



# **ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ СЛЕДОВ ТОКСИЧНЫХ ХИМИКАТОВ В БИОПРОБАХ**

Савельева Елена Игоревна  
Заведующая лабораторией аналитической токсикологии

Федеральное государственное унитарное предприятие «**НИИ  
гигиены, профпатологии и экологии человека**» Федерального  
медико-биологического агентства

Некоторые яды по внешним симптомам совпадают с психоактивными веществами или даже являются таковыми. Хроматомасс-спектрометрические технологии их обнаружения в биопробах учитывают:

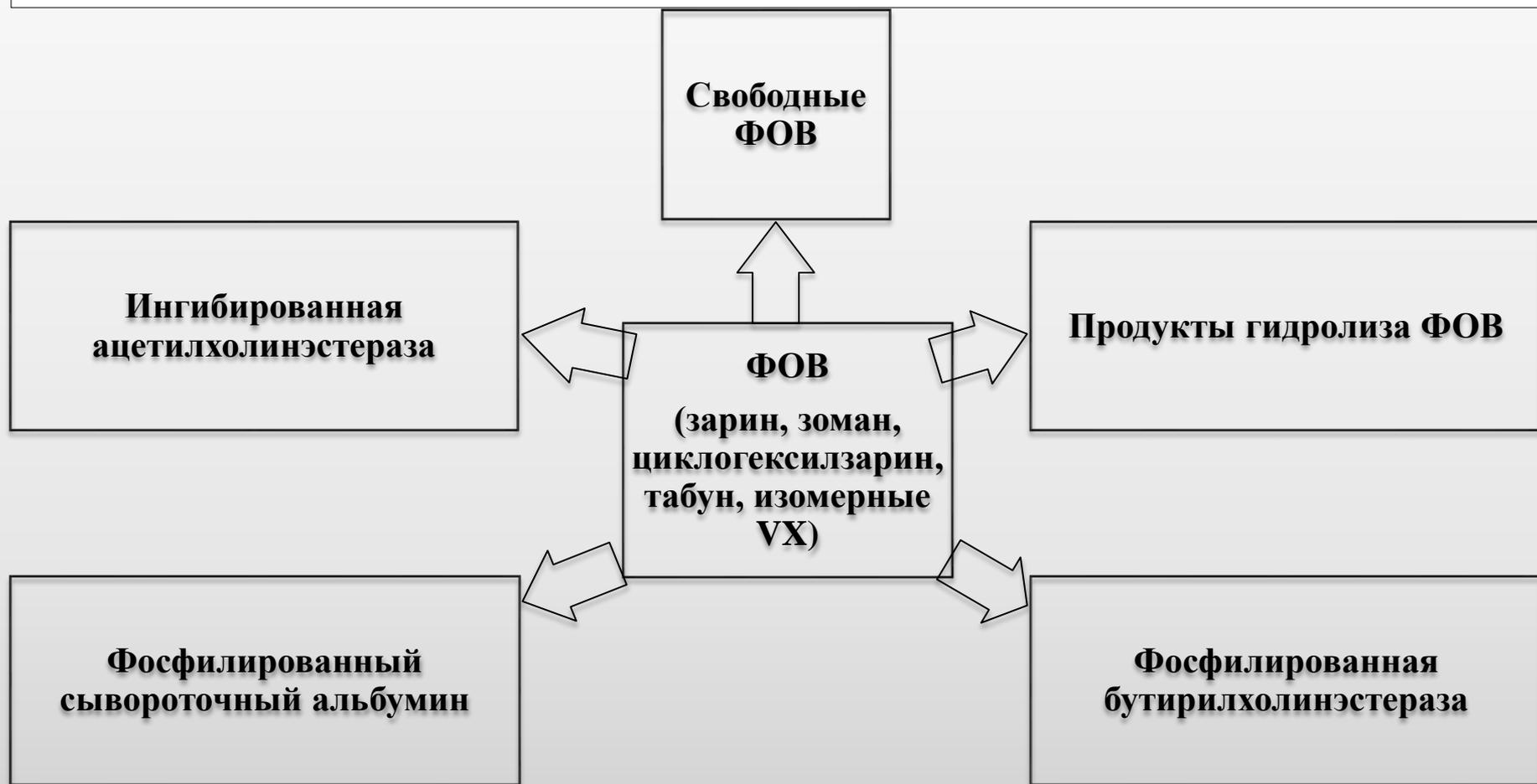
- Токсическую дозу;
- Характер метаболизма;
- Специфичность метаболитов как биомаркеров и время их жизни в организме...

**Нервно-паралитические (фосфорорганические) отравляющие вещества** – супертоксиканты, все метаболические пути дают специфические биомаркеры, которые необходимо определять в биопробах на уровне ppt.;

**Фосфорорганические пестициды** – значительно менее токсичны; возможно определение неизмененных веществ в биопробах; при диагностике острых отравлений предпочтительными являются низкомолекулярные биомаркеры, уровень ppb;

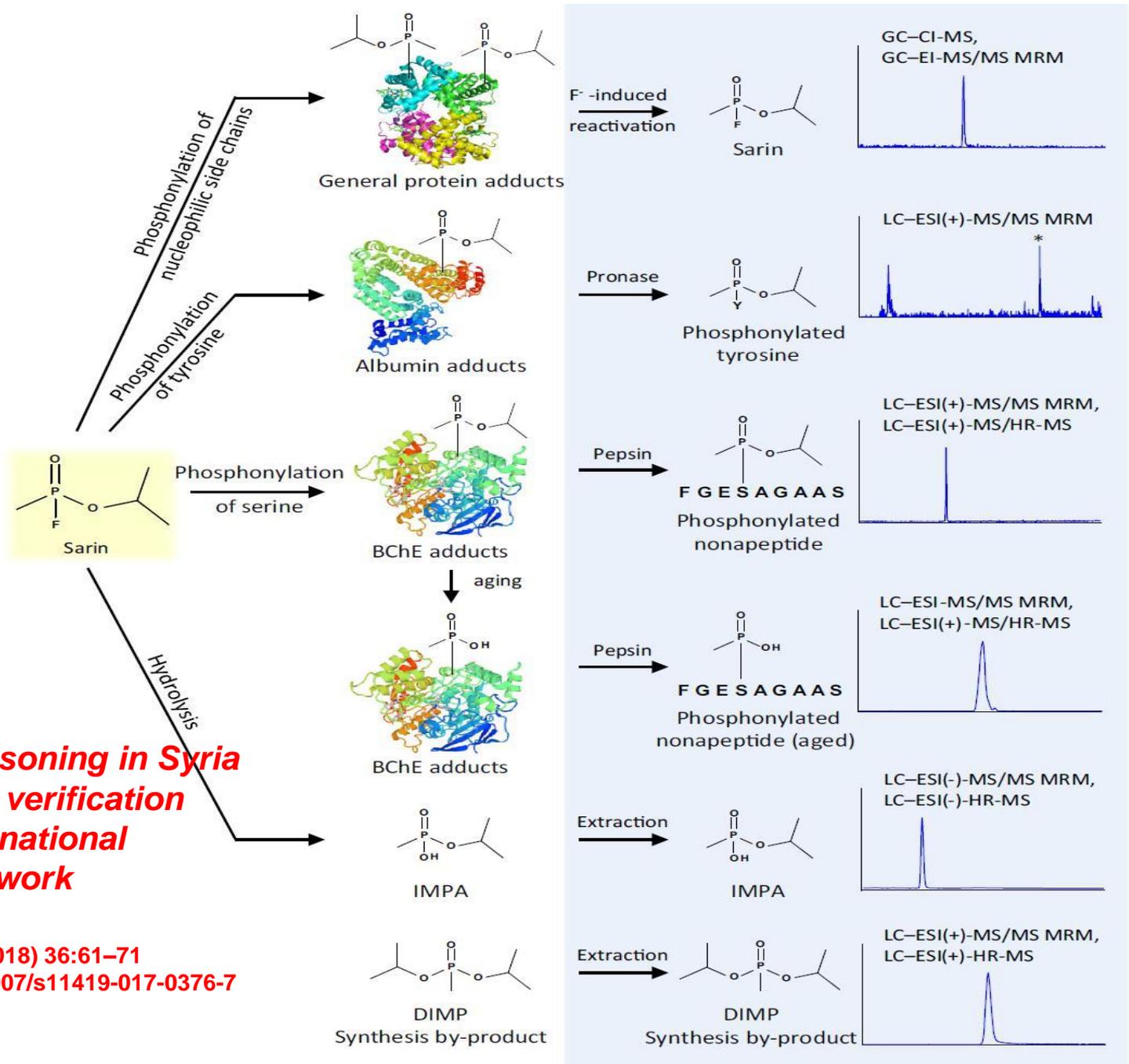
**Метаболические яды (фторацетат)** – отложенное действие, метаболизм без образования характеристичных биомаркеров.

# *Пути превращения ФОВ (нервно-паралитических ОВ) в организме после интоксикации*



# ***ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В БИОПРОБАХ.***

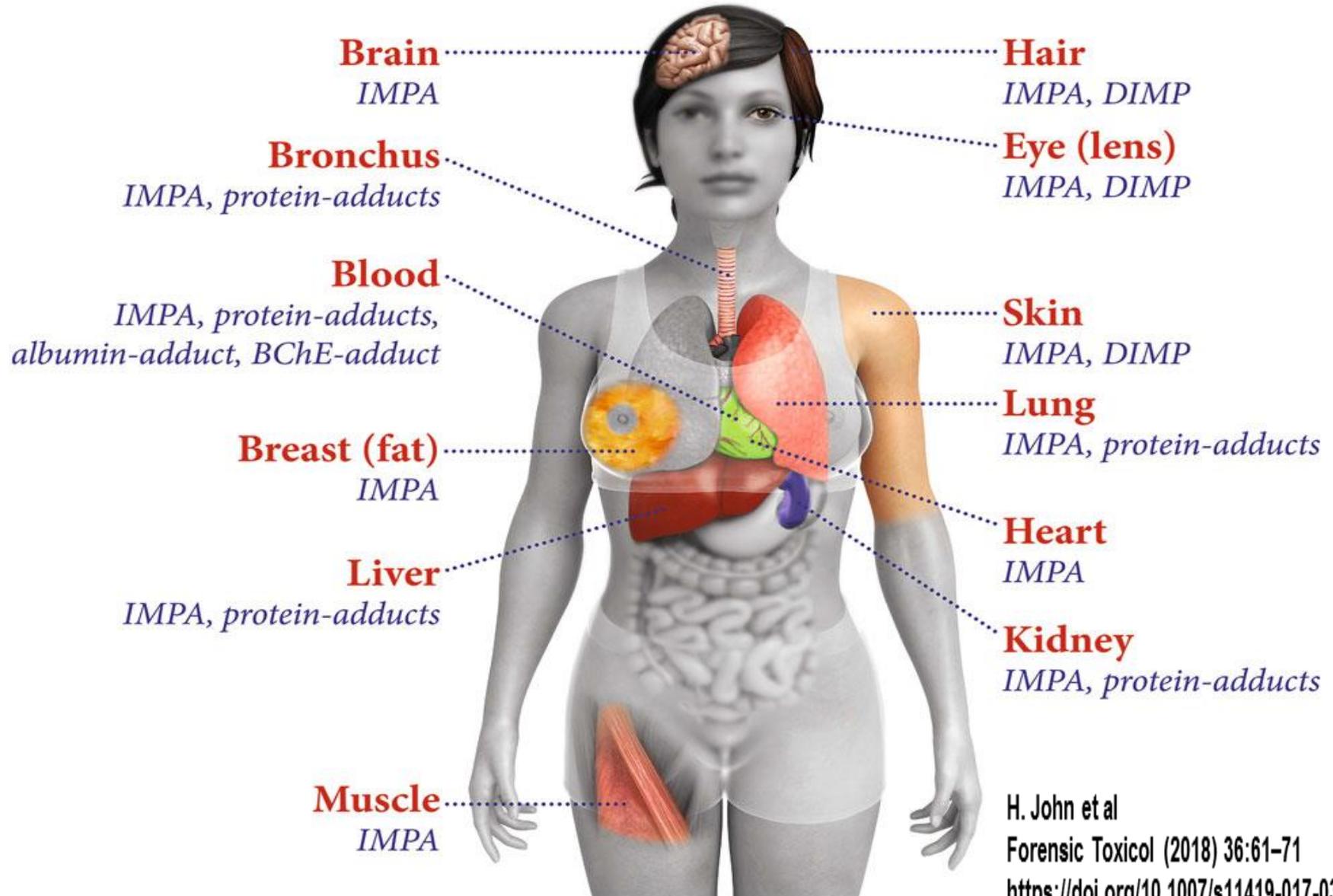




**Fatal sarin poisoning in Syria  
2013: forensic verification  
within an international  
laboratory network**

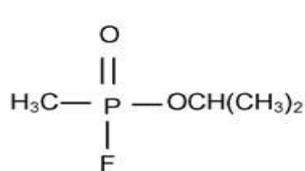
H. John et al  
Forensic Toxicol (2018) 36:61-71  
<https://doi.org/10.1007/s11419-017-0376-7>

# РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ЗАРИНА (ПОСМЕРТНЫЙ АНАЛИЗ)

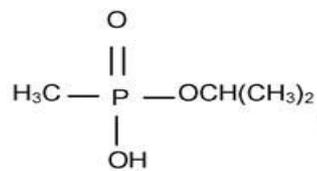


H. John et al  
Forensic Toxicol (2018) 36:61-71  
<https://doi.org/10.1007/s11419-017-0376-7>

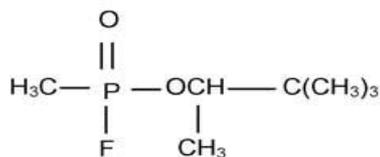
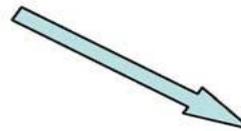
## Метаболиты фосфорорганических отравляющих веществ, образующиеся по гидролитическому пути



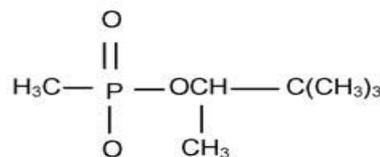
**sarin**



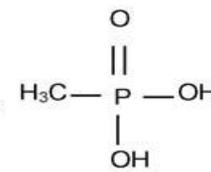
**IMPA**



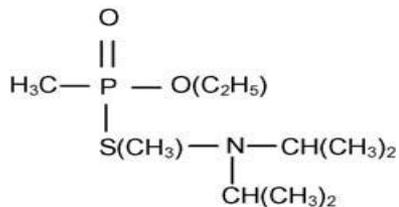
**soman**



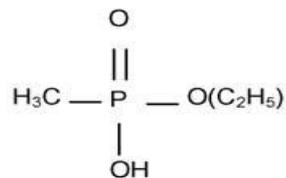
**PMPA**



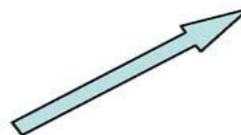
**MPA**



**VX**



**EMPA**



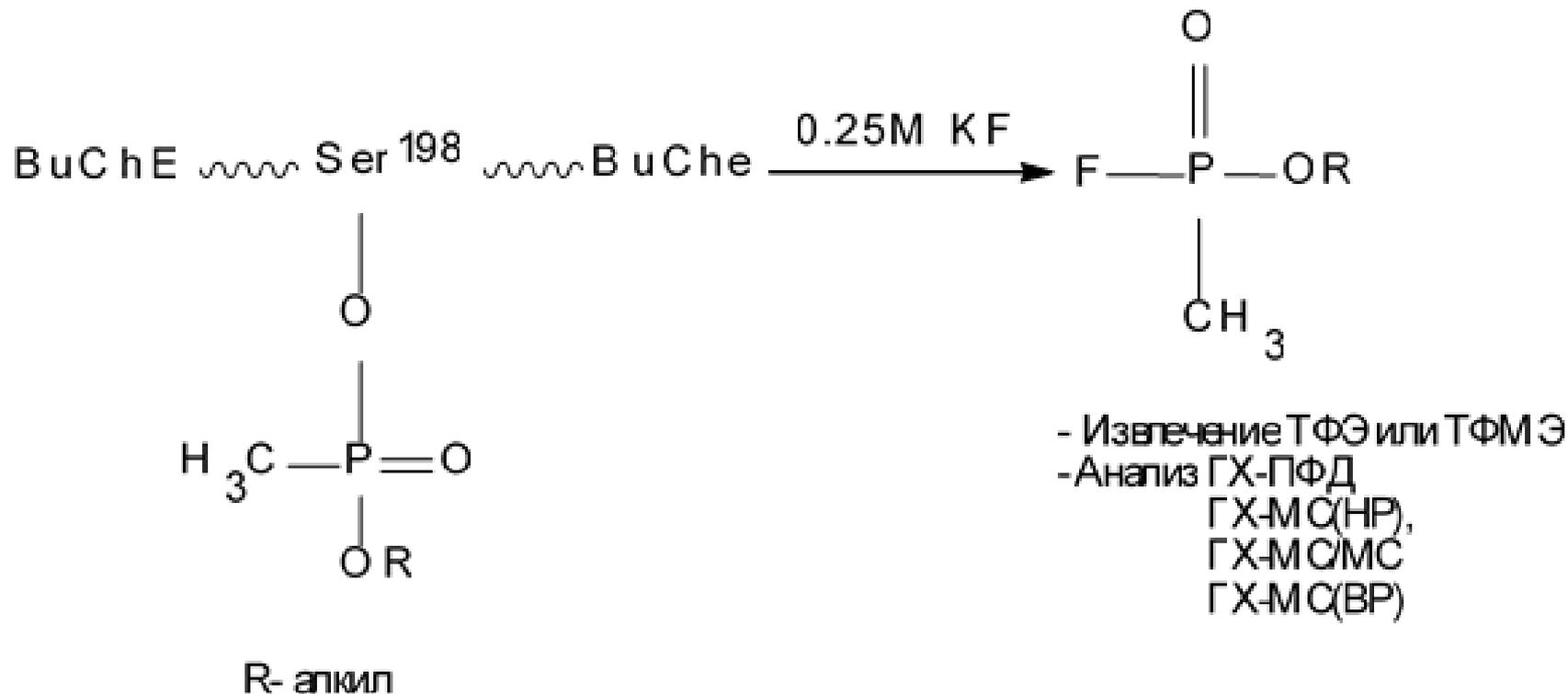
**МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ  
О-АЛКИЛМЕТИЛФОСФОНАТОВ  
В МОЧЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СЕЛЕКТИВНЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

Аттестована Федеральным государственным унитарным предприятием  
“Уральский научно-исследовательский институт метрологии” (ФГУП «УНИИМ»)  
Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Свидетельство № 222.0183/01.00258/2012 от 02.08.2012

Диапазон определяемых концентраций, нг/см <sup>3</sup> : - О-пинаколилметилфосфонат - О-изобутилметилфосфонат, О-изопропилметилфосфонат, О-этилметилфосфонат	0,1 – 50,0  1,0 – 50,0
Границы относительной погрешности при доверительной вероятности P=0.95, %: - О-пинаколилметилфосфонат - О-изобутилметилфосфонат - О-изопропилметилфосфонат, О-этилметилфосфонат	30 (0,1 - 1,0 нг/см <sup>3</sup> ) 26 (1,0 - 50,0 нг/см <sup>3</sup> ) 28 26
Предел обнаружения, нг/см <sup>3</sup> : - О-пинаколилметилфосфонат - О-изобутилметилфосфонат, О-изопропилметилфосфонат, О-этилметилфосфонат	0,05  0,5

## Схема регенерирования фосфорорганических ОВ из аддуктов с БХЭ



Корягина Н. Л., Савельева Е. И., Хлебникова Н. С., Копейкин В. А., Конева В. Ю., Радилов А.С. Особенности анализа фосфорорганических отравляющих веществ, реактивированных из состава аддуктов с белками крови, при установлении факта воздействия химического оружия // Токсикологический вестник. № 4. 2014. С.39 - 46.

# **МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, РЕАКТИВИРОВАННЫХ ИЗ СОСТАВА АДДУКТОВ, В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

На аттестации Федеральным государственным унитарным предприятием  
“Уральский научно-исследовательский институт метрологии” (ФГУП «УНИИМ»)   
Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

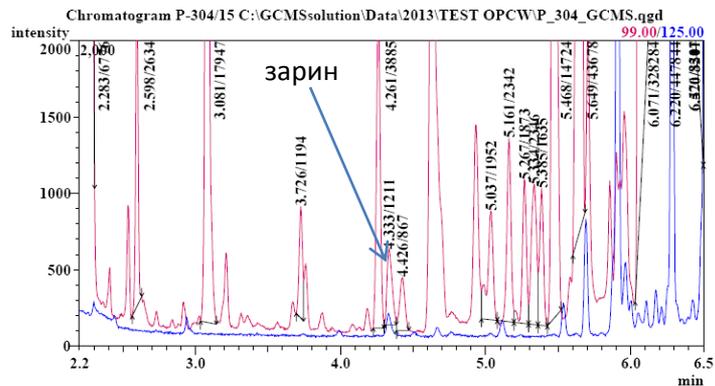
Свидетельство № № 222.0255/01.00258/2014 от 22.10.2014 г.

.....

<b>Определяемые вещества</b>	<b>Зарин, зоман, российский аналог вещества Vx</b>
<b>Методы хроматомасс-спектрометрии</b>	<b>- Тандемная масс-спектрометрия (ГХ-МС/МС); -Масс-спектрометрия высокого разрешения (ГХ-МСВР)</b>
<b>Диапазон определяемых концентраций, нг/см<sup>3</sup></b>	<b>0,5 – 25,0</b>
<b>Предел обнаружения, нг/см<sup>3</sup></b>	<b>0,25</b>

**Режим высокого разрешения позволяет очистить масс-спектр от мешающих компонентов матрицы и позволяет многократно повысить чувствительность при достоверной идентификации аналита**

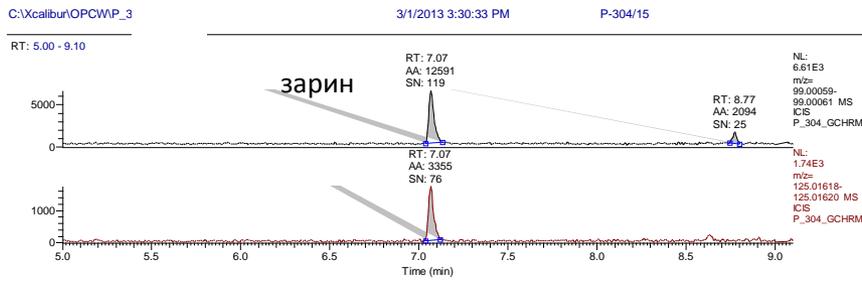
Sample Information  
 Analyzed : 01.03.2013 16:41:13  
 Sample Name : P-304/15  
 Data File : C:\GCMSsolution\Data\2013\TEST OPCWP\_304\_GCMS.qgd



Line#:1 R.Time:4.335(Scan#:428)  
 SIFS(SpPrTab==SpPrTab)RawMode:Averaged 4.330-4.340(427-429) BasePeak:99(474)

#	m/z	Abs. Int.	Rel. Int.
1	99.00	474	100.00
2	125.00	121	25.53

а



б

P\_304\_GCHRMS#565 RT: 7.07  
 T: + C EI SIM ms [ 98.50-131.49]

m/z	Intensity	Relative	Theo. Mass	Delta (ppm)	Composition
99.00060	6613.0	100.00	99.00057	0.23	C <sub>1</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> F <sub>1</sub> P <sub>1</sub>
125.01619	1744.0	26.37	125.01622	-0.27	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> F <sub>1</sub> P <sub>1</sub>

**Масс-хроматограммы образца плазмы крови, зараженной заринем на уровне  $0,5 \cdot 10^{-9}$  г/мл (нг/мл).**

а – масс-спектрометр низкого разрешения

б - масс-спектрометр высокого разрешения

### **2009 – 2010 – 1 тренировочный тест ОЗХО**

Определение метаболитов сернистого иприта и фосфорорганических отравляющих веществ в синтетической моче на уровне 10 - 100 ppb

### **2012 – 2 тренировочный тест**

Определение метаболитов сернистого иприта и фосфорорганических отравляющих веществ в моче на уровне 5 - 25 ppb

### **2013 – 3 тренировочный тест**

Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в моче и плазме крови на уровне 0,5 – 10 ppb

### **2014 – 4 тренировочный тест**

Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови на уровне 1,0 – 10 ppb

### **2015 – 5 тренировочный тест**

Определение метаболитов сернистого иприта в плазме крови на уровне 10 - 150 ppb

### **2016 – 1 квалификационный тест**

Определение метаболитов сернистого иприта в моче и плазме крови на уровне 40 - 100 ppb

### **2017 – 2 квалификационный тест**

Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в моче и плазме крови на уровне 15 - 100 ppb

### **2018 – 3 квалификационный тест**

Определение метаболитов табуна в плазме крови на уровне 10 - 60 ppb

### **2019 – 4 квалификационный тест**

Определение метаболитов циклогексилзарина и табуна в плазме крови и моче на уровне 2 - 50 ppb

# Исследование периодов возможного обнаружения фосфорорганических пестицидов методом кассетного дозирования; доза 0,1 ЛД50

Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. УНИИМ № 222.0320/01.00258/2013

• Диапазон измеряемых концентраций от  $1,0 \cdot 10^{-6}$  до  $2,0 \cdot 10^{-5}$  мг/см<sup>3</sup>

Образец цельной крови

Жидко-жидкостная экстракция с добавлением солей NaCl и Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Центрифугирование, 10 мин, 4000G

Сушка экстракта сульфатом натрия

Упаривание пробы досуха под током азота и перерастворение в 50 мкл ацетонитрила

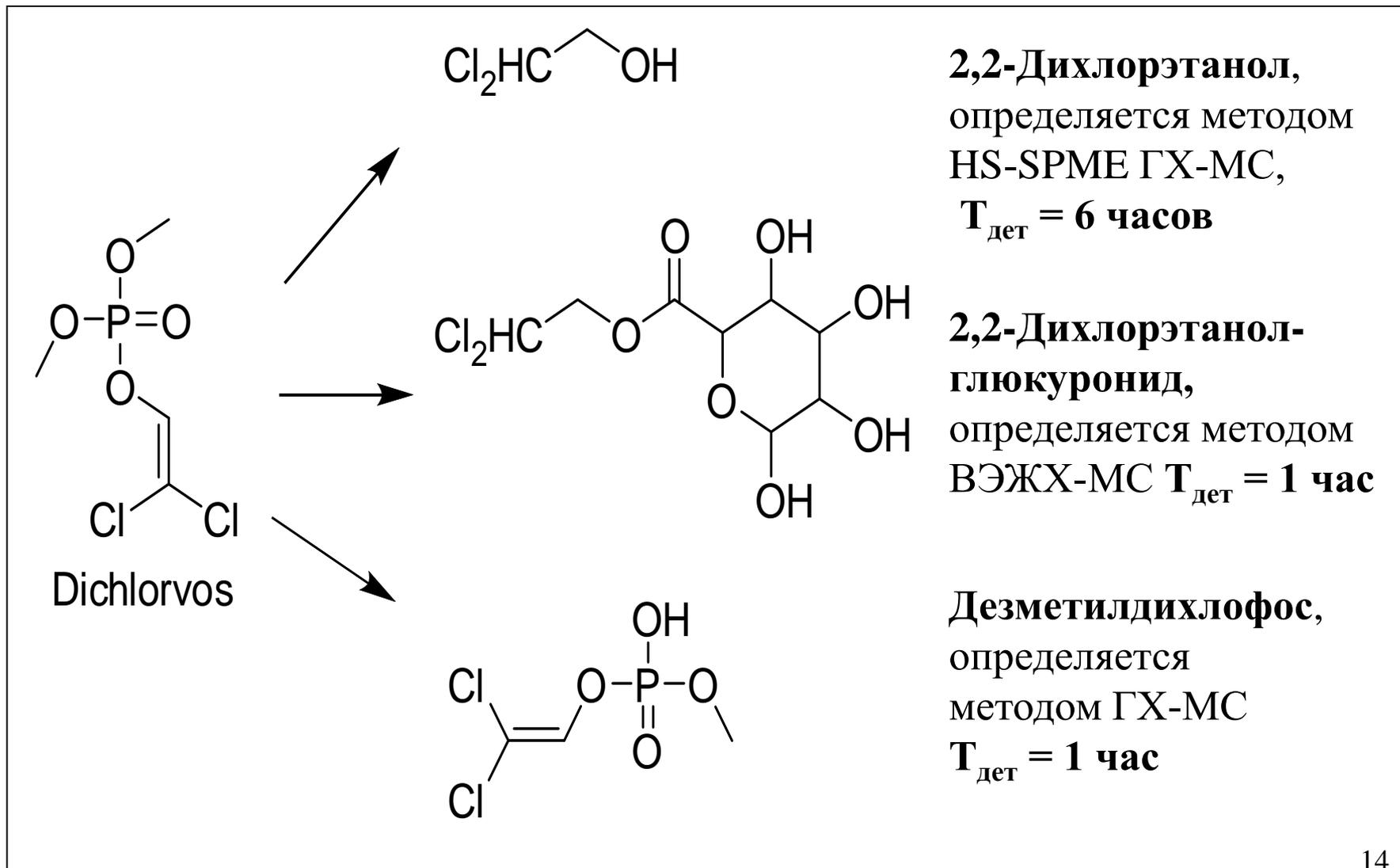


Вещество	Основной биомаркер
*Дихлофос	Дихлорэтанол
<b>Диметоат</b>	Натив.
*Диазинон	Пиримидиндиол
*Метилпаратион	4-нитрофенол
<b>Хлорпирифос</b>	Натив.
<b>Фозалон</b>	Натив.

Вещество	Период детектирования ФОС, сутки	
	Кровь	Моча
<b>Дихлофос</b>	<1	<1
<b>Диметоат</b>	3	3
<b>Диазинон</b>	3	3
<b>Метил паратион</b>	2	3
<b>Хлорпирифос</b>	3	3
<b>Фозалон</b>	5	>6

Уколов А.И., Сорокоумов П.Н., Уколова Е.С., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпаратиона в крови и моче методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием *Аналитика и контроль*. 2014, Т. 18, №3, С. 280-286.

# Идентификация биомаркеров дихлофоса и оценка периодов их возможного обнаружения при воздействии низких доз





# ***Вклад в методическое обеспечение определения отравляющих и сильнодействующих веществ в биопробах***

## **Методические рекомендации**

- **МР 12.15-2012 от 03.05.2012 г. «Идентификация нелетучих биомаркеров токсичных органических соединений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием»**
- **МР № 1.2.028-12 от 15.06.2012 «Подтверждение факта воздействия ФОВ на организм по результатам анализа мочи методом ВЭЖХ-МС/МС»**
- **МР № 1.2.060 – 12 от 12.12.2012 г. «Установление факта воздействия отравляющих веществ на организм по результатам анализа биологических проб при участии Российской Федерации в расследованиях Технического секретариата Организации по запрещению химического оружия возможных случаев применения химического оружия»**
- **МР № 4.1.23-2014 от 02.04.2014 г. «Процедура проведения количественного хромато-масс-спектрометрического анализа токсичных сильнодействующих веществ в биологических объектах».**
- **МР № 1.2.038–2016 от 31.05.2016 г. «Подтверждение факта воздействия фосфорорганических отравляющих веществ на организм по результатам анализа биопроб».**
- **МР «Методы определения биохимических маркеров ФОВ в биосредах» утв. ФМБА, № 38-08**



# ***Вклад в методическое обеспечение определения отравляющих и сильнодействующих веществ в биопробах***

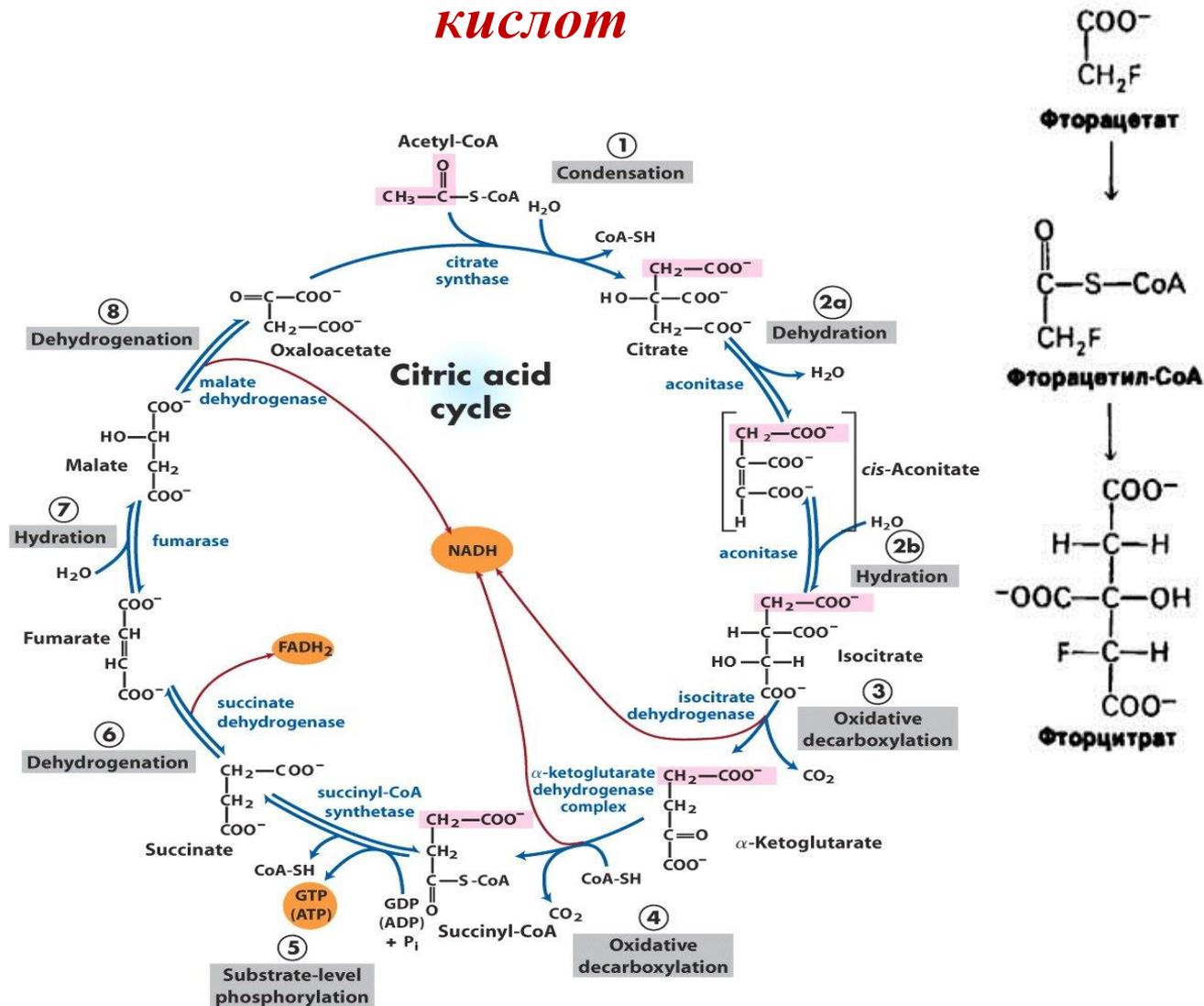
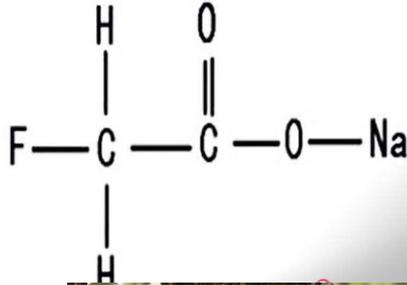
## **Методики измерений массовых концентраций**

- **МИ массовых концентраций О-алкилметилфосфонатов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием**  
Свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 222.0183/01.00258/2012 от 02.08.2012 г.
- **МИ массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии.**  
Свидетельство об аттестации МИ № 222.0319/01.00258/2013.
- **МИ массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биологических пробах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием.** Свидетельство об аттестации МИ № 222.0320/01.00258/2013
- **МИ массовых концентраций фосфорорганических веществ, реактивированных из состава аддуктов, в плазме крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии.**  
Свидетельство об аттестации методики № 222.0255/01.00258/2014 от 22.10.2014 г.

## **Инструкции ФМБА России**

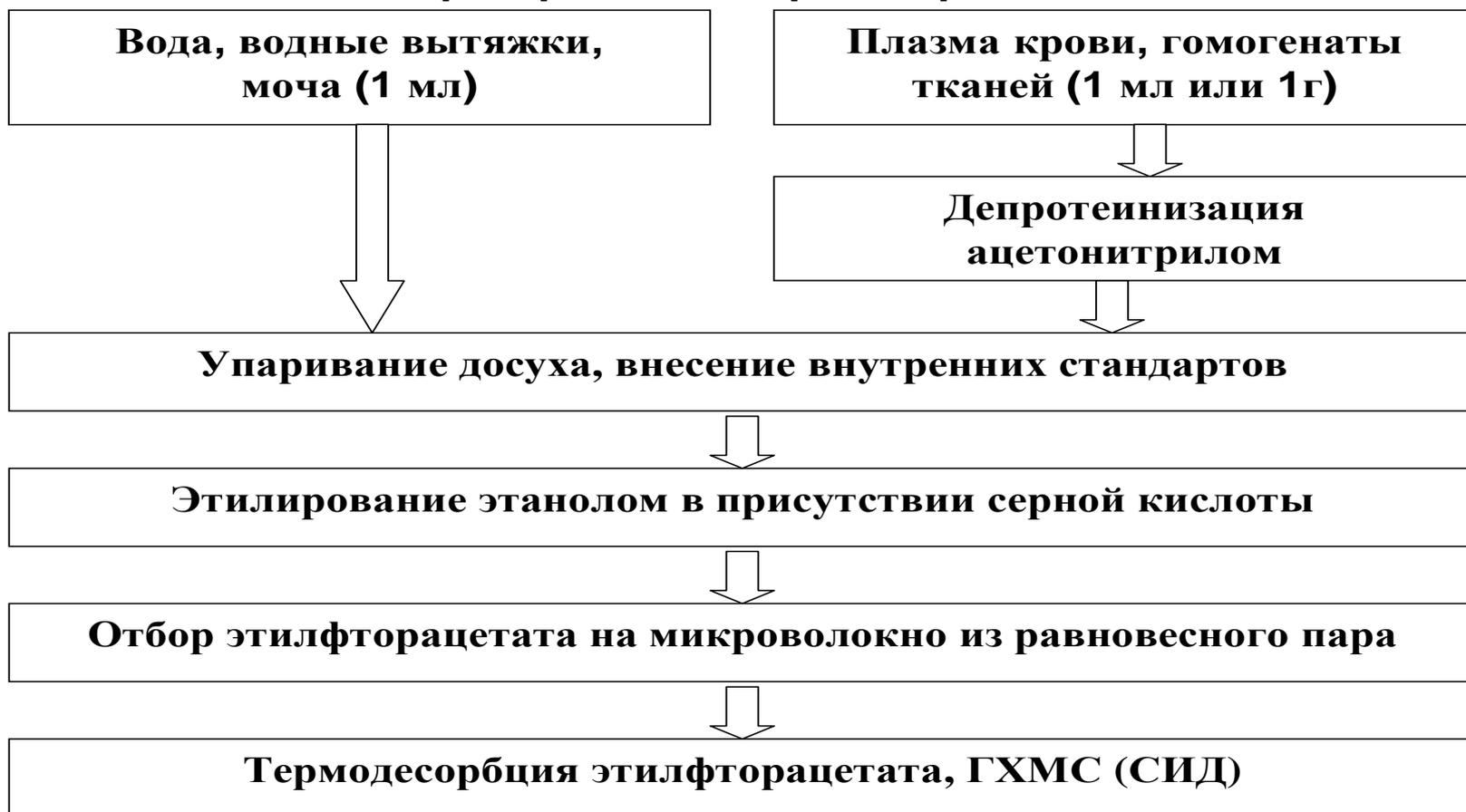
- **Инструкция И ФМБА России 21.21-2013 от 05.04.2013 г. «Пробоподготовка образцов плазмы крови для выявления прямых ковалентных аддуктов ФОВ (RVX, зоман) с белками плазмы с помощью хроматографических и масс-спектрометрических методов исследования»**

# Фторацетат натрия (ЛД50 для собак 0,07 мг/кг), запускает летальный синтез: превращается в фторцитрат, блокирующий цикл трикарбоновых кислот

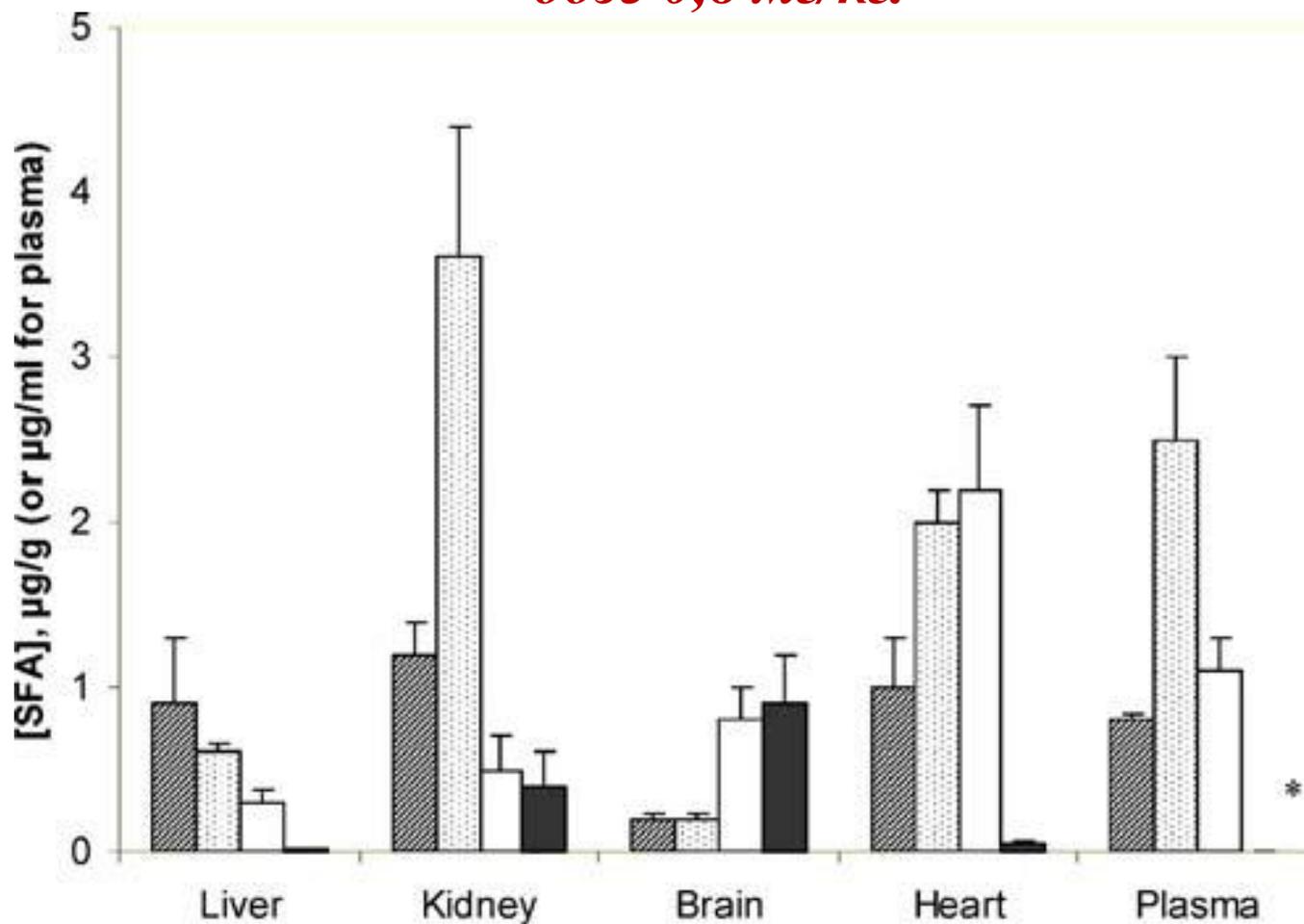


*Koryagina N.L., Savelieva E.I., Khlebnikova N.S., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Radilov A.S. Determination of fluoracetic acid in water and biological samples by GC-FID and GC-MS in combination with solid-phase microextraction. // J. Anal. Bioanal. Chem. – 2006 – V.386 – No.5 – P.1395-1400.*

**Унифицированная методика определения фторацетата натрия в воде и биомедицинских пробах методом ГХМС в сочетании с твердофазной микроэкстракцией**



*Концентрация фторуксусной кислоты (в пересчете на фторацетат натрия – SFA) в гомогенатах органов и плазме крови крыс через 1, 3, 6, 24 ч после перорального введения в дозе 0,8 мг/кг.*





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!