

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ V-ГАЗОВ В БИОЖИДКОСТЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Родин И.А.¹, Браун А.В.¹, Рыбальченко И.В.¹ Байгильдиев Т.М.¹

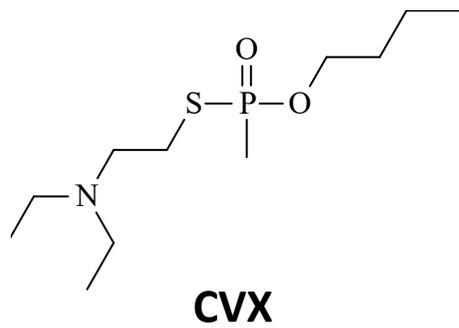
¹. МГУ имени М.В. Ломоносова, ул. Ленинские Горы, 1, 119991, Москва, Россия

avbraun@yandex.ru

Актуальность темы

V-газы являются высокотоксичными фосфорорганическими соединениями (ФОВ), которые, при попадании в живой организм, вызывают тяжелые отравления за счет ингибирования ацетилхолинэстеразы. В связи с этим их производство, накопление и применение запрещено Конвенцией по запрещению химического оружия, которая вступила в силу в 1997 году. Однако, за последние два десятилетия отмечено применение токсичных химикатов в ходе военных конфликтов (Ирак, Сирия), также существует угроза использования ФОВ в террористических целях. Данные примеры показывают, что создание высокочувствительных аналитических подходов для установления фактов воздействия ФОВ на человека является актуальной задачей в рамках исследований возможного применения ФОВ.

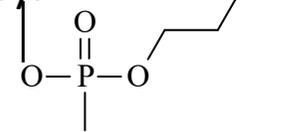
Объекты исследования – биомаркеры интоксикации плазмы нервно-паралитическими отравляющими веществами V-типа



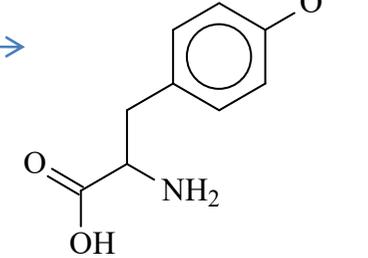
Плазма
связывание

Альбумин

Tyr

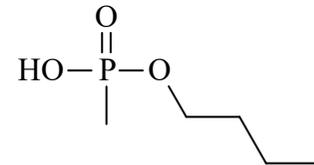


Проназа
гидролиз



Тирозиновый аддукт VR
(TCVX)

Моча
гидролиз

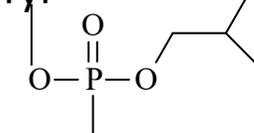


н-Бутил метилфосфонат **(BMFA)**

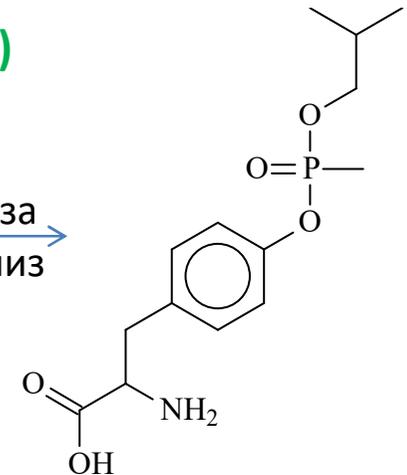
Плазма
связывание

Альбумин

Tyr

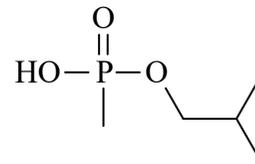


Проназа
гидролиз

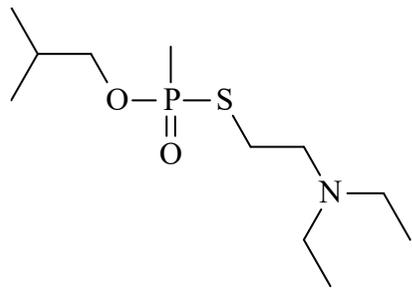


Тирозиновый аддукт CVX
(TVR)

Моча
гидролиз



Изобутил метилфосфонат **(IBMFA)**



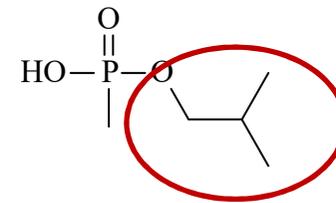
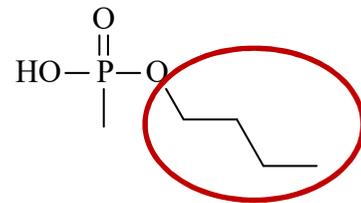
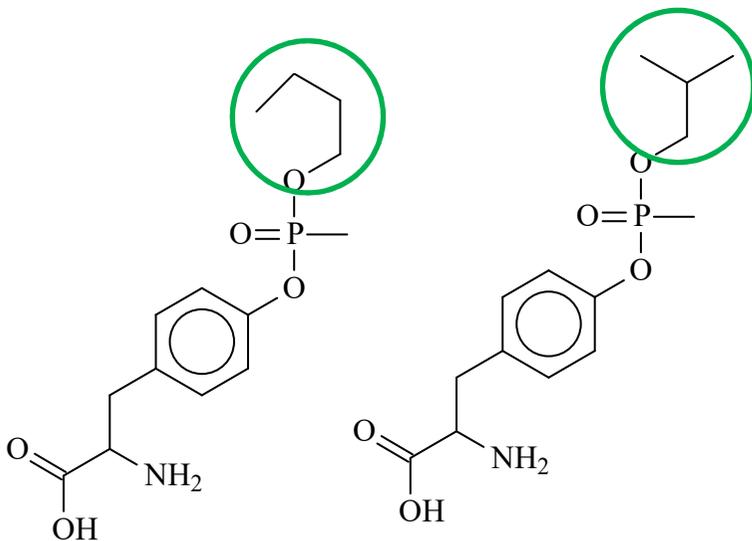
VR

Методы исследования

- Подготовка проб с использованием твердо фазной экстракции и ферментативного гидролиза
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (разделение компонентов)
- Tandemная масс-спектрометрия высокого разрешения

Особенности идентификации

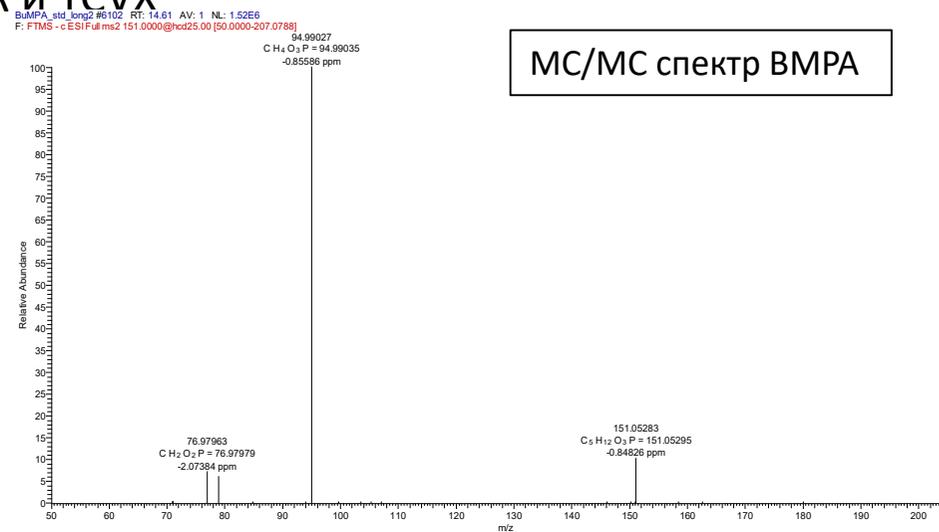
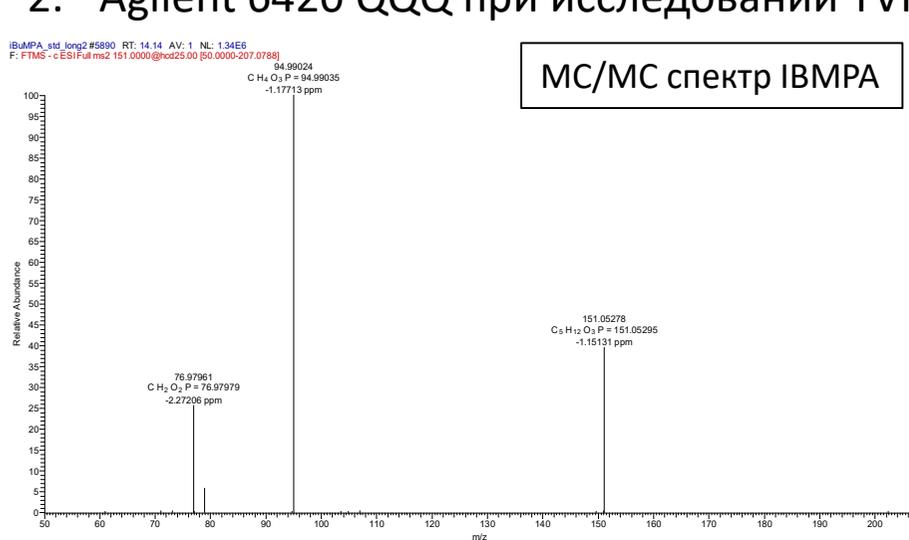
1. Изомеры (качественно, имеют одинаковые пути фрагментации)
2. Имеют близкие времена удерживания в варианте обращено-фазовой ВЭЖХ



Выбор условий масс-спектрометрического детектирования

Оборудование:

1. Orbitrap Fusion Lumos (высокое разрешение) при исследовании ВМРА и ИВМРА
2. Agilent 6420 QQQ при исследовании TVR и TCVX



Характеристики выбранных ионных реакций биомаркеров

Биомаркер	Ионная реакция, m/z	Тип ионной реакции	Соотношение интенсивностей сигналов, %
ИВМРА	151.05→94.99035	Количеств. оценка	100
ИВМРА	151.05→76.97979	Подтверждение	25.7±6.4
ВМРА	151.05→94.99035	Количеств. оценка	100
ВМРА	151.05→76.97979	Подтверждение	7.2±3.6
TVR	316→214	Количеств. оценка	100
TVR	316→260	Подтверждение	69.2±13.8
TCVX	316→214	Количеств. оценка	100
TCVX	316→260	Подтверждение	41.5±10.4

Условия хроматографического разделения

Параметр	Разделение IBMA, BМРА, TVR, TCVX
Тип колонки	Thermo Acclaim 120 C18 (250 мм x 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 3 мкм (Thermo Scientific, США)
Состав подвижной фазы	А – 0.1 % муравьиная кислота в воде Б - 0.1 % муравьиная кислота в ацетонитриле
Программа элюирования	0 – 1.5 мин: 95 % А; 1.5 – 33 мин: 5 – 80 % Б; 33 – 35 мин: 80 % Б; 35 – 40 мин: 95 % А

Параметры хроматографического разделения IBMA, BМРА, TVR, TCVX

Параметр	Значение
Объем вводимой пробы, мл	0.020
Время удерживания IBMPA, мин	14.14±0.20
Время удерживания BMPA, мин	14.60±0.20
Время удерживания TVR, мин	34.41±0.20
Время удерживания TCVX, мин	35.03±0.20
Коэффициент емкости IBMPA	6.4
Коэффициент емкости BMPA	6.7
Коэффициент емкости TVR	17.1
Коэффициент емкости TCVX	17.4
Число теорет. тарелок для IBMPA, ТТ/м	12000
Число теорет. тарелок для BMPA, ТТ/м	13200
Число теорет. тарелок для TVR, ТТ/м	240000
Число теорет. тарелок для TCVX, ТТ/м	245000

Условия подготовки проб плазмы и мочи к анализу

Подготовка проб для обнаружения аддуктов TVR и TCVX. К образцу плазмы крови объемом 1.0 см^3 добавляли 1.0 см^3 15 мг/см^3 проназы в 25 мМ гидрокарбоната аммония (Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma, P6911) и выдерживали пробу в течение 12 час при 37°C . Для устранения избытка ферментов раствор фильтровали через Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (10k, Millipore) и центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g . Надосадочную жидкость пропускали через сорбент ISOLUTE SPE Columns C8 (100 mg, 3 ml), предварительно кондиционированный ацетонитрилом ($2 \times 1.0 \text{ см}^3$) и водой ($2 \times 1.0 \text{ см}^3$). Сорбент промывали водой ($3 \times 0.5 \text{ см}^3$). Целевые вещества элюировали 50% раствором ацетонитрила в воде ($2 \times 0.5 \text{ см}^3$) и 60% раствором ацетонитрила в воде ($2 \times 0.5 \text{ см}^3$). Элюат упаривали досуха при 45°C в испарителе (TurboVar) и перерастворяли в 0.1 см^3 5% раствора ацетонитрила в воде. Аликвоту объемом 0.020 см^3 анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Подготовка проб для обнаружения ВМРА и ИВМРА. 1 мл мочи упаривали досуха при 70°C в токе азота на установке концентрирования TurboVar. Сухой остаток экстрагировали дважды 1 см^3 5% воды в ацетонитриле. Объединенный экстракт пропускали через сорбент Chromabond SiOH columns (100 mg, 1ml), предварительно кондиционированный 1.0 см^3 25% воды в ацетонитриле и 1.0 см^3 ацетонитрилом. Образец промывали 1.0 см^3 10% воды в ацетонитриле и элюировали 1.0 см^3 25% воды в ацетонитриле. Элюат упаривали досуха в токе азота при 70°C . Осадок перерастворяли в 150 мкл 5% раствора ацетонитрила в воде. Аликвоту объемом 0.020 см^3 анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

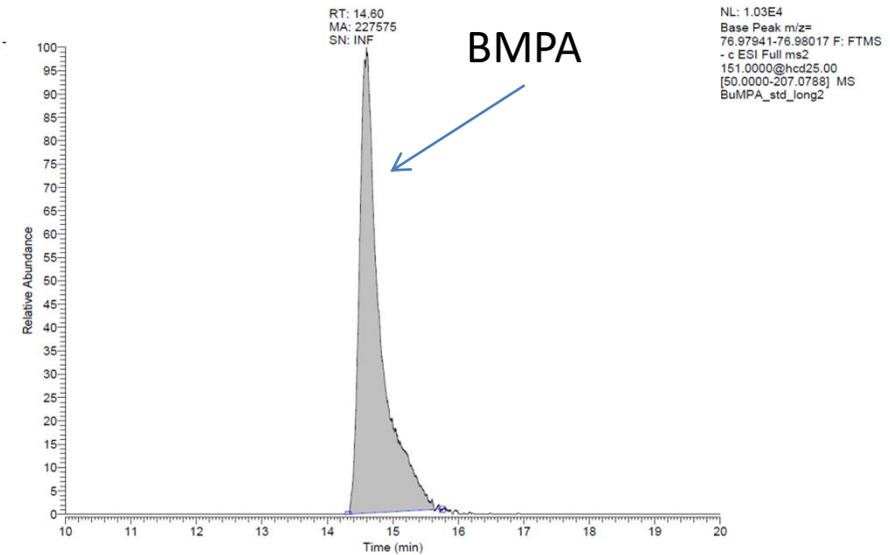
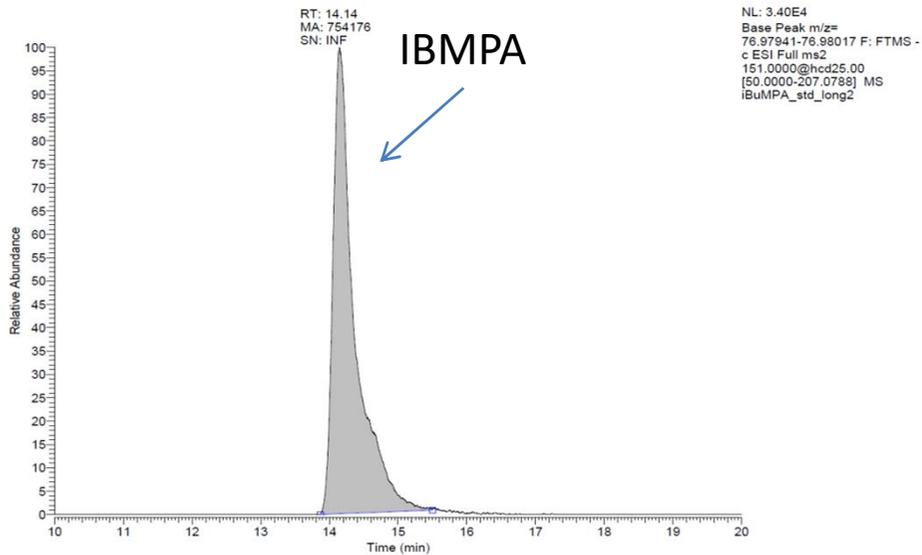
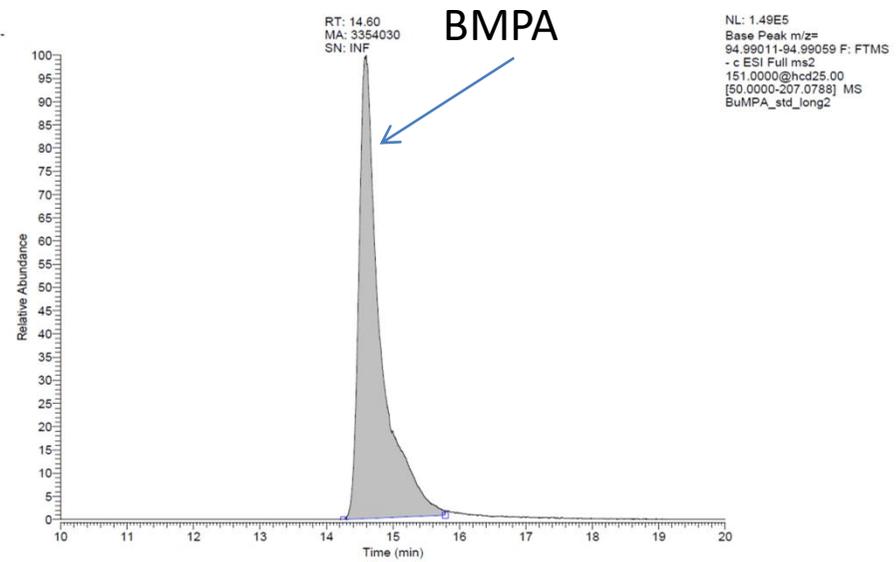
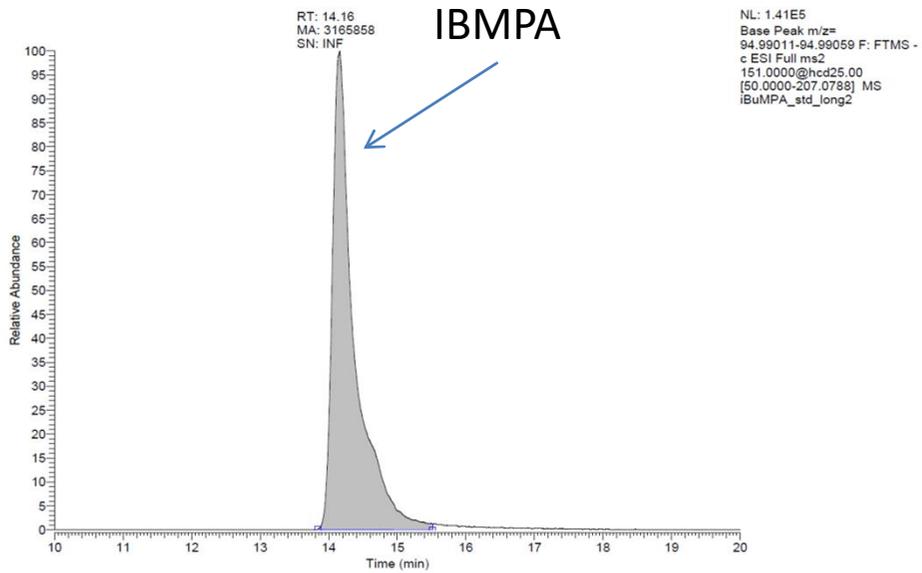
Апробация на реальных объектах

Метрологические характеристики определения VR и CVX в виде биомаркеров ВМРА, ИВМРА, TVR и TCVX (P = 0.95, n = 3).

Метаболит	Тип биожидкости	Диапазон концентраций, нг/мл	Уравнение градуировочного графика	Коэффициент корреляции	Матричный эффект, %	Предел обнаружения, нг/мл
ВМРА	Моча	1-100	$S_i=54500 \times C_i$	0.995	90±7	0.5
ИВМРА	Моча	1-100	$S_i=64100 \times C_i$	0.998	92±8	0.5
TVR	Плазма	10-500	$S_i=1910 \times C_i$	0.998	90±10	5
TCVX	Плазма	10-500	$S_i=2080 \times C_i$	0.996	90±8	5

S_i – площадь пика выбранного ионного перехода для количественной оценки соответствующего метаболита. C_i – концентрация циклогексилметилфторфосфоната в пробе, нг/мл.

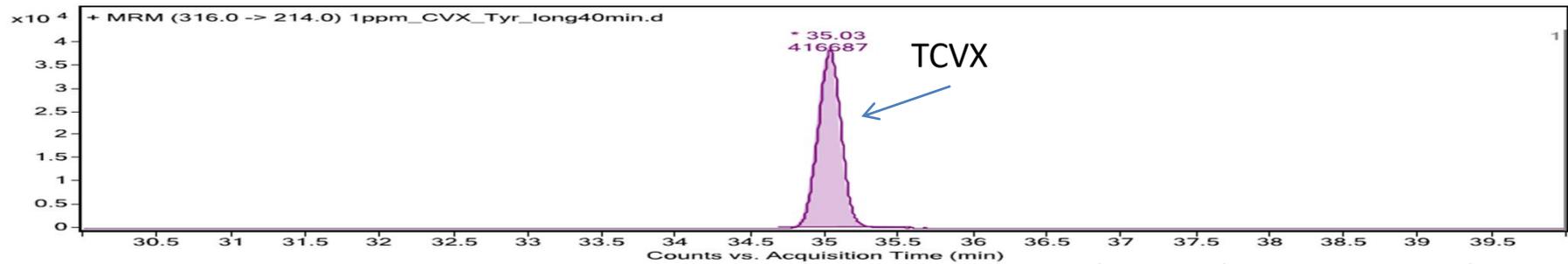
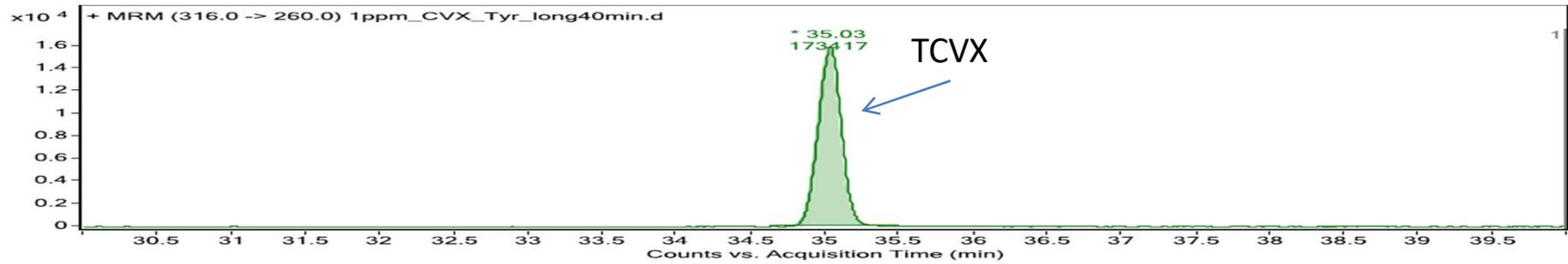
Апробация на реальных объектах (моча)



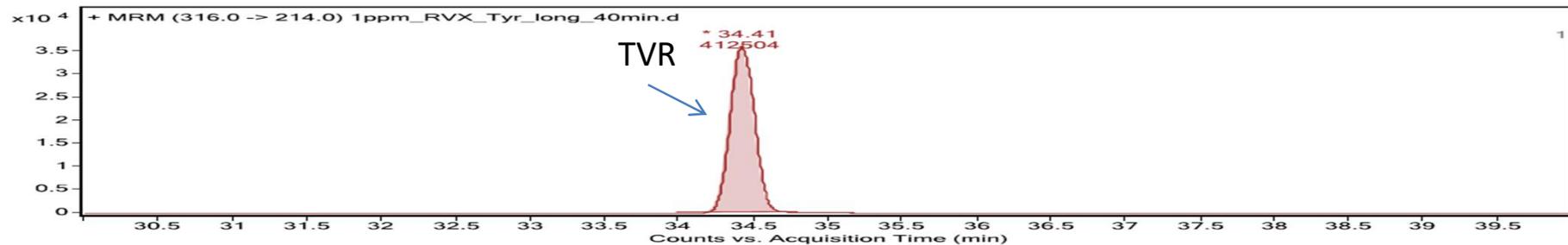
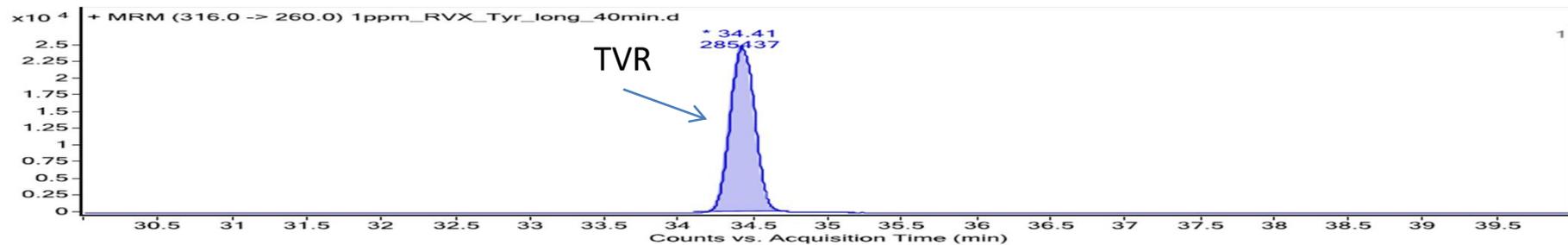
Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации IBMPA m/z 151.05 \rightarrow 94.99035 (верхняя) и m/z 151.05 \rightarrow m/z 76.97979 (нижняя) пробы мочи, искусственно зараженной 50 нг/мл IBMPA

Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации BMPA m/z 151.05 \rightarrow 94.99035 (верхняя) и m/z 151.05 \rightarrow m/z 76.97979 (нижняя) пробы мочи, искусственно зараженной 50 нг/мл BMPA

Апробация на реальных объектах (плазма)



Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации CVX (в виде TCVX) m/z 316 \rightarrow m/z 214 (верхняя) и m/z 316 \rightarrow m/z 260 (нижняя) пробы плазмы, искусственно зараженной 20 нг/мл CVX



Хроматограммы по выбранным ионным реакциям при идентификации VR (в виде TVR) m/z 316 \rightarrow m/z 214 (верхняя) и m/z 316 \rightarrow m/z 260 (нижняя) пробы плазмы, искусственно зараженной 20 нг/мл VR

Выводы

Оптимизирован и апробирован на экспонированных *in vitro* образцах плазмы крови человека способ определения биомаркеров применения VR и CVX –тирозиновых аддуктов (TVR и TCVX), а также соответствующих кислых эфиров метилфосфоновой кислоты (IBMPA и BMPA) в моче, образующихся в соответствии с различными метаболическими процессами, методом ВЭЖХ—МС/МС высокого разрешения, который характеризуется высокой чувствительностью (0.5 – 5 нг/мл), высокой специфичностью и удовлетворительными метрологическими характеристиками. Можно полагать, что обнаружение в реальных пробах мочи и плазмы крови пострадавших данных биомаркеров V-газов однозначно указывает на факт интоксикации и обеспечивает достоверную идентификацию фосфорорганических вещества нервно-паралитического действия.

Благодарность

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