных объектах открыла возможность создания экспрессного, надежного и чувствительного 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. Разработанный способ применяли к реальным образцам воды, полученным в ходе лабораторного теста ОЗХО.

*Разработка условий хроматографического разделения.* Хроматографическое разделение проводили на обращенно-фазовой колонке Acclaim RSLC (150 × 2.1 мм, 2.2 мкм). В качестве подвижной фазы использовали наиболее часто применимую смесь растворителей, состоящую из 0.1% водного раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила. 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. В подобранных условиях (Табл. 7) для МФОМФК (Рис. 41) был достигнут высокий кажущийся коэффициент емкости (3.8), удовлетворяющий рекомендуемому в литературе значению. Кажущаяся эффективность хроматографического разделения была высока (109682 ТТ/м).



**Рис. 41.** 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 7.

*Изучение влияния матричного эффекта.* Для изучения возможного влияния матричного эффекта добавляли одно и тоже количество МФК в деионизованную воду и 5 различных типов воды: вода из колодца, из скважины, из родника и два образца водопроводной воды, отобранные на Химическом факультете МГУ и в Главном Здании МГУ. Проводили реакцию дериватизации с ПМФБ и анализировали полученные растворы в подобранных условиях. Матричный эффект рассчитывали по следующей формуле:  $МЭ, \% = 100 \times \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$ , где  $S_1$  – площадь пика МФК в реальных водах, а  $S_2$  – площадь пика МФК в деионизованной воде. В таблице 17 представлены результаты определения матричного эффекта при определении МФК в виде производного с ПМФБ.

**Таблица 17.** Среднее значение матричного эффекта ( $n=3$ ) в образцах реальных вод при определении МФК в виде производного с ПМФБ в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Образец воды	Вода из колодца	Вода из скважины	Вода из родника	Водопроводная вода (ХФ)	Водопроводная вода (ГЗ МГУ)
Матричный эффект, %	16	58	41	58	60

Как видно из таблицы 17, в образцах реальной воды наблюдается положительный матричный эффект, завышающий содержание МФК. Так как в качестве катализатора реакции выступал карбонат калия, то было логичным предположить, что в составе реальных вод присутствует либо более подходящий катион, либо анион соли. На первой стадии изучали влияние основных наиболее распространенных катионов металлов вод. Проанализировав литературные данные по примерному содержанию катионов натрия, калия, магния и кальция в реальных водах [135] готовили модельные растворы МФК в деионизованной воде с добавками солей, содержащих катионы натрия, калия, магния и кальция в диапазоне концентраций соответствующих катионов от 0.4 до 100 мкг/мл. В качестве солей использовали карбонат натрия, карбонат калия, хлорид кальция и сульфат магния. К полученным растворам добавляли карбонат калия (20 мг/мл) и ПМФБ (10 мг/мл) и проводили реакцию дериватизации. После проведения дериватизации образцы анализировали и вычисляли значения матричного эффекта при помощи сравнения полученных площадей пиков производных с площадью пика производного в растворе МФК в деионизованной воде без добавления солей, содержащих какие-либо дополнительные катионы металлов. Полученные результаты представлены в таблице 18.

**Таблица 18.** Матричный эффект при определении МФК в виде производного при добавлении солей, содержащих катионы натрия, калия, магния и кальция

Катион соли	Среднее значение матричного эффекта (n=3), %				
	Концентрация катиона соли, мкг/мл				
	0.4	2.0	10.0	50.0	100.0
Na	-13	-10	-15	-2	-2
K	-9	-9	-12	-6	-7
Ca	-10	-17	-6	-17	-11
Mg	-16	-4	-11	-9	-8

Как видно из таблицы 18, в данном диапазоне концентраций катионов металлов в модельных растворах, положительного матричного эффекта не наблюдается, что может свидетельствовать о том, что катионы металлов не оказывают положительного влияния на реакцию дериватизации, либо в анализируемых образцах воды их содержание превосходит содержание в модельных растворах. Для

проверки второго предположения при помощи метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой [136] анализировали соответствующие 5 образцов воды. В таблице 19 приведены найденные значения концентраций катионов натрия, калия, магния и кальция.

**Таблица 19.** Содержание катионов металлов в анализируемых образцах воды

Катион соли	Концентрация катиона металла, мкг/мл				
	Вода из колодца	Вода из скважины	Вода из родника	Водопроводная вода (ХФ)	Водопроводная вода (ГЗ МГУ)
Na	79	8	4	17	25
K	8	3	9	3	3
Mg	20	18	12	14	18
Ca	73	67	48	55	61

Как видно из таблицы 19, в анализируемых образцах воды катионы металлов находятся в выбранном диапазоне концентраций металлов модельных растворов. Таким образом, можно сделать вывод, что катионы металлов реальных образцов воды, не оказывают положительного влияния на реакцию дериватизации и не являются причиной положительного матричного эффекта.

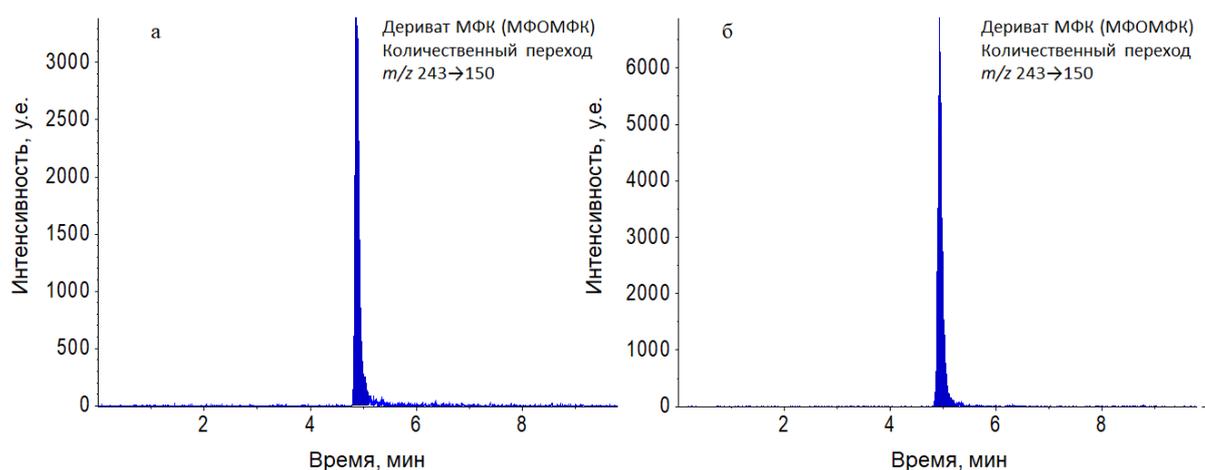
На следующей стадии работы изучали влияние на реакцию дериватизации наиболее распространенных анионов воды, которыми является гидрокарбонат, хлорид и сульфат-ионы [73]. Хлорид и сульфат-ионы входили в состав солей, содержащих кальций и магний на стадии изучения влияния катионов. Из чего следует вывод, что данные анионы не могут оказывать положительного влияния на реакцию дериватизации. По этой причине изучали влияние только гидрокарбонат-иона на реакцию дериватизации, для чего к растворам МФК в деионизованной воде добавляли раствор гидрокарбоната натрия. Уже небольшая добавка гидрокарбоната натрия (25 мкг/мл) вызывала небольшое увеличение площади пика производного МФК. Модельный раствор МФК с концентрацией добавки гидрокарбоната натрия 200 мкг/мл давал примерно такую же площадь пика производного, как и в реальных образцах воды, в которых был замечен положительный матричный эффект (Табл. 17). Данное обстоятельство наводило на мысль о схожем содержании гидрокарбонат-иона в данных образцах воды. Для подтверждения данного

предположения проводили титрование анализируемых образцов воды [137]. Содержание найденного количества гидрокарбонат-иона представлено в таблице 20.

**Таблица 20.** Найденное содержание гидрокарбонат-иона в образцах воды

Концентрация гидрокарбонат-иона, мкг/мл				
Вода из колодца	Вода из скважины	Вода из родника	Водопроводная вода (ХФ)	Водопроводная вода (ГЗ МГУ)
217	229	287	189	171

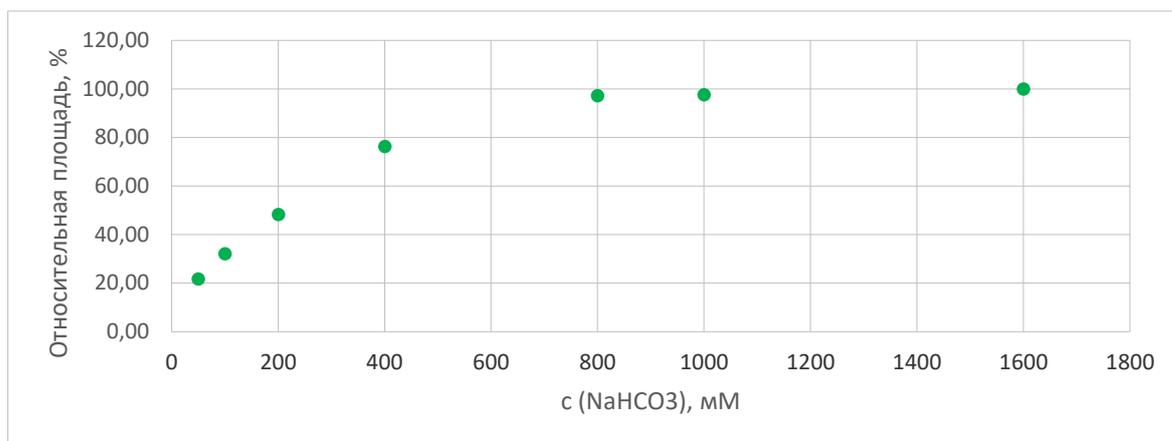
Как видно из таблицы 20, предположение подтвердилось: именно гидрокарбонат-ион ответственен за положительный матричный эффект. Более того, площадь пика МФОМФК в случае добавления раствора гидрокарбоната натрия, как единственного катализатора, без добавления раствора карбоната калия, при одной и той же концентрации, становится значительно выше (Рис. 42).



**Рис. 42.** Хроматограммы МФК в виде МФОМФК в режиме мониторинга выбранных реакций в воде с концентрацией карбоната калия 400 мкг/мл (а) и концентрацией гидрокарбоната натрия 400 мкг/мл (б).

Поэтому в дальнейшем в качестве катализатора использовали раствор гидрокарбоната натрия. Однако так как гидрокарбонат-ион может содержаться в реальных водах в различных количествах, то необходимо найти не только наиболее подходящую концентрацию гидрокарбоната натрия, при которой будет достигаться наивысшая площадь пика производного, но и ту концентрацию, при которой дополнительное количество гидрокарбонат-иона в реальных образцах воды не будет оказывать влияния на реакцию дериватизации. Для этого готовили модельные растворы МФК с концентрацией гидрокарбоната натрия в диапазоне от 50 до 1600 мкг/мл и проводили реакцию дериватизации с ПМФБ. Полученная зависимость

относительной площади пика производного МФК от концентрации гидрокарбоната натрия представлена на рисунке 43.



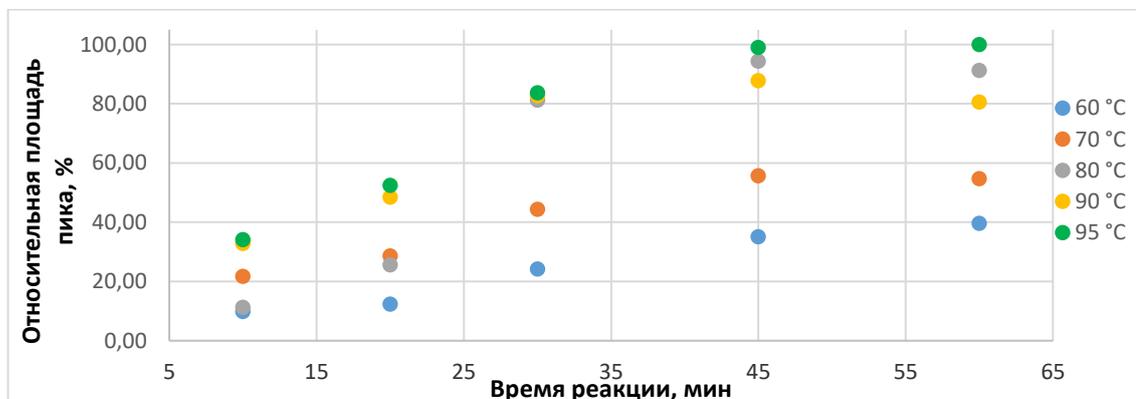
**Рис. 43.** Зависимость относительной площади пика МФОМФК от концентрации гидрокарбоната натрия.

Как видно из представленной зависимости, максимальная площадь пика производного МФК достигается при концентрации гидрокарбоната натрия, равной 800 мкг/мл, при дальнейшем увеличении концентрации, вплоть до 1600 мкг/мл, площадь пика не уменьшается и находится на плато. Содержание гидрокарбонат-иона в большинстве природных вод находится в диапазоне от 20 до 300 мкг/мл [135]. Таким образом, наиболее подходящей концентрацией добавки гидрокарбоната натрия как катализатора является 800 мкг/мл, так как при данной концентрации гидрокарбоната натрия в модельном растворе и реальных образцах воды площади пика производного МФК будут практически идентичны, несмотря на избыточное количество гидрокарбонат-иона в образцах воды. Данное предположение подтверждается практически полным отсутствием матричного эффекта при добавлении к модельному раствору и реальным образцам воды гидрокарбоната натрия до концентрации 800 мкг/мл (Табл. 21).

**Таблица 21.** Среднее значение матричного эффекта ( $n=3$ ) в образцах воды при определении МФК в виде производного с ПМФБ в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Образец воды	Вода из колодца	Вода из скважины	Вода из родника	Водопроводная вода (ХФ)	Водопроводная вода (ГЗ МГУ)
Матричный эффект, %	5	-5	4	4	-4

Для выбора наиболее подходящих условий проведения реакции дериватизации, изучали зависимости площади пика МФОМФК при температурах 60, 70, 80, 90 и 95 °С от времени термостатирования (Рис. 44). Реакцию дериватизации изучали согласно условиям, описанным в пункте 2.5.



**Рис. 44.** Зависимость площади пика МФОМФК от времени термостатирования при температурах 60, 70, 80, 90 и 95 °С.

Из полученных зависимостей видно, что при термостатировании в течение 45 минут достигается максимум площади пика МФОМФК, при дальнейшем увеличении времени термостатирования наблюдается плато либо небольшое снижение площади пика МФОМФК, что свидетельствует о завершенности реакции либо возможной термодеструкции образующегося производного МФК.

При добавлении ПМФБ до концентраций 500, 1000 и 5000 мкг/мл площадь пика МФОМФК вырастает примерно в 2 раза при переходе к более высокой концентрации, однако при добавлении ПМФБ до концентрации 5000 мкг/мл сильно превышает растворимость реагента в воде и образуется большое количество осадка. Концентрация, равная 1000 мкг/мл была выбрана в качестве наиболее подходящей.

*Оценка метрологических характеристик.* Для построения градуировочной зависимости, нахождения предела обнаружения и наименьшей определяемой концентрации, в образцы деионизованной воды делали добавки МФК в диапазоне от 2 до 500 нг/мл. Проводили реакцию дериватизации и анализировали полученные растворы. Для построения градуировочного графика и определения линейной области получали зависимость площади пика производного от концентрации добавки МФК в воду.

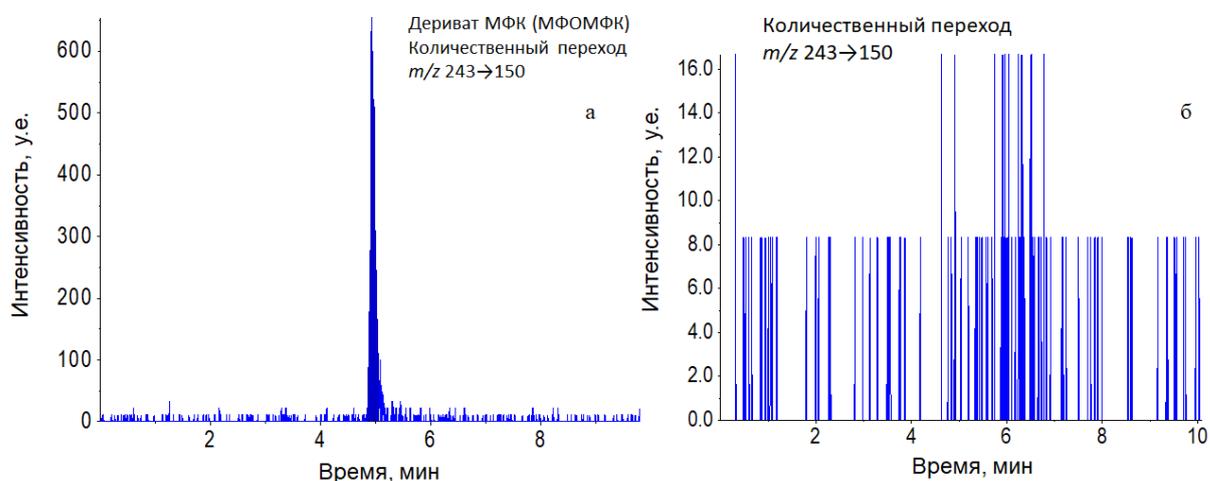
Прецизионность и ВЛП оценивали при помощи вычисления относительного стандартного отклонения (ОСО) серии анализов на трех уровнях концентраций. Для определения прецизионности в течение одного дня анализировали по 5 образцов плазмы с добавками МФК на трех уровнях концентраций. Для определения ВЛП в течение трех дней анализировали по 5 образцов деионизованной воды с добавками МФК на трех уровнях концентраций. Полученные метрологические характеристики представлены в таблице 22.

**Таблица 22.** Метрологические характеристики при определении МФК в виде МФОМФК в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Диапазон линейности, нг/мл	R <sup>2</sup>	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность * (n=5), ОСО %	ВЛП* (n=15), ОСО %
5 – 500	0.9995	5	2	9	14

\*Значения ОСО были близки на трех уровнях концентраций

*Апробация.* 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 (Рис. 45). В холостой пробе воды подтверждено отсутствие МФК.



**Рис. 45.** Хроматограммы по выбранной реакции  $m/z$  243→150 тестовой (а) и холостой (б) проб воды, которые были получены в рамках официального теста, проводимого лабораторией ОЗХО.

Сравнивая с уже разработанными способами определения МФК в водных объектах, следует отметить, что по чувствительности и надежности разработанный способ превосходит способ без применения дериватизации, однако уступает на порядок по чувствительности способу, включающему в себя дериватизацию ПБФБ и применение гидрофильной хроматографии. Однако данный способ превосходит последний в несколько раз по экспрессности. Если лимитирующей стадией анализа является чувствительность определения и количество образцов не велико, то более предпочтительным представляется применение способа, включающего в себя сочетание дериватизации ПБФБ, гидрофильной хроматографии и тандемного масс-спектрометрического детектирования. Данный способ становится более предпочтительным, в случае, когда важно время анализа, нужна высокая надежность, содержание МФК невозможно предсказать и количество образцов для анализа велико.

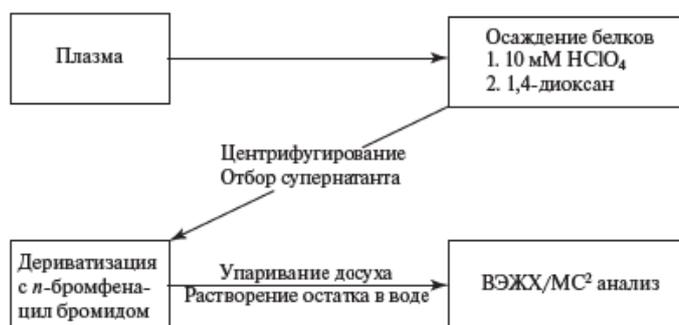
### **3.8 Разработка способа определения МФК в плазме крови в виде производного с ПБФБ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием**

Для определения МФК в образцах плазмы крови был предложен способ, включающий в себя применение дериватизации и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Для дериватизации был выбран ПБФБ, так как при работе с образцами плазмы необходимой стадией пробоподготовки является осаждение белков, которое, как правило, наиболее эффективно протекает при добавлении органических растворителей. После осаждения белков имеется возможность проведения дериватизации напрямую в данном органическом растворителе. Было обнаружено, что извлечение МФК из плазмы и реакция дериватизации лучше протекает в 1,4-диоксане, который не является подходящим растворителем для ввода образца в гидрофильной и обращенно-фазовой хроматографии, однако он может быть легко удален при помощи упаривания при пониженном давлении. Далее остаток переводили в водную фазу и анализировали методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Так как плазма является очень сложной и многокомпонентной матрицей, то из этого следует, что хроматографическое разделение и эффективность хроматографического разделения очень важны для

снижения влияния матричных компонентов на масс-спектрометрический сигнал. В предыдущих экспериментах при определении МФК в водных объектах при использовании ОФЖХ достигали более высокого значения эффективности хроматографического разделения, чем при использовании гидрофильной хроматографии. Однако несмотря на это, полученные пределы обнаружения в случае гидрофильной хроматографии были ниже, что связано с положительным влиянием на ионизацию больших количеств ацетонитрила в подвижной фазе. Тем не менее в случае анализа объектов с очень сложной матрицей, таких как кровь и моча, эффективность хроматографического пика, а, следовательно, и разделение с матричными компонентами, может являться более предпочтительным фактором при выборе способа определения, так как в случае высокого матричного эффекта сигнал анализируемого соединения может быть полностью подавлен.

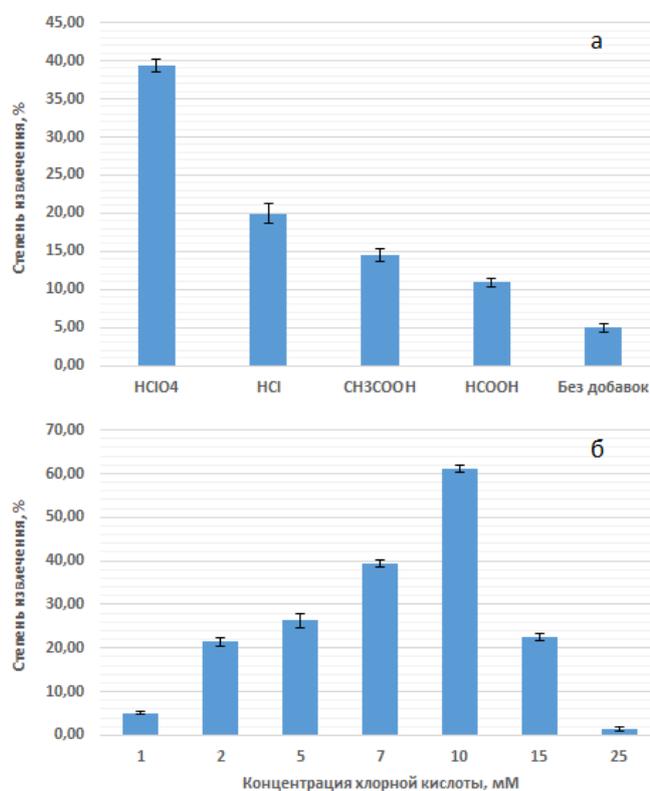
*Дериватизация.* Реакция дериватизации МФК с ПБФБ и выбор условий реакции описан в разделе 3.3. Однако плазма является более сложной матрицей по сравнению с природными водами и грунто-пылевой смесью, поэтому часть реагента вступала в реакцию с матричными компонентами, тем самым снижая выход целевой реакции. 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.

*Пробоподготовка.* Для извлечения МФК из образцов плазмы человека была разработана схема, детально описанная в главе 2.6 и изображенная на рисунке 46. Осаждение белков проводили при помощи 1,4-диоксана, который в дальнейшем выступал в качестве реакционной среды для дериватизации МФК с ПБФБ. Однако степень извлечения МФК из плазмы при использовании только 1,4-диоксана оказалась неудовлетворительной (не превышала 5%). Степень извлечения определяли в процентах как отношение площади пика производного, полученного при помощи добавки МФК до и после процедуры экстракции.



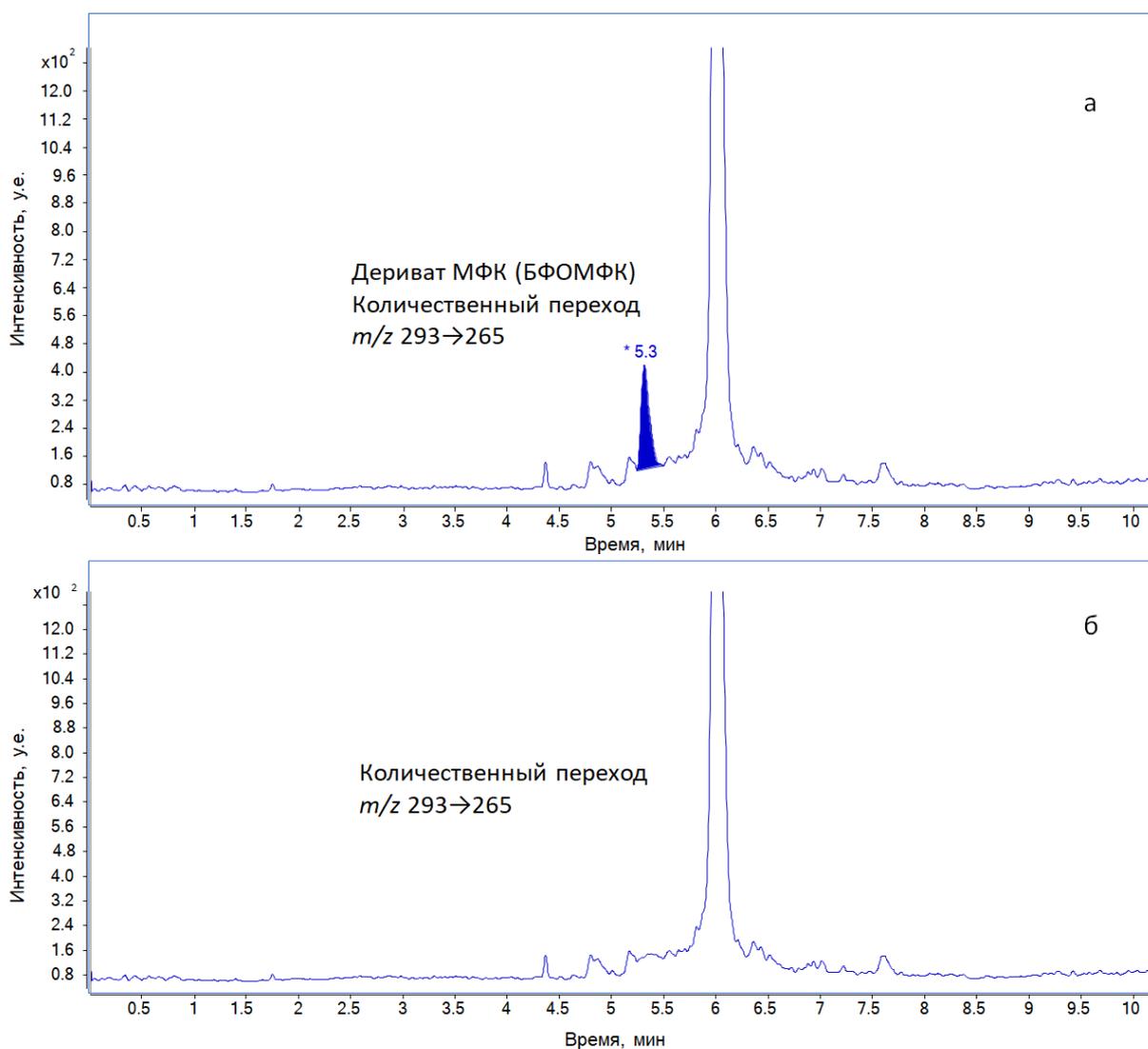
**Рис. 46.** Схема пробоподготовки при определении МФК в виде производного в плазме человека.

Для улучшения степени извлечения МФК исследовали влияние добавок хлорной, хлороводородной, уксусной и муравьиной кислот к образцам плазмы до осаждения белков 1,4-диоксаном (Рис. 47а). Из Рис. 47а видно, что добавка хлорной кислоты лучше других кислот помогает увеличить степень извлечения МФК. Далее изучали зависимость степени извлечения МФК от концентрации добавки хлорной кислоты (Рис. 47б). Было выяснено, что добавка 10 мМ хлорной кислоты значительно увеличивает степень извлечения МФК из плазмы с 5% до 61%. Хлорная кислота, по-видимому, переводит МФК в незаряженную форму ( $pK_{a1}=2.12$ ), разрушая ее аддукты с белком и помогая более полно осадить белки.



**Рис. 47.** Зависимости степени извлечения МФК из плазмы  $\pm$  абсолютное стандартное отклонение ( $n=5$ ) от типа кислоты (а) и концентрации хлорной кислоты (б).

*Выбор условий разделения.* Реакция дериватизации протекает в экстракте плазмы, которая является сложной и многокомпонентной матрицей. Поэтому очень важной задачей является выбор подходящих условий разделения пика производного МФК с матричными компонентами и возможными продуктами их реакции с ПФБФ. Разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Подбирали наиболее подходящую программу (раздел 2.6). Критерием выбора программы являлось достижение высокой эффективности хроматографического разделения и приемлемого значения кажущегося коэффициента емкости производного в диапазоне от 1.5 до 5. Полученный хроматографический пик производного (Рис. 48а) характеризуется высоким значением кажущейся эффективности разделения ( $N=61900$  ГТ/м) и кажущегося коэффициента емкости ( $k'=4.9$ ), мешающие пики с близким временем удерживания отсутствуют (Рис. 48б).



**Рис. 48.** 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).

Область линейности градуировочного графика, предел обнаружения, наименьшая определяемая концентрация и правильность. Для построения градуировочной зависимости, нахождения предела обнаружения и наименьшей определяемой концентрации, в образцы усредненной плазмы делали добавки МФК в диапазоне от 3 до 500 нг/мл. Проводили процедуру пробоподготовки, реакцию дериватизации и анализировали полученные растворы. Для построения градуировочного графика и определения линейной области получали зависимость площади пика производного от концентрации добавки МФК в плазму. Полученные метрологические характеристики представлены в таблице 23.

**Таблица 23.** Метрологические характеристики разработанной процедуры определения МФК в образцах плазмы методом ВЭЖХ-МС/МС

Диапазон линейности, нг/мл	R <sup>2</sup>	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность * (n=5), ОСО %	ВЛП* (n=15), ОСО %
10 – 500	0.9998	10	3	7	10

\*Значения ОСО были близки на двух уровнях концентраций

Правильность разработанного способа определения МФК проверяли при помощи метода «введено-найденно». Для этого делали добавки МФК в образцы отдельной плазмы и усредненной плазмы. Оценку проводили на двух уровнях концентраций - 20 и 200 нг/мл. Найденные значения концентрации МФК определяли по градуировочному графику. Результаты проверки правильности представлены в таблице 24.

**Таблица 24.** Проверка правильности разработанного способа определения МФК методом «введено-найденно» (n=3, p=0.95)

Проба плазмы	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл (n=3, p=0.95)	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл (n=3, p=0.95)
Образец плазмы №1	20	19 ± 1	200	195 ± 10
Образец плазмы №2	20	20 ± 1	200	200 ± 14
Образец плазмы №3	20	19 ± 2	200	203 ± 9
Образец плазмы №4	20	21 ± 1	200	195 ± 12
Образец плазмы №5	20	20 ± 2	200	205 ± 10
Усредненная плазма	20	20 ± 1	200	200 ± 8

*Воспроизводимость.* Прецизионность и ВЛП оценивали при помощи вычисления относительного стандартного отклонения (ОСО) серии анализов на двух

уровнях концентрации - 20 и 200 нг/мл. Для определения прецизионности в течение одного дня анализировали по 5 образцов плазмы с добавками МФК на двух уровнях концентрации. Для определения ВЛП в течение трех дней анализировали по 5 образцов плазмы с добавками МФК на двух уровнях концентраций. Полученные значения ОСО представлены в таблице 23.

Разработанный способ превосходит предыдущие работы по определению МФК в образцах плазмы (Табл. 2) по пределу обнаружения, наименьшей определяемой концентрации и воспроизводимости результатов. Также сравнивая с предыдущими работами следует отметить относительную простоту процедуры пробоподготовки, не требующую применения твердофазной экстракции, а также наличия множества экспериментов по проверке разработанной процедуры.

Разработан новый способ ВЭЖХ-МС/МС определения МФК в образцах плазмы человека с пределом обнаружения (3 нг/мл), ранее не описанном в литературе. МФК переводили в более удобную для анализа форму при помощи дериватизации ПБФБ. Применяли несложную схему пробоподготовки (Рис. 46) с дериватизацией напрямую в осаждающем белки растворителе. Достигнуто хорошее разделение с матричными компонентами и их возможными продуктами дериватизации с ПБФБ. Способ является правильным, характеризуется хорошей воспроизводимостью (ОСО  $\leq 10\%$ ) и может быть более эффективной альтернативой существующим способам ГХ-МС определения МФК в образцах плазмы.

### **3.9 Разработка способа определения МФК в образцах мочи методом анионообменной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием**

Разработанные ранее способы, включающие в себя дериватизацию МФК при помощи ПБФБ и ПМФБ не дали положительных результатов как в варианте обращенно-фазовой, так и гидрофильной хроматографии. Данный факт связан с чрезвычайной сложностью мочи как биологической матрицы. По-видимому, большое число матричных компонентов сильно снижают выход реакции дериватизации МФК. Так как МФК при нейтральном рН находится в растворе в виде аниона ( $pK_{a1}=2.12$ ), то возможно применение анионообменной хроматографии для ее хроматографического разделения. 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 подходы. Ионную хроматографию и тандемное масс-спектрометрическое детектирование для анализа МФК в образцах мочи ранее не применяли.

В связи с этим разработка нового комбинированного метода ионохроматографического разделения и чувствительного и надежного масс-спектрометрического детектирования представляется актуальной задачей при решении проблемы снижения пределов обнаружения и повышения надежности детектирования МФК, особенно в такой сложной матрице как моча. Для решения поставленной цели решали задачи по выбору подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометрическим детектором, а также подбору и синтезу подходящей неподвижной фазы, которая бы позволила удерживать МФК с хорошим значением коэффициента емкости в рамках анионообменной жидкостной хроматографии и позволила бы добиться разделения с мешающими масс-спектрометрическому детектированию МФК матричными компонентами мочи. Неподвижная фаза также должна обладать хорошей устойчивостью и надежностью для обеспечения множества последовательных измерений. Важной задачей была разработка простого и быстрого метода пробоподготовки, который бы не включал в себя длительную стадию упаривания либо дериватизации, но позволял минимизировать влияние матричного эффекта и загрязнения хроматографической колонки.

*Выбор неподвижной фазы.* Для ИХ-МС/МС определения МФК в моче неподвижная фаза должна соответствовать двум важным требованиям. Во-первых, находясь в используемой подвижной фазе, неподвижная фаза должна обладать превосходной стабильностью, как субстрата, так и функциональных групп на поверхности. Во-вторых, химический состав неподвижной фазы должен обеспечивать хорошее разделение МФК с матричными компонентами. Для выполнения первого требования в качестве субстрата был выбран сополимер стирола и дивинилбензола (ПС-ДВБ) с высокой степенью сшивки, так как он является наиболее популярным субстратом для анионообменных смол и обладает высокой механической стабильностью и совместимостью с большим числом

элюентов в любом диапазоне рН. Стабильность прикрепления функциональных групп к поверхности субстрата также очень важна, так как их отсоединение и попадание в поток подвижной фазы во время эксплуатации может приводить к негативному влиянию на масс-спектрометрический сигнал. Химическая дериватизация сополимера стирола и дивинилбензола являлась наилучшим вариантом для обеспечения стабильной ковалентной прививки слоя с функциональными группами к поверхности субстрата. При выборе структуры функционального ионообменного слоя было принято во внимание, что МФК не является сильно гидратированной молекулой и может иметь дополнительные не ионные адсорбционные взаимодействия с гидрофобной поверхностью ПС-ДВБ, что может привести к низкой эффективности и значительному уширению пиков. Поэтому в качестве оптимального был выбран метод модификации [125], основанный на создании ковалентно-связанных разветвленных функциональных слоев, защищающих ароматическое ядро от взаимодействий с целевым аналитом. Дополнительным преимуществом такого способа является простота изменения селективности, которая может быть обеспечена путем замены алкилирующих или аминирующих агентов в предлагаемой схеме синтеза.

Методика модификации включала в себя приготовление аминированного ПС-ДВБ [125], его алкилирование диглицидиловым эфиром 1,4-бутандиола (1,4-ДГЭБД) или диглицидиловым эфиром резорцина (ДГЭР) и последующие аминирование третичными аминами с различной гидрофильностью. Было отмечено, что выбор диглицидилового эфира и амина может существенно влиять на селективность колонки, а увеличение гидрофильности функционального слоя приводит к повышению эффективности, но к уменьшению селективности разделения [125]. Очень высокая гидрофильность функционального слоя в нашем случае может привести к малому удерживанию МФК и ее коэлюированию с компонентами матрицы за счет высокого сродства подвижной фазы к функциональному слою. Поэтому для того, чтобы иметь гидрофильные и гидрофобные фрагменты в структуре, в качестве алкилирующего агента был выбран более гидрофильный 1,4-ДГЭБД (поскольку он обеспечивал почти в два раза более высокую эффективность по сравнению с ДГЭР -модифицированными фазами [125]), тогда как гидрофобный триметиламин служил в качестве аминирующего агента (также потому, что он не

имеет громоздких заменителей, которые могли бы обеспечить стерические препятствия для удерживания МФК).

Полученный анионообменник упаковывали в колонки длиной 5 см и 10 см. Короткая колонка (А1) использовалась для оценки элюирующей силы и применимости определенных подвижных фаз для элюирования МФК, а более длинная (А2) применялась для анализа МФК в образцах мочи, чтобы обеспечить более высокую эффективность [138].

Следует отметить, что совместимость полученных анионообменников с широким разнообразием подвижных фаз, а также с органическими растворителями вызвана высокой степенью сшивки субстрата, состоящего из ПС-ДВБ и ковалентным связыванием функционального ионообменного слоя с его поверхностью. Данный факт делает разработанную неподвижную фазу также перспективной и для разделения алкилметилфосфоновых кислот с более длинными алкильными заменителями.

*Выбор подвижной фазы.* Известно, что не все подвижные фазы, традиционно используемые для ИХ с кондуктометрическим или УФ-детектированием, совместимы с системами масс-спектрометрического детектирования [127, 138]. Для масс-спектрометрического детектирования наиболее подходящими являются подвижные фазы, которые обладают летучестью, например, некоторые соли аммония и органические кислоты. Поэтому водные растворы муравьиной, уксусной и трифторуксусной кислот, а также ацетат и формиат аммония были выбраны в качестве потенциально пригодных подвижных фаз для определения МФК с помощью ИХ-МС/МС. Первичную оценку соответствия подвижных фаз проводили с использованием 10 мМ растворов каждой подвижной фазы. Рассчитанные коэффициенты емкости и относительная интенсивность пиков при МС детектировании представлены в таблице 25.

**Таблица 25.** Коэффициенты емкости и относительные интенсивности пика МФК, полученные на колонке А1 с различными подвижными фазами. Концентрация элюентов: 10 мМ. Скорость потока 0.95 мл/мин

<b>Подвижная фаза (10 мМ)</b>	<b>Формиат аммония</b>	<b>Ацетат аммония</b>	<b>Уксусная кислота</b>	<b>Муравьиная кислота</b>
<b>k'</b>	4.3	4.6	60.5	19.3
<b>Относительная интенсивность пика, %</b>	32	60	98	100

Водный раствор трифторуксусной кислоты оказался самым слабым элюентом среди тестируемых. Увеличение концентрации трифторуксусной кислоты в подвижной фазе с 10 мМ до 400 мМ не обеспечивало элюирование МФК в течение 15 мин. Ацетат и формиат аммония демонстрировали схожую элюирующую силу, однако они сильно подавляли ионизацию в ионном источнике масс-спектрометра по сравнению с водными растворами муравьиной и уксусной кислоты в аналогичных концентрациях. Этот факт можно объяснить более высокой величиной ионной силы для раствора соли по сравнению с соответствующей слабой органической кислотой. Таким образом, ацетат и формиат аммония не подходили для дальнейших экспериментов.

Водный раствор уксусной кислоты оказался значительно более слабым элюентом, чем муравьиная кислота, но он оказывал более выраженное положительное влияние на ионизацию МФК. Однако более низкая элюирующая сила уксусной кислоты приводила к значительному уширению пика МФК по сравнению с муравьиной кислотой, даже при увеличении концентрации уксусной кислоты в подвижной фазе до 200 мМ форма пика значительно не улучшалась.

Муравьиная кислота была самым сильным элюентом среди тестируемых. Получали узкий и симметричный пик МФК, интенсивность которого заметно возрастала с увеличением концентрации муравьиной кислоты, как и в случае уксусной кислоты (Табл. 26). Наилучшая интенсивность пика и самый низкий коэффициент емкости на колонке А1 были достигнуты с использованием 200 мМ муравьиной кислоты в качестве элюента. Дальнейшее увеличение концентрации элюента считали неразумным, поскольку пик МФК приближался к мертвому

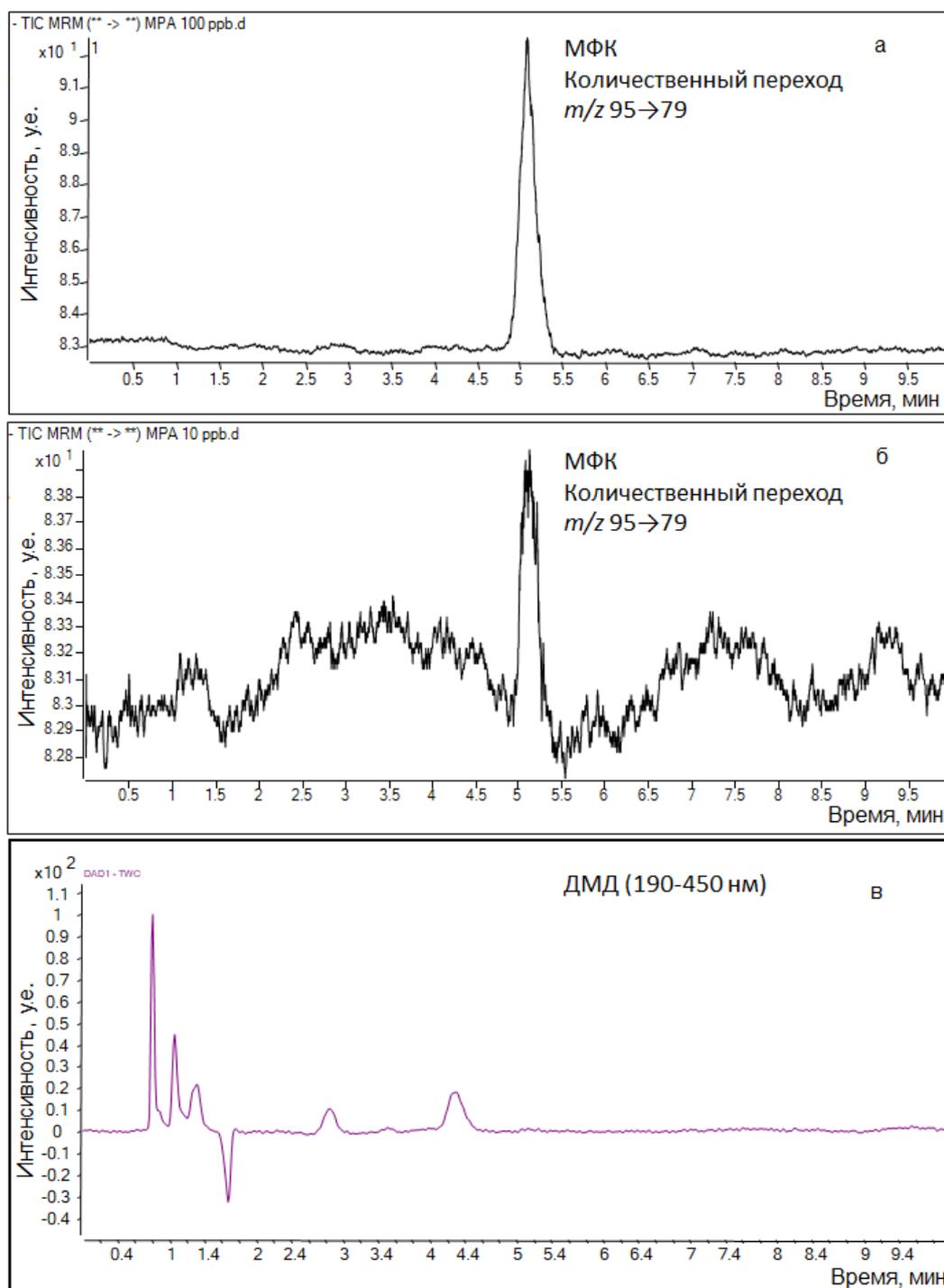
времени колонки, в результате чего увеличивалась вероятность совместного элюирования с макрокомпонентами мочи.

**Таблица 26.** Коэффициенты емкости и относительные интенсивности пика МФК, полученные на колонке А1 при различных концентрациях муравьиной кислоты в подвижной фазе. Скорость потока 0.95 мл/мин

<b>Концентрация муравьиной кислоты</b>	<b>10 мМ</b>	<b>30 мМ</b>	<b>80 мМ</b>	<b>100 мМ</b>	<b>200 мМ</b>
<b>к'</b>	19.3	10.1	5.6	4.8	2.8
<b>Относительная интенсивность пика, %</b>	25	50	70	75	100

Известно, что использование масс-спектрометрического детектирования в режиме мониторинга выбранных реакций обеспечивает высокую чувствительность и надежность определения МФК. Другим преимуществом режима мониторинга выбранных реакций является то, что он не требует полного разделения целевого analyта с компонентами матрицы, в случае, если доказано отсутствие матричного эффекта. Применение выбранных условий элюирования (200 мМ раствор муравьиной кислоты), к колонке А2 длиной 10 см, обеспечило приемлемый коэффициент емкости ( $k' = 4.1$ ), что позволило отделить МФК от основных матричных компонентов мочи (Рис. 49). На рисунке 49в показана хроматограмма холостого образца мочи, полученная с использованием диодного матричного детектора (ДМД) в диапазоне длин волн от 190 до 450 нм. На рисунке 49а представлена хроматограмма по выбранной реакции холостой мочи с добавкой МФК до концентрации 100 нг/мл, а на рисунке 49б представлена хроматограмма по выбранной реакции холостой мочи с добавкой МФК до концентрации 10 нг/мл, которая демонстрирует чувствительность разработанного способа.

Из-за меньшей чувствительности ДМД на хроматограмме могут быть обнаружены только пики матричных макрокомпонентов, которые присутствуют в гораздо более высокой концентрации по сравнению с МФК. Рисунок 49 наглядно демонстрирует, что в выбранных условиях пик МФК полностью разрешается с эндогенными компонентами мочи, которые могут оказывать влияние на масс-спектрометрический сигнал МФК.



**Рис. 49.** 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.

*Выбор процедуры пробоподготовки.* Так как приготовленный анионообменник А2 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 (Табл. 27, раздел *Матричный эффект*).

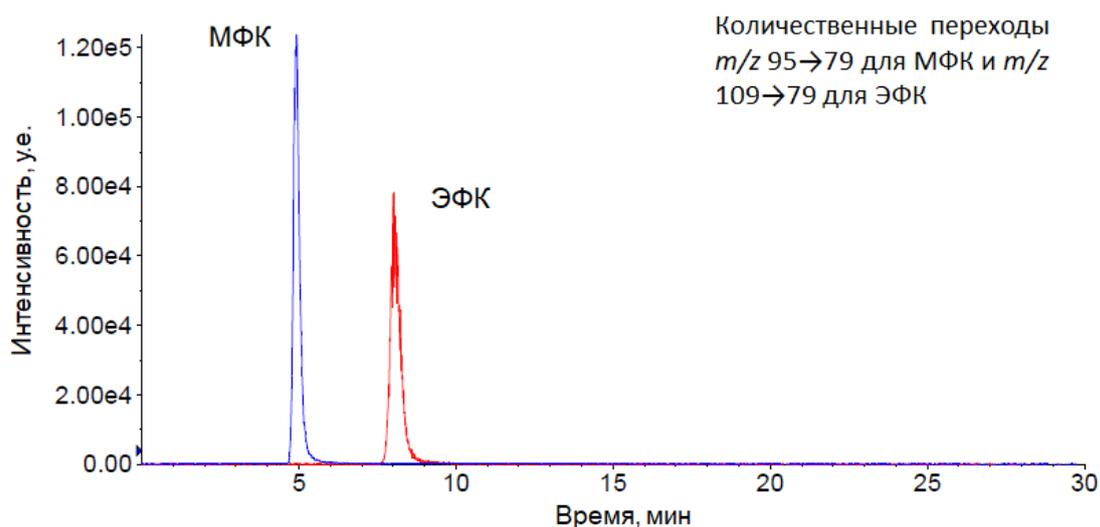
*Линейность, предел обнаружения и наименьшая определяемая концентрация.* Градуировочную прямую получали путем построения зависимости площади пика МФК от концентрации МФК, добавленной в холостую мочу. Было установлено, что градуировочная зависимость является линейной в диапазоне концентраций 10-500 нг/мл с тремя вводами на каждом уровне концентрации. Градуировочная зависимость показала отличную линейность с коэффициентом корреляции 0,9998 и остатками, не превышающими 10%. Полученные предел обнаружения и наименьшая определяемая концентрация в холостой моче составили 4 и 10 нг/мл, соответственно, что, насколько нам известно, ниже, чем когда-либо достигалось при ВЭЖХ определении МФК в моче.

*Матричный эффект.* Для оценки матричного эффекта использовали следующую формулу:  $MЭ, \% = 100 \times \left( \frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$ , где  $S_1$ -площадь пика МФК в моче, а  $S_2$  – площадь пика МФК в деионизованной воде. Данные таблицы 27 показывают, что на трех уровнях концентрации МФК не наблюдалось матричного эффекта, что дополнительно подтверждает разделение МФК с макрокомпонентами мочи и показывает, что микрокомпоненты либо разделяются с МФК, либо не влияют на ее масс-спектрометрический сигнал. Таким образом, можно сделать вывод, что предложенный способ подготовки образцов в сочетании с анионообменным разделением на синтезированной ковалентно связанной полимерной смоле и тандемное масс-спектрометрическое детектирование позволяют полностью избежать влияния матричного эффекта на определение МФК.

**Таблица 27.** Данные по проверке процедуры при определении МФК в условиях ИХ-МС/МС (n=3, p=0.95)

Концентрация, нг/мл	Среднее значение матричного эффекта (n=3), %	Прецизионность, ОСО %	Внутрилабораторная прецизионность, ОСО %
20	-2	8	12
100	1	6	8
400	-1	5	10

*Селективность.* Для проверки отсутствия мешающего влияния схожих по структуре фосфоновых кислот в выбранных условиях анализировали смесь МФК и этилфосфоновой кислоты (ЭФК). ЭФК была выбрана для проверки мешающего влияния, так как из всех фосфоновых кислот, она наиболее близка по свойствам к МФК. На рисунке 50 представлена хроматограмма демонстрирующая разделение смеси МФК и ЭФК.



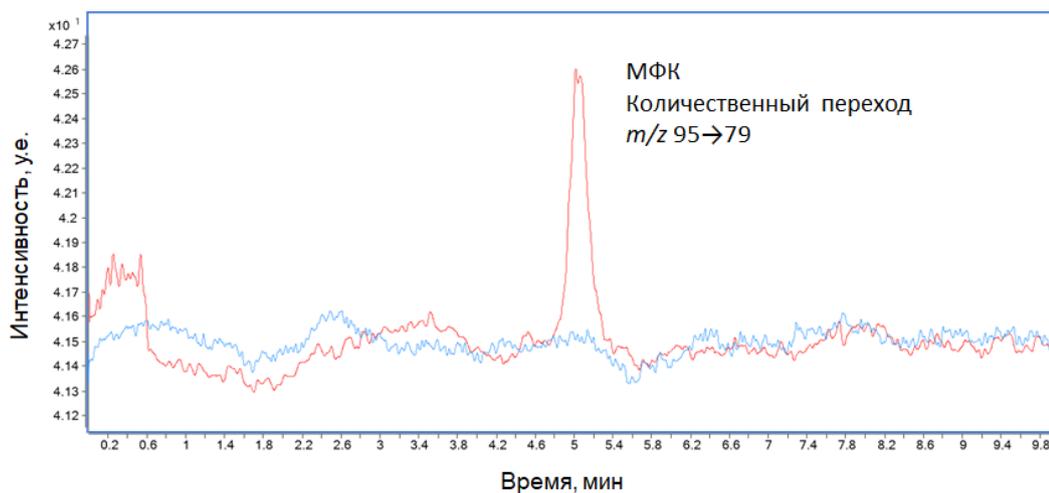
**Рис. 50.** Хроматограмма по выбранным реакциям  $m/z$  95→79 для МФК и  $m/z$  109→79 для ЭФК. Колонка А2. Подвижная фаза – водный раствор 200 мМ муравьиной кислоты. Скорость потока 0.95 мл/мин.

Как видно из рисунка 50, МФК и ЭФК превосходно разделяются, что свидетельствует об отсутствии мешающего влияния других фосфоновых кислот и демонстрирует хорошую селективность процедуры. Также из представленной хроматограммы можно заключить, что разработанная анионообменная смола позволяет проводить разделение близких по структуре соединений не только за счет ионообменных механизмов, но и за счет даже небольших различий в гидрофобности.

*Воспроизводимость.* Прецизионность и ВЛП оценивали при помощи вычисления относительного стандартного отклонения (ОСО) серии анализов на трех уровнях концентраций. Для определения прецизионности в течение одного дня анализировали по 5 образцов мочи с добавками МФК. Для определения ВЛП в течение трех дней анализировали по 5 образцов холостой мочи с добавками МФК. Полученные значения ОСО представлены в Таблице 27. Прецизионность и ВЛП были близки на все уровнях концентраций и не превышали значения 8 и 12%, соответственно.

Анализ мочи крыс, собранной после токсикологического эксперимента. Перед анализом мочи крыс была построена градуировочная зависимость, которая хорошо согласуется с полученной на этапе проверки процедуры. Для предотвращения ложных результатов, которые могут произойти из-за загрязнения источника ионов, после каждых десяти тестируемых образцов анализировали три образца контроля качества (КК) на низком, среднем и высоком уровне концентраций. Найденные концентрации МФК в образцах КК не отличалась более чем на 10% по сравнению градуировочной прямой.

На рисунке 51 показана одна из хроматограмм мочи крыс, собранная на 7-й день после введения зомана с нелетальной дозой  $\frac{1}{2}$  LD<sub>50</sub> (красная линия) и хроматограмма холостой мочи крысы (синяя линия). Обе хроматограммы мочи по ДМД были схожи по общему профилю макрокомпонентов, холостая проба не содержала пика МФК, либо других эндогенных соединений с похожими выбранными реакциями.



**Рис. 51.** Хроматограммы по выбранной реакции  $m/z$  95→79 мочи крысы, собранной на 7-й день после введения зомана с дозой  $\frac{1}{2}$  LD<sub>50</sub> (красная линия) и холостой мочи крысы (синяя линия).

Полученные данные свидетельствуют о том, что разработанный способ является надежным и перспективным для анализа МФК в моче. Полные результаты представлены в таблице 28. 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 методик определения МФК в биопробах.

**Таблица 28.** Результаты исследования мочи крыс (n=3, p=0.95)

<b>Найденная концентрация МФК (С<sub>МФК</sub>), нг/мл</b>				
<b>1/2 LD<sub>50</sub> VR</b>				
<b>Номер животного</b>	<b>1-й день после введения</b>	<b>3-й день после введения</b>	<b>7-й день после введения</b>	<b>13-й день после введения</b>
1	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	20 ± 2	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	Не обнаружено
2	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	16 ± 1	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	Не обнаружено
3	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	17 ± 1	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	Не обнаружено
<b>1/2 LD<sub>50</sub> Зарин</b>				
4	Не обнаружено	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	11 ± 1	10 ± 1
5	Не обнаружено	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	13 ± 1	11 ± 1
6	Не обнаружено	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК	14 ± 1	9 ± 1
<b>1/2 LD<sub>50</sub> Зоман</b>				
7	38 ± 3	29 ± 2	14 ± 1	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК
8	42 ± 3	30 ± 2	16 ± 1	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК
9	35 ± 3	26 ± 2	15 ± 1	ПО < С <sub>МФК</sub> < НОК

\*НОК – наименьшая определяемая концентрация

Рассматривая данные, представленные в таблице 28, можно видеть, что для всех животных в группе, подвергающихся воздействию одного конкретного НПОВ, наблюдается явное сходство в изменениях концентрации МФК в моче с течением времени. Однако при сравнении животных из разных групп, которые подвергались воздействию различных НПОВ, видно, что скорости превращений НПОВ в МФК отличаются друг от друга. Это связано с тем, что различные НПОВ сначала трансформируются в алкилметилфосфоновые кислоты, которые затем трансформируются в МФК с разной скоростью [4]. Достигнутые низкие пределы обнаружения для определения МФК в моче крыс позволяют обнаруживать даже незначительные изменения концентрации МФК со временем на очень низких уровнях.

\*\*\*

Суммарные данные, отражающие характеристики разработанных способов определения МФК, представлены в сводной таблице 29.

**Таблица 29.** Сводные данные по характеристикам разработанных способов определения МФК

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) – [88] 10 (ВЭЖХ-МС/МС) – [60]
Водные объекты	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-метоксифенацилбромидом	2	9.4 (ГХ-ПИД) – [88] 10 (ВЭЖХ-МС/МС) – [60]
Экстракты грунто-пылевых смесей	Гидрофильная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	0.2	90 (ГХ-МС) – [81]
Плазма крови	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	4	6 (ГХ-МС) – [117]
Моча	Анионообменная жидкостная хроматография с МС/МС детектированием	3	10 (ГХ-ПИД) – [121]

# 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.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Brief Description of Chemical Weapons. 2014. Available at: <https://www.opcw.org/about-chemical-weapons/what-is-a-chemical-weapon>.
- [2] *Grigoriu N., Epure G., Ginghina R., Mosteanu D.* An Overview of the OPCW's programme for biomedical samples analysis // *Int. Conf. Knowl. Organ.* 2015. V. 21. № 3. P. 815-820.
- [3] National Research Council (US) Subcommittee on Guidelines for Military Field Drinking-Water Quality. Guidelines for Chemical Warfare Agents in Military Field Drinking Water. Washington (DC): National Academies Press (US); 1995. 3, Guidelines for Organophosphorus Nerve Agents. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK224189/>
- [4] *Kingery A.F., Allen H.E.* The environmental fate of organophosphorus nerve agents: A review // *Toxicol. Environ. Chem.* 1995. V. 47. № 3–4. P. 155–184.
- [5] *Black R.M.* History and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare agent detection // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 17–18. P. 1207–1215.
- [6] *Mill T., Gould C.W.* Free-radical oxidation of organic phosphonic acid salts in water using hydrogen peroxide, oxygen, and ultraviolet light // *Env. Sci. Technol.* 1979. V. 13. № 2. P. 205–208.
- [7] *Serjeant E.P., Dempsey B.* Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. // International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Chemical Data Series No. 23, NY, Pergamon Press, 1979. 12 p.
- [8] *Daughton C.G., Cook A.M., Alexander M.* Phosphate and Soil Binding: Factors Limiting Bacterial Degradation of Ionic Phosphorus-Containing Pesticide Metabolites // *Appl. Environ. Microbiol.* 1979. V. 37. № 3. P. 605–609.
- [9] *Schowanek D., Verstraete W.* Phosphonate Utilization by Bacterial Cultures and Enrichments from and Enrichments from Environmental Samples // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 4. P. 895–903.
- [10] *Osamura N., Murata K., Kimura A.* Cytosolic C-P Bond Cleavage Activity in Bacterial Cells Isolated from Soil // *J. Ferment. Bioeng.* 1991. V. 71. № 2. P. 128–130.

- [11] *Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H.* Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. 960 p.
- [12] *Meer J.A., Trap H.C., Noort D., Schans M.J.* Comprehensive gas chromatography with Time of Flight MS and large volume introduction for the detection of fluoride-induced regenerated nerve agent in biological samples // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 17-18. P. 1320–1325.
- [13] *Yeung D.T., Smith J.R., Sweeney R.E., Lenz D.E., Cerasoli D.M.* A gas chromatographic-mass spectrometric approach to examining stereoselective interaction of human plasma proteins with soman // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32, № 1. P. 86–91.
- [14] *Byers C.E., McGuire J.M., Hulet S.W., Burnett D.C., Gaviola B.I., Jakubowski E.M., Thomson S.A.* Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of red blood cells from Göttingen minipig following whole-body vapor exposure to VX // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. № 1. P. 57–62.
- [15] *Richardson D.D., Caruso J.A.* Derivatization of organophosphorus nerve agent degradation products for gas chromatography with ICPMS and TOF-MS detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 388. № 4. P. 809–823.
- [16] *Riches J., Morton I., Read R.W., Black R.M.* The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography-ion trap negative ion tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2005. V. 816. № 1–2. P. 251–258.
- [17] *McDaniel L.N., Romero N.A., Boyd J., Coimbatore G., Cobb G.P.* Tandem capillary column gas chromatography-mass spectrometric determination of the organophosphonate nerve agent surrogate dimethyl methylphosphonate in gaseous phase // *Talanta.* 2010. V. 81. № 4–5. P. 1568–1571.
- [18] *Carrick W.A., Cooper D.B., Muir B.* Retrospective identification of chemical warfare agents by high-temperature automatic thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 925. № 1–2. P. 241–249.
- [19] *Stuff J.R., Cheicante R.L., Morrissey K.M., Durst H.D.* Trace determination of isopropyl methylphosphonofluoridate (GB) and bis (2-chloroethyl) sulfide (HD)

- in chemical neutralization solutions by gas chromatography-mass spectrometry // *J. Microcolumn Sep.* 2000. V. 12. № 2. P. 87–92.
- [20] *Driskell W.J., Shih M., Needham L., Barr D.* Quantitation of organophosphorus nerve agent metabolites in human urine using isotope dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Tox.* 2002. V. 26. № 1. P. 6–10.
- [21] *Barr J.R., Driskell W.J., Aston L.S., Martinez R.A.* Quantitation of metabolites of the nerve agents sarin, soman, cyclohexylsarin, VX, and Russian VX in human urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28, № 5. P. 372–378.
- [22] *Miki A., Katagi M., Tsuchihashi H., Yamashita M.* Determination of alkyl methylphosphonic acids, the main metabolites of organophosphorus nerve agents, in biofluids by gas chromatography-mass spectrometry and liquid-liquid solid-phase transfer- catalyzed pentafluorobenzoylation // *J. Anal. Tox.* 1999. V. 23. P. 86–93.
- [23] *Rohrbaugh D.K., Sarver E.W.* Detection of alkyl methylphosphonic acids in complex matrices by gas chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 809. № 1–2. P. 141–150.
- [24] *Rohrbaugh D.K.* Characterization of equimolar VX–water reaction product by gas chromatography–mass spectrometry// *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 809, № 1–2. P. 131–139.
- [25] *Rohrbaugh D.K.* Methanol chemical ionization quadrupole ion trap mass spectrometry of O-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothiolate (VX) and its degradation products // *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 893. № 2. P. 393–400.
- [26] *Noami M., Kataoka M., Seto Y.* Improved tert-butyldimethylsilylation gas chromatographic/mass spectrometric detection of nerve gas hydrolysis products from soils by pretreatment of aqueous alkaline extraction and strong anion-exchange solid-phase extraction // *Anal. Chem.* 2002. V. 74. № 18. P. 4709–4715

- [27] *Лебедев А.Т., Лебедев К.С., Мясоедов Б.Ф., Рыбальченко И.В., Сигейкин Г.И., Суворкин В.Н.* Масс-спектрометрическая идентификация высокотоксичных алкилфторфосфонатов // Масс-спектрометрия. 2006. Т. 3, № 4. С. 277–283.
- [28] *Лебедев А.Т., Морозик Ю.И., Мясоедов Б.Ф., Рыбальченко И.В., Фоменко П.В.* Установление строения О-алкилалкилфторфосфонатов методом масс-спектрометрии и компьютерное прогнозирование их масс-спектров // Масс-спектрометрия. 2007. Т. 4, № 4. С. 255–266.
- [29] *Lebedev A.T.* Mass spectrometry in identification of ecotoxicants including chemical and biological warfare agents // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. V. 207. № 2. P. 451–458.
- [30] *Schneider J.F., Boparai A.S., Reed L.L.* Screening for sarin in air and water by solid-phase microextraction-gas chromatography mass // *J. Chromatogr. Sci.* 2001. V. 39. № 10. P. 420–424.
- [31] *Gravett M.R., Hopkins F.B., Main M.J., Self A.J., Timperley C.M., Webb A.J., et al.* Detection of the organophosphorus nerve agent VX and its hydrolysis products in white mustard plants grown in contaminated soil // *Anal. Methods* 2013. V. 5. № 1. P. 50–53.
- [32] *Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H.* Determination of the main hydrolysis product of O – ethyl S—2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate, ethyl methylphosphonic acid, in human serum // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 689. № 2. P. 327–333.
- [33] *Wils E. R. J., Hulst A. G.* Determination of organophosphorus acids by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1988. V. 454. P. 261–272.
- [34] *Tornes J. Aa., Johnsen B. A.* Gas chromatographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide // *J. Chromatogr. A.* 1989. V. 467. P. 129–138.
- [35] *Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Копейкин В.А., Конева В.Ю., Радиллов А.С.* Особенности анализа фосфорорганических отравляющих веществ, реактивированных из состава аддуктов с белками крови при

- установлении факта воздействия химического оружия // Токсикологический вестник. 2014. № 4. С. 39–46.
- [36] *Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Уколов А.И., Уколова Е.С., Каракашев Г.В., Радиллов А.С.* Хроматомасс-спектрометрическое определение алкилметилфосфоновых кислот в моче // Масс-спектрометрия. 2015. Т.4. № 4. С. 236–246.
- [37] *Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Бабаков В.Н., Дубровский Я.А., Уколова Е.С., Хлебникова Н.С., Мурашко Е.А., Конева В.Ю., Уколов А.И., Копейкин В.А., Радиллов А.С.* Определение конъюгированных с белками метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови // Журнал аналитической химии. 2016. Т. 71. № 8. С. 883–893.
- [38] *Savel'eva E.I., Gustyleva L.K., Orlova O.I., Khlebnikova N.S., Koryagina N.L., Radilov A.S.* Modern methods for identification and quantitative determination of organophosphorus chemical warfare agents. // Russ. J. Appl. Chem. 2014. V. 87. № 8. P. 1003–1012.
- [39] *Берзин И.А., Романов В.С., Савельева Е.И., Рыбальченко И.В., Новиков С.В., Василевский С.В., Гончаров В.М.* Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в биомедицинских пробах с использованием твердофазной экстракции // Medline.ru. 2009. Т. 10. № 1. С. 44–56.
- [40] *Морозик Ю.И., Смирнов А.О.* Прогнозирование масс-спектров о-метил,о-алкилметилфосфонатов // Масс-спектрометрия. 2008. Т. 5. № 3. С. 211–218.
- [41] *Морозик Ю.И., Дудкин А.В., Ткачук Ю.В., Рыбальченко И.В., Хатымов Р.В.* Прогнозирование масс-спектров электронной ионизации о-алкилметилтионфторфосфонатов // Масс-спектрометрия. 2016. Т. 13. № 1. С. 36–43.
- [42] *Noort D., Hulst A.G., Platenburg D.H., Polhuijs M.* Quantitative analysis of O-isopropyl methylphosphonic acid in serum samples of Japanese citizens allegedly exposed to sarin: estimation of internal dosage // Arch. Toxicol. 1998. V. 72. № 10. P. 671–675.

- [43] *Bossle P.C., Martin J.J., Sarver E.W., Sommer H.Z.* High-performance liquid chromatography analysis of alkyl methylphosphonic acids by derivatization // *J. Chromatogr. A.* 1983. V. 267. P. 209–212.
- [44] *Read R.W., Black R.M.* Rapid screening procedures for the hydrolysis products of chemical warfare agents using positive and negative ion liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 862, № 2. P. 169–177.
- [45] *D’Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R.* Analysis of *O*-ethyl *S*-[2-(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothiolate (VX) and its degradation products by packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 837. № 1–2. P. 93–105.
- [46] *D’Agostino P.A., Hancock J.R., Chenier C.L., Jackson Lepage C.R.* Liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometric and desorption electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of chemical warfare agents in office media typically collected during a forensic investigation // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1110. № 1–2. P. 86–94.
- [47] *D’Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R.* Determination of sarin, soman and their hydrolysis products in soil by packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 912. № 2. P. 291–299.
- [48] *Willison S.A.* Investigation of the persistence of nerve agent degradation analytes on surface through wipe sampling and detection with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 2. P. 1034–1041.
- [49] *Mawhinney D.B., Hamelin E.I., Fraser R., Silva S.S., Pavlopoulos A.J., Kobelski R.J.* The determination of organophosphonate nerve agent metabolites in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 852. № 1–2. P. 235–243.
- [50] *Hamelin E.I., Schulze N.D., Shaner R.L., Coleman R.M., Lawrence R.J., Crow B.S., et al.* Quantitation of five organophosphorus nerve agent metabolites in serum

- using hydrophilic interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 21. P. 5195–5202.
- [51] *Crow B.S., Pantazides B.G., Quinones-Gonzalez J., Garton J.W., Carter M.D., Perez J.W., et al.* Simultaneous measurement of tabun, soman, cyclosarin, VR, VX and VM adducts to tyrosine in blood products by isotope dilution UHPLC-MS/MS // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 20. P. 10397–10405.
- [52] *Leigh L. Swaim<sup>1</sup>, Rudolph C. Johnson, Yingtao Zhou, Chris Sandlin, John R. Barr.* Quantification of Organophosphorus Nerve Agent Metabolites Using a Reduced-Volume, High-Throughput Sample Processing Format and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V.32. № 9. P. 774–777.
- [53] *Odetokun M.S., Montesano M.A., Weerasekera G., Whitehead Jr. R.D., Needham L.L., Barr D.B.* Quantification of dialkylphosphate metabolites of organophosphorus insecticides in human urine using 96-well plate sample preparation and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 27. P. 2567–2574.
- [54] *Ciner F.L., McCord C.E., Plunkett Jr. R.W., Martin M.F., Croley T.R.* Isotope dilution LC/MS/MS for the detection of nerve agent exposure in urine // *J. Chromatogr. B.* 2007. V. 846. № 1–2. P. 42–50.
- [55] *Koller M., Becker C., Thiermann H., Worek F.* GC-MS and LC-MS analysis of nerve agents in body fluids: intra-laboratory verification test using spiked plasma and urine samples // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 17-18. P. 1226–1233.
- [56] *Katagi M., Tatsuno M., Nishikawa M., Tsuchihashi H.* On-line solid-phase extraction liquid chromatography-continuous flow frit fast atom bombardment mass spectrometric and tandem mass spectrometric determination of hydrolysis products of nerve agents alkyl methylphosphonic acids by p-bromophenacyl derivatization // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 833. № 2. P. 169–179.
- [57] *Zi-Hui M., Qin L.* Determination of degradation products of nerve agents in human serum by solid phase extraction using molecularly imprinted polymer// *Anal. Chim. Acta.* 2001. V. 435. № 1. P. 121–127.

- [58] *Rodin I.A., Braun A.V., Anan'eva I.A., Shpigun O.A., Savel'eva E.I., Rybal'chenko I.V.* Detection of Nerve Agent Markers by Liquid Chromatography– Mass Spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2011. V. 66, № 11. P. 1417–1422.
- [59] *Stubbs S.J., Read R.W.* Liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to quantitation of the organophosphorus nerve agent VX in microdialysates from blood probes // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 17–18. P. 1253–1256.
- [60] *Owens J., Koester C.* Quantitative analysis of chemical warfare agent degradation products in beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. № 18. P. 8227–8235.
- [61] *Evans R.A., Jakubowski E.M., Muse W.T., Matson K., Hulet S.W., Mioduszewski R.J., Thomson S.A., Totura A.L., Renner J.A., Crouse C.L.* Quantification of sarin and cyclosarin metabolites isopropyl methylphosphonic acid and cyclohexyl methylphosphonic acid in minipig plasma using isotope-dilution and liquid chromatography- time-of-flight mass spectrometry // *J. Anal. Toxicol.* 2008. Vol. 32. № 1. P. 78–85.
- [62] *Tsuge K., Seto Y.* Detection of human butyrylcholinesterase-nerve gas adducts by liquid chromatography-mass spectrometric analysis after in gel chymotryptic digestion // *J. Chromatogr. B.* 2006. V. 838. № 1. P. 21–30.
- [63] *Røen B.T., Sellevag S.R., Lundanes E.* On-line solid phase extraction-liquid chromatography–mass spectrometry for trace determination of nerve agent degradation products in water samples // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 761. P. 109–116.
- [64] *Tak V., Pardasani D., Kanaujia P.K., Dubey D.K.* Liquid–liquid–liquid microextraction of degradation products of nerve agents followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 20. P. 4319–4328.
- [65] *Kubachka K.M., Richardson D.D., Heitkemper D.T., Caruso J.A.* Detection of chemical warfare agent degradation products in foods using liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and

- electrospray ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2008. V. 1202. № 2. P. 124–131.
- [66] *Родин И.А., Браун А.В., Ананьева И.А., Шпигун О.А., Савельева Е.И., Рыбальченко И.В., Болотов С.Л., Родченков Г.М.* Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии // Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8. № 1. С. 45–50.
- [67] *Родин И.А., Браун А.В., Ставрианиди А.Н., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В.* Обнаружение маркеров нервно-паралитических отравляющих веществ методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии - тандемной масс-спектрометрии. // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 3. С. 254–259.
- [68] *Родин И.А., Браун А.В., Шпигун О.А.* Определение боевых отравляющих веществ и продуктов их превращения методами хроматомасс-спектрометрии (обзор). // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2013. Т. 79. № 4. С. 5–13.
- [69] *Rodin I., Stavrianidi A., Braun A., Smirnov R., Shpigun O., Rybalchenko I.* New Techniques for Nerve Agent Oxidation Products Determination in Environmental Water by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS) and Capillary Electrophoresis (CE) with Direct Ultraviolet (UV) Detection. // Environ. Forens. 2013. V. 14. № 2. P. 87–96.
- [70] *Rodin I., Braun A., Stavrianidi A., Baygildiev T., Shpigun O., Rybalchenko I.* “Dilute-and-Shoot” RSLC-MS/MS method for fast detection of nerve and vesicant chemical warfare agent metabolites in urine. // J. Anal. Toxicol. 2015. V. 39. № 1. P. 69–74.
- [71] *Родин И.А., Браун А.В., Байгильдиев Т.М., Ананьева И.А., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В.* Определение продуктов гидролитической трансформации отравляющих веществ VX и VR в природных водах методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии// Масс-спектрометрия. 2011. Т. 8. № 3. С. 217–224.

- [72] *Kuban P., Seiman A., Makarotsewa N., Vaher M., Kaljurand M.* In situ determination of nerve agents in various matrices by portable capillary electropherograph with contactless conductivity detection // *J. Chromatogr. A.* 2011. V. 1218. № 18. P. 2618–2625.
- [73] *Алексеев А.И., Серeda М.В., Юзвяк С.* ХИМИЯ ВОДЫ: (Теория, свойства, применение) Учеб. пособие. СПб: СЗТУ, 2001. 179 с.
- [74] *Дроздова В.М., Петренчук О.П., Селезнева В.С., Свистов П.Ф.* Химический состав атмосферных осадков на Европейской территории СССР: Л.: Гидрометеиздат, 1964. 212 с.
- [75] *Скопинец Б.А.* Органическое вещество в природных водах (водный гумус). Тр. Гос. океаногр. ин-та. Л.: Гидрометеиздат, 1950. Вып. 17(29). 290 с.
- [76] ГОСТ 25100-2011. Грунты. Классификация. М.: Стандартинформ, 2013.
- [77] *Pardasani D., Palit M., Gupta A.K., Kanaujia P.K., Sekhar K., Dubey D.K.* Microemulsion mediated in situ derivatization–extraction and gas chromatography–mass spectrometric analysis of alkylphosphonic acids // *J. Chrom. A.* 2006. V. 1108. № 2. P. 166–175.
- [78] *Kuitunen M.* Sample Preparation for Analysis of Chemicals Related to the Chemical Weapons Convention in an Off-site Laboratory, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry.* R.A. Meyers (Ed.). Wiley. Chichester, 2000. 1055 p.
- [79] *Black R.M., Muir B.* Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1000. № 1–2. P. 253–281.
- [80] *Kataoka M., Tsunoda N., Ohta H., Tsuge K., Takesako H., Seto Y.* Effect of cation-exchange pretreatment of aqueous soil extracts on the gas chromatographic–mass spectrometric determination of nerve agent hydrolysis products after *tert.*-butyldimethylsilylation // *J. Chrom. A.* 1998. V. 824. № 2. P. 211–221.
- [81] *Kataoka M., Tsuge K., Seto Y.* Efficiency of pretreatment of aqueous samples using a microporous strong anion-exchange resin on the determination of nerve gas hydrolysis products by gas chromatography–mass spectrometry after *tert.*-butyldimethylsilylation // *J. Chrom. A.* 2000. V. 891. № 2. P. 295–304.

- [82] *Kataoka M., Tsuge K, Takesako H., Hamazaki T., Seto Y.* Effect of pedological characteristics on aqueous soil extraction recovery and *tert*-butyldimethylsilylation yield for gas chromatography-mass spectrometry of nerve gas hydrolysis products from soils // *Environ. Sci. Technol.* 2001. V. 35, № 9. P. 1823–1829.
- [83] *Creasy W.R., Rodriguez A.A., Stuff J.R., Warren R.W.* Atomic emission detection for the quantitation of trimethylsilyl derivatives of chemical-warfare-agent related compounds in environmental samples // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 709. № 2. P. 333–344.
- [84] *D'Agostino P. A.; Provost L. R.* Determination of chemical warfare agents, their hydrolysis products and related compounds in soil // *J. Chromatogr. A.* 1992. V. 589. № 1–2. P. 287-294.
- [85] *Fredriksson S.-A., Hammarstrom L.-G., Henriksson L., Lakso H.-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 // *J. Mass Spectrom.* 1995. V. 30. № 8. P. 1133–1143.
- [86] *Vermillion W.D., Crenshaw M.D.* In-line respeciation: an ion-exchange ion chromatographic method applied to the separation of degradation products of chemical warfare nerve agents in soil // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 770. № 1–2. P. 253–260.
- [87] *Sng M.T., Ng W.F.* In-situ derivatisation of degradation products of chemical warfare agents in water by solid-phase microextraction and gas chromatographic–mass spectrometric analysis // *J. Chrom. A.* 1999. V. 832. № 1–2. P.173–182.
- [88] *Sega G.A., Tomkins B.A., Griest W.H.* Analysis of methylphosphonic acid, ethyl methylphosphonic acid and isopropyl methylphosphonic acid at low microgram per liter levels in groundwater // *J. Chrom. A.* 1997. V. 790. № 1–2. P. 143-152.
- [89] *Pardasani D., Mazumder A., Gupta A.K., Kanaujia P.K., Tak V., Dubey D.K.* Determination of hydrolytic degradation products of nerve agents by injection port fluorination in gas chromatography/mass spectrometry for the verification of the

- Chemical Weapons Convention // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. V. 21. № 18. P. 3109–3114.
- [90] *Wils E.R.J., Hulst A.G.* The use of thermospray-liquid chromatography/mass spectrometry for the verification of chemical warfare agents // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1992. V. 342. № 9. P. 749–758.
- [91] *Wils E.R.J., Hulst A.G.* Determination of O-ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothioate (VX) by thermospray liquid chromatography–mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1990. V. 523. P. 151–161
- [92] *Tornes J. A.* Identification of Some Alkyl Methylphosphonic Acids by Thermospray Mass Spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. V. 10. № 3. P. 878–882.
- [93] *Borrett V.T., Colton R., Traeger J.C.* The electrospray mass spectra of phosphoric acid, methylphosphonic acid and its alkyl esters, and their complexes with alkali and alkali earth metal ions // *Eur. J. Mass Spectrom.* 1995. V. 1. № 2. P. 131–140.
- [94] *Black R.M., Read R.W.* Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents // *J. Chromatogr. A.* 1997. V. 759. № 1–2. P. 79–92.
- [95] *Black R.M., Read R.W.* Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography–mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 794. № 1–2. P. 233–244.
- [96] *D’Agostino P.A., Hancock J.R., Provost L.R.* Packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry analysis of organophosphorus chemical warfare agents // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 840. № 2. P. 289–294.
- [97] *D’Agostino P.A., Chenier C.L., Hancock J.R.* Packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry of snow contaminated with sarin // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 950. № 1–2. P. 149–156.

- [98] *Creasy W.R.* Postcolumn derivatization liquid chromatography/mass spectrometry for detection of chemical-weapons-related compounds // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999. V. 10, № 5. P. 440–447.
- [99] *John H., Worek F., Thiermann H.* LC-MS-based procedures for monitoring of toxic organophosphorus compounds and verification of pesticide and nerve agent poisoning // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. № 1. P. 97–116.
- [100] *Liu Q., Hu X., Xie J.* Determination of nerve agent degradation products in environmental samples by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry with electrospray ionization // *Anal.Chim. Acta.* 2004. V. 512. № 1. P. 93–101.
- [101] *Tak V, Kanaujia P.K., Pardasani D., Kumar R., Srivastava R.K., Gupta A.K., Dubey D.K.* Application of Doehlert design in optimizing the determination of degraded products of nerve agents by ion-pair liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1161. № 1–2. P. 198–206
- [102] *Pianetti G.A., Moreira de Campos L.M.* Application of ion chromatography with indirect spectrophotometric detection to the sensitive determination of alkylphosphonic acids and fosfomycin // *Anal.Chim. Acta.* 1993. V. 284. № 2. P. 291–299.
- [103] *Piao H., Marx R.B., Schneider S., Irvine D.I., Staton J.* Analysis of VX nerve agent hydrolysis products in wastewater effluents by ion chromatography with amperometric and conductivity detection // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1089. № 1–2. P. 65–71.
- [104] *Bossle P.C., Reutter D.J., Sarver E.W.* Analysis of alkyl methylphosphonic acids in aqueous matrices by ion-pair reversed-phase ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 1987. V. 407. P. 399–404.
- [105] *Robins W.H., Wright B.W.* Capillary electrophoretic separation of organophosphonic acids using borate esterification and direct UV detection // *J. Chromatogr. A.* 1994. V. 680. № 2. P. 667–673.

- [106] *Oehrle S.A., Bossle P.C.* Analysis of nerve agent degradation products using capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* 1995. V. 692. № 1–2. P. 247–252.
- [107] *Mercier J.P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A.* Capillary electrophoresis analysis of chemical warfare agent breakdown products I. Counterelectroosmotic separation of alkylphosphonic acids and their monoester derivatives // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 741. № 2. P. 279–285.
- [108] *Mercier J.P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A.* Capillary electrophoresis separation of alkylphosphonic acid monoesters with indirect ultraviolet detection // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 779. № 1–2. P. 245–252.
- [109] *Kostiainen R., Bruins A.P.* Identification of degradation products of some chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1993. V. 634. № 1. P. 113–118.
- [110] *Mercier J.P., Chaimbault P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A.* Identification of phosphonic acids by capillary electrophoresis– ion spray mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 825. № 1. P. 71–80.
- [111] *Mercier J.P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A.* Liquid chromatography analysis of phosphonic acids on porous graphitic carbon stationary phase with evaporative light-scattering and mass spectrometry detection // *J. Chromatogr. A.* 1999. V. 849. № 1. P. 197–207.
- [112] *Lagarrigue M., Boss'ee A., B'egos A., Varenne A., Gareil P., Bellier B.* Separation and identification of isomeric acidic degradation products of organophosphorus chemical warfare agents by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1137. № 1. P. 110–118
- [113] *Кольман Я., Рем К.-Г.* Наглядная биохимия. Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. 469 с.
- [114] *Abu-Qare W., Abou-Donia B.* Simultaneous analysis of sarin, pyridostigmine bromide and their metabolites in rat plasma and urine using HPLC // *Chromatographia.* 2001. V. 53. № 5–6. P. 251–255.
- [115] *Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H.* Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acids,

- in human serum by indirect photometric detection ion chromatography // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 698. № 1–2. P. 81–88.
- [116] *Kataoka M., Seto Y.* Discriminative determination of alkyl methylphosphonates and methylphosphonate in blood plasma and urine by gas chromatography–mass spectrometry after *tert.*-butyldimethylsilylation // *J. Chromatogr. B.* 2003. V. 795. № 1. P. 123–132.
- [117] *Wang Q., Xie J., Gu M., Feng J., Ruan J.* Gas chromatographic–mass spectrometric method for quantitation of trimethylsilyl derivatives of nerve agent degradation products in human plasma, using strong anion–exchange solid-phase extraction // *Chromatographia.* 2005. V. 62. № 3. P. 167–173.
- [118] *Qi R.D.* Diagnostics. People Sanitation Publishing Company. Beijing, 2001. 463 p.
- [119] *Ren H.M., Lang H.Q.* Handbook of analytical chemistry. Chemical Industry Press. Hangzhou, 1997. 99 p.
- [120] *Minamia M., Huia D-M., Katsumataa M., Inagakia H., Boulet C.A.* 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 // *J. Chromatogr. B.* 1997. V. 695. № 2. P. 237–244.
- [121] *Nakajima T., Sasaki K., Ozawa H., Sekijima Y., Morita H., Fukushima Y., Yanagisawa N.* Urinary metabolites of sarin in a patient of the Matsumoto sarin incident // *Arch. Toxicol.* 1998. V.72. № 9. P. 601–603.
- [122] *Grob D., Harvey J.C.* Effects in man of the anticholinesterase compound sarin (isopropylmethylphosphonofluoridate) // *J. Clin. Invest.* 1958. V. 37. № 3. P. 350–368.
- [123] *Hayes T.L., Kenny D.V., Kenny L.H.* Feasibility of direct analysis of saliva and urine for phosphonic acids and thiodiglycol-related species associated with exposure to chemical warfare agents using LC-MS/MS // *J. Med. Chem. Def.* 2004. V. 2. P. 121–144.

- [124] «Правила лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 N 267).
- [125] *Shchukina O.I., Zatirakha A.V., Smolenkov A.D., Nesterenko P.N., Shpigun O.A.* Anion exchangers with branched functional ion exchange layers of different hydrophilicity for ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2015. V. 1408. 78–86.
- [126] *Uzhel A.S., Zatirakha A.V., Shchukina O.I., Smolenkov A.D., Shpigun O.A.* Covalently-bonded hyperbranched poly(styrene-divinylbenzene)-based anion exchangers for ion chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1470. P. 97–103.
- [127] *Witkiewicz Z., Sliwka E., Neffe S.* Chromatographic analysis of chemical compounds related to the Chemical Weapons Convention // *Trends Anal. Chem.* 2016. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.trac.2016.05.006>.
- [128] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [129] *Wang M., Jiang N., Xian H., Wei D., Shi L., Feng X.* A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1429. P. 22–29.
- [130] *Caban M., Migowska N., Stepnowski P., Kwiatkowski M., Kumirska J.* Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ -agonists in environmental samples // *J. Chrom. A.* 2012. V. 1258. P. 117–127.
- [131] Основы аналитической химии. Книга 1. Общие вопросы. Методы разделения. Под ред. академика Золотова Ю.А. Высшая школа, 2004.
- [132] *Buszewski B., Noga S.* Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. № 1. P. 231–247.

- [133] *Carey F.A., Sundberg R.J.* Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms. Springer US, 2007. 582 p.
- [134] *Horsley L.H.* Azeotropic Data. III. American Chemical Society. Washington. D.C., 1973.
- [135] *Вольф И.В., Ткаченко Н.И.* Химия и микробиология природных и сточных вод. Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. 238 с.
- [136] Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектроскопии. ГОСТ 31870 – 2012.
- [137] Вода. Методы определения щелочности и массовой концентрации карбонатов и гидрокарбонатов. ГОСТ 31957 – 2012.
- [138] *Weiss J.* Handbook of Ion Chromatography. fourth ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, 2016. 1522 p.