

Порядок проведения химико-токсикологического анализа биологических проб для установления факта воздействия отравляющих веществ на организм

© 2014. В. С. Романов¹, к.б.н., зам. нач. отдела, Е. В. Кинаш¹, к.х.н., нач. отдела, В. А. Берестов¹, с.н.с., Е. И. Савельева², д.х.н., зав. лабораторией, Н. Л. Корягина², к.х.н., в.н.с.,

¹Научно-исследовательский центр Федерального управления по безопасному хранению и уничтожению химического оружия,

²Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, e-mail: fubhuho@mail.ru

Материал статьи включает порядок проведения химико-токсикологического анализа биологических проб (мочи, крови) с использованием методов хромато-масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии масс-спектрометрии. При определении метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) маркерами экспозиции фосфорорганических отравляющих веществ являются сами фосфорорганические отравляющие вещества, реактивированные в цельной крови из состава белковых аддуктов, и их метаболиты O-алкилметилфосфонаты, которые могут быть обнаружены в крови и моче. При определении метаболитов отравляющих веществ кожно-нарывного (КНОВ) действия в биопробах маркерами сернистого иприта являются метаболиты: тиодигликоль, сульфид тиодигликоля, β-лиазные метаболиты; маркерами люизита являются метаболиты: 2-хлорвиниларсоновая кислота и 2-хлорвиниларсонистая кислота; маркерами экспозиции ипритно-люизитной смеси являются метаболиты люизита и сернистого иприта. Определены критерии идентификации результатов анализируемого вещества и стандартного образца. Предложены методы интерпретации результатов определения метаболитов типа ФОС и КНОВ в биопробах газохроматографическим методом с tandemным масс-селективным детектированием и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Полученные в ходе хроматографического анализа биопроб результаты рекомендуется идентифицировать в соответствии с предложенными требованиями.

The paper includes a procedure for chemical-toxicological analysis of biological samples (urine, blood) using gas chromatography-mass spectrometry, high performance liquid chromatography mass spectrometry. In detecting the metabolites of organophosphorus chemical agents (OCA), the markers of exposure organophosphorus agents are represented by organophosphorus poisons reactivated in whole blood from the protein adducts, as well as by their metabolites, O-alkylmethylphosphonates, which can be detected in blood and urine. In determining the metabolites of blister-causing toxic substances (KNOV) in bioassays it was stated that the markers of sulfur mustard are such metabolites as thiodiglycol sulfide, thiodiglycol, β-lyase metabolites; the markers of lewisite are the metabolites 2-vinylchloridearsonic acid and 2-vinylchloridearsonous acid; the exposure markers of mustard-lewisite mixtures are metabolites of sulfur mustard and lewisite. The criteria of result identification of the analyzed sample and the standard sample are stated. The methods of interpreting the results of detecting metabolites of the types FOS and KNOV in bioassays using gas chromatography with tandem mass-selective detection and high-performance liquid chromatography (HPLC) with tandem mass spectrometric detection are suggested. We recommend to identify the results obtained during chromatographic analysis of bioassay in accordance with the suggested requirements.

Ключевые слова: хроматографический анализ, идентификация, маркеры, метаболиты.

Keywords: chromatographic analysis, identification, markers, metabolites.

Целью химико-токсикологического анализа биологических проб является достоверная идентификация метаболитов – маркеров отравляющих веществ (ОВ) в биопробах человека и животных (моче, цельной крови, плазме крови, сыворотке) методами хромато-масс-спектрометрии (метод газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС)) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС).

Для однозначной идентификации биомаркеров необходимо соблюдение критериев, разработанных Европейской комиссией (ЕС), Управлением по контролю продуктов и лекарств США (FDA), Всемирным антидопинговым агентством (WADA) [1,2]:

– достоверность уменьшается в следующем порядке: SCAN (масс-спектр полного сканирования) > MRM (режим мониторинга нескольких реакций), HRSIM (селективное

ионное детектирование в режиме высокого разрешения) > SIM (селективное ионное детектирование в режиме низкого разрешения);

- наличие как минимум двух фрагментаций в режиме MRM и трёх характеристичных ионов для режима SIM;

- переходы/ионы должны структурно характеризовать искомое вещество, а также желательнo иметь принадлежность к различным частям молекулы аналита;

- идентификацию проводить независимыми методами (не менее двух), например, использовать два вида производных при анализе методом ГХ-МС, либо подтвердить данные ГХ-МС данными ВЭЖХ-МС;

- кроме хроматограмм исследуемых проб, лаборатории должны предоставлять хроматограммы холостой пробы.

При проведении химико-токсикологического анализа рекомендуется в отсутствии априорной информации об ОВ, в отношении возможного применения которого проводится исследование, каждую пробу проверять на содержание метаболитов всех ОВ.

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России в рамках научно-исследовательской работы «Проба-КХ» разработаны стандартные процедуры для определения метаболитов ОВ в биопробах (кровь, моча) [3].

Для получения надёжных достоверных результатов анализа соблюдают следующий протокол анализа проб: 1 – анализ бланковой (контрольной) биопробы, заведомо не содержащей определяемых веществ после полной процедуры пробоподготовки; 2 – анализ исследуемой биопробы; 3 – анализ образца сравнения

для подтверждения идентификации (добавка стандарта определяемого соединения в исследуемый образец или в бланковый образец).

При определении метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) зарин (О-изопропилметилфторфосфонат); зоман (О-пинаколилметилфторфосфонат); RVX (О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)метилтиофосфонат); Vx (О-этил-S-(2-диизопропиламиноэтил)метилтиофосфонат) нервно-паралитического действия в биопробах необходимо учитывать, что маркерами экспозиции ФОВ являются сами ФОВ, реактивированные в цельной крови (сыворотке, плазме крови) из состава белковых аддуктов и их метаболиты – О-алкилметилфосфонаты (О-АМФК), которые могут быть обнаружены как в крови, так и в моче:

- О-изопропилметилфосфонат (О-ИПМФК) (метаболит зарина);

- О-пинаколилметилфосфонат (О-ПМФК) (метаболит зомана);

- О-этилметилфосфонат (О-ЭМФК) (метаболит ОВ типа Vx);

- О-изобутилметилфосфонат (О-ИБМФК) (метаболит RVx);

- метилфосфоновая кислота (МФК) (продукт метаболизма всех ФОВ) [4].

В таблице 1 представлена характеристика стандартных процедур, рекомендуемых для определения метаболитов ФОВ в биопробах [3].

Кроме того, проводилось определение метаболитов ОВ кожно-нарывного действия в биопробах.

Сернистый иприт [бис(2-хлорэтил)сульфид], люизит (2-хлорвинилдихлорарсин) и

Таблица 1

Характеристика стандартных процедур, рекомендуемых для определения метаболитов ФОВ в биопробах

Название стандартных процедур	Предел обнаружения	Краткое содержание стандартных процедур
Стандартная процедура определения О-алкилметилфосфонатов в моче методом ВЭЖХ-МС/МС	О-ЭМФК, О-ИПМФК, О-ИБМФК – 1,0 нг/мл О-ПМФК – 0,1 нг/мл	Фильтрация мочи. ВЭЖХ-МС/МС анализ.
Стандартная процедура установления факта воздействия зомана и зарина на организм по результатам анализа крови (цельной крови, сыворотки, плазмы крови) ГХ-МС анализа в режиме высокого разрешения	зарина – 0,1 нг/мл зомана – 0,1 нг/мл	Реактивирование зомана из состава белковых аддуктов КF в ацетатном буфере до высвобождения свободного зомана, извлечение зомана методом ТФЭ. ГХ-МС анализ в режиме высокого разрешения.
Стандартная процедура определения О-алкилметилфосфонатов в моче и плазме крови методом ГХ-МС/МС	О-ЭМФК, О-ИПМФК, О-ИБМФК, О-ПМФК – 0,1 нг/мл.	Экстракция из мочи (крови) смесью органических растворителей, дериватизация C ₆ F ₅ Ch ₂ Br. ГХ-МС/МС анализ.

ипритно-люизитная смесь являются наиболее известными боевыми ОВ кожно-нарывного действия.

Маркерами экспозиции сернистого иприта (СИ) являются метаболиты: тиодигликоль (ТДГ); тиодигликольсульфоксид (ТДГО); β-лиазные метаболиты: 1,1'-сульфонилбис [2-(метилсульфинил)этан] и 1-метилсульфинил-2-[(метилтио)этилсульфонил]этан; 1,1ϕ-сульфонилбис [2-S-(N-ацетилцистеинил)этан] [4].

Маркерами экспозиции люизита являются метаболиты: 2-хлорвиниларсонистая кислота (ХВАК), 2-хлорвиниларсоновая кислота (ХВАОК) [4].

Маркерами экспозиции ипритно-люизитной смеси (ИЛС) являются метаболиты люизита и СИ. При хранении биопроб при комнатной температуре происходит разложение ХВАК и ХВАОК. Биопробы, отобранные для исследования, должны быть незамедлительно подвергнуты заморозке (-18-20°C).

В таблице 2 представлена характеристика стандартных процедур определения метаболитов

КНОВ, рекомендуемых к применению для установления факта поражения КНОВ [3].

При интерпретации и выдаче результатов анализа рекомендуются следующие критерии идентификации:

- время удерживания (сек., мин.);
- расхождение в значениях относительных интенсивностей ионов в регистрируемом диапазоне масс между масс-спектрами анализируемого вещества и стандартного образца (%).

Критерием надёжной идентификации является детектирование сигнала с соотношением сигнал: шум не менее 3:1 при времени удерживания, совпадающем в пределах 0,2 мин. со временем удерживания, установленным для стандартного образца. Для надёжной идентификации требуется совпадение масс-спектров (МС/МС-переходов) с масс-спектром (МС/МС-переходом) стандартного образца, полученными в аналогичных условиях.

При невыполнении хотя бы одного из критериев результат идентификации не может считаться достоверным.

Таблица 2

Характеристика стандартных процедур определения метаболитов КНОВ, рекомендуемых к применению для установления факта поражения КНОВ

Название стандартных процедур	Предел обнаружения, нг/см ³	Краткое содержание стандартных процедур
Стандартная процедура определения АЦЦ-СИ в моче методом ВЭЖХ-МС	1	Разбавление пробы мочи органическим растворителем; удаление взвешенных частиц центрифугированием; анализ супернатанта ВЭЖХ-МС высокого разрешения.
Стандартная процедура определения метаболитов сернистого иприта (тиодигликоля, тиодигликольсульфоксида, β-лиазных метаболитов СИ) в моче ГХ-МС/МС	1	Обработка образца мочи (1–10) мл с солянокислым раствором хлорида титана при 75°C (1 час), нейтрализация 10М раствором NaOH, центрифугирование. ТФЭ надосадочной жидкости на сорбенте Oasis HLB. Элюирование ТДГ ацетонитрилом. Разделение элюата на 2 части, дериватизация ГФМА и ПФБХл. ГХ-МС/МС-ХИ анализ в режиме MRM.
Стандартная процедура идентификации 2-хлорвиниларсонистой кислоты – метаболита люизита в биопробах ГХ-МС/МС	0,1 (в моче) 10 (в крови)	Дериватизация ХВАК 1,3-пропандитиолом в биопробе с последующим извлечением летучего циклического производного на микроволокно и определением методом ГХ-МС/МС-ЭУ. Полуколичественную оценку проводят по внутреннему стандарту фениларсиноксиду, который вносят в биопробу перед анализом.
Стандартная процедура определения 2-хлорвиниларсонистой кислоты в моче методом ВЭЖХ-МС/МС	0,5	Очистка мочи методом ТФЭ. Детектирование анализируемых веществ проводят прямым методом, регистрируя интенсивность характеристичных ионных переходов.
Стандартная процедура определения 2-хлорвиниларсоновой кислоты в моче методом ВЭЖХ-МС/МС	2,0	Очистка мочи методом ТФЭ. Детектирование анализируемых веществ проводят прямым методом, регистрируя интенсивность характеристичных ионных переходов.

Для подтверждения результатов идентификации применяют метод добавок. К исследуемой пробе прибавляют известное количество стандарта определяемого вещества, не превышающее содержание аналита в анализируемой пробе (оценивают ориентировочно по площади хроматографического пика аналита на хроматограмме) и сравнивают хроматограммы без добавки и с добавкой. В случае увеличения площади пика определяемого соединения и совпадения масс-спектров (МС/МС-спектров) до и после внесения добавки результат идентификации признается положительным.

По результатам химико-токсикологического анализа биопроб, отобранных в течение первых 3 суток после отравления, могут быть вынесены суждения о типе отравления:

- резкое снижение содержания метаболитов в биопробе на 2-е сутки после отравления указывает на острое отравление;

- содержание метаболитов во всех представленных пробах, отобранных в течение 3 суток, примерно на одном уровне ($\pm 20\%$) указывает на хроническое отравление или острое отравление, которое было в прошлом.

Неопровержимым доказательством контакта человека или животных с ФОВ является положительный результат, полученный при реализации «Стандартной процедуры установления факта воздействия зомана и зарина на организм по результатам анализа крови (цельной крови, сыворотки, плазмы крови) хромато-масс-спектрометрическим методом в режиме высокого разрешения». В данном случае установление факта воздействия ФОВ проводят по определению самих ФОВ (зарина, зомана, RVX), полученных в результате реактивирования ФОВ из состава белковых аддуктов.

Положительный результат, полученный при реализации «Стандартной процедуры определения О-алкилметилфосфонатов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием» и «Стандартной процедуры определения О-алкилметилфосфонатов в моче и плазме крови методом газовой хроматографии с применением тандемного масс-селективного детектирования», может служить как свидетельством возможного прямого контакта человека или животных с ФОВ, так и результатом попадания в организм непосредственно самого определяемого вещества с воздухом, водой или продуктами питания, содержащими продукты деструкции ФОВ.

Неопровержимое доказательство контакта человека или животных с СИ – положительный результат, полученный при определении β -лиазных метаболитов СИ и (или) 1,1 ζ -сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этана] (АЦЦ-СИ) в моче в рамках реализации «Стандартной процедуры определения метаболитов сернистого иприта (тиодигликоля, тиодигликольсульфоксида, β -лиазных метаболитов СИ) в моче газохроматографическим методом с тандемным масс-селективным детектированием» и «Стандартной процедуры определения АЦЦ-СИ в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения».

Не является неопровержимым доказательством контакта человека или животных с СИ обнаружение в биопробах ТДГ и ТДГО (продукта окисления ТДГ в организме) при реализации «Стандартной процедуры определения метаболитов сернистого иприта (тиодигликоля, тиодигликольсульфоксида, β -лиазных метаболитов СИ) в моче газохроматографическим методом с тандемным масс-селективным детектированием», поскольку ТДГ может поступать в организм человека из других источников. В частности, ТДГ может присутствовать в лакокрасочных покрытиях, полимерных и фотографических материалах, чернилах и других материалах. Фоновые содержания ТДГ и ТДГО в моче людей варьируют в пределах 1–36 и 1–25 нг/мл, соответственно. В то же время обнаружение ТДГ и/или ТДГО в биопробах является свидетельством возможного контакта человека с СИ и влечёт за собой необходимость дальнейшего анализа биопроб на более специфичные маркеры воздействия (АЦЦ-СИ, β -лиазных метаболитов СИ).

Неопровержимым доказательством контакта человека или животных с люизитом является обнаружение его метаболитов – 2-хлорвиниларсоновой и 2-хлорвиниларсонистой кислот в биожидкостях организма в любой концентрации в рамках реализации «Стандартной процедуры идентификации 2-хлорвиниларсонистой кислоты – метаболита люизита в биопробах газохроматографическим методом с тандемным масс-селективным детектированием», «Стандартной процедуры определения 2-хлорвиниларсонистой кислоты в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием» и (или) «Стандартной процедуры опреде-

ления 2-хлорвиниларсоновой кислоты в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием».

Моча является универсальной и наиболее предпочтительной матрицей для определения биомаркера люизита. Проведение антидотной терапии унитиолом существенно меняет профиль экскреции 2-хлорвиниларсонистой кислоты в течение первых суток после введения антидота. За счёт более активной экскреции и перераспределения гидрофильного комплекса биомаркера люизита с унитиолом из тканей в кровотоке антидотная терапия повышает возможность обнаружения 2-хлорвиниларсонистой кислоты в моче в течение 2 суток после введения унитиола. При этом содержание биомаркера люизита в цельной крови (эритроцитах) снижается. Кровь (эритроциты) является перспективной матрицей для подтверждения результатов, полученных при анализе мочи. Плазма крови является бесперспективной матрицей для установления факта воздействия люизита ввиду весьма низких концентраций биомаркера.

Неопровержимым доказательством контакта человека или животных с ИЛС является одновременное обнаружение в биопробах метаболитов СИ и люизита. Наличие в биопробах метаболитов СИ не мешает идентификации метаболитов люизита, и эти соединения могут быть достоверно идентифицированы в ходе параллельных определений.

По результатам ХТА оформляется протокол ХТА. Форма протокола ХТА регламентируется «Руководством по качеству аккредитованной лаборатории».

Обязательным приложением к протоколу ХТА являются материалы, полученные при

хроматографическом анализе биопроб, подтверждающие результаты идентификации:

- хроматограмма бланкового образца (биопробы), заведомо не содержащего определяемое вещество, после полной процедуры пробоподготовки (не должна содержать пиков посторонних соединений на профиле хроматограммы в местах ожидаемого выхода целевых соединений);
- хроматограмма исследуемого образца биопробы;
- хроматограмма образца сравнения для подтверждения идентификации (добавка стандарта определяемого соединения в исследуемый образец или в бланковый образец биопробы).

Литература

1. Report of the Fourteenth Session of the Scientific Advisory Board (Отчёт 14 сессии Научного консультативного комитета), SAB-14/1, Гаага, Нидерланды. 9–11 ноября 2009 г.
2. Report of the Sixteenth Meeting of the of the Scientific Advisory Board (Отчёт 16 сессии Научного консультативного комитета), SAB-16/1, Гаага, Нидерланды. 18–19 ноября 2010 г.
3. Отчёт о научно-исследовательской работе «Разработка методов анализа продуктов распада отравляющих веществ в биосфере в целях подготовки участия России, в соответствии со статьёй IX Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожения, в расследованиях случаев возможного применения химического оружия». Шифр «Проба-КХ». 2012. 43 с.
4. Рыбальченко И.В., Хлебникова Н.С., Савельева Е.И., Газохроматографический анализ биологических проб. Определение метаболитов токсичных химикатов // Российский химический журнал. 2005. № 2. С. 26–30.