

*На правах рукописи*

КОРЯГИНА НАДЕЖДА ЛЕОНИДОВНА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ  
ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В  
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Специальность 05.11.11 – Хроматография и хроматографические приборы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ 2007

Работа выполнена в лаборатории общей токсикологии и гигиенического нормирования НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека  
Федерального медико-биологического агентства

**Научный руководитель**

кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
**Савельева Елена Игоревна**

**Официальные оппоненты:**

доктор химических наук, профессор  
**Рыбальченко Игорь Владимирович**  
ФГУ «27 Научный центр МО РФ»

доктор химических наук, старший научный сотрудник  
**Бродский Ефим Соломонович**  
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН

**Ведущая организация:**

**Санкт-Петербургский  
Государственный Университет**

Защита состоится «18» декабря 2007 г. в 17 час. 00 мин. на заседании Совета по защите докторских диссертаций Д 002.259.04 при ИФХЭ РАН по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 31, корп. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук

Автореферат размещен на сайте Института: <http://phycbe.ac.ru>

Отзывы на автореферат (заверенные печатью) просим высылать по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 31, корп. 4, ИФХЭ РАН  
ученому секретарю Совета по защите докторских диссертаций Д 002.259.04

Автореферат разослан «16» ноября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат химических наук

 Коломиец Л.Н.

**Введение.** Газовая хроматография (ГХ) с масс-спектрометрическим (МС) детектированием (ГХМС) применяется в качестве базового метода в большинстве лабораторий, специализирующихся в области аналитической токсикологии. Круг органических соединений, анализируемых ГХМС, как известно, ограничен летучими или образующими летучие производные соединениями. Анализ нелетучих органических соединений в виде производных методами ГХ и ГХМС в современной практике можно рассматривать как самостоятельную задачу, существенно более сложную, чем хорошо разработанные классические подходы к дериватизации летучих соединений (жирных кислот, фенолов и др.) в целях улучшения их хроматографических характеристик. В настоящей работе объектом анализа являлись маркеры токсического воздействия - высокотоксичные соединения и продукты их трансформации (фтор - или фосфорсодержащие кислоты, полиолы) – полярные и термолабильные. Некоторые из них способны давать при алкилировании смесь моно- и диэфиров. Реакции дериватизации таких соединений чувствительны к мешающему влиянию матричных компонентов. Этим обстоятельством, а также высокой неспецифической сорбционной активностью и низкими степенями извлечения из гидрофильных матриц органическими растворителями этих соединений обусловлены особые требования, предъявляемые к процедурам, предшествующим дериватизации – выделению из матрицы, концентрированию и очистке фракции целевых веществ. Разработка унифицированных процедур подготовки к ГХМС анализу таких соединений в матрицах различной природы в большинстве случаев проблематична. Рациональным подходом является унификация отдельных стадий анализа.

**Актуальность темы.** Разработка химико-аналитических методов обнаружения, точной структурной идентификации и количественной оценки высокотоксичных веществ и продуктов их трансформации в объектах окружающей среды и биологических пробах человека и животных при токсикологических исследованиях является чрезвычайно актуальной задачей. Надёжные химико-аналитические методы выявления факта воздействия токсичных веществ, идентификации действующего фактора воздействия и оценки уровня экспозиции необходимы как компонент медицинских и судебно- медицинских мероприятий в случаях возможного применения высокотоксичных соединений в условиях военных конфликтов и террористических актов, а также при аварийных ситуациях на предприятиях по хранению и уничтожению химического оружия и других вредных веществ. В соответствии с частью 9 (приложение 46,е-17) «Кон-

венции о запрещении разработки, производства, накопления, применения химического оружия и о его уничтожении» расследования случаев несанкционированного применения отравляющих веществ должны в обязательном порядке включать анализ биологических проб человека и животных (кровь, моча, ткани и др.). В то же время до настоящего времени не разработано документов, обобщающих и регламентирующих подходы к идентификации и анализу токсичных химикатов и продуктов их метаболизма в биосредах. В ряду токсикологически значимых органических соединений велика доля нелетучих веществ. Разработка методик их ГХМС анализа позволила бы решить ряд актуальных задач в области токсикологической экспертизы.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы являлась разработка комплекса методик определения нелетучих высокотоксичных химических соединений и продуктов их превращений в различных средах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

-Исследовать особенности и подобрать условия для количественной дериватизации нелетучих органических соединений, выделенных из объектов окружающей среды и биологических проб.

-Подобрать условия твердофазной экстракции (ТФЭ) на стадии пробоподготовки в целях создания приемлемых условий для последующей дериватизации О-алкилметилфосфонатов (О-АМФК).

-Определить возможности и ограничения метода твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) как альтернативы парофазному анализу (ПФА) в случае пробоотбора из равновесного пара и альтернативы ТФЭ в режиме пробоотбора при погружении микроволокна в пробу.

-Разработать эффективные процедуры дериватизации нелетучих органических веществ при использовании метода ТФМЭ в вариантах пробоотбора из равновесного пара и при погружении микроволокна в пробу.

-Оценить возможности создания унифицированных методик для ГХМС анализа нелетучих органических соединений (галоген-, фосфор-, серусодержащих) в матрицах различной природы в рамках методов ТФЭ и ТФМЭ.

**Научная новизна.** Установлены основные принципы унифицированной ГХМС методики определения нелетучих органических соединений при использовании метода ТФМЭ в режиме отбора летучего производного из равновесного пара. Установлено, что применение метода ТФМЭ позволяет снизить предел

обнаружения этилового эфира фторуксусной кислоты не менее чем в 100 раз в сравнении со статическим ПФА.

Найдены корреляционные зависимости между функцией, отражающей влияние стерического эффекта (для неполярных фаз), параметром гидрофобности (для полярных фаз) и коэффициентом извлечения О-АМФК, позволяющие рассчитать эффективность извлечения определенным типом микроволокна химического соединения по структуре заместителя в пределах исследуемого гомологического ряда.

Проведен систематический анализ особенностей дериватизации нелетучих токсичных соединений и продуктов их деструкции в различных матрицах. Установлено, что дериватизация тиодигликоля (ТДГ), как продукта распада сернистого иприта, в стандартных условиях (при 65°C в течение 30 мин в ацетонитриле) протекает с низким выходом в результате силилирования по одной гидроксильной группе. Увеличение времени реакции относительно стандартных условий и внесение в реакционную смесь пиридина и солей калия предотвращает образование промежуточных продуктов реакции дериватизации.

Идентифицированы 9 компонентов мочи и плазмы крови: 3-гидроксимасляная кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, мочевины, фосфорная кислота, 3-кетовалериановая кислота, 3-гидроксиизовалериановая кислота, пирокатехин, фенилуксусная кислота, *para*-крезол, снижающих возможности достоверной идентификации в биожидкостях следовых количеств МФК и О-АМФК, являющихся продуктами метаболизма фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ).

Найден предпочтительный режим элюирования О-АМФК с патронов с сильным анионообменником (SAX).

Предложено использование дейтерированных стандартов О-АМФК для подтверждения первичной идентификации целевых соединений.

**Практическая значимость.** Разработана и оптимизирована новая унифицированная высокочувствительная методика определения фторуксусной кислоты и ее натриевой соли (ФАН) в воде, биологических пробах (моче, плазме крови, гомогенатах тканей), а также в водных вытяжках различных объектов, основанная на этилировании фторуксусной кислоты, ТФМЭ этилфторацетата и последующем ГХ или ГХМС анализе. Методика апробирована в опытах *in vivo* на лабораторных животных и позволила исследовать токсикокинетику и ток-

сикодинамику отравлений ФАН, установить органы-мишени, в первую очередь кумулирующие этот яд. Методика была использована при разработке средств эффективной терапии отравлений ФАН, выборе оптимального средства терапии (в настоящее время являющегося объектом патентования) и описании механизмов его действия.

Разработана процедура отбраковки и направления на повторный анализ проб, в которых степень извлечения целевых веществ ниже установленного порогового значения.

Разработан и опробован на практике высокочувствительный способ определения ТДГ в морской воде (предел обнаружения 1 мкг/л). Методика обнаружения ТДГ в морской воде прошла государственную метрологическую экспертизу и была использована при выполнении работ по корректировке трассы Северо - Европейского газопровода Нордстрим по дну Балтийского моря.

Разработаны и опубликованы методические указания «Химико-аналитический и санитарно-химический контроль основных продуктов распада ФОВ» (МУК 4.1-04).

Разработаны и находятся на стадии утверждения методические указания по установлению факта воздействия ФОВ на организм человека и животных по результатам анализа биосред.

Методики идентификации высокотоксичных веществ и продуктов их превращений в биологическом материале рекомендованы Федеральным медико-биологическим агентством (ФМБА России) для применения в токсикологических центрах, находящихся под эгидой ФМБА, при проведении медицинских и судебно-медицинских мероприятий по выявлению факта воздействия отравляющих, токсичных веществ в потенциальных объектах токсикологической экспертизы (вода, почва, биологические пробы).

Методики определения продуктов распада ФОВ методом ГХМС в почве (МВИ № 242/12-04) и воде (МВИ № 242/11-04) прошли метрологическую аттестацию и внесены в Госреестр методик Российской Федерации, рекомендуемых к применению для санитарно-химического сопровождения программы уничтожения химического оружия (УХО) в России. В настоящее время МВИ № 242/12-04 используется в целях экологического мониторинга санитарно-защитной зоны объектов УХО (Марадыковский, Щучье).

### **На защиту выносятся:**

1. Экспериментальные приемы применения метода ТФМЭ в ГХМС анализе нелетучих органических соединений в токсикологических исследованиях, позволяющие повысить чувствительность, преодолеть матричный эффект и обеспечить более эффективное использование хроматографической и масс-спектрометрической систем.
2. Способы дериватизации нелетучих органических соединений - маркеров токсического воздействия, в различных матрицах.
3. Результаты исследования зависимости степени извлечения О-АМФК при проведении ТФЭ от природы элюента.
4. Иммобилизация определяемого вещества на микроволокне из равновесного пара как способ преодоления матричного эффекта и основа для разработки унифицированной методики анализа.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на конференции «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (25-30 сентября 2005 г., г. Краснодар), на I съезде физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» (19-23 сентября, г. Сочи), Annual Meeting of the American Institute of Chemical Engineers (30 октября – 04 ноября, 2005., г. Цинциннати, США), PITTCON (12-17 марта 2006г., Орландо, Флорида, США), X-ой Международной конференции «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбция и хроматография» (24-28 апреля 2006 г., г. Клязьма, Московской обл.), 9<sup>th</sup> International Chemical Weapons Demilitarisation Conferenc, CWD 2006, (15 – 18 мая 2006 г., Люнебург, Германия), The Sixth International Chemical and Biological Medical Treatment Symposium (30 апреля-5 мая 2006, SPIEZ, Швейцария), Science workshops and seminars «Analysis of toxic substances: method of development and applications» (19-20июня 2006 г., С-Петербург (Пушкин)), 3-ей Международной научно-практической конференции «Новые технологии создания инновационных лекарств. От достижений «постгеномной эры» к национальным фармацевтическим брендам» (1 декабря 2006г, Московская обл, г.о. Химки, Центр высоких технологий «ХИМРАР»), на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 45-летию ФГУП НИИГПЭЧ ФМБА России (15-16 февраля 2007 г., Санкт-Петербург), Международном семинаре по деконтаминации «Очистка зданий и сооружений, загрязненных в результате химического терроризма» (11-13 сентября 2006 г. Москва), 4-м Всемирном конгрессе по химическому, биологическому и радиологическому терроризму (15-19 апреля 2007 г.,

Дубровник, Хорватия), Международном конгрессе по управлению отходами Вэйст-Тэк (31 мая - 3 июня 2007 г., г. Москва), Международном семинаре МНТЦ «Предупреждение и устранение последствий химически опасных чрезвычайных ситуаций, обусловленных терроризмом и промышленными авариями» (18-20 сентября 2007 г., г. Санкт-Петербург), II-ой Всероссийской конференции «Аналитика России» (7-12 октября 2007 г., г. Краснодар).

**Публикации.** По материалам исследований опубликованы 32 научных работы в виде статей, тезисов докладов, методик и методических указаний.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы.

Диссертация изложена на 140 страницах, содержит 24 рисунка, 46 таблиц и список литературы из 152 наименований.

### **Основное содержание работы**

#### **Оборудование, исходные вещества, методика эксперимента**

Работа выполнена с использованием хромато-масс-спектрометрических приборных комплексов GCMS 5000 Shimadzu и QP 2010 Shimadzu (Япония), включающих газовый хроматограф, многофункциональный масс-спектрометр с квадрупольным (GCMS 5000) и квадрупольно-октапольным (QP 2010) детекторами и систему обработки данных GCMS Solution. Приборы оборудованы инжектором для ввода проб с делением/без деления потока. Для разделения летучих производных использовали капиллярные кварцевые колонки DB-5MS (Supelco) 25м×0,2мм×0,33мкм. ГХ анализы выполнены на газовом хроматографе HP 5890 (Hewlett Packard) с ионизационно-пламенным детектором с использованием капиллярной колонки HP-5 (Supelco) 25м×0,2мм×0,33мкм.

Объектами целевого анализа были: фторуксусная кислота (ФК) и ФАН, метилфосфоновая кислота (МФК) и О-АМФК (О-изопропил МФК, О-изобутил МФК, О-пинаколил МФК), а также ТДГ.

Для подготовки проб к ГХМС анализу были разработаны подходы, основанные на жидкостной, твердофазной экстракции и твердофазной микроэкстракции. Последняя осуществлялась как в режиме отбора проб из равновесного пара, так и в режиме погружения микроволокна в пробу.

Для получения летучих производных целевых веществ использовали процедуры дериватизации, производимой в экстрактах, в сухом остатке пробы или на микроволокне.

В качестве внутренних стандартов использовали: трибутилфосфат, толуол, четыреххлористый углерод, дейтерированные О-АМФК, *мета*-фторбензойную кислоту, тиодипропанол.

Хроматографическое разделение проводили как в изотермическом режиме, так и в режиме программирования температуры. В качестве газа-носителя использовали гелий марки «А» (99,99%).

Масс-спектрометрическую регистрацию летучих производных целевых веществ осуществляли в режиме полного ионного тока (ПИТ) или селективного ионного детектирования (СИД). Масс-спектры получали в условиях электронной ионизации (ЭИ). Энергия ионизирующих электронов 70 эВ.

Объектами исследования служили: водопроводная и морская вода, почва, биологические пробы (плазма крови, гомогенаты тканей, моча) с добавками целевых веществ, пробы почвы, доставленные с объекта УХО, а также биопробы после экспонирования соответствующими токсичными соединениями цельной крови и плазмы крови человека и животных в опытах *in vitro*, плазма крови, моча и гомогенаты органов и тканей лабораторных животных (кроликов и крыс), полученные при интоксикации животных в опытах *in vivo*.

### **Особенности следового химического анализа в токсикологической экспертизе**

Целевыми веществами для химического анализа в токсикологической экспертизе могут быть как сами высокотоксичные вещества (например, фторуксусная кислота (ФК) и ее соли), так и продукты их биогенной и абиогенной трансформации: ТДГ, как основной продукт гидролиза сернистого иприта, МФК и О-АМФК, как продукты трансформации ФОВ. Анализ маркеров токсического воздействия актуален как в биологических пробах для подтверждения факта отравления и идентификации токсиканта, так и в «небиологических» пробах, через которые возможна опосредованная доставка токсичного агента в организм. Маркеры, как правило, бифункциональны, имеют гидрофильную или гидрофильно-гидрофобную природу, часто являются продуктами гидролиза и содержат в своей структуре одну, а преимущественно две и более гидроксильных групп. Такие соединения не являются традиционным объектом ГХ анализа, их дериватизация в рамках классических процедур требует особых подходов. В сложных матрицах подтверждающая идентификация, особенно в следовом анализе, является самостоятельной проблемой, не имеющей достоверного решения

на основании только хроматографической информации. Последнее особенно актуально в отношении биологических проб, при анализе которых, как было подтверждено нами в модельных экспериментах, даже ГХМС в режиме СИД не обеспечивает надежной идентификации. В таких случаях требуется либо дополнительная очистка пробы, либо идентификация по полному масс-спектру.

### **Особенности выделения из матрицы, разделения и концентрирования нелетучих органических соединений.**

#### **Оценка возможности создания унифицированных методик**

Метод жидкостной экстракции находит незначительное применение для извлечения высокополярных аналитов из водных сред. Даже при использовании полярных экстрагентов и высаливающих агентов степени извлечения ФК, МФК, О-АМФК и ТДГ из водных растворов не превышают (10 – 40) %. Вместе с тем, жидкостная экстракция может быть успешно применена для очистки проб от гидрофобных примесей (очистка водных вытяжек почвы и биологических проб хлористым метилом в анализе МФК и О-АМФК). Для анализа твердых объектов (почва, стройматериалы, биологические ткани, растертые с сульфатом натрия) может применяться экстракция ацетонитрилом в ультразвуковой ванне (извлечение МФК и О-АМФК из стройматериалов), но более эффективна экстракция щелочными водными растворами (извлечение МФК и О-АМФК из почвы, рН 10). Для подготовки к анализу нелетучих органических соединений в водных средах, к числу которых относятся не только вода, но и водные вытяжки из твердых проб и гомогенатов биологических тканей, моча, депротеинизованная кровь и плазма, классическим подходом является упаривание досуха и перерастворение в субстанциях, наиболее приемлемых для последующей дериватизации. Если дериватизация нелетучего соединения проводится в сухом остатке, а отбор летучего производного (например, этилового эфира ФК) возможен из равновесного пара, например методом ТФМЭ, характер матрицы малосущественен, и унификации поддаются все стадии анализа. ТФМЭ из равновесного пара сохраняет все преимущества ПФА, но обеспечивает существенно более высокую чувствительность. На этой основе для определения ФАН нами предложен новый унифицированный высокочувствительный способ ГХ анализа с ионизационно-пламенным и МС детектированием в воде и биологических пробах, соответственно. Способ основан на упаривании образца (воды или ацетонитрильного экстракта биопробы) досуха, этилировании сухого ос-

татка этиловым спиртом в присутствии серной кислоты, отборе этилового эфира ФК из равновесного пара на микроволокно с последующим ГХМС анализом. Определены оптимальные условия для проведения ТФМЭ, а также установлено, что применение ТФМЭ для извлечения из матрицы и концентрирования аналита позволяет повысить чувствительность определения на 2 порядка в сравнении со статическим ПФА. В табл. 1 представлены результаты определения содержания ФАН в водопроводной воде методами ПФА и ТФМЭ.

**Таблица 1.** Результаты определения содержания ФАН в водопроводной воде методами ПФА и ТФМЭ

Внесено ФАН, мг/л	Найдено, мг/л	
	ПФА	ТФМЭ
10,0	10,4 ± 0,8	9,55 ± 0,68
5,0	4,3 ± 0,8	4,68 ± 0,65
0,5	≤5*	0,43 ± 0,16
0,005	≤5*	0,005 ± 0,002

\*- предел обнаружения 5 мг/л

В тех случаях, когда невозможен отбор летучего производного из равновесного пара, дериватизация целевых веществ проводится либо в сухом остатке, полученном после упаривания пробы или соответствующего экстракта, либо на микроволокне. В этом случае унификации подлежат отдельные стадии процедур.

### **Выбор режима дериватизации МФК и О-АМФК**

Продукты как биогенного, так и абиогенного гидролиза ФОВ - МФК и О-АМФК, методами ГХ и ГХМС могут быть определены только в виде производных. При их анализе ГХМС в режиме ионизации электронным ударом наиболее часто используют дериватизацию с получением метиловых, триметилсилиловых, а в последние годы – *трет*-бутилдиметилсилиловых (ТБДМС) эфиров. Для выбора процедуры дериватизации в рамках настоящей работы было проведено сравнительное исследование эффективности дериватизации с применением трех указанных выше процедур. Интересно отметить, что в виде разных производных О-АМФК обнаруживают различный порядок выхода с хроматографической колонки со стандартной слабополярной фазой. При метилировании О-пинаколил МФК образуются четыре диастереомерные формы, которые

выходят в виде 2-х пиков (группируясь парами); при силилировании МФК и О-АМФК образуются эфиры, дающие одиночные пики на хроматограмме.

При выборе процедуры получения производных во внимание принимали ее вклад в обеспечение чувствительности, селективности и воспроизводимости анализа. Выбор был сделан в пользу *трет*-бутилдиметилсилилирования МФК и О-АМФК с целью их последующего целевого ГХМС анализа. Характеристики, необходимые для анализа ТБДМС эфиров О-АМФК, полученные в режиме программирования температуры и при ионизации электронным ударом, приведены в табл. 2. Линейно-логарифмические индексы удерживания рассчитывали с помощью компьютерной программы в формате Q Basic.

При анализе проб биохимической природы требуются особые режимы силилирования МФК и О-АМФК с учетом биогенных компонентов плазмы крови. Нами установлено, что определению О-АМФК в плазме крови мешают 2-гидроксимасляная кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, мочевины, фосфорная кислота, 3-кетовалериановая кислота. Введение процедуры предварительной очистки хлористым метиленом подкисленных до pH 2 экстрактов биопроб позволило снизить мешающее влияние компонентов матрицы.

**Таблица 2.** Масс-спектры и индексы удерживания (RI) на стандартных слабополярных фазах ТБДМС эфиров МФК и О-АМФК

Соединение	Масс-спектр ЭУ	RI
МФК	45(12), 73(55), 75(12), 135(12), 153(13), 225(11), <b>267</b> (100), 268(20), 269(10), 309(5)	1571
О-изопропил МФК	45(7), 73(6), 75(20), 77(4), 121(5), <b>153</b> (100), 154(10), 155(5), 195(6), 237(3)	1314
О-изобутил МФК	45(6), 57(4), 73(8), 75(19), 77(4), 121(6), <b>153</b> (100), 154(10), 155(6), 193(1), 195(4), 209(3), 211(2)	1427
О-пинаколил МФК	45(8), 53(9), 55(12), 56(7), 67(8), 69(54), 73(8), 75(20), 84(19), 121(9), <b>153</b> (100), 154(13), 182(7), 195(7), 211(9), 237(13).	1536

Проведена оценка селективности определения МФК и О-АМФК в биопробах путем сравнительного анализа проб плазмы крови *in vitro* экспонированной метафосом (инсектицид, применяется в качестве имитатора RVX) и образцов плазмы крови *in vitro* экспонированных ФОВ (RVX и зоманом). Установлено, что продукты превращения метафоса (RT 26,4 – не идентифицирован, RT 29,1 - *para*-нитрофенол) имеют в масс-спектре сигнал, соответствующий  $m/z$  153 аналогично ТБДМС эфирам О-изобутил МФК (продукт метаболизма RVX) и О-пинаколил МФК (продукт метаболизма зомана) и близкое с ними время выхода на хроматографической колонке со стандартной слабополярной фазой. Проведенные исследования свидетельствуют о принципиальной возможности ошибок при диагностике поражений, вызванных антихолинэстеразными ядами (RVX, зоман, метафос) при проведении анализа методом ГХМС в режиме СИД без идентификации ТБДМС эфиров О-изобутил МФК и О-пинаколил МФК по полному масс-спектру.

Проведено определение органических соединений, мешающих анализу МФК и О-АМФК в моче. Установлено, что определению О-изопропил МФК в моче человека практически не мешают компоненты матрицы. Определению МФК мешают *para*-крезол (в условиях анализа хроматографически не отделяется) и 3-гидроксимасляная кислота; определению О-изобутил МФК мешает 3-гидроксиизовалериановая кислота и бутандиол моноацетат (идентифицирован предположительно); определению О-пинаколил МФК – пирокатехин и фенилуксусная кислота. Применение метода ГХМС в сочетании с ТФМЭ позволило преодолеть негативное влияние матричного эффекта.

### **Результаты исследования зависимости степени извлечения МФК и О-АМФК при проведении ТФЭ от природы элюента**

Для подготовки проб к ГХМС анализу ТФЭ используется в режиме удерживания как целевых веществ, так и примесей. Для извлечения полярных органических аналитов кислотной природы наиболее эффективно применение сильных анионообменников. Катионообменники эффективны для удаления ионов металлов из водных проб, а гидрофобные сорбенты – неполярной органики. Для выделения и концентрирования МФК и О-АМФК из воды и предварительно очищенных экстракцией хлористым метиленом водных вытяжек почвы применяли ТФЭ в режиме анионообменной хроматографии с применением сильного анионообменника - силикагеля, модифицированного четвертичными аммоние-

выми группами (SAX). Элюат упаривали досуха. Определение МФК и О-АМФК проводили в виде силилированных производных.

В рамках указанной процедуры наиболее значимой является стадия элюирования, условия которой необходимо было оптимизировать.

При выборе элюентов руководствовались общими принципами элюирования, характерными для анионообменных процессов. В качестве элюентов были опробованы следующие реагенты:

-раствор кислоты в органическом растворителе (раствор соляной кислоты в метаноле, растворы муравьиной кислоты в метаноле и ацетонитриле);

-раствор основания в органическом растворителе (гидроксид натрия и аммиак в метаноле, диэтиламин в метаноле);

-элюент, содержащий противоион с более высокой специфической селективностью (водный раствор бромида натрия).

Положительный результат был получен только с 5 элюентами из опробованных 12 (табл. 3).

**Таблица 3.** Результаты тестирования различных растворов в качестве элюентов

№	Элюент	Результат элюирования
1.	0,1 н. раствор HCl в метаноле	_*
2.	0,15 н. раствор HCl в метаноле	-
3.	Муравьиная кислота : метанол (0,3:10)	+**
4.	Муравьиная кислота : ацетонитрил (0,6:10)	+
5.	0,3М водный раствор NaBr	-
6.	3% NH <sub>3</sub> в метаноле	-
7.	1,8М раствор диэтиламина в метаноле	-
8.	0,1 н. NaOH в метаноле	+
9.	0,5 н. NaOH в метаноле	-
10.	1 н. NaOH в метаноле	+
11.	3% NH <sub>3</sub> в метаноле : 1 н. NaOH в метаноле (9:1)	-
12.	3% NH <sub>3</sub> в метаноле : 25% NH <sub>3</sub> в воде (4,5: 0,5)	+

\* (-) - регистрируемые хроматографические пики определяемых веществ с соотношением сигнал/шум менее 3:1

\*\*(+)- регистрируемые хроматографические пики определяемых веществ с соотношением сигнал/шум более 3:1

Основная проблема возникла при упаривании элюата досуха, так как присутствие нелетучих веществ в пробе снижало выход реакции силилирования.

Низкие степени извлечения целевых веществ, выпадение неорганического осадка, препятствующего концентрированию пробы до малого объема, заставили продолжить поиск подходящего элюента. Наиболее предпочтительным был признан элюент, содержащий 4,5 мл 3% метанольного раствора  $\text{NH}_3$  и 0,5 мл 25% водного раствора  $\text{NH}_3$ . В табл. 4. представлены результаты, полученные при применении данного элюента. Параллельно для сравнения, представлены результаты опыта, в котором в качестве элюента был использован 0,1н. раствор  $\text{NaOH}$  в метаноле (лучший из ранее исследованных). В качестве внутреннего стандарта использовали трибутилфосфат, который вносили в пробу перед дериватизацией.

Существенным преимуществом выбранного элюента является отсутствие солевого осадка при упаривании элюата, который снижал бы выход реакции дериватизации с использованием *N,O*-бис(триметилсилил)трифторацетамида в качестве силилирующего агента. МФК, обладающая повышенной неспецифической сорбционной активностью, обнаруживает низкие степени извлечения, независимо от используемого элюента.

**Таблица 4.** Зависимость степени извлечения МФК и О-АМФК от природы элюента

Название соединения	Степень извлечения О-АМФК, % (n=3)	
	3% $\text{NH}_3$ в метаноле : 25% $\text{NH}_3$ в воде (4,5 : 0,5)	0,1н. $\text{NaOH}$ в метаноле
МФК	29±21	34±20
О-изопропил МФК	74±37	17±9
О-изобутил МФК	84±38	7±5
О-пинаколил МФК	98±25	17±7

Анализ литературных публикаций показывает, что большинство авторов при подборе условий проведения ТФЭ в режиме ионообменной хроматографии (выбор сорбента, противоиона, элюента) исходят из эмпирических, а не теоретических закономерностей.

#### **Преимущества применения метода ТФМЭ в режиме погружения микроволокна в пробу как альтернативы ТФЭ**

Метод ТФЭ с применением сильного анионообменника не удалось адаптировать к анализу мочи. В последние годы в качестве альтернативы методу ТФЭ все чаще выступает метод ТФМЭ, позволяющий объединить в пределах

одной стадии анализа процедуры извлечение из матрицы, концентрирование, дериватизацию и ввод пробы в хроматограф. Для успешного использования метода ТФМЭ решающее значение имеет правильный выбор микроволокон, условий проведения сорбции (температура, время, режим перемешивания пробы, ионная сила анализируемого раствора) и десорбции (температура, время задержки сброса).

В отличие от некоторых родственных технологий, ТФМЭ на микроволоконе предоставляет уникальную возможность экспериментировать с различными типами микроволокон, отличающимися химической природой сорбирующей фазы и размерами микропор.

Эффективность того или иного микроволокон для определения конкретных органических соединений в значительной степени зависит от качественного и количественного состава анализируемой пробы в целом. Большое значение имеет уровень фонового сигнала в ГХМС анализе, который очень высок в случае полярных микроволокон (на основе полиакриловых полимеров) и мешает определению. Кроме того, анализируемые вещества конкурируют между собой и с матричными компонентами в процессе сорбции. Итоговый результат этих процессов заранее непредсказуем и может быть получен лишь в эксперименте с реальными пробами.

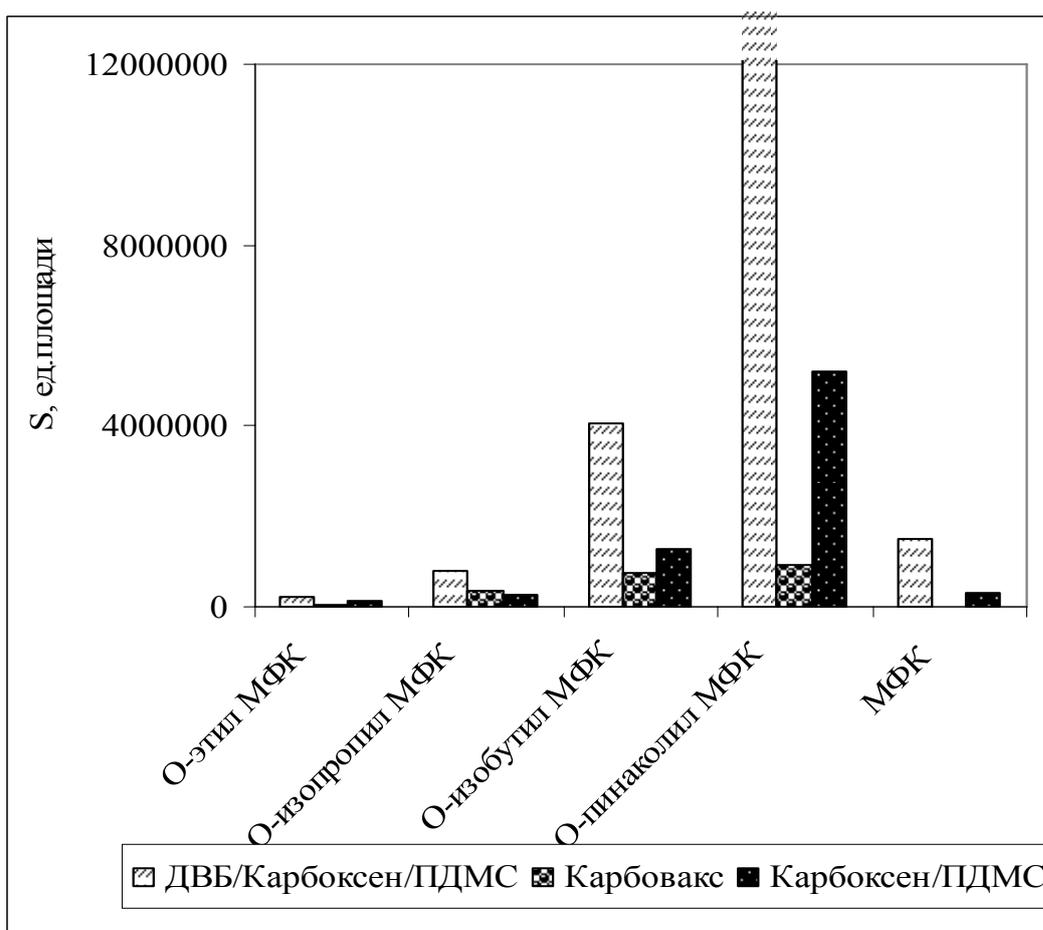
Для анализа МФК и О-АМФК в моче нами была предложена процедура, включающая: извлечение МФК и О-АМФК из мочи на микроволокон, их силилирование *N*-метил-*N*-трет-бутилдиметилсилилтрифторацетамидом (МТБСТ-ФА) непосредственно на микроволоконе, термодесорбция полученных производных в горячем испарителе газового хроматографа, ГХ разделение и МС детектирование в режиме СИД. В целях повышения чувствительности метода были проведены исследования по оптимизации ряда экспериментальных параметров.

Было опробовано три типа микроволокон различной полярности: сополимер дивинилбензол/карбоксен/полидиметилсилоксан (50/30um DVB/Carboxen/PDMS), карбоксен/полидиметилсилоксан (85um Carboxen/PDMS) и карбовакс/дивинилбензол (70um Carbowax/DVB) (рис.1). Наиболее предпочтительным оказалось микроволокон на основе сополимера дивинилбензола и полидиметилсилоксана (50/30um DVB/Carboxen/PDMS).

Для неполярных микроволокон установлена четкая корреляционная зависимость между параметром  $E_S^0$ , отражающей влияние стерического эффекта алкильного заместителя в молекуле О-АМФК и коэффициентом извлечения. Для микро волокна DVB/Carboxen/PDMS корреляционная зависимость выражена уравнением (1):

$$S_{O-AMФК} / S_{MФК} = -5,56 \times E_S^0 - 2,91 \quad (1)$$

$R^2 = 0,979$  при уровне значимости  $F=0,010592$ .



**Рис. 1** Эффективность различных микроволокон для определения МФК и О-АМФК в виде ТБДМС эфиров

Для микро волокна Carboxen/PDMS - уравнением (2):

$$S_{O-AMФК} / S_{MФК} = -4,88 \times E_S^0 - 1,88 \quad (2)$$

$R^2 = 0,981$  при уровне значимости  $F=0,009671$ .

Для МФК, имеющей в структуре две полярные ОН - группы, стерический эффект не существен.

Для полярного микроволокна степень извлечения больше коррелирует не со стерическим эффектом, а с константой распределения О-АМФК в системе 1-октанол:вода  $\log P$ , являющейся мерой гидрофобности этих соединений в целом. Для микроволокна Carbowax/DVB корреляционная зависимость выражена уравнением (3):

$$\frac{S_{O-AMFK}}{S_{MFK}} = 432,39 \times \log P + 674,49 \quad (3)$$

$R^2 = 0,988$  при уровне значимости  $F=0,01167$ .

(Значения величин  $\log P$  для МФК и О-АМФК были рассчитаны по структуре молекул методом молекулярной механики ММ2 с помощью программного обеспечения CS ChemUltra).

Полученные результаты согласуются с классическими представлениями теории сорбционных процессов: стерические факторы являются определяющими при удерживании О-АМФК на твердых пористых сорбентах (DVB/Carboxen/PDMS, Carboxen/PDMS), в то время как показатель гидрофобности является определяющим для эффективности удерживания аналитов жидкой фазой Carbowax.

Таким образом, найденные корреляционные зависимости позволяют рассчитать эффективность извлечения определенным типом микроволокна, при проведении ТФМЭ, химического соединения в пределах исследуемого гомологического ряда по структуре заместителя.

Остальные параметры процедуры ТФМЭ (табл. 5) были оптимизированы последовательно.

Экспериментально установлено, что применение ТФМЭ для извлечения из матрицы и концентрирования МФК и О-АМФК позволяет значительно повысить чувствительность определения в сравнении с методом ТФЭ. В табл. 6 представлены результаты определения содержания МФК и О-АМФК в водопроводной воде методами ТФЭ и ТФМЭ.

Максимальная чувствительность определения О-пинаколил МФК, достигаемая при применении как ТФЭ так и ТФМЭ, может быть объяснена преимущественно наибольшей липофильностью этого соединения в исследуемом ряду.

**Таблица 5.** Рекомендуемые параметры метода ТФМЭ для анализа МФК и О-АМФК в моче

Фактор	Параметр
Тип микроволокна	50/30 $\mu\text{m}$ DVB Carboxen/PDMS
Режим кондиционирования микроволокна	15 мин в горячем инжекторе и далее 5 минут в парах силилирующего агента при комнатной температуре
Температура сорбции	Комнатная
Температура десорбции	250°C
Время сорбции	30 мин
Высаливание	Добавка равного объема насыщенного раствора хлористого натрия
Время десорбции	0,5 мин
Режим сорбции	Погружение микроволокна в пробу
Режим дериватизации	В парах дериватирующего агента при комнатной температуре

**Таблица 6.** Средние значения по результатам параллельных определений (n=3) содержания МФК и О-АМФК в водопроводной воде методами ТФЭ и ТФМЭ

№ п/п	Название соединений	Внесено, мг/л	Найдено, мг/л	
			ТФЭ	ТФМЭ
1	О-изопропил МФК	1	0,7±0,3	0,8±0,4
		0,1	≤0,2	0,07±0,03
		0,01	≤0,2	0,005±0,003
		0,001	≤0,2	≤0,005
2	МФК	1	0,3±0,2	0,6±0,4
		0,1	≤0,4	0,05±0,04
		0,01	≤0,4	0,006±0,006
		0,001	≤0,4	≤0,01
3	О-изобутил МФК	1	0,6±0,3	0,7±0,4
		0,1	≤0,2	0,07±0,05
		0,01	≤0,2	0,006±0,005
		0,001	≤0,2	≤0,005
4	О-пинаколил МФК	1	0,8±0,2	0,9±0,5
		0,1	0,07±0,04	0,08±0,04
		0,01	≤0,1	0,009±0,006
		0,001	≤0,1	0,001±0,001

### **Сочетание аналитических параметров для ГХМС определения ТДГ**

При силилировании ТДГ необходимо контролировать и исключать возможность образования моноэфиров в качестве конечных продуктов реакции. При силилировании ТДГ в стандартных условиях (растворитель – ацетонитрил, 30 мин, 60°C) преимущественно образуется монопроизводное ТДГ (ТДГ МТБСТФА,  $m/z$  179, 163). Для выбора предпочтительных условий получения диэфира ТДГ [ТДГ (МТБСТФА)<sub>2</sub>,  $m/z$  189, 293] было опробовано четыре процедуры дериватизации ТДГ с использованием различных растворителей.

Проведенные исследования показали, что при дериватизации ТДГ реагентом МТБСТФА получение диэфира с максимальным выходом достигается путем внесения в реакционную смесь неорганических солей калия и проведения реакции в смеси растворителей ацетонитрил:пиридин (10:1) при температуре 85°C в течение 1 часа. Пиридин и соли калия, по-видимому, выступают в качестве катализатора реакции между монопроизводным ТДГ и МТБСТФА.

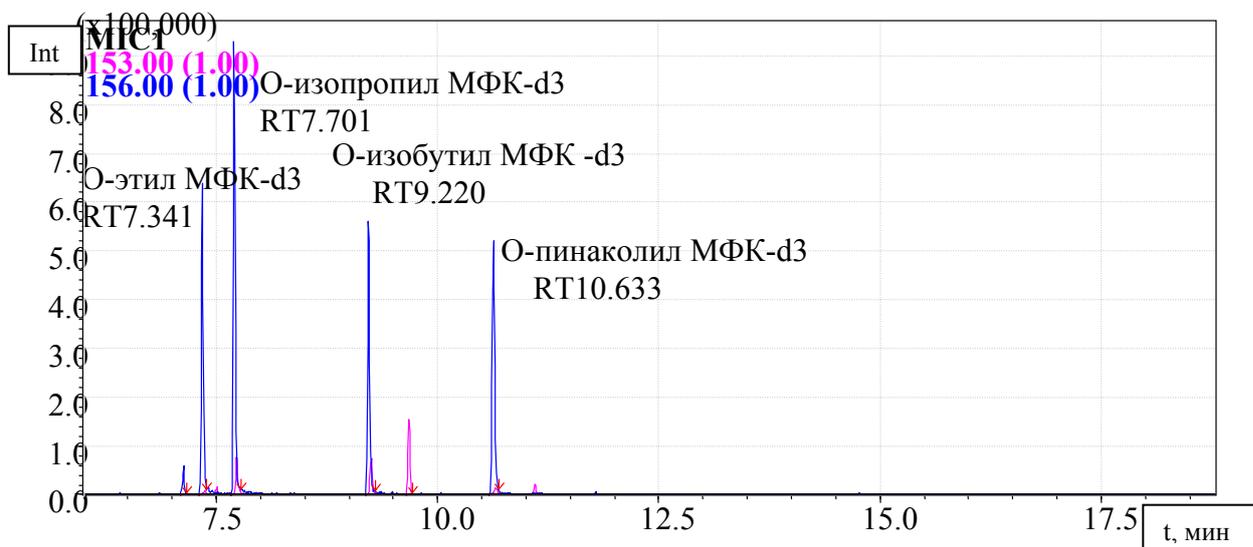
### **Обоснование необходимости использования внутренних, или суррогатных, стандартов для проведения количественных определений и устранения ложноотрицательных ответов**

В ГХМС анализе нелетучих органических соединений внесение в пробу внутренних или суррогатных стандартов на ранних стадиях анализа не только полезно для уточнения количественного результата, но и необходимо во избежание ложноотрицательных ответов в тех случаях, когда вариации в составе пробы или ошибки в пробоподготовке приводят к тому, что площадь пика внутреннего (суррогатного) стандарта меньше установленного порогового значения и, следовательно, прогноз достижения удовлетворительной степени извлечения целевого вещества неблагоприятен.

Ввиду возможного частичного перекрытия пиков внутреннего стандарта и матричных компонентов пробы, при анализе ФАН в биологических пробах использовали два внутренних стандарта (толуол и четыреххлористый углерод). Поскольку содержание ФК в анализируемой пробе не может быть предсказано, один из внутренних стандартов (четырёххлористый углерод) вносили в пробу в количестве, близком к нижней границе линейного диапазона, другой (толуол) – в количестве, близком к верхней границе линейного диапазона.

Для контроля правильности проведения химических анализов морской воды на содержание ТДГ в пробу вносили в качестве внутреннего стандарта *мета*-фторбензойную кислоту. В тех случаях, когда площадь пика внутреннего стандарта была меньше заданной пороговой величины, или его время удерживания не попадало в заданный интервал, пробы направлялись на повторный ГХМС анализ. Если удовлетворительная площадь пика и (или) время удерживания внутреннего стандарта не достигалась и в этом случае, пробы готовили повторно. Из 46 проанализированных проб морской воды 8 были направлены на повторный анализ, т.к. площадь пика внутреннего стандарта не достигала порогового значения.

Для повышения надежности идентификации О-АМФК в моче были использованы дейтерированные стандарты О-АМФК. На рис. 2 представлена масс-фрагментограмма ТБДМС эфиров дейтерированных стандартов О-АМФК.



**Рис. 2** Масс – фрагментограмма ТБДМС эфиров дейтерированных О-АМФК. При ГХМС-СИД анализе ТБДМС эфиров О-АМФК проводится регистрация интенсивностей сигналов ионов с массовым числом  $m/z$  153. Как видно из рис. 2, дейтерированные стандарты также дают сигналы с  $m/z$  153 с интенсивностью в среднем 10 % по отношению к интенсивности основного сигнала в их масс-спектрах (иона  $m/z$  156). Поэтому внесение в пробу дейтерированных ( $d_3$ ) стандартов может приводить к искажению результатов количественного анализа и послужить источником ложно-положительных ответов при идентификации. При обнаружении О-АМФК в следовых количествах в биоматрицах повторный ГХМС анализ с внесением дейтерированных стандартов позволяет подтвердить ГХ и МС идентификацию.

## Выводы

1. Показано, что в случае, когда возможна дериватизация нелетучего аналита непосредственно в пробе, а отбор летучего производного производится из равновесного пара (например, этилового эфира ФК) характер матрицы малосущественен, и унификации поддаются все стадии анализа. В остальных случаях унификации подлежат отдельные стадии анализа (режим ГХМС анализа, дериватизации и др.).
2. Изучены варианты дериватизации МФК и О-АМФК различными реагентами; показано, что для дериватизации МФК и О-АМФК предпочтительным является *трет*-бутилдиметилсилилирование. Проведен выбор режима силилирования О-АМФК с учетом биогенных компонентов плазмы крови и мочи. Установлено, что определению О-АМФК в плазме крови мешают 2-гидроксимасляная кислота, 3-гидроксипропионовая кислота, мочевины, фосфорная кислота, 3-кетовалериановая кислота. Установлено также, что определению О-изопропил МФК в моче человека практически не мешают компоненты матрицы, определению МФК мешают *пара*-крезол и 3-гидроксимасляная кислота, определению О-изобутил МФК мешает 3-гидроксиизовалериановая кислота и бутандиол моноацетат (идентифицирован предположительно), определению О-пинаколил МФК – пирокатехин и фенилуксусная кислота.
3. Для элюирования О-АМФК с патрона с сильным анионообменником из 12 опробованных элюентов наилучшие результаты были получены с использованием в качестве элюента смеси 3% метанольного раствора  $\text{NH}_3$  и 25% водного раствора  $\text{NH}_3$  в соотношении 9 : 1. Разработанная процедура анализа О-АМФК была положена в основу методики определения продуктов распада фосфорорганических отравляющих веществ в почве.
4. Показано, что маркеры воздействия на организм ФОВ (О-алкилметилфосфонаты) и сернистого иприта (тиодигликоль) методом ГХМС в режиме ионизации электронным ударом эффективно определяются в виде *трет*-бутилдиметилсилиловых эфиров. Однако для О-алкилметилфосфонатов предпочтительным является *трет*-бутилдиметилсилилирование парами дериватирующего агента на микроволокне, а для тиодигликоля – дериватизация в упаренной досуха и перерастворенной в смеси ацетонитрила и пиридина пробе.

5. Экспериментально подтверждено, что при разработке методик на основе ГХМС-ТФМЭ решающее значение имеет подбор таких параметров как тип микроволокна, температура и время пробоотбора, ионная сила раствора. Влияние указанных факторов в равной мере проявляется как в случае пробоотбора из равновесного пара (этиловый эфир ФК), так и при погружении микроволокна в пробу и дериватизации аналитов непосредственно на нем парами силилирующего агента (определение О-алкилметилфосфонатов в воде и моче). По результатам экспериментальных исследований показано, что наиболее эффективным является микроволокно на основе сополимера полидиметилсилоксана – дивинилбензола. Найдены корреляционные зависимости между функцией, отражающей влияние стерического эффекта (для неполярных фаз), параметром гидрофобности (для полярных фаз) и коэффициентом извлечения О-АМФК, позволяющие рассчитать эффективность извлечения определенным типом микроволокна химического соединения в пределах исследуемого гомологического ряда по структуре заместителя.

6. Установлено, что при алкилировании тиодигликоля необходимо контролировать и исключать возможность образования промежуточных продуктов дериватизации. В случае *трет*-бутилдиметилсилилирования ТДГ получение диэфира с максимальным выходом достигается путем внесения неорганических солей калия и проведения реакции в смеси растворителей ацетонитрил : пиридин.

7. Предложено использование дейтерированных ( $d_3$ ) стандартов О-АМФК для подтверждения первичной идентификации в следовом анализе этих соединений независимо от используемого метода подготовки проб.

### Список публикаций по теме диссертации

1. Koryagina N.L., Savelieva E.I., Khlebnikova N.S., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Radilov A.S. Determination of fluoracetic acid in water and biological samples by GC-FID and GC-MS in combination with solid-phase microextraction. // J. Anal. Bioanal. Chem. – 2006 – V.386 – No.5 – P.1395-1400.
2. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Гончаров Н.В., Хлебникова Н.С., Радиллов А.С. Применение метода газовой хроматографии с ионизационно-пламенным и масс-селективным детектированием для определения содержания фторацетата натрия в воде и биомедицинских пробах. // Токсикологический вестник. – 2007 - №1 - С.29-36.
3. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Радиллов А.С. Сравнение эффективности статического парофазного анализа и твердофазной микроэкстракции при газохроматографическом определении фторацетата натрия в питьевой воде. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007 - Т.7 - Вып.3 - С. 420-424.
4. Рембовский В.Р., Ермолаева Е.Е., Савельева Е.И., Гончаров Н.В., Цибульская Е.А., Корягина Н.Л., Хлебникова Н.С., Цимбал Ф.А. Токсиколого-гигиеническая оценка опасности отходов бывших предприятий по производству и использованию отравляющих веществ. // Российский химический журнал. – 2007 - Т.ЛІ - №2 - С.77-82.
5. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Радиллов А.С. Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови // Тезисы докладов на конференцию «Разделение и концентрирование в аналитической химии». г. Краснодар 25 - 30 сентября 2005 г. С.406.
6. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Фельд В.Э., Радиллов А.С.. Установление факта воздействия зомана на организм по результатам анализа мочи. // X Международная конференция «Теоретические проблемы химии поверхности, адсорбции и хроматографии». г. Клязьма, Московская область 24 - 28 апреля 2006 г. С.291.
7. Savelieva E.I., Koryagina N.L., Khlebnikova N.S., Feld V.E., Radilov A.S. Establishment of exposure of an organism to soman by chemical analysis of urine. // The Sixth International Chemical and Biological Medical Treatment Symposium. SPIEZ, Швейцария 30 апреля - 5 мая 2006 г. С. 64.
8. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С., Радиллов А.С. Разработка процедур анализа биологических жидкостей и тканей для установления факта воздействия высокотоксичных химических соединений. // Science workshops and seminars «Analysis of toxic substances:method of development and applications». г. Санкт-Петербург (Пушкин) 19-20июня 2006 г. С.73-78.
9. Корягина Н.Л., Савельева Е.И., Радиллов А.С., Хлебникова Н.С., Хрусталева В.С., Фельд В.Э. Установление факта воздействия фосфорорганических отравляющих веществ на организм по результатам анализа биожидкостей методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в сочетании с твердофазной микроэкстракцией. // Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 45-летию ФГУП НИИГ-ПЭЧ ФМБА России. г.Санкт-Петербург 15-16 февраля 2007 г. С.111-112.
10. Savel'eva E.I., Koryagina N.L., Radilov A.S., Khlebnikova N.S. Development of Procedures for the Analysis of Components of Dumped Chemical Weapons and Their Principal Transformation Products in Sea Water. // Тезисы 4 Всемирного конгресса по химическому, биологическому и радиологическому терроризму. г. Дубровник, Хорватия 16-19 апреля 2007 г. С.15.