

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ,
ПРОФПАТОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
(ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА РОССИИ)

На правах рукописи



ШАЧНЕВА МАРИЯ ДМИТРИЕВНА

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ *БИС*(2-ХЛОРЭТИЛ)СУЛЬФИДА И ПРОДУКТОВ ЕГО
ТРАНСФОРМАЦИИ В СТРОИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛАХ И
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ ГАЗОВОЙ
ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

1.4.2 – Аналитическая химия

Диссертация
на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Савельева Е.И.

Санкт-Петербург
2022

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Свойства <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида	13
1.2 Продукты трансформации <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида в объектах окружающей среды	16
1.3 Продукты трансформации при уничтожении <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида.....	18
1.4 Химико-аналитический контроль в процессе уничтожения химического оружия	19
1.5 Методы определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида в конструкционных материалах	23
1.6 Биомаркеры воздействия <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида	26
1.6.1 Гидролитические метаболиты <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида	28
1.6.2 <i>Бис</i> (N-ацетилцистеиновый) конъюгат сульфона <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида	30
1.6.3 Аддукты <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида с ДНК	31
1.6.4 Аддукты <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида с белками плазмы крови	32
1.6.5 Аддукты <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида с гемоглобином	35
1.7 Методы определения аддуктов <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида с гемоглобином ..	36
1.8 Методы определения высвобожденных из состава белковых аддуктов тиодигликоля и <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида.....	41
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	45
2.1 Оборудование и материалы.....	45
2.2 Процедура определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в смывах с поверхностей	46
2.2.1 Объекты исследования и модельные образцы.....	46
2.2.2 Взятие образцов смывов и пробоподготовка.....	46
2.2.3 Условия ГХ-МС/МС анализа.....	47
2.3 Процедура определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в образцах строительных конструкций и инженерной инфраструктуры	48
2.3.1 Объекты исследования и модельные образцы.....	48
2.3.2 Подготовка образцов к анализу.....	48
2.3.3 Условия ГХ-МС/МС анализа.....	49
2.4 Процедура определения глобинового аддукта <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида в образцах цельной крови	49

2.4.1 Объекты исследования и модельные образцы.....	49
2.4.2 Дериватизация стандартного образца НЕТЕ-Val	49
2.4.3 Пробоподготовка образцов цельной крови, <i>in vitro</i> экспонированной <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфидом	50
2.4.3.1 Выделение глобина из эритроцитарной массы.....	50
2.4.3.2 Выделение НЕТЕ-Val из глобина и получение летучих производных	50
2.4.4 Условия ГХ-МС/МС анализа.....	51
2.5 Процедура определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови	52
2.5.1 Объекты исследования и модельные образцы.....	52
2.5.2 Пробоподготовка образцов плазмы крови, <i>in vitro</i> экспонированной <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфидом	52
2.5.2.1 Выделение белка из плазмы.....	52
2.5.2.2 Регенерирование <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида из состава белковых аддуктов плазмы крови.....	52
2.5.3 Условия ГХ-МС/МС анализа.....	53
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	54
3.1 Схема аналитического контроля объектов инженерной инфраструктуры предприятий по уничтожению <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида при решении вопроса о возможности их вторичного использования	54
3.1.1 Подбор условий хроматографического разделения и масс- спектрометрического детектирования для определения <i>бис</i> (2- хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана методом ГХ-МС/МС-ИЭ	54
3.1.2 Разработка процедуры определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4- дителиана в образцах смывов с поверхностей	56
3.1.2.1 Определение степеней извлечения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4- дителиана из марлевых тампонов	57
3.1.2.2 Оценка матричного влияния при определении <i>бис</i> (2- хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в экстрактах из марлевых тампонов методом ГХ-МС/МС	59
3.1.2.3 Определение доли извлекаемой формы <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана с различных поверхностей.....	59
3.1.2.4 Рабочий диапазон концентраций и предел обнаружения	60
3.1.3 Разработка методики определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4- дителиана в строительных материалах и полимерных элементах инфраструктуры.....	61

3.1.3.1 Выбор оптимального экстрагента для извлечения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана из образцов конструкционных материалов	62
3.1.3.2 Определение степеней извлечения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана из образцов конструкционных материалов	62
3.1.3.3 Оценка матричного влияния при определении <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в экстрактах из образцов конструкционных материалов методом ГХ-МС/МС.....	64
3.1.3.4 Оценка селективности методики определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах конструкционных материалов методом ГХ-МС/МС	65
3.1.3.5 Градуировочные характеристики и линейный диапазон концентраций	66
3.1.3.6 Метрологические характеристики методики определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в конструкционных материалах	67
3.1.3.7 Долгосрочная стабильность образцов конструкционных материалов с внесением <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана.....	69
3.1.3.8 Апробация разработанных подходов при анализе проб с бывшего объекта по уничтожению химического оружия на этапе его конверсии в народное хозяйство	70
3.2 Разработка методики определения аддукта <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида с глобином в эритроцитах крови.....	72
3.2.1 Подбор условий анализа глобинового аддукта методом ГХ-МС/МС.....	72
3.2.2 Определение глобинового аддукта <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида в образцах цельной крови	77
3.2.3 Оценка селективности методики определения глобинового аддукта <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида в образцах цельной крови методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ.....	80
3.2.4 Градуировочная характеристика	80
3.2.5 Метрологические характеристики методики определения глобинового аддукта <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида	81
3.3 Разработка методики определения <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови.....	82
3.3.1 Подбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования регенерированного из состава белковых аддуктов <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида	82
3.3.2 Оптимизация условий пробоподготовки для определения регенерированного из состава белковых аддуктов <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида.	83

3.3.3 Оценка селективности методики определения регенерированного бис(2-хлорэтил)сульфида методом ГХ-МС/МС	87
3.3.4 Метрологические характеристики методики определения регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови бис(2-хлорэтил)сульфида	87
3.3.5 Стабильность образцов плазмы с внесением бис(2-хлорэтил)сульфида	88
3.3.6 Оценка абсолютной концентрации бис(2-хлорэтил)сульфида, регенерируемого из состава белковых аддуктов	91
3.3.7 Апробация разработанной методики определения бис(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	100

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВС – внутренний стандарт

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ГФБИ – гептафторбутирилимидазол

ГФМА – гептафтормасляный ангидрид

ГХ – газовая хроматография

ГХ-МС – газовая хроматомасс-спектрометрия

ГХ-МС/МС – газовая хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием

ДМП – диметоксипропан

ИЭ – ионизация электронами

КВ – коэффициент вариации

МСМТЭСЭ – 1-метилсульфинил-2-[(метилтио)этилсульфонил]этан

МТБСТФА – N-(трет-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифтор-ацетамид

ОЗХО – Организация по запрещению химического оружия

ОХИ – отрицательная химическая ионизация

ПВХ – поливинилхлорид

ПД – предел детектирования

ПКО – предел количественного определения

ПО – предел обнаружения

ПФБХ – пentaфторбензоилхлорид

ПФД – пламенно-фотометрический детектор

ПФИТЦ – пentaфторофенилизотиоцианат

СБМСЭ – 1,1'-сульфонилбис[2-(метилсульфинил)этан]

СБМТЭ – 1,1'-сульфонилбис[2-(метилтио)этан]

СБСНАЭ – 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этан]

ТДГ – тиодигликоль

ТДГО – тиодигликольсульфоксид

ТХ – токсичный химикат

УХО – уничтожение химического оружия

ХО – химическое оружие

bis-G – бис(2-этил-N7-гуанин)тиоэфир

НЕТЕ-СР – S-гидроксиэтилтиоэтил-цистеин-пролин

НЕТЕ-СРF – S-гидроксиэтилтиоэтил-цистеин-пролин-фенилаланин

НЕТЕ-СРТ – S-гидроксиэтилтиоэтил-цистеин-пролин-тирозин

НЕТЕ-Val – N-[2-[(гидроксиэтил)тио]этил]-валин

НЕТЕ-Val-P – 1-(2-(2-гидроксиэтилтио)этил)-5-изопропил-3-(перфторфенил)-2-тиооксоимидазолидин-4-он

НЕТЕ-Val-P-P – 2-(2-(5-изопропил-4-оксо-3-(перфторфенил)-2-тиооксоимидазолидин-1-ил)этилтио)этил перфторбутаноат

N3-НЕТЕА – N3-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-аденин

N7-НЕТЕГ – N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин

O6-НЕТЕГ – O6-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин

TTR – транстиретрин

ВВЕДЕНИЕ

В 2017 г было завершено уничтожение химического оружия в Российской Федерации. Проведение государственного санитарно-эпидемиологического надзора за выводом из эксплуатации и подготовке к перепрофилированию предприятий по хранению и уничтожению химического оружия (УХО) потребовало определить объекты инфраструктуры предприятий, у которых отсутствуют следы контаминации бис(2-хлорэтил)сульфидом (сернистым ипритом) и реакционными массами от его уничтожения. Существующие методики нацелены на определение в образцах строительных материалов только бис(2-хлорэтил)сульфида, но не продуктов его трансформации, не позволяют в реальные сроки с высокой чувствительностью проводить анализ большого количества образцов и не охватывают все необходимые типы матриц. Санитарно-химическое обследование элементов инфраструктуры бывших предприятий УХО на этапе подготовки к перепрофилированию требует разработки экспрессной и надежной процедуры контроля содержания бис(2-хлорэтил)сульфида и стабильных продуктов его конверсии в образцах конструкционных материалов различного матричного состава.

Бис(2-хлорэтил)сульфид преобладает среди химического оружия (ХО), затопленного и захороненного в неустановленных местах, что обуславливает опасность поражения при различных видах хозяйственной деятельности. Воздействие бис(2-хлорэтил)сульфида на человека и животных устанавливается на основании обнаружения и идентификации продуктов его метаболизма (биомаркеров) в биообразцах. Продукты гидролитической биотрансформации бис(2-хлорэтил)сульфида быстро выводятся с мочой, поэтому предпочтение отдается долгоживущим биомаркерам – аддуктам бис(2-хлорэтил)сульфида с ДНК, белками плазмы крови и гемоглобином. При расследовании ситуаций, связанных с токсичными химикатами (ТХ), важно использовать возможности каждого метода для определения максимального количества маркерных аналитов, поскольку, согласно официальным документам Технического Секретариата Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО) [1], установление

факта воздействия ТХ должно опираться, по крайней мере, на определение одного маркера двумя методами или двух маркеров одним методом. Практикой верификационной деятельности в соответствии с обязательствами по Конвенции об уничтожении ХО [2], равно как и практикой санитарно-химических обследований на бывших предприятиях по УХО востребованы методики, применимые к анализу различных матриц и обеспечивающие надежную идентификацию маркеров ТХ.

При определении следовых концентраций летучих или способных образовывать летучие производные соединений в матрицах сложного состава газовая хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС/МС) представляется методом выбора ввиду минимальных матричных влияний и отсутствия ограничений, связанных с низкой эффективностью электрораспылительной ионизации слабополярных соединений. Отсутствие высокочувствительных и надежных химико-аналитических процедур, охватывающих определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида и стабильного продукта его конверсии в конструкционных материалах различного матричного состава, а также долгоживущих метаболитов *бис*(2-хлорэтил)сульфида в биологических образцах обуславливают **актуальность цели** настоящей работы, которая заключалась в разработке аналитических схем определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его трансформации в строительных материалах и биомедицинских пробах методом тандемной газовой хроматомасс-спектрометрии.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Разработка унифицированного подхода к определению *бис*(2-хлорэтил)сульфида и стабильного продукта его нейтрализации 1,4-дителиана в смывах с поверхностей технологического оборудования и глубинных пробах конструкционных материалов.
2. Установление особенностей применения методик определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана при анализе проб с бывшего объекта по уничтожению химического оружия на этапе его перепрофилирования.

3. Разработка и апробация методики определения аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида с глобином – N-[2-[(гидроксиэтил)тио]этил]-валина (**НЕТЕ-Val**) в эритроцитах крови.

4. Разработка методики определения регенерированного из состава белковых аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида в плазме крови.

5. Апробация методики определения регенерированного из состава белковых аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида при разработке сценария и подготовке биопроб для международного квалификационного теста ОЗХО.

Научная новизна. Разработана унифицированная методика одновременного определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и стабильного продукта его трансформации 1,4-дितिана в объектах строительных конструкций и инженерной инфраструктуры, позволяющая определять аналиты в образцах различного матричного состава на уровне 0,7-0,9 нг/г (0,007-0,009 ПДК). Оценены степени извлечения аналитов и матричные эффекты при их определении в конструкционных материалах и смывах с поверхностей.

Разработана методика определения дериватов аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида с глобином методом ГХ-МС/МС в режимах отрицательной химической ионизации (**ОХИ**) и ионизации электронами (**ИЭ**), реализуемая в идентичных условиях пробоподготовки и хроматографического разделения.

Разработана методика определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови, позволившая оценить способность алкилированных *бис*(2-хлорэтил)сульфидом белков плазмы к регенерированию при различных условиях хранения образцов плазмы.

Практическая значимость работы. Методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дितिана в смывах с поверхностей и образцах строительных конструкций и инженерной инфраструктуры применены при анализе проб с бывшего объекта по УХО.

Методики определения биомаркеров *бис*(2-хлорэтил)сульфида в биообразцах включены в сборник рабочих процедур, используемых Лабораторией

химико-аналитического контроля и биотестирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ» в международных квалификационных тестах ОЗХО. Методика определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови, применена при разработке сценария 6-го (2021 г.) международного квалификационного теста ОЗХО по анализу биомедицинских проб, а также для контроля стабильности разосланных участникам теста образцов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Унифицированные подходы к определению *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в смывах с поверхностей и измельченных образцах конструкционных материалов различного матричного состава для оценки возможности вторичного использования элементов инфраструктуры бывших предприятий по уничтожению химического оружия.

2. Определение аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида с глобином методами ГХ-МС/МС-ИЭ и ГХ-МС/МС-ОХИ при установлении факта воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида на организм в режиме ретроспективного анализа.

3. Процедура определения регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови *бис*(2-хлорэтил)сульфида и обоснование его применимости в качестве стабильного биомаркера экспозиции при различных условиях хранения биопроб.

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Достоверность результатов исследований подтверждена значительным объемом экспериментальных исследований, значимостью выборки анализируемого материала, использованием современных методов исследования и статистической обработки данных, согласованностью теоретически ожидаемых и экспериментально полученных данных.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на: Всероссийской научной конференции «Медико-биологические проблемы обеспечения химической безопасности Российской Федерации» (2017 г., Санкт-Петербург); IV Всероссийской конференции с

международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (2020 г., Краснодар); V Международной конференции «Актуальные научные и научно-технические проблемы обеспечения химической безопасности» (2020 г., Казань); 11-й Всероссийской Научной конференции и школе «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (2021 г., Новосибирск); VI Всероссийском симпозиуме с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (2021 г., Краснодар); Всероссийском симпозиуме и школе-конференции молодых ученых «Физико-химические методы в междисциплинарных экологических исследованиях» (2021 г., Севастополь).

Публикации. По результатам проведенных исследований опубликованы 5 статей в рецензируемых научных изданиях, в том числе 4 – в рекомендованных ВАК РФ журналах по специальности 1.4.2 – аналитическая химия, а также 6 тезисах докладов в материалах научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 30 рисунков и 17 таблиц, список использованных источников – 127 наименований.

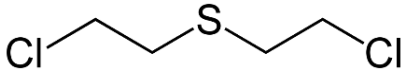
Личный вклад автора. Соискателем выполнены экспериментальные и теоретические исследования по разработке и определению бис(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его (био)трансформации в пробах различного происхождения. Формулировка целей и задач исследования, интерпретация экспериментальных данных, систематизация результатов исследования и оформление публикаций соискателем выполнены совместно с научным руководителем.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Свойства бис(2-хлорэтил)сульфида

Бис(2-хлорэтил)сульфид (сернистый иприт, 2,2-дихлордиэтилсульфид, 2,2'-дихлордиэтиловый тиоэфир, HD) относится к боевым отравляющим веществам кожно-нарывного действия. При комнатной температуре представляет собой бесцветную или желтоватую маслянистую жидкость с запахом чеснока или горчицы [3]. Это липофильное и реакционноспособное соединение, при попадании капель или вдыхании паров поражающее как наружные части тела, так и внутренние органы, вызывая воспаление, волдыри и общее поражение тканей. Физико-химические свойства *бис(2-хлорэтил)сульфида* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические свойства *бис(2-хлорэтил)сульфида* [4]

Брутто-формула	$C_4H_8Cl_2S$
Структурная формула	
CAS	505-60-2
Молекулярная масса	159,08
Температура плавления (°C)	13-14
Температура кипения (°C)	215-217
Плотность (г/мл, жидкость, при 20 °C)	1,27
Плотность пара (воздух = 1)	5,5
Давление насыщенного пара (mmHg при 20 °C или 25 °C)	0,11
Летучесть (мг/м ³)	920
Растворимость в воде (г/л)	0,92
Константа Генри (атм×м ³ /моль)	$2,41 \times 10^{-5}$
ЛД50 (мг/кг, крысы, перорально)	2,4

Бис(2-хлорэтил)сульфид растворим в большинстве органических растворителей, включая бензин, масла, ацетон и спирты. Из-за высокой плотности паров имеет тенденцию скапливаться в низких местах при распылении. После удаления первоначального загрязнения поверхности *бис*(2-хлорэтил)сульфид, сорбированный пористым или окрашенным материалом, может мигрировать обратно на поверхность, создавая опасность как контакта, так и испарения.

Помимо поражающего воздействия на дыхательные пути и кожные покровы *бис*(2-хлорэтил)сульфид является мутагеном и потенциальным канцерогеном. Попадая в организм, он реагирует с белками, РНК и фосфолипидами, но его наиболее выраженное цитотоксическое действие заключается в алкилировании и перекрестном сшивании ДНК [5, 6]. Многие исследования свидетельствуют о том, что острая токсичность *бис*(2-хлорэтил)сульфида связана с его алкилирующей способностью и способностью вызывать окислительный стресс и воспаление в пораженных тканях, что, в свою очередь, приводит к изменениям в метаболических, генетических и других клеточных функциях и приводит к гибели клеток в результате апоптоза или некроза [7, 8].

Основным путем трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида является гидролиз (период полураспада 4-8 мин при 25 °С в дистиллированной воде). Скорость гидролиза лимитируется низкой скоростью растворения *бис*(2-хлорэтил)сульфида в воде, а также образованием промежуточных продуктов гидролиза, покрывающих капли *бис*(2-хлорэтил)сульфида и замедляющих процесс. Образование конечных продуктов зависит от температуры окружающей среды, от механического воздействия (турбулентность, перемешивание), а также присутствия других веществ, влияющих на растворимость и скорость гидролиза *бис*(2-хлорэтил)сульфида. На рисунке 1 представлена схема гидролиза *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

они образуют стабильный слой вокруг первичной капли, предотвращающий дальнейшие реакции гидролиза *бис*(2-хлорэтил)сульфида, что способствует его длительному сохранению в окружающей среде.

1.2 Продукты трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида в объектах окружающей среды

В окружающей среде *бис*(2-хлорэтил)сульфид гидролизуеться до ТДГ с последующим окислением до тиодигликольсульфоксида (ТДГО). Из-за высокой реакционной активности *бис*(2-хлорэтил)сульфида помимо ТДГ в пробах окружающей среды присутствует множество других продуктов его разложения. При анализе донных отложений, собранных в местах захоронений ХО в Балтийском море, *бис*(2-хлорэтил)сульфид и ТДГ не были обнаружены ни в одном из образцов, в то время как различные циклические продукты трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида идентифицировали довольно часто, рисунок 2 [11-13].

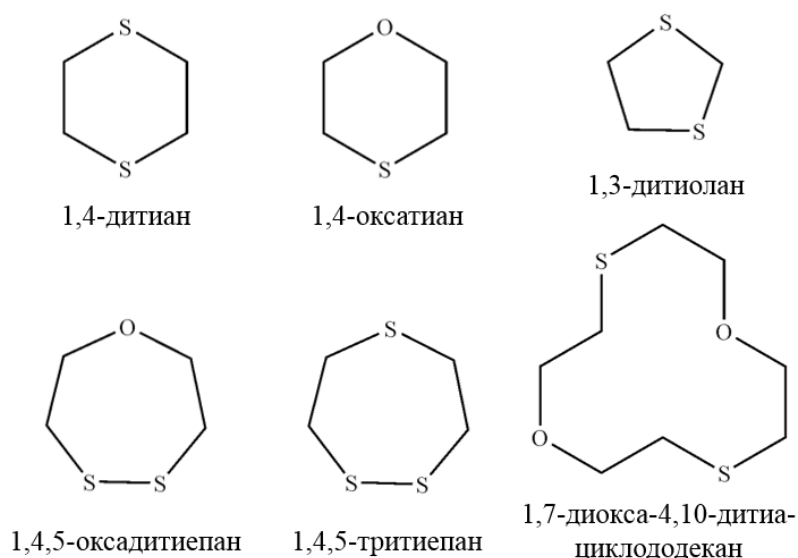


Рисунок 2 – Циклические продукты трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида, идентифицированные в объектах окружающей среды

Затопленный *бис*(2-хлорэтил)сульфид в настоящее время находится в виде твердых комков (блоков), образовавшихся, как полагают, в результате процессов полимеризации, происходящих, когда гидрофобный *бис*(2-хлорэтил)сульфид вытекал из разрушающихся контейнеров (боеприпасов) и подвергался

воздействию морской воды [14]. При анализе методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) силилированных экстрактов из затвердевших комков *бис*(2-хлорэтил)сульфида были идентифицированы продукт его гидролиза ТДГ и окисленная форма *бис*(2-хлорэтил)сульфида – *бис*(2-хлорэтил)сульфон. Также были обнаружены четыре аналога *бис*(2-хлорэтил)сульфида, сам *бис*(2-хлорэтил)сульфид и три циклических продукта разложения – 1,4-дитиан, 1,4-оксатиан и 1,4,5-трителипан. Среди продуктов трансформации в качестве маркера утечки *бис*(2-хлорэтил)сульфида в местах захоронений ХО наибольшее распространение получил 1,4-дитиан. На рисунке 3 представлены разные пути трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида в 1,4-дитиан в зависимости от условий хранения.

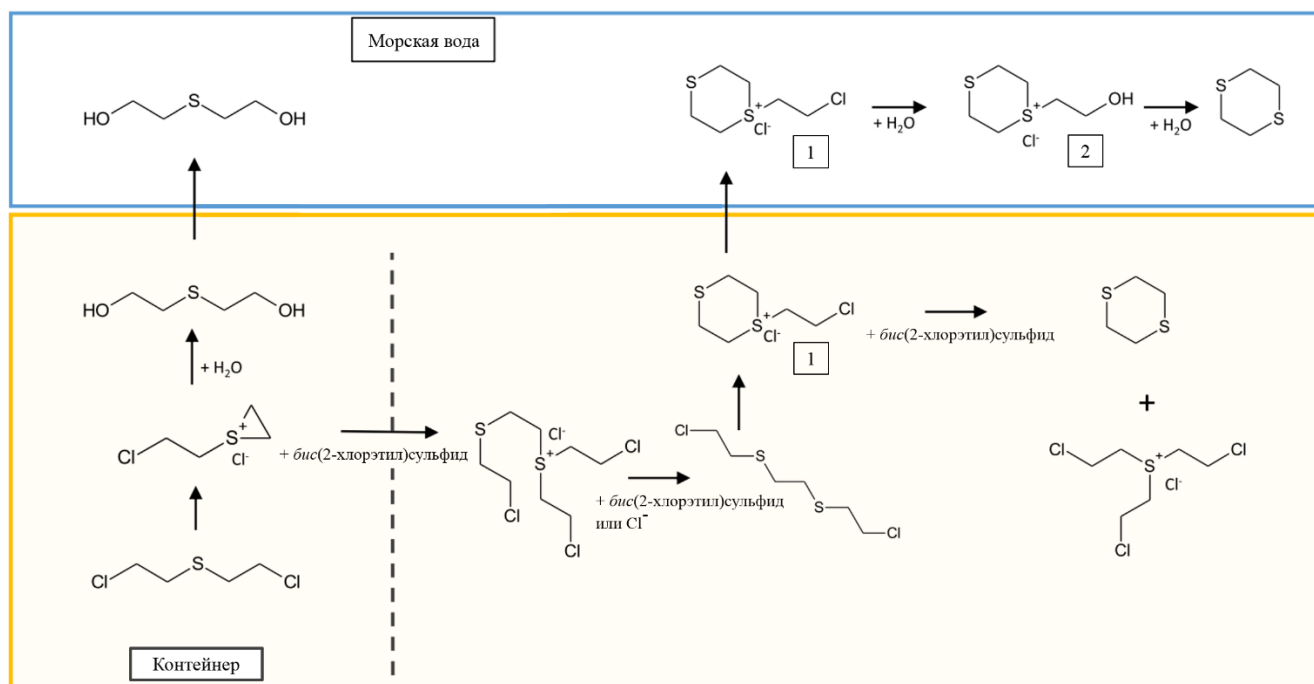


Рисунок 3 – Пути трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида в 1,4-дитиан в разных условиях: в морской воде (вверху), в контейнере (внизу)

При длительном хранении без доступа воды образование 1,4-дитиана происходит через образование промежуточного продукта – 1-(2-хлорэтил)-1,4-дитиана (1). При контакте с морской водой в результате разрушения контейнера или боеприпаса происходит конверсия 1-(2-хлорэтил)-1,4-дитиана в 1,4-дитиан через образование промежуточного продукта гидролиза – 1-(2-гидроксиэтил)-1,4-дитиана (2).

В почве *бис*(2-хлорэтил)сульфид достаточно устойчив и может оставаться в неизменном виде в течение нескольких лет. Так, например, в нескольких образцах почвы, отобранных в Ираке через четыре года после применения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, наряду с продуктами разложения (1,4-дитианом, 1,4-оксатианом и др.) были обнаружены следовые количества *бис*(2-хлорэтил)сульфида [15].

1.3 Продукты трансформации при уничтожении *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Уничтожение запасов *бис*(2-хлорэтил)сульфида и ипритно-люизитных смесей в РФ производили по двухстадийной технологии, включающей химическую детоксикацию ТХ смесью моноэтаноламина и этиленгликоля с последующей битумизацией продуктов нейтрализации с целью получения нерастворимой битумно-солевой массы – твердого водонерастворимого продукта, пригодного для захоронения [16-18].

В основе данного способа детоксикации лежит реакция, аналогичная описанному еще в 1934 г. взаимодействию бромистого аналога *бис*(2-хлорэтил)сульфида с этаноламином, приводящему к 2-(тиоморфолин-4-ил)этанолу, рисунок 4 [19].

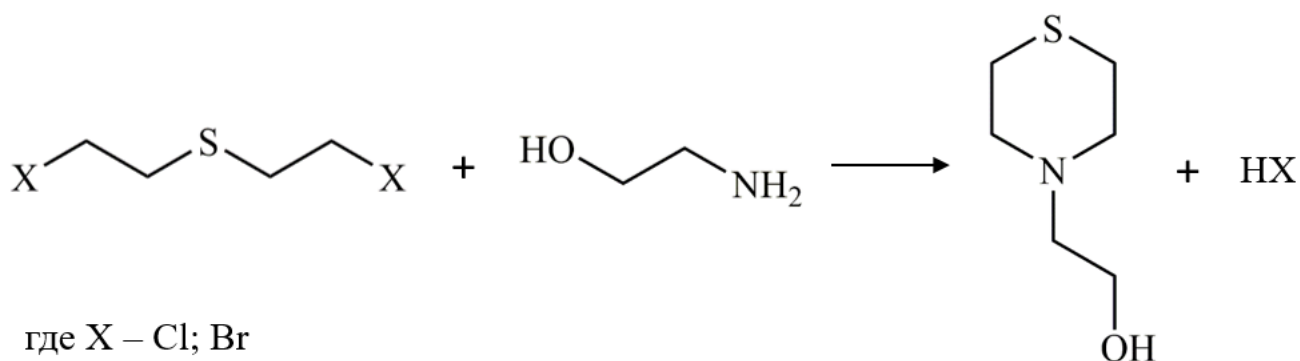


Рисунок 4 – Реакция *бис*(2-хлорэтил)сульфида или его бромистого аналога с этаноламином

В экстрактах из реакционных масс после детоксикации *бис*(2-хлорэтил)сульфида были идентифицированы следующие соединения: 1,4-дитиан, 2-метил-1,4-дитиан, 2-(тиоморфолин-4-ил)этанол, два изомера: 2-(2-метилтиоморфолин-4-ил)этанол (1) и 2-(3-метилтиоморфолин-4-ил)этанол (2),

Таблица 2 – Методики измерений концентрации бис(2-хлорэтил)сульфида в объектах окружающей среды, производственной инфраструктуры и отходах

Наименование методики выполнения измерений	Диапазон концентраций	Погрешность измерений	Номер в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений
МУК 4.1.014-2009. Методика выполнения измерений содержания иприта на металлических поверхностях технологического оборудования методом газовой хроматографии.	от $1,0 \times 10^{-4}$ до $2,0 \times 10^{-3}$ мг/дм ²	$\pm 59\%$	ФР.1.31.2011.09234 [22]
МУК 4.1.016-2010. Методика выполнения измерений содержания иприта на поверхностях металлических отходов после обжига методом газовой хроматографии.	от $1,0 \times 10^{-4}$ до $2,0 \times 10^{-3}$ мг/дм ²	$\pm 59\%$	ФР.1.31.2011.09241 [23]
МУК 4.1.014-2010. Методика выполнения измерений массовой доли иприта в пробах отходов после печей сжигания (золе) методом газовой хроматографии.	от $5,0 \times 10^{-8}$ до $5,0 \times 10^{-7}$ г/г (0,050-0,5 мг/кг)	$\pm 43\%$	ФР.1.31.2011.09239 [24]
МУК 4.1.008-2009. Методика выполнения измерений массовой доли иприта в пробах почв методом газовой хроматографии.	от $2,0 \times 10^{-8}$ до $4,0 \times 10^{-7}$ г/г (0,020-0,4 мг/кг)	$\pm 41\%$	ФР.1.31.2011.09228 [25]
МУК 4.1.010-2009. Методика выполнения измерений массовой концентрации иприта в пробах водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования методом газовой хроматографии.	от $1,0 \times 10^{-4}$ до $2,0 \times 10^{-3}$ мг/дм ³	$\pm 35\%$	ФР.1.31.2011.09230 [26]

Аттестованные методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, используемые в процессе УХО, отсутствуют в открытом доступе и представлены в отдельном разделе «1-ХО» Федерального реестра [27].

Основным методом анализа для химико-аналитического контроля процесса УХО являлась газовая хроматография (ГХ) в сочетании с масс-спектрометрическим и другими способами детектирования [28].

При разработке методик определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах строительных конструкций и инженерной инфраструктуры ориентировались на нормативы, установленные для почвы [29]. Для извлечения аналита из матрицы применяется жидкостная экстракция смесью гексан:ацетон (9:1) или ацетоном [30]. Анализ осуществляют методом ГХ с пламенно-фотометрическим детектором (ПФД). Предел обнаружения методики составляет 3×10^{-5} мг/мл, что соответствует содержанию *бис*(2-хлорэтил)сульфида в пробе $8,0 \cdot 10^{-3}$ мг/кг.

Все аттестованные методики, используемые для контроля остаточного содержания ГХ и продуктов их трансформации в процессе УХО, обеспечивали чувствительность определения аналитов на уровне 0,5 их гигиенических нормативов (ПДК, ПДУ) [31], таблица 3.

Таблица 3 – Гигиенические нормативы содержания *бис*(2-хлорэтил)сульфида в объектах окружающей среды, производственной инфраструктуры и отходах

Объект	Норматив
ПДК в воде водоемов, мг/л	$2,0 \times 10^{-4}$
ПДК в почве районов размещения объектов УХО, мг/кг	0,05
ПДК в почве территорий промышленных площадок объектов уничтожения ХО, мг/кг	0,5
ПДК в отходах после печей сжигания, мг/кг	0,1
ПДК в материалах строительных конструкций, мг/кг	0,1
ПДУ загрязнения металлических отходов, мг/дм ²	$2,0 \times 10^{-4}$
ПДУ загрязнения технологического оборудования, мг/дм ²	$2,0 \times 10^{-4}$

Уничтожение запасов ХО в РФ производилось в соответствии с законом Российской Федерации «Об уничтожении химического оружия» [32] и Федеральной целевой программой «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации» [33], предусматривающих поэтапный вывод объектов УХО из эксплуатации, ликвидацию последствий их деятельности и конверсию производственных мощностей в народное хозяйство после завершения процесса УХО. Перепрофилированию объектов УХО предшествует дегазация зданий, сооружений и тех элементов инфраструктуры, которые планируются к вторичному использованию. Для оценки полноты дегазации необходимо проводить мониторинг содержания остаточных количеств ОВ и продуктов их деструкции на поверхностях и в глубинных слоях материалов различной природы (кирпич, бетон, кафельная плитка, полимеры, металлические поверхности). Возникла необходимость контроля остаточного содержания *бис*(2-хлорэтил)сульфида в матрицах, методики измерений для которых не были разработаны. Имеющиеся в Федеральном информационном фонде методики для определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида в объектах техногенной среды были разработаны более 10 лет назад и предполагают применение разных достаточно трудоемких методик, регламентирующих определение одного вещества в матрице определенного типа. Определение продуктов трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида в объектах рабочей зоны методически не обеспечено.

На этапе перепрофилирования бывших предприятий по УХО предъявляются более жесткие требования к их безопасности, поэтому при разработке методик необходимо было достичь существенно более низких по сравнению с порогом токсического действия пределов обнаружения. Также важным требованием к разрабатываемым методикам являлась высокая производительность и экспрессность, поскольку в результате деятельности предприятий по УХО было накоплено большое количество отходов (элементы инженерной инфраструктуры, строительные материалы, технологические установки), вероятно, загрязненных ТХ, и количество образцов для химико-аналитического контроля исчислялось сотнями.

1.5 Методы определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида в конструкционных материалах

Одним из самых распространенных способов пробоотбора является взятие смывов ватно-марлевыми тампонами для последующей оценки загрязнения поверхностей токсичными веществами (пестицидами, ГХ и др.). Однако ввиду проблем, связанных с проникновением токсикантов в пористые поверхности и сложностью их извлечения, считается, что данный способ отбора проб пригоден только для непористых материалов. В работе [34] с целью определения содержания *бис*(2-хлорэтил)сульфида на различных поверхностях проводилось сравнение стандартной техники взятия смывов с поверхностей марлевыми тампонами и техники пробоотбора методом нанесения-отслаивания (*spread and peel surface sampling technique*) с последующим анализом методом ГХ-МС-ИЭ. Для исследования были выбраны девять поверхностей, имеющих различную структуру. В качестве растворителя для взятия смывов использовали изопропанол, в качестве экстрагента аналитов с марлевых тампонов – смесь 10 % изопропанола в дихлорметане. При осуществлении техники нанесения-отслаивания на поверхности наносили жидкий латекс, после высыхания которого отделяли пленку, помещали ее в вialу и экстрагировали аналиты смесью метанол/ацетон (3:7). Наилучшее извлечение *бис*(2-хлорэтил)сульфида было достигнуто при осуществлении смывов с поверхности глазурованной плитки (49,7 %) и нержавеющей стали (21,2 %), а также при использовании жидкого латекса для пробоотбора с гладкого цемента (35,2 %) и керамической плитки (16,7 %). В остальных случаях степень извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида с поверхностей была менее 10 %.

Для визуального определения поверхностей, загрязненных *бис*(2-хлорэтил)сульфидом авторами работы [35] был разработан распыляемый водорастворимый полимер, иммобилизированный 3,6-Ди-(пиперидин-1-ил)-9Н-ксантен-9-тионом (ДПКТ). Локализация загрязненных участков поверхностей осуществлялась за счет селективного взаимодействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида с ДПКТ с образованием видимого невооруженным глазом флуоресцирующего продукта реакции. Распыляемые датчики по сравнению с другими датчиками не

требуют повреждения исследуемой поверхности и могут стать мощным инструментом для мониторинга эффективности процессов дезактивации ТХ.

Для оценки эффективности 4-х дегазирующих рецептур различного состава для очистки загрязненных *бис*(2-хлорэтил)сульфидом древесины, стекла и оцинкованных металлических пластин в работе [36] предложена процедура, основанная на извлечении аналита из образцов в гексан при обработке ультразвуком с последующим ГХ-МС анализом экстрактов. Степень извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида из измельченных образцов оцинкованных металлических пластин через 60 и 90 мин после приготовления модельных образцов в среднем составила 80 %. Из образцов древесины через 60 мин после нанесения извлеклось около 40 % от исходного количества, такой же показатель был получен при анализе проб через 90 мин после приготовления. В образцах стекла *бис*(2-хлорэтил)сульфид был обнаружен только через 60 мин после нанесения. Степень извлечения составила 80 %.

В работе [37] определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида осуществляли в образцах резины (каучука) и металлических пластин, покрытых тонким слоем алкидной краски. Проводили экстракцию аналита хлористым метиленом при ультразвуковом воздействии в течение 30 мин и анализировали экстракты методом ГХ-МС. В дополнение к анализу экстрактов также проводили определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах резины и соскобов краски методом ГХ-МС в сочетании с динамическим парофазным анализом. Было показано, что при анализе экстрактов высокий процент высококипящих углеводородов, используемых в качестве пластификаторов в каучуке, приводил к уширению пика *бис*(2-хлорэтил)сульфида и резкому снижению разрешения ГХ. Лучшие результаты были получены при использовании метода динамического парофазного ГХ-МС анализа. Для достижения максимального разделения между аналитом и компонентами матрицы, а также для предотвращения нежелательных реакций термического разложения применялась максимально низкая температура десорбции. При нагревании небольших навесок исследуемых образцов в потоке гелия при 120 °С большая часть углеводородов пластификатора не выделялась и

снижения разрешения ГХ не наблюдалось. Степени извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида из образцов резины через 30 мин, 3 недели и 6 месяцев после внесения при хранении образцов при комнатной температуре составили 86 %, 60 % и 50 % соответственно.

Определение содержания *бис*(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его трансформации в образцах бетона исследовали в работе [38]. Навеску бетона с внесенным *бис*(2-хлорэтил)сульфидом экстрагировали хлороформом и анализировали методами ГХ-МС и ЯМР-спектроскопии. Методом ГХ-МС содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах бетона через 1 час после приготовления модельного образца составляло 90 %, через сутки – 40 %, через 8 дней – только 5 % от внесенного количества, тогда как исследование методом ЯМР-спектроскопии измельченных образцов не показало снижения содержания *бис*(2-хлорэтил)сульфида в пробах в процессе хранения. По мнению авторов, *бис*(2-хлорэтил)сульфид присутствует в бетоне до его разложения в неэкстрагируемой форме и, таким образом, представляет потенциальную опасность для окружающей среды.

Прямое определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) является сложной задачей ввиду низкой эффективности электрораспылительной ионизации слабополярных соединений [39] и плохой растворимости *бис*(2-хлорэтил)сульфида в воде. Замена хлоридных групп нуклеофильными высокоионизированными группами является хорошей концепцией для чувствительного определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида методом ВЭЖХ-МС/МС с электрораспылительной ионизацией [40]. Однако в этом случае нельзя однозначно определить тип электрофильных групп (хлорид, бромид, винил и др.), существовавших до дериватизации. Альтернативный способ определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида методом ВЭЖХ-МС с электрораспылительной ионизацией предложили авторы работы [41]. Способ заключается в селективном окислении сульфидной группы *бис*(2-хлорэтил)сульфида электрофильным реагентом N-йодосукцинимидом с получением стабильного и растворимого в

воде монооксида *бис*(2-хлорэтил)сульфида. Схема реакции представлена на рисунке 6.

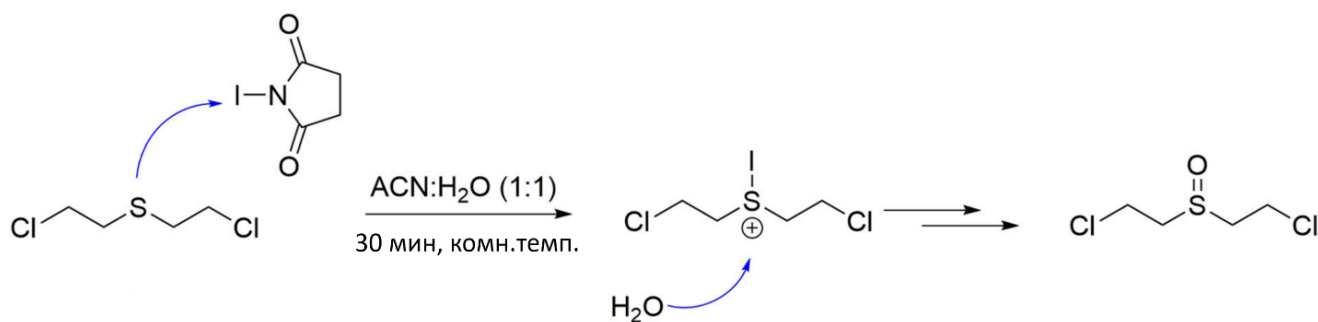


Рисунок 6 – Схема реакции окисления *бис*(2-хлорэтил)сульфида N-йодосукцинимидом

Влияние матричных компонентов на эффективность реакции дериватизации оценивали на ацетонитрильных экстрактах, приготовленных из бланковых образцов почвы, асфальта, ламината, ткани и линолеума, в которые вносили *бис*(2-хлорэтил)сульфид в диапазоне концентраций 50-5000 пг/мл. Было показано, что влияния матричных компонентов на выход реакции и результаты анализа не наблюдалось. Предел обнаружения и предел количественного определения для экстрактов из всех матриц составили 50 пг/мл и 100 пг/мл.

1.6 Биомаркеры воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Широкое изучение метаболизма *бис*(2-хлорэтил)сульфида (в том числе и изотопно меченного) проводили на лабораторных животных [42-45], а в более ранних исследованиях и на добровольцах [46]. Метаболизм *бис*(2-хлорэтил)сульфида осуществляется по нескольким направлениям: гидролитическому, окислительному, образованию β -лиазных метаболитов и аддуктов с макромолекулами, рисунок 7 [47, 48].

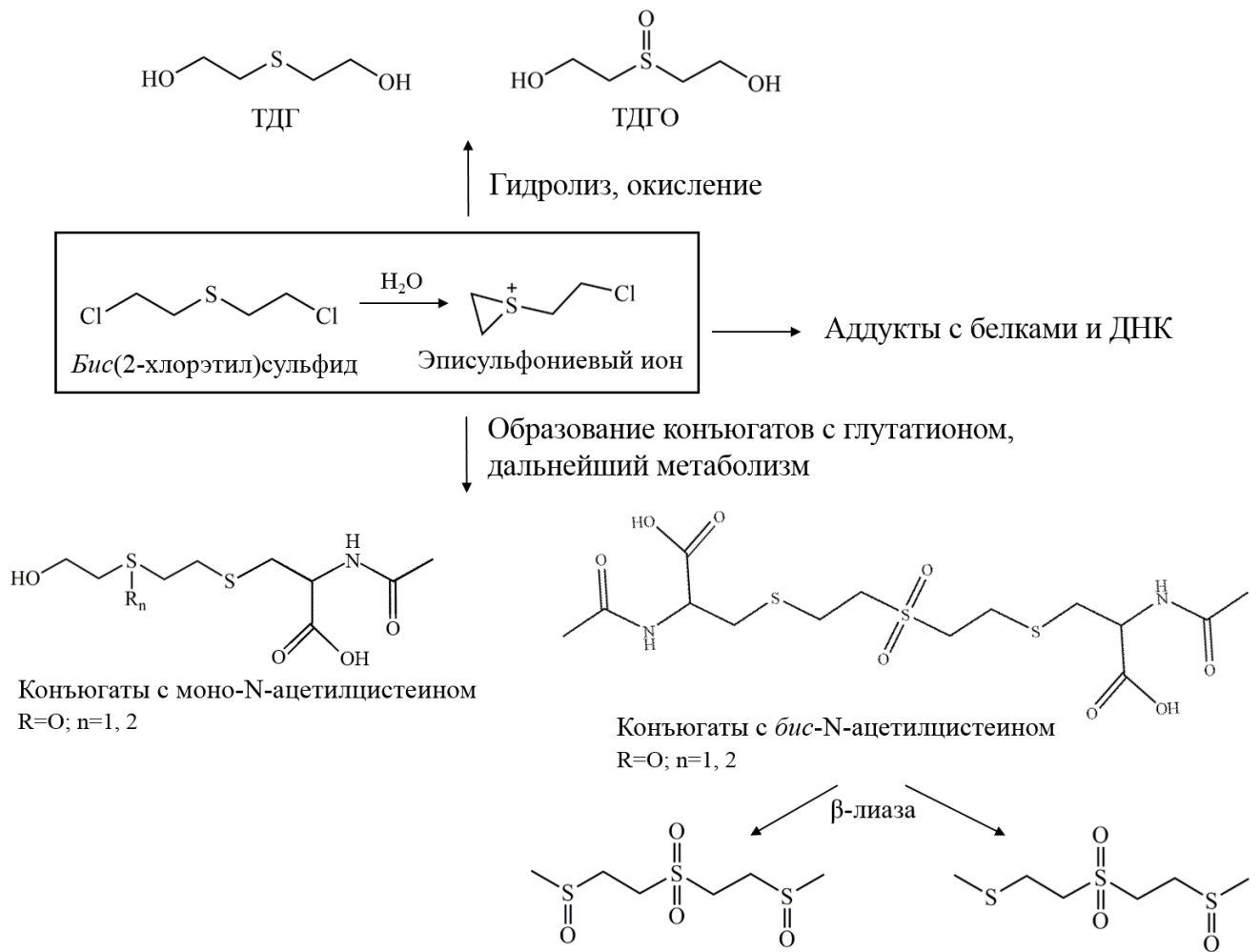


Рисунок 7 – Пути метаболизма бис(2-хлорэтил)сульфида

Бис(2-хлорэтил)сульфид содержит два электрофильных углеродных атома и, как следствие, его химические свойства и метаболизм обусловлены главным образом реакциями с нуклеофилами, протекающими через промежуточное образование высоко реакционноспособного эписульфоницевого иона. Бис(2-хлорэтил)сульфид также склонен к окислению по атому серы. В конкурентной среде эписульфоницеый ион предпочтительнее реагирует с «мягкими» нуклеофилами, такими как тиольные группы цистеинового остатка трипептида глутатиона, который в относительно больших количествах содержится в крови и является частью системы защиты организма от алкилирующих агентов. При определенных физиологических условиях реакция с глутатионом конкурирует с реакцией с наиболее распространенным нуклеофилом – водой. Реакции с водой и глутатионом, сопровождающиеся окислением сульфидного атома серы до сульфоксидного и сульфонного, являются источником основных метаболитов

бис(2-хлорэтил)сульфида, выводящихся с мочой. Другой путь превращений *бис*(2-хлорэтил)сульфида в организме включает реакции с сульфогидрильными, гидроксильными, карбоксильными и аминогруппами белков и ДНК. Методы определения метаболитов *бис*(2-хлорэтил)сульфида в биологических образцах подробно описаны в обзорах [47-51] и диссертационной работе И.А. Родина [52].

1.6.1 Гидролитические метаболиты *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Как было сказано выше, первичным продуктом гидролиза *бис*(2-хлорэтил)сульфида является ТДГ, который в последствии окисляется до ТДГО. Следует отметить, что в здоровом организме в небольших количествах содержится ТДГ биогенного происхождения, либо полученного из иных источников, нежели поражение *бис*(2-хлорэтил)сульфидом (лаки, краски, полимеры, чернила, фотоматериалы, гидрогели и пр.) [53-55]. Фоновые содержания ТДГ в моче людей на уровне 1-12 нг/мл были зафиксированы в исследованиях [56, 57]. Таким образом, ТДГ и ТДГО могут рассматриваться в качестве маркеров воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида на организм человека только при детектировании высоких концентраций.

Глутатион/ β -лиазный путь метаболизма *бис*(2-хлорэтил)сульфида приводит к образованию двух метаболитов – 1,1'-сульфонилбис[2-(метилсульфинил)этана] (СБМСЭ) и 1-метилсульфинил-2-[(метилтио)этилсульфонил]этана (МСМТЭСЭ), содержащих одну и две сульфоксидные группы соответственно. В работах [58, 59] был предложен способ одновременного определения данных метаболитов после восстановления с помощью $TiCl_3$ в виде 1,1'-сульфонилбис[2-(метилтио)этана] (СБМТЭ), рисунок 8.

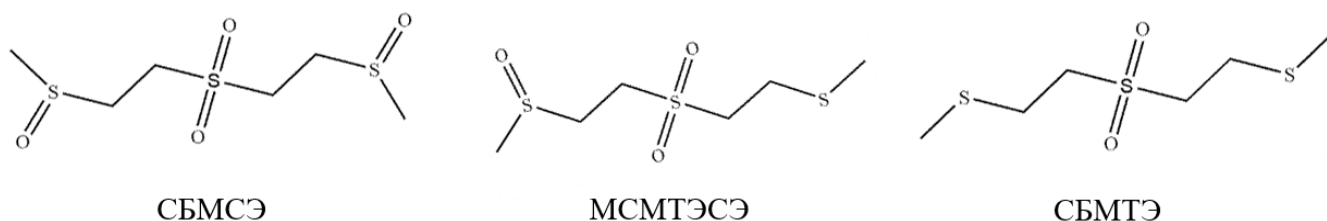


Рисунок 8 – Структурные формулы β -лиазных метаболитов *бис*(2-хлорэтил)сульфида

В отличие от ТДГ, β -лиазные метаболиты *бис*(2-хлорэтил)сульфида являются абиогенными веществами, и их присутствие однозначно свидетельствует о факте воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида на организм.

Гидролитические метаболиты *бис*(2-хлорэтил)сульфида и методы их определения в моче хорошо освещены в публикациях зарубежных и отечественных авторов и в диссертационной работе А.В. Брауна [60-67].

В качестве биомаркеров воздействия ТХ на организм выделяемые с мочой гидролитические метаболиты являются наиболее удобными аналитами. Моча, как правило, не содержит белков и липидов и представляет собой сравнительно чистую матрицу, а также может быть отобрана в большом количестве неинвазивным способом. С мочой выводится основное количество (50-90 %) как свободного, так и метаболизированного ТХ.

Главный недостаток использования свободных метаболитов в качестве биомаркеров заключается в их относительно быстром выведении из организма. Их детектирование возможно в течение нескольких дней после интоксикации. Для ретроспективного анализа требуются биомаркеры, которые могут быть обнаружены в биологических образцах даже через несколько месяцев после поражения. Таковыми маркерами могут быть ковалентные аддукты с ДНК и белками крови, которые являются намного более долгоживущими биоиндикаторами по сравнению со свободными метаболитами. На рисунке 9, цитируемом из [68], показаны временные рамки обнаружения метаболитов, идентифицированных в биологических образцах пострадавших от воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

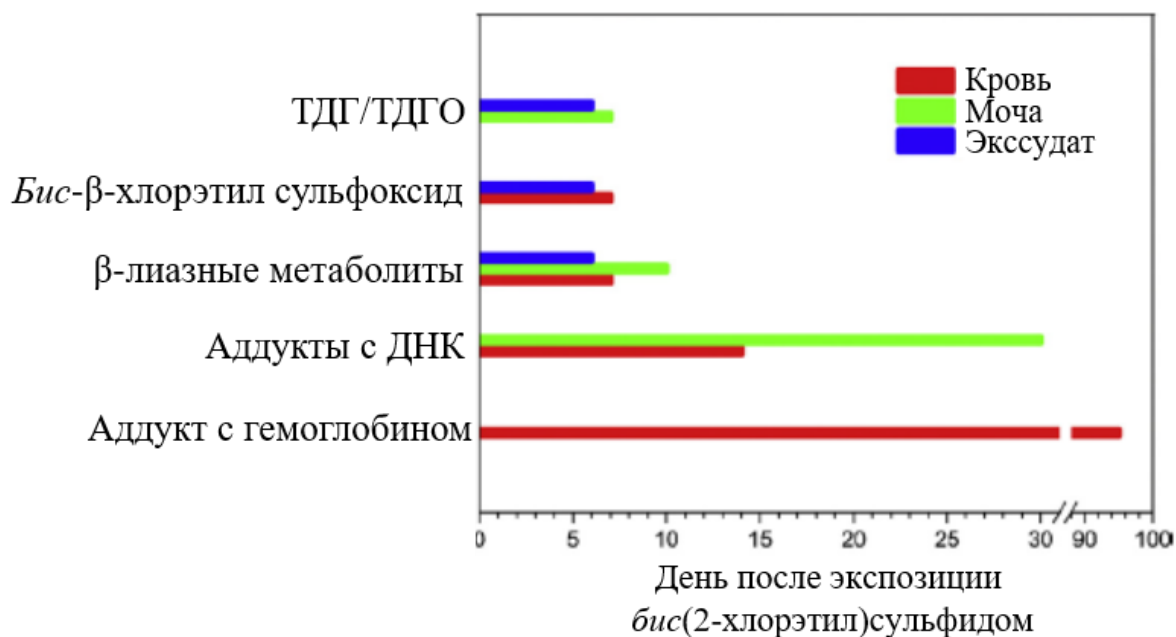


Рисунок 9 – Возможность обнаружения биомаркеров *бис(2-хлорэтил)сульфида* в зависимости от времени, прошедшего с момента отравления [68]

Как следует из данных, представленных на рисунке 9, аддукты с ДНК обнаруживались в моче на протяжении 30 дней после воздействия *бис(2-хлорэтил)сульфида*, аддукты с гемоглобином по N-терминальному валину идентифицировали на 90 день после поражения, тогда как гидролитические метаболиты *бис(2-хлорэтил)сульфида* возможно было определить только до 7-10 дня после экспозиции.

1.6.2 *Бис(N-ацетилцистеиновый) конъюгат* сульфона *бис(2-хлорэтил)сульфида*

Бис(2-хлорэтил)сульфид, вступая в реакцию с глутатионом в крови, подвергается окислению до сульфена и затем расщепляется β-лиазой, что приводит к образованию 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этана] (**СБСНАЭ**), рисунок 10.

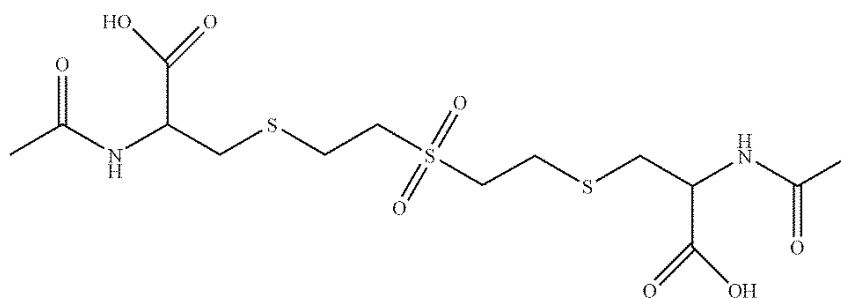


Рисунок 10 – Структурная формула СБСНАЭ

Присутствие СБСНАЭ однозначно говорит об имевшем место факте воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида на организм человека или животных [69-73].

1.6.3 Аддукты *бис*(2-хлорэтил)сульфида с ДНК

В основе повреждающего ДНК действия *бис*(2-хлорэтил)сульфида лежит образование ковалентных связей с пуриновыми основаниями нуклеотидов (аденином, гуанином). Алкилирование ДНК протекает по 3-м основным сайтам: N7 и O6 положения в гуанине и N3 положение в аденине [74]. В качестве биомаркеров воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида рассматривают 4 типа аддуктов: N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (**N7-НЕТЕГ**), *бис*(2-этил-N7-гуанин)тиоэфир (**Bis-G**), N3-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-аденин (**N3-НЕТЕА**) и O6-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (**O6-НЕТЕГ**). Структурные формулы аддуктов приведены на рисунке 11.

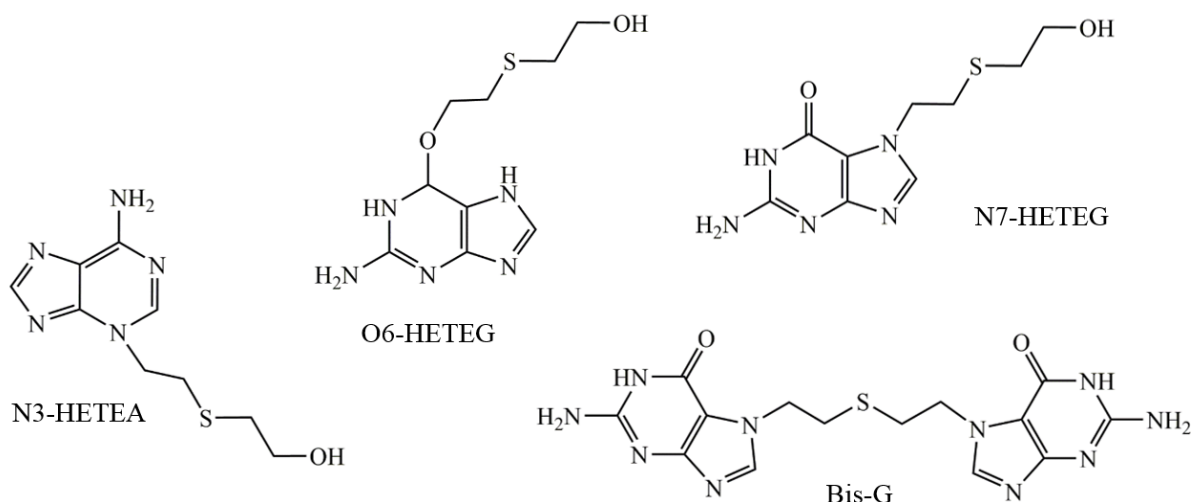


Рисунок 11 – Структурные формулы аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида с ДНК

Среди аддуктов, показанных на рисунке 11, на долю N7-НЕТЕГ приходится примерно 61 % всех образующихся аддуктов, Bis-G – 17 %, N3-НЕТЕА – 16 %, O6-НЕТЕГ – 0,1 %. Это обуславливает выбор N7-НЕТЕГ в качестве целевого соединения при определении аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида с ДНК в моче и крови. Методы определения аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида с ДНК представлены в диссертационной работе О.И. Орловой [75] и публикациях [76-78].

1.6.4 Аддукты бис(2-хлорэтил)сульфида с белками плазмы крови

Одним из основных белков плазмы крови является сывороточный альбумин. В работе [79] было установлено, что бис(2-хлорэтил)сульфид алкилирует цистеиновый остаток Cys³⁴ человеческого сывороточного альбумина. Место алкилирования было определено путем введения [¹⁴C] бис(2-хлорэтил)сульфида в триптический гидролизат альбумина. В альбумине Cys³⁴ является единственным свободным цистеиновым остатком и имеет относительно низкое значение рK_a, благодаря межмолекулярной стабилизации тиолатного аниона.

Определение аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида с альбумином возможно после ферментативного гидролиза протеиназой К или проназой с получением трипептида S-гидроксиэтилтиоэтил-цистеин-пролин-фенилаланин (НЕТЕ-СРФ) и дипептида S-гидроксиэтилтиоэтил-цистеин-пролин (НЕТЕ-СР) соответственно, рисунок 12. В работе [80] было показано, что аддукты бис(2-хлорэтил)сульфида с альбумином стабильны *in vivo* в течение по меньшей мере 29 дней после экспозиции.

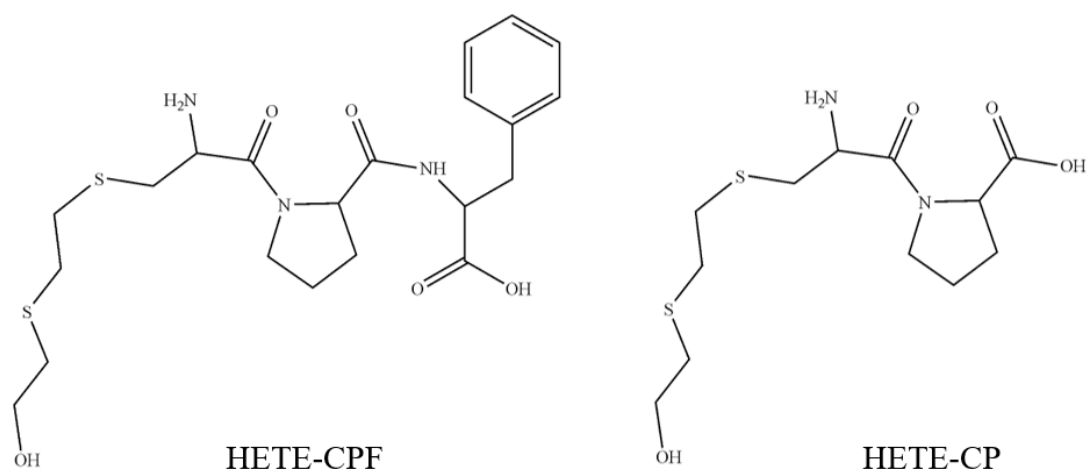


Рисунок 12 – Структурные формулы
аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида с альбумином

Большое количество публикаций относится к определению именно этих двух аддуктов в качестве биомаркеров воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида [80-87].

Для улучшения хроматомасс-спектрометрических характеристик при определении дипептида HETE-CP и уменьшения влияния матрицы на результаты анализа разработаны новые подходы для подтверждения факта экспозиции *бис*(2-хлорэтил)сульфидом. Процедуры включают селективную предколоночную дериватизацию N-конца аддукта HETE-CP, полученного после протеолиза проназой, с использованием 1-никотиноилокси-сукцинимиды с получением производного NA-C(-HETE)P [88] и дериватизацию пропионовым ангидридом с получением производного PA-C(-HETE)P [89]. Представленные процедуры были применены при анализе образцов плазмы пострадавших от воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

Альбумин содержит многочисленные свободные карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые могут быть алкилированы электрофильным *бис*(2-хлорэтил)сульфидом с образованием сложных гидроксиэтилтиоэтил (HETE) эфиров [90]. Конъюгаты подвергают щелочному [90-92] или кислотному [93] гидролизу: в первом случае высвобождается свободный ТДГ, во втором – происходит конверсия ТДГ в *бис*(2-хлорэтил)сульфид.

Авторы работы [94] оптимизировали условия гидролиза белка проназой для получения единичных аминокислотных аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида. В качестве новых биомаркеров экспозиции были выбраны пять аминокислотных аддуктов: HETE-Glu, HETE-Asp, [N1-HETE]-His, [N3-HETE]-His и HETE-Lys, структурные формулы которых представлены на рисунке 13.

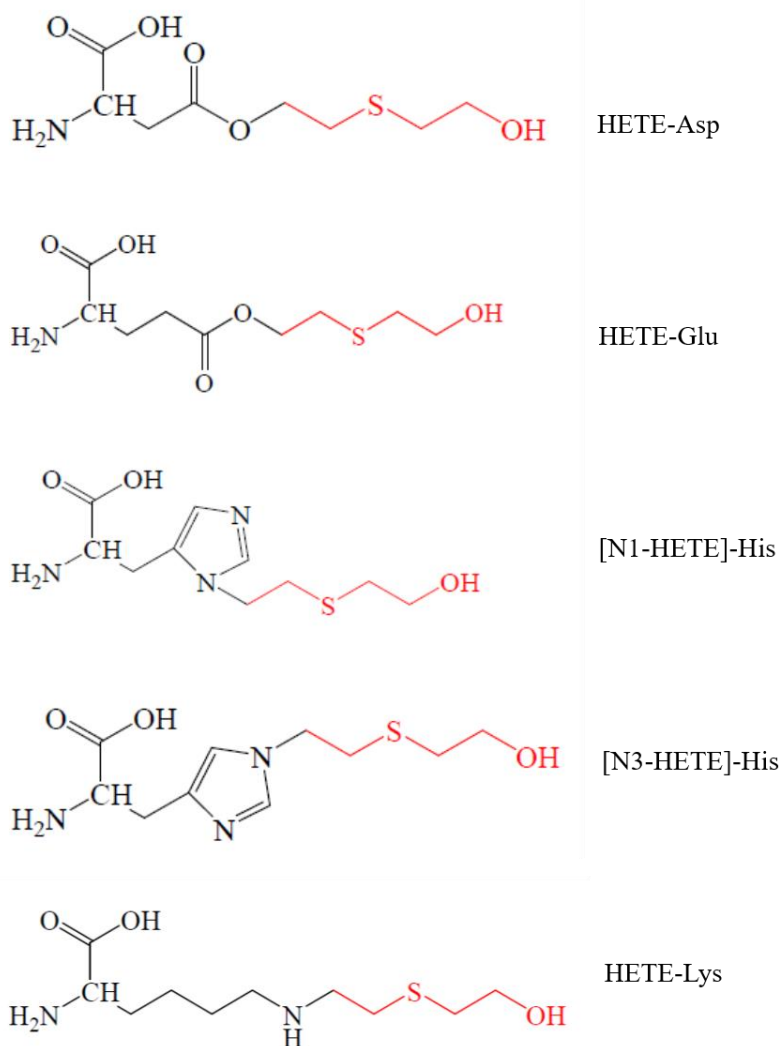


Рисунок 13 – Аминокислотные аддукты бис(2-хлорэтил)сульфида, определяемые в плазме крови [94]

Данный подход был успешно применен авторами при анализе плазмы крови, *in vitro* экспонированной бис(2-хлорэтил)сульфидом, и в экспериментах *in vivo* на кроликах.

В качестве новой мишени для алкилирующих агентов, в частности, бис(2-хлорэтил)сульфида авторы работы [95] исследовали транстретрин (TTR) – белок

в плазме и спинномозговой жидкости, который транспортирует гормон щитовидной железы тироксин и ретинол в печень. Повреждения и модификации TTR влияют на его физиологическую функцию и приводят к развитию различных заболеваний. Авторы цитируемой работы выделяли TTR из обработанной бис(2-хлорэтил)сульфидом плазмы методом иммуномагнитной сепарации и анализировали полученный после трипсинолиза гексапептид C(-HETE)PLMVK методом ВЭЖХ-МС/МС-ВР. Было обнаружено, что алкилирование гидроксиэтилтиоэтил (HETE) фрагментом происходит по цистеиновому остатку Cys¹⁰ гексапептида. В плазме *in vitro* алкилированный TTR был стабилен в течение 14 дней при 37 °С. Однако из-за относительно короткого биологического периода полураспада TTR *in vivo* (2-3 дня) данный аддукт рассматривается как короткоживущий биомаркер воздействия бис(2-хлорэтил)сульфида и других алкилирующих агентов. Возможное влияние алкилирования на стабильность TTR *in vivo* и связанные с ним патофизиологические эффекты является предметом дальнейших исследований.

1.6.5 Аддукты бис(2-хлорэтил)сульфида с гемоглобином

Определение аддуктов с гемоглобином является хорошо зарекомендовавшим себя методом биомониторинга воздействия алкилирующих канцерогенов на организм человека и животных [96-101]. Гемоглобин является распространенным белком в крови человека (140 мг/мл), а срок жизни эритроцитов человека, в которых содержится гемоглобин, составляет приблизительно 120 дней. Таким образом, аддукты ксенобиотиков с гемоглобином являются ретроспективными биомаркерами экспозиции. В случае хронического воздействия аддукты накапливаются со временем [47].

ВЭЖХ-МС анализ продуктов ферментативного гидролиза трипсином гемоглобина, выделенного из экспонированной изотопно меченным бис(2-хлорэтил)сульфидом крови, выявил алкилирование по сайтам шести различных остатков гистидина, трех остатков глутаминовой кислоты и двух N-концевых валинов [102, 103]. Среди продуктов ферментативного гидролиза проназой были

выделены алкилированный лизин, цистеин, триптофан и аспарагиновая кислота. Мажорными компонентами гидролизатов были аддукты *бис*(2-хлорэтил)сульфида с гистидином в положениях N1 и N3.

1.7 Методы определения аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида с гемоглобином

Глобин, модифицированный *бис*(2-хлорэтил)сульфидом, легко подвергается ферментативному гидролизу с получением алкилированных фрагментов, пригодных для идентификации и анализа [102]. Использование трипсина для расщепления алкилированного глобина дает алкилированные пептиды, а применение проназы в основном дает отдельные аминокислотные аддукты.

Для определения методом ГХ-МС алкилированных *бис*(2-хлорэтил)сульфидом аминокислот, полученных после ферментативного гидролиза глобина проназой E, необходимо проводить дериватизацию. В работе [104] синтезированные стандартные образцы аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида с аминокислотами (НЕТЕ-Asp, НЕТЕ-Cys, НЕТЕ-Glu, НЕТЕ-Val) дериватизировали 1,3-дихлортетрафторацетоном с последующим ацилированием гептафтормасляным ангидридом (ГФМА). Было показано, что данная процедура применима для всех исследуемых аддуктов, кроме аддукта с гистидином. Ввиду высокой полярности производного, вероятно, происходила его полная сорбция на неподвижной фазе колонки. Другие производные гистидинового аддукта, полученные путем инкубирования стандартного образца со смесью метанол/НСl и последующим ацилированием ГФМА, а также после дериватизации N-(трет-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифтор-ацетамидом (МТБСТФА) с получением трис-(трет-бутилдиметилсилильного) деривата, оказались термически нестабильными. Для обоих производных не удалось достичь низких пределов обнаружения.

Наиболее подходящим методом для анализа алкилированных *бис*(2-хлорэтил)сульфидом фрагментов, полученных после ферментативного гидролиза, является ВЭЖХ-МС. В работе [104] проводили определение аддукта с гистидином после дериватизации фторенилметилоксикарбонилхлоридом

(Fmoc-Cl) методом обращенно-фазовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Авторы работы [105] определяли алкилированные пептиды после триптического гидролиза гемоглобина, экспонированного *бис*(2-хлорэтил)сульфидом в диапазоне концентраций от 0,25 до 100 мкг/мл. Аликвоту гидролизата объемом 5 мкл и 150 мкл трис-буфера пропускали через предколонку Newguard RP-18 со скоростью 50 мкл/мин. После промывки системы 1 мл деионизированной воды пептиды, удерживаемые на предколонке, элюировали в аналитическую колонку и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Оптимизированный метод извлечения гемоглобина из цельной крови и его очистки предложен в работе [106]. Исследование проводили на образцах цельной крови, *in vitro* экспонированной *бис*(2-хлорэтил)сульфидом в диапазоне концентраций от 0,014 до 28 мкг/мл. Процедура включала в себя гемолиз эритроцитов путем замораживания при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение двух циклов по 1 ч с последующей очисткой лизата ультрафильтрацией. Выделенный и очищенный глобин подвергали ферментативному гидролизу трипсином в реакторе с иммобилизованными ферментами (IMER) и анализировали полученные алкилированные пептиды методом ВЭЖХ-МС/МС. Линейный отклик наблюдался во всем интервале исследуемых концентраций для 13 алкилированных пептидов. Предел количественного определения составил 0,4 нг/мл по внесенному в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду.

При обработке крови *in vitro* *бис*(2-хлорэтил)сульфидом гистидиновые аддукты гемоглобина (HETE-His) были обнаружены в наибольших количествах [104], тогда как степень алкилирования N-концевого валина в человеческом гемоглобине составляет всего 1-2% от общего алкилирования [47]. Однако N-концевой валин является перспективным биомаркером воздействия *бис*(2-хлорэтил)сульфида на организм, так как он легко отщепляется от глобина с помощью метода Эдмана. Метод Эдмана – один из ранних методов определения первичной последовательности (секвенирования) пептидов. Разработан в 1950-1956 гг. шведским биохимиком П.В. Эдманом. Суть метода заключается в

обработке исследуемого пептида определенным набором реагентов (фенилизотиоцианат (ФИТЦ) или его производные), что приводит к отщеплению одной аминокислоты с N-конца последовательности. ФИТЦ способен реагировать с альфа-аминокислотами и альфа-карбоксильной группой свободных аминокислот. В результате взаимодействия с N-концевой аминокислотой полипептида образуется фенилтиогидантоиновое производное, в котором дестабилизирована связь между альфа-карбоксильной группой N-концевой аминокислоты в пептиде. Эта связь избирательно гидролизуется без повреждения других пептидных связей. После реакции выделяют комплекс ФИТЦ с N-концевой аминокислотой и идентифицируют его хроматографическим методом. Далее этот процесс повторяют с укороченным пептидом и, таким образом, получают последовательность аминокислот в пептиде [107].

Определение фрагмента модифицированного *бис*(2-хлорэтил)сульфидом гемоглобина – *N*-[2-[(гидроксиэтил)тио]этил]-*DL*-валина (HETE-Val), авторы работы [108] осуществляли по модифицированной процедуре секвенирования по Эдману, которая впервые была предложена авторами работы [109] для определения глобиновых аддуктов промышленных канцерогенов. На рисунке 14 представлена схема реакции получения производного HETE-Val из образцов глобина, выделенного из цельной крови, экспонированной *бис*(2-хлорэтил)сульфидом.

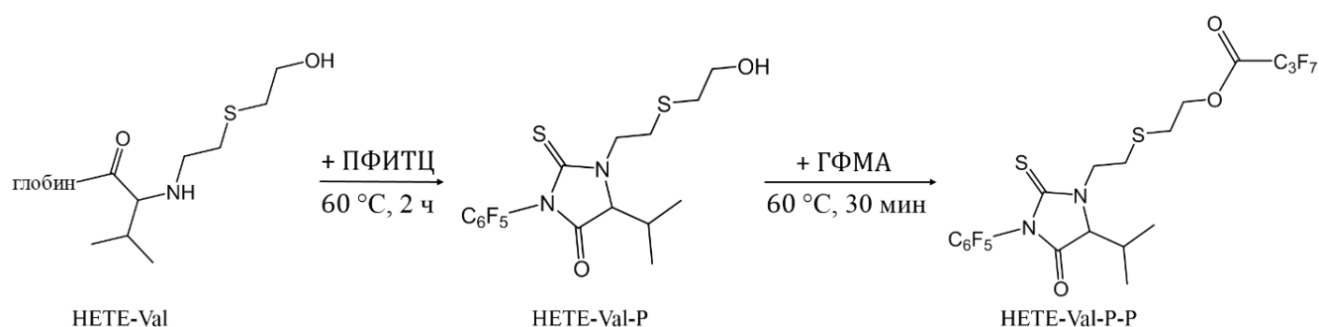


Рисунок 14 – Схема получения летучих производных HETE-Val из глобина, алкилированного *бис*(2-хлорэтил)сульфидом

На первой стадии пентафторофенилизотиоцианат (ПФИТЦ) в слабощелочных условиях реагирует с N-терминальной аминокислотой глобина –

валином, модифицированным *бис*(2-хлорэтил)сульфидом. При этом происходит селективное отщепление фенилтиогидантоинового производного 1-(2-(2-гидроксиэтилтио)этил)-5-изопропил-3-(перфторфенил)-2-тиооксоимидазолидин-4-она (**НЕТЕ-Val-P**). Далее, на второй стадии проводят дериватизацию НЕТЕ-Val-P по гидроксильной группе ГФМА или гептафторбутирилимидазолом (ГФБИ) и полученное производное 2-(2-(5-изопропил-4-оксо-3-(перфторфенил)-2-тиооксоимидазолидин-1-ил)этилтио)этил перфторбутаноат (**НЕТЕ-Val-P-P**) анализируют методом ГХ-МС-ОХИ в режиме сканирования выбранных ионов [108, 110].

Работы по оптимизации условий определения НЕТЕ-Val и снижению предела обнаружения постоянно продолжаются. Авторы [111] провели исследования по оптимизации процедуры очистки НЕТЕ-Val-P от матричных компонентов с использованием метода твердофазной экстракции (ТФЭ). В качестве сорбентов были опробованы силикагель и флорисил. Выбор был сделан в пользу флорисила, так как силикагель хорошо очищал пробу от матричных компонентов, но при этом необратимо сорбировал определяемое соединение. В качестве элюентов были опробованы отдельно этилацетат, диэтиловый эфир, толуол, анизол, дихлорметан, ацетонитрил, метанол, а также смеси этих растворителей в различных соотношениях. Оптимальным элюентом была выбрана смесь этилацетат:дихлорметан (1:9). Оптимизация условий ТФЭ позволила снизить предел обнаружения со 100 [108, 110] до 20 нМ (предел обнаружения по внесённому *in vitro* в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду).

В литературе представлен ряд примеров успешного определения методом ГХ-МС-ОХИ алкилированного *бис*(2-хлорэтил)сульфидом глобина как маркера отравления *бис*(2-хлорэтил)сульфидом. Аддукт был определен в крови морских свинок через 48 часов после внутривенного введения *бис*(2-хлорэтил)сульфида в дозе 0,5 мг/кг (0,06ЛД₅₀) [108]. В образцах крови жертв Ирано-Иракского конфликта, отобранных в период с 22 по 26 день после поражения, был идентифицирован глобиновый аддукт. При этом его содержание было таким же как в образце цельной крови, *in vitro* экспонированной *бис*(2-хлорэтил)сульфидом

в дозе 0,9 μM [112]. Также аддукт был определен в образцах биопроб 4-х пострадавших, отобранных на 5-10 день после инцидента, на уровне 0,3-0,8 нг/мл [113]. В образцах эритроцитов, выделенных из цельной крови мартышек, экспонированных *бис*(2-хлорэтил)сульфидом в дозе 4,1 мг/кг, аддукт НЕТЕ-Val был идентифицирован на 94 день после отравления [114]. Сравнение возможностей ретроспективного определения аддуктов альбумина S-2-[(гидроксиэтил)тио]этил]-цистеин-пролин-тирозин (НЕТЕ-СРТ) и гемоглобина показало, что после экспозиции крыс *бис*(2-хлорэтил)сульфидом в дозе 0,3 мг/кг содержание НЕТЕ-СРТ линейно снижалось с течением времени, в то время как концентрация НЕТЕ-Val нарастала в первые три дня после отравления (авторы выдвинули предположение, что в это время свободный *бис*(2-хлорэтил)сульфид все еще присутствует в организме и аккумулируется в мембранах эритроцитов, медленно высвобождается и образует аддукты с гемоглобином) и затем медленно снижалось. Ретроспективность анализа НЕТЕ-СРТ составила 7 дней, в то время как НЕТЕ-Val через 28 дней после экспозиции все еще достоверно определялся [115]. Полученные результаты согласуются с данными о времени жизни альбумина и гемоглобина в крови крыс. Аддукты с альбумином значительно быстрее гидролизуются и выводятся из организма в сравнении с аддуктами с глобином (время жизни эритроцитов крыс 65 дней) [116].

Процедура определения глобинового аддукта была успешно применена для анализа биопроб 4-х пострадавших мужчин в Китае [68]. Образцы крови были отобраны в период с 3 по 95 дней после отравления. Высокие концентрации НЕТЕ-Val были определены на 3-7 день после чего происходило постепенное снижение до второй недели после отравления. У троих пациентов содержание аддукта было примерно одинаковое и составляло в первую неделю 120 пмоль/г глобина, через 1 месяц – 90 пмоль/г и постепенно снижалось до 10 пмоль/г в течение 3 месяцев (95 дней). У пациента, получившего наименьшую дозу отравления, содержание НЕТЕ-Val в крови было значительно меньше и составляло 20 пмоль/г на 3 день, через 1 месяц – 9,8 пмоль/г и через 2 месяца только 2,3 пмоль/г.

1.8 Методы определения высвобожденных из состава белковых аддуктов тиодигликоля и *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Метод, основанный на высвобождении ТДГ из состава белковых аддуктов, впервые был предложен в работе [90]. Выделенный из плазмы, цельной крови или эритроцитов белок обрабатывали гидроксидом натрия, после чего нейтрализовали гидролизат 6М HCl, экстрагировали высвобожденный ТДГ этилацетатом и дериватизировали пентафторбензоилхлоридом (**ПФБХ**). В качестве внутреннего стандарта использовали октадейтеротиодигликоль. Анализ осуществляли методом ГХ-МС-ОХИ. Предел обнаружения ТДГ составил 2 пг/мг белка при внесении *бис*(2-хлорэтил)сульфида в кровь в концентрации 25 нМ. Применимость разработанной методики проверяли в опытах *in vivo* на лабораторных животных. Содержание ТДГ в крови африканских зеленых мартышек на 1-ый день после экспозиции *бис*(2-хлорэтил)сульфидом составило в среднем 220 пг/мг белка, а на 45-ый день снизилось до 10 пг/мг белка. Средние уровни ТДГ в крови йоркширских свиней на 1-ый и 21-ый день после экспозиции составили 60 пг/мг белка и 4 пг/мг белка соответственно.

Авторы работы [91] усовершенствовали способ определения ТДГ, высвобожденного из состава аддуктов с белками, путем небольших изменений в процедуре пробоподготовки и оптимизации условий ГХ-МС анализа. Была внесена стадия очистки от избытка дериватирующего агента твердым бикарбонатом натрия и концентрирование экстракта перед анализом. Это позволило существенно снизить базовую линию на хроматограмме, увеличить соотношение сигнал:шум и снизить предел обнаружения с 25 нМ [90] до 1,56 нМ.

Новый способ определения биомаркера экспозиции *бис*(2-хлорэтил)сульфидом в плазме крови разработали авторы работы [93]. Это модифицированная версия аналитического метода [90], позволяющая определять высвобожденный из состава белковых аддуктов свободный *бис*(2-хлорэтил)сульфид. Способ основан на обработке выделенного из плазмы белка концентрированной соляной кислотой с добавлением диметоксипропана (ДМП) в

качестве связывающего воду реагента. Схема реакции представлена на рисунке 15.

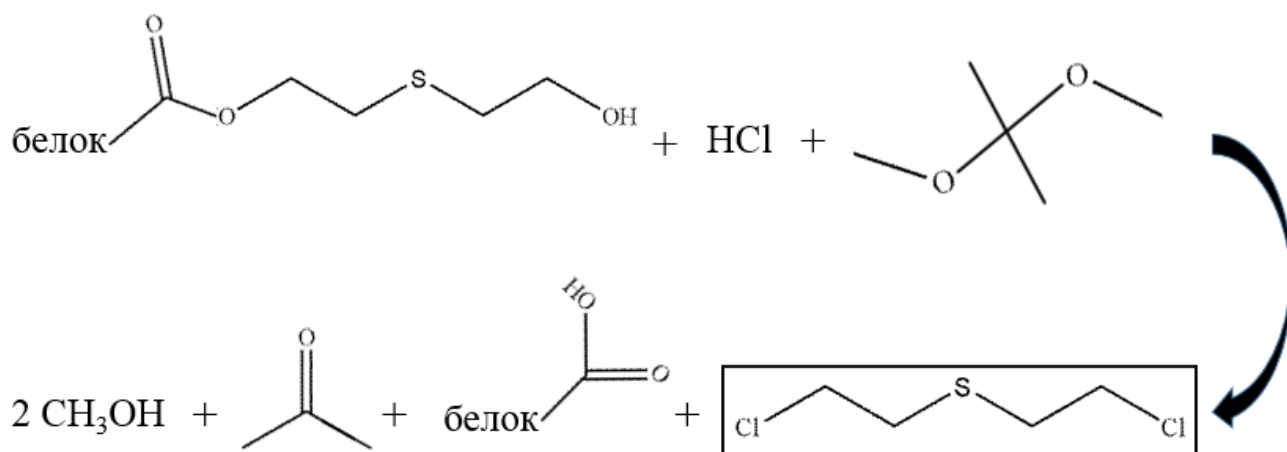


Рисунок 15 – Схема реакции регенерирования *бис*(2-хлорэтил)сульфида из состава белковых аддуктов

Во время этой реакции аддукт одновременно отщепляется и превращается в свободный *бис*(2-хлорэтил)сульфид, а ДМП реагирует с избытком воды с образованием ацетона и метанола, теоретически, увеличивая выход регенерированного *бис*(2-хлорэтил)сульфида. В качестве внутреннего стандарта (ВС) был использован дейтерированный ТДГ, который при воздействии HCl превращался в дейтерированный *бис*(2-хлорэтил)сульфид. После экстракции целевого соединения и ВС из гидролизата гексаном проводили их определение методом ГХ-МС/МС. Предел количественного определения был установлен на уровне 0,2 нг/мл.

Способ конверсии ТДГ в свободный *бис*(2-хлорэтил)сульфид под действием концентрированной HCl был предложен еще 1985 г. авторами работ [56, 57] для анализа проб мочи пострадавших в Ирано-Иракском конфликте. Анализ осуществляли методом ГХ-МС с термодесорбцией уловленных из паровой фазы над гидролизатом компонентов. ТДГ был обнаружен в моче пострадавших в диапазоне от 3 до 140 нг/мл. В образцах мочи контрольной группы содержание ТДГ не превышало 20 нг/мл. В дальнейшем данный метод не нашел широкого применения в лабораторной практике.

Обзор литературы показал, что определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида, изучение путей его метаболизма в организме и разложения в окружающей среде, исследование влияния *бис*(2-хлорэтил)сульфида на организм человека до сих пор является актуальной задачей. Однако в основном внимание химиков-аналитиков сосредоточено на определении *бис*(2-хлорэтил)сульфида в биологических и экологических образцах, таких как вода и почва, особенно в зоне затопления ХО в Балтийском море. В то же время процедур определения содержания *бис*(2-хлорэтил)сульфида в материалах строительных конструкций и инженерной инфраструктуры в доступной печати было найдено ограниченное количество. Аттестованные методики, используемые в санитарно-химических исследованиях в процессе УХО, разработаны более десятилетия назад и позволяют определять *бис*(2-хлорэтил)сульфид в одной определенной матрице на уровне гигиенических нормативов. В процессе перепрофилирования бывших объектов УХО возникла необходимость за ограниченное время исследовать большое количество образцов различного матричного состава, методики для которых не были разработаны.

Среди биомаркеров поражения *бис*(2-хлорэтил)сульфидом основное внимание исследователей уделено определению гидролитических метаболитов и аддуктов с белками плазмы крови, в наибольшей степени – аддуктов с цистеином. Определение наиболее ретроспективного биомаркера – аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида с N-терминальным валином в глубине, а также *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови, методически мало разработано.

Таким образом, унифицированные подходы к определению *бис*(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его трансформации в объектах техногенного происхождения, а также способы определения наиболее ретроспективных и малоизученных биомаркеров поражения *бис*(2-хлорэтил)сульфидом, являются актуальной областью для исследования. Основной задачей настоящей работы была разработка селективных и высокочувствительных методик определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его трансформации в строительных материалах и элементах производственной инфраструктуры, а также наиболее

ретроспективного биомаркера экспозиции *бис*(2-хлорэтил)сульфидом – аддукта с глобином, и регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Оборудование и материалы

В работе использовалось следующее оборудование:

- Газовый хроматограф модели 7890А с масс-селективным детектором с тройным квадруполем модели 7000 фирмы Agilent Technologies (США), оснащенных источником химической ионизации или источником ионизации электронами.
- Газовый хроматограф GC-2010 Plus с масс-селективным детектором с тройным квадруполем GCMS-TQ8040 фирмы Shimadzu (Япония).
- Кварцевая капиллярная колонка HP-5MS с привитой неподвижной фазой 5 % фенил-, 95 % диметилполисилоксан длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм (Agilent Technologies, США).
- Весы лабораторные электронные АТХ-224 (Shimadzu, Япония).
- Центрифуга Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Германия).
- Центрифуга Centrifuge 5810 (Eppendorf, Германия).
- Ультразвуковая ванна УЗВ 2,8-ТТЦ (Сапфир, Россия).
- Установка для концентрирования SuperVar 24 4 mL Vial Concentrator (Экрос Инжиниринг, Россия).
- Прибор для перемешивания проб Multi Reax (Heidolph, Германия).
- Нагреватель для проб Dry Block Heater (ИКА, Германия).
- Нагреватель для проб ThermoStat C (Eppendorf, Германия).

В работе использовались следующие реактивы и материалы:

Бис(2-хлорэтил)сульфида (ГСО 8248-2003), 1,4-дитиан (Sigma Aldrich; США), нафталин-d8 (≥ 98 %, Sigma Aldrich, США), N-[2-[(гидроксиэтил)тио]этил]-DL-валин (синтезирован в лаборатории органического синтеза ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России), ацетонитрил, сорт «0» (ТУ 2634-002-54260861-2013), ацетон (ГОСТ 2603-79), диэтиловый эфир (ТУ 2600-001-43852015-10), 2-хлорпропан (Sigma Aldrich, США), гексан (ТУ 2631-158-44493179-13), формамид,

Ч (ТУ 6-09-3884-84), пиридин, ЧДА (ГОСТ 13647-78), толуол, ОСЧ (ТУ 2361-065-44493179-01), метанол, ХЧ (ГОСТ 6995-77), соляная кислота (ГОСТ 14261-77), дихлорметан для жидкостной хроматографии LiChrosolv (Merck Millipore, США), магний серноокислый 7-водный, ХЧ (ГОСТ 452377), пентафторфенил изотиоцианат (Sigma, США), гептафтормасляный ангидрид (Fluka, США), натрий углекислый, безводный, ХЧ (ГОСТ 83-79), натрий хлористый, ЧДА (ГОСТ 4233-77), смесь n-алканов C5-C24 (Supelco, США), фильтр вакуумный Bottle top Rapid-Flow Nalgene (0.2 мкм, Thermo Fisher Scientific, США).

Рабочие растворы аналитов и других реагентов готовили растворением в соответствующих растворителях исходных растворов или точных навесок этих веществ.

2.2 Процедура определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в смывах с поверхностей

2.2.1 Объекты исследования и модельные образцы

Для исследования были выбраны три типа материалов: плитка из поливинилхлорида (**ПВХ**), ламинат и металлические пластины. Для взятия смывов с поверхностей использовали отрезки медицинской марли площадью 1 дм² (10 × 10 см).

Модельные образцы готовили следующим образом: на исследуемые поверхности наносили раствор *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в хлористом метиле для достижения концентрации 100 нг/дм² по каждому веществу и оставляли образцы в вытяжном шкафу на 30 мин.

2.2.2 Взятие образцов смывов и пробоподготовка

Для отбора проб смывов смачивали тампон в хлористом метиле, слегка отжимали и протирали участок контролируемой поверхности. После этого протирали тот же участок поверхности еще одним тампоном, смоченным в хлористом метиле, и одним сухим тампоном. Все три тампона помещали в вials вместимостью 7 мл, добавляли 4 мл хлористого метилена и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 5 мин. Экстракт переносили в

центрифужную пробирку вместимостью 10 мл и повторяли процедуру экстракции еще раз. Объединенные экстракты концентрировали под током азота при комнатной температуре до конечного объема 0,2 мл и анализировали методом ГХ-МС/МС.

2.2.3 Условия ГХ-МС/МС анализа

ГХ-МС/МС анализ осуществляли на газовом хроматографе модели 7890А с масс-селективным детектором с тройным квадрупом модели 7000 (Agilent Technologies; США), оснащенным капиллярной кварцевой колонкой HP-5MS: 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм (Agilent Technologies; США). Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в образцах смывов с поверхностей представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана методом ГХ-МС/МС

Режим работы инжектора	без деления потока
Температура инжектора	270 °С
Газ-носитель	Гелий
Объем вводимой пробы	2 мкл
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Температурная программа термостата колонки	40 °С (0 мин) – 10 °С/мин – 280 °С (5 мин)
Температура источника ионов	230 °С
Температура интерфейса	280 °С
Режим ионизации	Ионизация электронами
Энергия ионизирующих электронов	70 эВ
Режим детектирования	Мониторинг выбранных реакций (MRM)

В таблице 5 приведены параметры детектирования *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана методом ГХ-МС/МС.

Таблица 5 – Параметры детектирования *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана методом ГХ-МС/МС.

Определяемое соединение	MRM-переход (энергия соударений, эВ)	Время удерживания, мин
<i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфид	109→63 (6) 158→109 (3)	9,2
1,4-дитиан	120→61 (6) 120→105 (3)	7,4

2.3 Процедура определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в образцах строительных конструкций и инженерной инфраструктуры

2.3.1 Объекты исследования и модельные образцы

Для исследования были выбраны следующие образцы строительных материалов и полимерных элементов инфраструктуры: керамическая плитка, бетон, огнеупорный, керамический и силикатный кирпич, образцы кабель-канала из ПВХ (полимер № 1), уплотняющей прокладки на основе резины (полимер № 2), гофры для кабеля из ПВХ (полимер № 3).

Модельные образцы готовили следующим образом: к навескам массой 1 г добавляли по 200 мкл раствора *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в диэтиловом эфире для достижения концентраций 0,5-50 нг/г по каждому веществу. Образцы тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре перед анализом в течение 12 ч.

2.3.2 Подготовка образцов к анализу

К навеске массой 1 г добавляли 4 мл 2-хлорпропана и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 5 мин. Надосадочную жидкость переносили в центрифужную пробирку вместимостью 10 мл и повторяли процедуру экстракции еще раз. Объединенные экстракты центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин, концентрировали под током азота при комнатной температуре до конечного объема 0,2 мл и анализировали методом ГХ-МС/МС.

2.3.3 Условия ГХ-МС/МС анализа

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования аналогичны представленным в п.2.2.3.

2.4 Процедура определения глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах цельной крови

2.4.1 Объекты исследования и модельные образцы

Объектами исследования являлись образцы донорской крови, *in vitro* экспонированные *бис*(2-хлорэтил)сульфидом, а также аналитический стандарт НЕТЕ-Val, синтезированный в лаборатории органического синтеза ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

Модельные образцы готовили следующим образом: к образцам свежей донорской цельной крови, отобранной в пробирки, содержащие ЭДТА, добавляли раствор *бис*(2-хлорэтил)сульфида в ацетонитриле для достижения концентраций 1-100 нг/мл и инкубировали образцы в течение 2 ч при 37 °С. Для разделения плазмы и эритроцитарной массы образцы центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин, плазму крови отбирали и замораживали, а эритроцитарную массу дважды промывали физиологическим раствором.

2.4.2 Дериватизация стандартного образца НЕТЕ-Val

Навеску стандартного образца НЕТЕ-Val массой 10 мг растворяли в 2 мл 0,25М бикарбоната натрия, добавляли 1,5 мл ацетонитрила, 15 мкл ПФИТЦ, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 ч при 45 °С. После этого проводили экстракцию целевого соединения диэтиловым эфиром (3×1,5 мл). Объединенный экстракт промывали 2 мл деионизированной воды, высушивали над безводным MgSO₄ и упаривали досуха под током азота при 60 °С. К сухому остатку (производное НЕТЕ-Val-P) добавляли 1 мл толуола и анализировали методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ. Затем отбирали 500 мкл полученного раствора, добавляли 20 мкл ГФМА и термостатировали в течение 30 мин при 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры смесь

промывали 300 мкл деионизированной воды и упаривали досуха под током азота при 60 °С. Сухой остаток (производное НЕТЕ-Val-P-P) перерастворяли в 100 мкл толуола и анализировали методом ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ.

2.4.3 Пробоподготовка образцов цельной крови, *in vitro* экспонированной бис(2-хлорэтил)сульфидом

2.4.3.1 Выделение глобина из эритроцитарной массы

Образец цельной крови объемом 1 мл центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин. После этого в пластиковую пробирку на 15 мл отбирали 500 мкл плазмы крови и замораживали. Эритроцитарную массу промывали 500 мкл физиологического раствора, добавляли 500 мкл деионизированной воды и выдерживали в течение 10 мин при 4 °С. К гемолизату добавляли 6 мл 1% соляной кислоты в ацетоне, встряхивали на устройстве Вортекс в течение 5 мин и центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин. Супернатант отбрасывали и последовательно промывали осадок (глобин) 1,5 мл 1 % соляной кислоты в ацетоне, 1 мл ацетона, 2×1 мл диэтилового эфира. Высушивали при комнатной температуре в течение ночи.

2.4.3.2 Выделение НЕТЕ-Val из глобина и получение летучих производных

Образец высушенного глобина растворяли в 2 мл формамида, добавляли 8 мкл пиридина и 8 мкл ПФИТЦ. Смесь термостатировали в течение 2 ч при 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры добавляли 4 мл толуола, встряхивали на устройстве Вортекс в течение 5 мин и центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин. Органический экстракт промывали 1 мл деионизированной воды и упаривали досуха под током азота при 60 °С. К сухому остатку добавляли 500 мкл толуола и 20 мкл ГФМА и термостатировали в течение 30 мин при 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры промывали смесь 300 мкл деионизированной воды и упаривали очищенный экстракт досуха при 60 °С. Сухой остаток перерастворяли в 50 мкл толуола и анализировали методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ.

2.4.4 Условия ГХ-МС/МС анализа

ГХ-МС/МС-ОХИ анализ осуществляли на газовом хроматографе модели 7890А с масс-селективным детектором с тройным квадруполом модели 7000 (Agilent Technologies; США). ГХ-МС/МС-ИЭ анализ осуществляли на газовом хроматографе модели GC-2010 Plus с масс-селективным детектором с тройным квадруполом GCMS-TQ8040 фирмы Shimadzu (Япония). Хроматографическое разделение проводили на капиллярной кварцевой колонке HP-5MS: 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм (Agilent Technologies; США).

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения НЕТЕ-Val-P и НЕТЕ-Val-P-P: температура инжектора – 270 °С; режим работы инжектора – без деления потока; газ-носитель – гелий; расход газа-носителя – 1 мл/мин; объем вводимой пробы – 2 мкл; температурная программа термостата колонки: 150 °С (1 мин) – 20 °С/мин – 280 °С (15 мин); режим ионизации – ионизация электронами (ИЭ) и отрицательная химическая ионизация (ОХИ); температура источника ионов – 230 °С (ИЭ) и 150 °С (ОХИ); температура интерфейса – 280 °С; режим детектирования – мониторинг выбранных реакций (MRM).

В таблице 6 приведены параметры детектирования НЕТЕ-Val-P и НЕТЕ-Val-P-P методом ГХ-МС/МС в режимах ионизации электронами и отрицательной химической ионизации.

Таблица 6 – Параметры детектирования НЕТЕ-Val-P и НЕТЕ-Val-P-P методом ГХ-МС/МС.

Определяемое соединение	MRM-переход (энергия соударений, эВ)		Время удерживания, мин
	ГХ-МС/МС-ИЭ	ГХ-МС/МС-ОХИ	
НЕТЕ-Val-P	383 → 130 (18) 383 → 162 (18)	383 → 323 (9) 383 → 363 (9)	8,7
НЕТЕ-Val-P-P	383 → 130 (18) 383 → 162 (18)	564 → 544 (9) 407 → 320 (15)	8,4

2.5 Процедура определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови

2.5.1 Объекты исследования и модельные образцы

Объектами исследования были образцы плазмы крови, *in vitro* экспонированные *бис*(2-хлорэтил)сульфидом.

Модельные образцы готовили следующим образом: к предварительно отфильтрованным через вакуумный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм образцам плазмы крови добавляли раствор *бис*(2-хлорэтил)сульфида в ацетонитриле для достижения концентраций 0,5-100 нг/мл. Образцы инкубировали в течение 2 ч при 37 °С, после чего остужали, замораживали и хранили при –20 °С до анализа.

2.5.2 Пробоподготовка образцов плазмы крови, *in vitro* экспонированной *бис*(2-хлорэтил)сульфидом

2.5.2.1 Выделение белка из плазмы

К образцу плазмы крови объемом 500 мкл добавляли 1,5 мл ацетона, встряхивали на устройстве Вортекс в течение 10 мин и центрифугировали в течение 3 мин при 3000 об/мин. Супернатант отбрасывали, к белку добавляли 1 мл ацетона, размешивали шпателем, центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и отбрасывали супернатант. Процедуру промывки белка повторяли два раза, после чего высушивали белок при комнатной температуре в течение 2-3 ч.

2.5.2.2 Регенерирование *бис*(2-хлорэтил)сульфида из состава белковых аддуктов плазмы крови

К сухому белку добавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты и термостатировали пробу в течение 15 мин при 80 °С. После охлаждения до комнатной температуры в гидролизат добавляли 10 мкл раствора нафталина-d₈ в ацетоне с концентрацией 200 нг/мл и 1 мл гексана. Смесь встряхивали на устройстве Вортекс в течение 5 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 4000 об/мин. Затем отбирали органический экстракт, концентрировали его под

током азота при комнатной температуре до 50 мкл и анализировали методом ГХ-МС/МС.

2.5.3 Условия ГХ-МС/МС анализа

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования аналогичны представленным в п.2.2.3. Нафталин-d₈ идентифицировали по характеристичным MRM-переходам: 136 → 84 (27 эВ), 136 → 108 (18 эВ); время удерживания 9,4 мин.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Схема аналитического контроля объектов инженерной инфраструктуры предприятий по уничтожению *бис*(2-хлорэтил)сульфида при решении вопроса о возможности их вторичного использования

3.1.1 Подбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования для определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана методом ГХ-МС/МС-ИЭ

Для подбора оптимальных условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования были проанализированы стандартные растворы *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана методом ГХ-МС-ИЭ в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z 40-200 [117, 118]. В масс-спектре *бис*(2-хлорэтил)сульфида наиболее интенсивными являются ионы с m/z 158 $[M]^+$ и m/z 109 $[M-CH_2Cl]^+$, соответствующие молекулярному иону $[C_4H_8SCl_2]^+$ и фрагменту $[C_3H_6SCl]^+$. В масс-спектре 1,4-дителиана – ион с m/z 120 $[M]^+$, соответствующий молекулярному иону $[C_4H_8S_2]^+$. Для выбранных ионов были зарегистрированы масс-спектры диссоциации, индуцированной соударениями в диапазоне энергий от 3 до 12 эВ с шагом 3 эВ. Оптимальной энергии соударения соответствовала максимальная интенсивность аналитического сигнала (площадь пика) по характеристичным переходам.

Характеристика продукт-ионов, образующихся при фрагментации молекулярного иона *бис*(2-хлорэтил)сульфида с m/z 158 при энергии соударений 3 эВ, представлена на рисунке 16. Наиболее интенсивный пик принадлежит иону с m/z 109. При фрагментации иона с m/z 109 при энергии 6 эВ образуются продукт-ионы с m/z 63 $[C_2H_4Cl]^+$, m/z 45 $[SCH]^+$ и m/z 73 $[C_3H_5S]^+$.

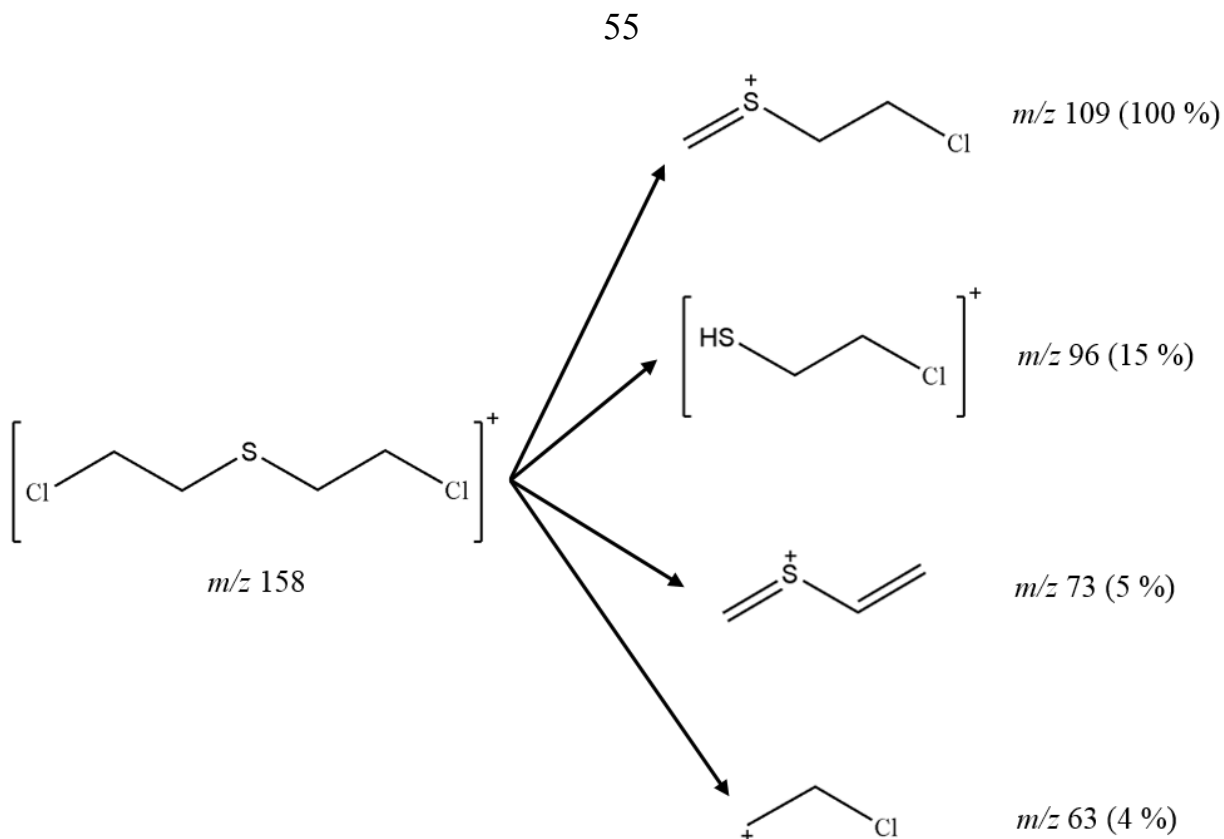


Рисунок 16 – Продукт-ионы, образующиеся при фрагментации молекулярного иона бис(2-хлорэтил)сульфида с m/z 158 при энергии соударений 3 эВ

При фрагментации молекулярного иона 1,4-дитиана с m/z 120 образуются продукт-ионы с m/z 105 $[C_3H_5S_2]^+$ и m/z 61 $[C_2H_5S]^+$.

Таким образом в результате проведенных исследований были подобраны следующие характеристичные MRM-переходы: m/z 109 \rightarrow 63 (6 эВ) и m/z 158 \rightarrow 109 (3 эВ) – для идентификации бис(2-хлорэтил)сульфида; m/z 120 \rightarrow 61 (6 эВ) и m/z 120 \rightarrow 105 (3 эВ) – для идентификации 1,4-дитиана.

Критериями надежной идентификации являлось:

- детектирование сигналов с соотношением сигнал:шум не менее 3:1;
- совпадение времен удерживания бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в пробе в пределах $\pm 0,02$ со временами удерживания, установленными для стандартных образцов состава аналитов;
- совпадение соотношений характеристичных переходов в масс-спектре определяемого соединения в исследуемом образце и стандартном растворе.

На рисунке 17 представлена ГХ-МС/МС-хроматограмма, полученная при анализе стандартных растворов 1,4-дителиана и бис(2-хлорэтил)сульфида, реконструированная по характеристичным для аналитов MRM-переходам.

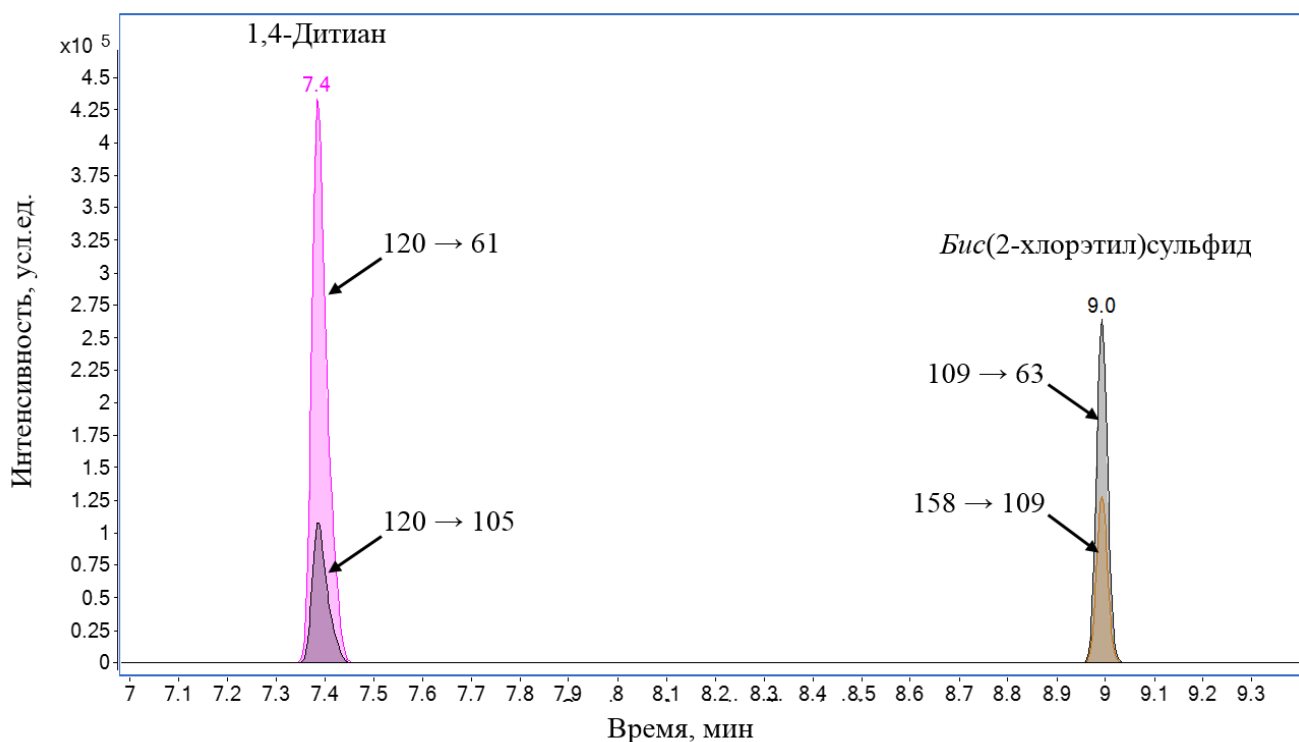


Рисунок 17 – ГХ-МС/МС-хроматограмма стандартных растворов 1,4-дителиана и бис(2-хлорэтил)сульфида

Для расчета линейных индексов удерживания (**RI**) аналитов были проанализированы стандартные растворы 1,4-дителиана и бис(2-хлорэтил)сульфида с внесением смеси н-алканов C_5 - C_{24} в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z от 45 до 250. Величины RI на слабополярной фазе для 1,4-дителиана и бис(2-хлорэтил)сульфида составили 1070 ± 2 и 1178 ± 2 ед. инд. соответственно.

3.1.2 Разработка процедуры определения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах смывов с поверхностей

Для контроля остаточного загрязнения оборудования и инфраструктуры токсичными веществами (пестицидами, токсичными металлами, отравляющими веществами и др.) широко применяется способ отбора проб путем взятия смывов с поверхностей. Установленные уровни загрязнения поверхностей напрямую

отражают опасность контакта с токсикантами и возможность эмиссии летучих соединений в воздушную среду. Однако также существует вероятность необратимой сорбции веществ и, как следствие, сложность их извлечения с исследуемых поверхностей.

Методики, разработанные для контроля загрязненности поверхностей токсичными веществами, для взятия смывов предусматривают использование тампонов, изготовленных из различных материалов (марля, вата, стекловолокно, фильтровальная бумага и др.). При этом извлечение целевых веществ происходит в тампон, а затем из тампона в экстрагирующий растворитель. Оба эти процесса могут сопровождаться значительными потерями аналитов, поэтому тампоны для взятия смывов также следует рассматривать как матрицу, способную сорбировать определяемые соединения. В настоящем исследовании тампоны для смывов были изготовлены из отрезков медицинской марли 10×10 см, промытых растворителями и высушенных.

3.1.2.1 Определение степеней извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана из марлевых тампонов

На первом этапе была оценена степень извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана из тампонов [119]. Для этого в виалу вместимостью 7 мл помещали три тампона и вносили аналиты в количестве 50 нг/мл по каждому веществу. После этого проводили одно-, двух- и трехкратную экстракцию целевых соединений хлористым метиленом. Объединенные экстракты концентрировали под током азота до 200 мкл и анализировали методом ГХ-МС/МС. Полученные результаты сравнивали с результатами анализа определяемых соединений в чистом растворителе. На рисунке 18 представлены результаты исследования.

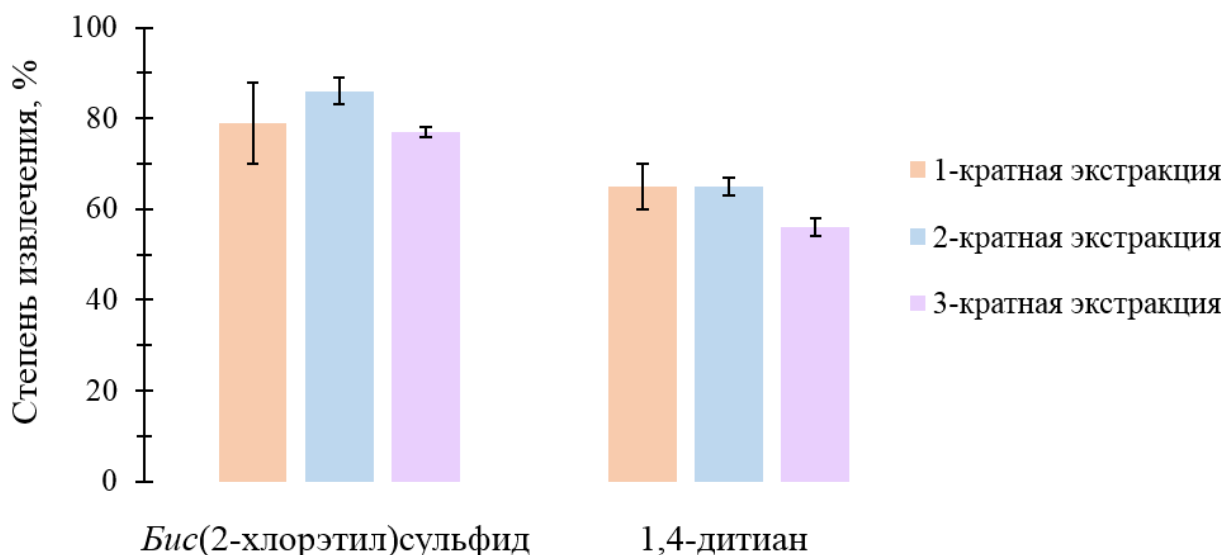


Рисунок 18 – Степень извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана из марлевых тампонов

Как видно из рисунка 18 количество стадий экстракции существенно не влияет на степень извлечения аналитов из марлевых тампонов: разброс результатов определения степеней извлечения аналитов при одно-, двух- и трехкратной экстракции не превышал 6 %. Наибольший разброс данных был зафиксирован при однократной экстракции ввиду, вероятно, неполного извлечения аналитов. При двукратной экстракции извлечение *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана более воспроизводимо ввиду устранения такого субъективного фактора, как полнота отбора растворителя из тампона при его отжатии. При трехкратной экстракции ввиду большего объема экстрагента и, таким образом, более длительного концентрирования экстракта под током азота, происходила потеря аналитов.

Оптимальным режимом была выбрана двухстадийная экстракция, при которой степень извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана составила 86 % и 65 % соответственно.

3.1.2.2 Оценка матричного влияния при определении *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в экстрактах из марлевых тампонов методом ГХ-МС/МС

Для расчета матричного фактора использовали метод постэкстракционной добавки. В экстракты из тампонов, не содержащих аналиты, вносили *бис*(2-хлорэтил)сульфид и 1,4-дителиан в количестве 50 нг/мл по каждому веществу, анализировали методом ГХ-МС/МС и сравнивали полученные результаты с результатами анализа стандартных растворов определяемых соединений той же концентрации. Матричные факторы при определении *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана методом ГХ-МС/МС были установлены на уровне 80 % и 70 % соответственно.

3.1.2.3 Определение доли извлекаемой формы *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана с различных поверхностей

Для определения доли извлекаемой формы *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана были выбраны три типа материалов: плитка ПВХ, ламинат и металлические пластины. На поверхность площадью 1 дм² наносили раствор *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в хлористом метиле для достижения концентрации 100 нг/дм² по каждому веществу. Оставляли образцы в вытяжном шкафу на 30 мин, после чего последовательно протирали участок контролируемой поверхности двумя марлевыми тампонами, смоченными хлористым метилом, и одним сухим марлевым тампоном. Все три тампона помещали в вialу вместимостью 7 мл, добавляли 4 мл хлористого метилена и подвергали ультразвуковому воздействию в течение 5 мин. Экстракт переносили в центрифужную пробирку и повторяли процедуру экстракции еще раз. Экстракты объединяли, центрифугировали и концентрировали под током азота до конечного объема 200 мкл при комнатной температуре. Аликвоту экстракта объемом 2 мкл анализировали методом ГХ-МС/МС. Результаты определения доли извлекаемой формы *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана, нанесенных на три типа поверхностей, после взятия смывов представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Доля извлекаемой формы бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана с различных поверхностей

Материал	Доля извлекаемой формы, % (\pm СКО; n=3)	
	Бис(2-хлорэтил)сульфид	1,4-дителиан
Плитка ПВХ	9,00 \pm 2,00	5,00 \pm 1,00
Ламинат	0,13 \pm 0,02	н/о
Металл	0,10 \pm 0,03	н/о

Примечание: н/о – не обнаружено, концентрация аналита в экстракте ниже предела обнаружения

Данные таблицы 7 показывают, что оба аналита активно проникают вглубь материалов, удерживаются их поверхностным слоем, либо быстро испаряются. При анализе смывов производилась оценка доли аналитов, оставшихся на поверхности и представляющих наибольшую опасность для окружающей среды и человека.

3.1.2.4 Рабочий диапазон концентраций и предел обнаружения

Для построения градуировочной характеристики были приготовлены две серии стандартных растворов, таблица 8:

- в диапазоне концентраций от 0,5 до 200 нг бис(2-хлорэтил)сульфида, внесенных в 200 мкл хлористого метилена (2,5-1000 нг/мл);
- в диапазоне концентраций от 0,2 до 200 нг 1,4-дителиана, внесенных в 200 мкл хлористого метилена (1-1000 нг/мл).

Предел обнаружения методики определяли как минимальную концентрацию аналита в образцах смывов с поверхностей, при которой был зарегистрирован хроматографический пик с соотношением сигнал:шум не менее 3:1.

Таблица 8 – Градуировочные характеристики и предел обнаружения методики

Аналит	Уравнение линейной регрессии	R ² (n=5)	ПО, нг/дм ²
Бис(2-хлорэтил)сульфид	$S = 145,35 \times C - 385,75$	0,9934	0,20
1,4-дителиан	$S = 148,76 \times C + 55,95$	0,9951	0,05

Примечания: ПО – предел обнаружения

Ввиду отсутствия безусловной корреляции между содержанием вещества на поверхности и в глубинных слоях материалов, а также низкой эффективности пробоотбора путем взятия смывов с поверхностей, необходимо наряду с анализом смывов исследовать «глубинные пробы» строительных и иных материалов при проведении санитарно-химического контроля возможного остаточного загрязнения элементов инфраструктуры бис(2-хлорэтил)сульфидом и 1,4-дителианом.

3.1.3 Разработка методики определения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в строительных материалах и полимерных элементах инфраструктуры

Скорость процесса испарения токсикантов с поверхностей или проникновения вглубь материалов определяется физико-химическими свойствами вещества (летучесть, способность к самокапсулированию, сорбционная активность, устойчивость и др.) и материала (пористость, сорбционная емкость, наличие каталитически активных центров и т.д.).

Как было показано выше, санитарно-химический контроль производственных помещений бывшего объекта по УХО не может ограничиваться анализом проб смывов с поверхностей технологического оборудования, а должен включать также анализ «глубинных проб» контролируемых объектов инфраструктуры.

Сильные электрофилы прочно удерживаются такими матрицами как строительные материалы. При экстракции аналитов органическими растворителями степени извлечения сильно варьируются в зависимости от матричного состава строительного материала.

Для модельного эксперимента были выбраны следующие материалы: керамическая плитка, бетон, огнеупорный, керамический и силикатный кирпич, образцы кабель-канала из ПВХ (полимер №1), уплотняющей прокладки на основе резины (полимер №2), гофры для кабеля из ПВХ (полимер №3).

3.1.3.1 Выбор оптимального экстрагента для извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана из образцов конструкционных материалов

Для ГХ-МС/МС определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана в образцах строительных конструкций и полимерных элементах инфраструктуры необходимо было подобрать экстрагент, который бы активно проникал в различные по своим свойствам материалы, селективно и эффективно извлекал из них аналиты, но не растворял ни один из материалов [120]. Большинство хлорсодержащих органических растворителей, как известно, растворяют полимерные материалы. Для целей данного исследования, в частности, в качестве экстрагентов не подошли хлористый метилен, дихлорэтан и хлороформ. Оптимальным хлорсодержащим растворителем оказался 2-хлорпропан. Также было проверено влияние на матрицу диэтилового эфира, ацетонитрила, гексана и ацетона (только для образцов бетона, плитки и кирпичей ввиду частичной растворимости полимеров в ацетоне).

3.1.3.2 Определение степеней извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана из образцов конструкционных материалов

Для определения степеней извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана из образцов строительных материалов и полимерных элементов инфраструктуры в исследуемые матрицы вносили стандартные растворы аналитов для достижения концентрации 50 нг/г и оставляли образцы в вытяжном шкафу на 15 ч. Проводили двухстадийную экстракцию целевых соединений различными растворителями при обработке проб ультразвуком, концентрировали полученные экстракты под током азота до 200 мкл и анализировали методом ГХ-МС/МС. Полученные результаты сравнивали с результатами анализа стандартных растворов *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дитиана такой же концентрации. Результаты определения величин степеней извлечения представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Степени извлечения бис(2-хлорэтил)сульфида (1) и 1,4-дителиана (2) из модельных образцов различными растворителями

Объект анализа	Степень извлечения, % (коэффициент вариации, %; n=3)									
	Диэтиловый эфир		2-хлорпропан		Ацетонитрил		Гексан		Ацетон	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Керамическая плитка	н/о	н/о	63 (20)	62 (22)	50 (30)	47 (31)	37 (8)	80 (16)	68 (9)	77 (5)
Огнеупорный кирпич	н/о	37 (5)	66 (2)	74 (14)	59 (3)	72 (9)	37 (11)	70 (4)	33 (9)	49 (11)
Керамический кирпич	49 (6)	39 (1)	62 (10)	72 (8)	42 (20)	65 (17)	34 (8)	67 (8)	27 (14)	46 (20)
Силикатный кирпич	69 (5)	52 (2)	50 (13)	64 (18)	30 (30)	59 (15)	34 (18)	62 (12)	22 (17)	58 (27)
Бетон	86 (14)	60 (11)	56 (30)	76 (30)	43 (25)	70 (25)	52 (14)	80 (16)	52 (11)	н/о
Полимер №1	67 (7)	19 (28)	77 (19)	22 (14)	36 (27)	10 (24)	36 (10)	7 (22)	н/и	
Полимер №2	60 (30)	56 (5)	92 (11)	59 (12)	100 (8)	83 (10)	78 (13)	43 (17)		
Полимер №3	48 (27)	16 (11)	100 (4)	30 (15)	57 (16)	9 (16)	30 (6)	5 (31)		

Примечания: н/о – не обнаружено, концентрация аналита в экстракте ниже предела обнаружения; н/и – не исследовалось, степень извлечения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана ацетоном из образцов полимеров не исследовалась

Как видно из таблицы 9 лучше всего *бис*(2-хлорэтил)сульфид извлекается диэтиловым эфиром из бетона (90 %), ацетонитрилом из полимера №2 (100 %), а также 2-хлорпропаном из всех образцов полимеров (80-100 %). Для 1,4-дителиана наибольшее значение степени извлечения (80 %) было получено при экстракции ацетонитрилом из полимера №2, а также гексаном из образцов бетона и керамической плитки.

Наилучшую экстрагирующую способность при одновременном извлечении *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана из образцов различного матричного состава показал 2-хлорпропан. Для бетона и силикатного кирпича степень извлечения *бис*(2-хлорэтил)сульфида составила 50-60 %, для всех остальных матриц – 60-100 %. Степень извлечения из исследуемых матриц 1,4-дителиана в среднем составила 60-80 %, кроме образцов полимеров №1 и №3 – 20-30 %.

Таким образом в результате проведенных исследований оптимальным экстрагентом был выбран 2-хлорпропан. Все дальнейшие исследования проводились с использованием данного растворителя.

3.1.3.3 Оценка матричного влияния при определении *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в экстрактах из образцов конструкционных материалов методом ГХ-МС/МС

Для оценки матричного влияния и расчета матричного фактора (МФ) в экстракты из бланковых образцов строительных материалов и полимеров вносили *бис*(2-хлорэтил)сульфид и 1,4-дителиан в концентрации 50 нг/мл и анализировали методом ГХ-МС/МС. Полученные результаты сравнивали с результатами анализа стандартных растворов аналитов такой же концентрации, таблица 10.

Таблица 10 – Матричный фактор (%) при определении *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах строительных материалов и полимеров методом ГХ-МС/МС

Объект анализа	Матричный фактор, %	
	<i>Бис</i> (2-хлорэтил)сульфид	1,4-дителиан
Керамическая плитка	80	102
Огнеупорный кирпич	94	120
Керамический кирпич	96	129
Силикатный кирпич	93	129
Бетон	101	82
Полимер №1	90	96
Полимер №2	104	111
Полимер №3	126	119

Исследуемые матрицы не оказывали существенного влияния на результаты определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в исследуемых образцах (МФ = 90-110 %). Для *бис*(2-хлорэтил)сульфида незначительное подавление сигнала наблюдалось при анализе экстракта из керамической плитки (МФ = 80 %) и увеличение сигнала при анализе экстракта из полимера №3 (МФ = 126 %). Для 1,4-дителиана наблюдалось подавление сигнала при анализе экстракта из образца бетона (МФ = 83 %) и увеличение – при анализе экстрактов из образцов кирпичей, а также полимера №3 (МФ = 120-130 %).

3.1.3.4 Оценка селективности методики определения

бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах конструкционных материалов методом ГХ-МС/МС

Для оценки селективности были проанализированы экстракты, приготовленные из образцов строительных материалов и полимеров, не содержащих целевые соединения. Было установлено, что на профиле хроматограмм, реконструированных по характеристичным для *бис*(2-

хлорэтил)сульфида MRM-переходам, посторонние сигналы коэлюируемых матричных соединений отсутствовали. Характеристичный для 1,4-дителиана MRM-переход m/z 120 \rightarrow 61 также соответствовал требованиям селективности. Однако по переходу m/z 120 \rightarrow 105 на хроматограммах, полученных при анализе экстрактов из бланковых проб полимерных материалов, наблюдался пик, совпадающий по времени удерживания с пиком 1,4-дителиана.

3.1.3.5 Градуировочные характеристики и линейный диапазон концентраций

Для построения градуировочных характеристик проводили анализ:

- серии стандартных растворов в диапазоне концентраций от 0,5 до 300 нг бис(2-хлорэтил)сульфида, внесенных в 200 мкл 2-хлорпропана (2,5-1500 нг/мл);
- серии стандартных растворов в диапазоне концентраций от 0,1 до 500 нг 1,4-дителиана, внесенных в 200 мкл 2-хлорпропана (0,5-2500 нг/мл).

В таблице 11 представлены полученные градуировочные характеристики определения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в модельных растворах.

Таблица 11 – Градуировочные характеристики определения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в модельных растворах

Аналит	Уравнение линейной регрессии	R ² (n=9)	ПД, нг/мл
Бис(2-хлорэтил)сульфид	$S = 55,50 \times C - 277,72$	0,9939	2,5
1,4-дителиан	$S = 83,45 \times C + 29,01$	0,9999	0,5

Примечания: ПД – предел детектирования аналитов в модельных растворах

Линейный диапазон концентраций определяли при анализе образцов строительных материалов и полимеров с внесением бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 300 нг/г. Для всех матриц были получены коэффициенты детерминации R² в диапазоне 0,9909-0,9998

($n=5$), что свидетельствует о линейности отклика детектора в исследуемом интервале концентраций *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана.

3.1.3.6 Метрологические характеристики методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в конструкционных материалах

Оценку прецизионности методики осуществляли при анализе образцов строительных материалов и полимеров с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана.

Пределом обнаружения (**ПО**) методики считали минимальную концентрацию каждого аналита в образцах, при которой было зарегистрировано хроматографический пик с соотношением сигнал:шум более 3:1.

Пределом количественного определения (**ПКО**) считали минимальную концентрацию аналитов, при которой был зарегистрирован хроматографический пик с соотношением сигнал:шум более 10:1.

Для оценки воспроизводимости результатов анализа вычисляли коэффициент вариации (**КВ**). Для этого анализировали по три параллельных образца каждой исследуемой матрицы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в течение одного дня и каждый день в течение трех дней. В таблице 12 представлены метрологические характеристики методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах строительных материалов и полимеров.

Таблица 12 – Метрологические характеристики методики определения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах строительных материалов и полимерных элементов инфраструктуры

Объект анализа	Бис(2-хлорэтил)сульфид				1,4-дителиан			
	ПО, нг/г	ПКО, нг/г	КВ (1 день), % n=3	КВ (3 дня), % n=9	ПО, нг/г	ПКО, нг/г	КВ (1 день), % n=3	КВ (3 дня), % n=9
Керамическая плитка	0,8	2,0	9,9	2,6	0,3	1,0	22,5	22,0
Огнеупорный кирпич	0,8	2,0	13,9	3,3	0,2	1,0	14,6	17,6
Керамический кирпич	0,9	3,0	3,1	9,8	0,2	1,0	7,8	9,9
Силикатный кирпич	0,9	3,0	21,6	4,6	0,3	1,0	18,0	13,4
Бетон	0,8	2,0	22,9	7,4	0,2	1,0	31,2	27,4
Полимер №1	0,9	2,0	10,8	1,6	1,0	2,0	14,9	16,3
Полимер №2	0,7	2,0	13,4	6,4	0,4	1,0	12,0	15,8
Полимер №3	0,8	2,0	4,4	8,8	1,0	2,0	25,5	20,5

Примечания: ПО – предел обнаружения; ПКО – предел количественного определения; КВ – коэффициент вариации

3.1.3.7 Долгосрочная стабильность образцов конструкционных материалов с внесением бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана

Стабильность проб оценивали по изменению содержания бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана, добавленных в концентрации 50 нг/г в образцы строительных материалов и полимеров, после хранения в течение 5 месяцев при температуре 4 °С. В таблице 13 представлены результаты исследования.

Таблица 13 – Содержание бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах строительных материалов и полимеров после хранения в течение 5 месяцев при температуре 4 °С

Объект анализа	Остаточное содержание, нг/г (n=3)	
	Бис(2-хлорэтил)сульфид	1,4-дителиан
Керамическая плитка	0,8	< 0,3
Огнеупорный кирпич	< 0,8	0,2-4,3
Керамический кирпич	< 0,9	1,4-2,3
Силикатный кирпич	< 0,9	26,5-28,8
Бетон	< 0,8	1,4-8,3
Полимер №1	23,7-29,7	7,6-15,5
Полимер №2	46,4-49,4	21,6-30,5
Полимер №3	37,8-39,2	8,4-14,3

Как видно из таблицы 13 в образцах бетона и кирпичей после 5 месяцев хранения бис(2-хлорэтил)сульфид обнаружен не был, а в одном образце керамической плитки аналит детектирован на уровне предела обнаружения. Однако в образцах полимерных материалов содержание бис(2-хлорэтил)сульфида снизилось менее, чем на 50 % после хранения образцов в течение 5 месяцев, и составило $26,3 \pm 3,1$ нг/г, $47,8 \pm 1,5$ нг/г и $38,5 \pm 0,7$ нг/г для образцов полимеров №1, №2 и №3 соответственно.

1,4-дителиан был обнаружен после 5 месяцев хранения во всех образцах, кроме керамической плитки. Наибольшее остаточное содержание аналита, в

среднем на уровне 30 нг/г, было в пробах силикатного кирпича и полимера №2. В остальных образцах содержание 1,4-дителиана было ниже 10-15 нг/г.

Полученные результаты показывают, что полимерные материалы, контактировавшие ранее с ТХ, могут быть источником потенциальной опасности для объектов окружающей среды, но в то же время являются наиболее перспективными объектами для ретроспективной идентификации *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана.

3.1.3.8 Апробация разработанных подходов при анализе проб с бывшего объекта по уничтожению химического оружия на этапе его конверсии в народное хозяйство

Разработанные методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в смывах с поверхностей и в образцах строительных материалов были апробированы при анализе проб, отобранных на бывшем объекте по уничтожению химического оружия. Было проанализировано более 60 образцов строительных материалов, полимерных элементов инфраструктуры и смывов с поверхностей технологического оборудования, предположительно ранее находившихся в контакте с *бис*(2-хлорэтил)сульфидом или реакционными массами от его нейтрализации.

В результате проведенных исследований *бис*(2-хлорэтил)сульфид был обнаружен в 5 из 15 проб смывов на уровне 0,2-2 нг/дм² (0,001-0,01 ПДУ) и в 7 из 50 проб строительных отходов (образцы полимерных материалов) на уровне 7-50 нг/г (0,07-0,5 ПДК).

Достоверность идентификации *бис*(2-хлорэтил)сульфида подтверждали по совпадению (в пределах допустимого отклонения) соотношения интенсивностей характеристичных переходов в пробе и в стандартном растворе при совпадении *R_T* *бис*(2-хлорэтил)сульфида в пробе и в стандартном растворе в пределах $\pm 0,02$ мин.

Содержание 1,4-дителиана в 12 из 15 образцов смывов находилось на уровне 3-150 нг/дм², а в 17 из 50 образцов строительных отходов (в основном образцы полимерных материалов) – в диапазоне от 17 до 700 нг/г.

Ввиду неселективности подтверждающего перехода для 1,4-дителиана (m/z 120 → 105) идентификацию аналита подтверждали по совпадению RT в пробе и в стандартном растворе в пределах ±0,02 мин, а также методом стандартной добавки.

Результаты исследований были учтены при решении вопроса о сохранении/утилизации технологического оборудования и элементов производственной инфраструктуры объекта.

Применение предложенных методик не ограничивается задачами обеспечения безопасности при перепрофилировании бывших объектов УХО и может быть распространено на проведение экспертиз при чрезвычайных ситуациях, связанных с непреднамеренным контактом с захороненным/затопленным ХО или террористическими атаками. При расследовании инцидентов, связанных с ХО, образцы абиогенного и биогенного происхождения, как правило, попадают в одну лабораторию и должны быть проанализированы в кратчайшие сроки. Определение разных маркеров на одном оборудовании позволяет существенно рационализировать процесс. В настоящей работе представлено методическое обеспечение для определения методом ГХ-МС/МС *бис*(2-хлорэтил)сульфида в смывах с поверхностей и глубинных пробах строительных материалов, а также в белках плазмы крови [121, 122]. Этим же методом может быть определен 1,4-дителиан – стабильный продукт абиогенной трансформации *бис*(2-хлорэтил)сульфида в различных матрицах, а также наиболее ретроспективный биомаркер *бис*(2-хлорэтил)сульфида – аддукт с гемоглобином крови.

3.2 Разработка методики определения аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида с глобином в эритроцитах крови

Как уже отмечено, *бис*(2-хлорэтил)сульфид способен атаковать различные мишени в организме, вследствие чего набор биомаркеров его воздействия обширен. При этом, определение наиболее ретроспективного биомаркера – аддукта с гемоглобином крови, в наименьшей степени методически разработано. Причиной этого, по-видимому, является то, что в международных квалификационных тестах ОЗХО в качестве биоматриц до настоящего времени предлагалось анализировать только мочу или плазму. При этом вне зоны внимания аналитиков остаются ситуации, при которых плазму крови технически получить нельзя.

3.2.1 Подбор условий анализа глобинового аддукта методом ГХ-МС/МС

Подбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования осуществляли с помощью синтезированного аналитического стандарта НЕТЕ-Val. Синтез проводили по процедуре [123]. Очистку от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ. Подтверждение структуры и чистоты стандарта проводили методом ВЭЖХ-МС/МС по пику с m/z 256,0862 – $[M+H]^+$.

Подготовку стандартного образца НЕТЕ-Val к ГХ-МС анализу осуществляли по процедуре [111] с небольшими модификациями [124]. Для этого навеску НЕТЕ-Val массой 10 мг растворяли в 2 мл 0,25М бикарбоната натрия, добавляли 1,5 мл ацетонитрила, 15 мкл ПФИТЦ и встряхивали на устройстве Вортекс в течение 5 мин. Полученную смесь термостатировали в течение 2 ч при 45 °С. После охлаждения до комнатной температуры экстрагировали целевое вещество диэтиловым эфиром (3×1,5 мл) и промывали 2 мл деионизированной воды. Органический слой высушивали над безводным MgSO₄ и упаривали досуха под током азота при температуре 60 °С. К сухому остатку (производное №1 – НЕТЕ-Val-P) добавляли 1 мл толуола и тщательно перемешивали. Аликвоту объемом 500 мкл

замораживали для последующих исследований, а вторую половину раствора НЕТЕ-Val-P анализировали методами ГХ-МС-ОХИ и ГХ-МС-ИЭ в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z 45-450. На рисунке 19 представлены полученные масс-спектры производного НЕТЕ-Val-P.

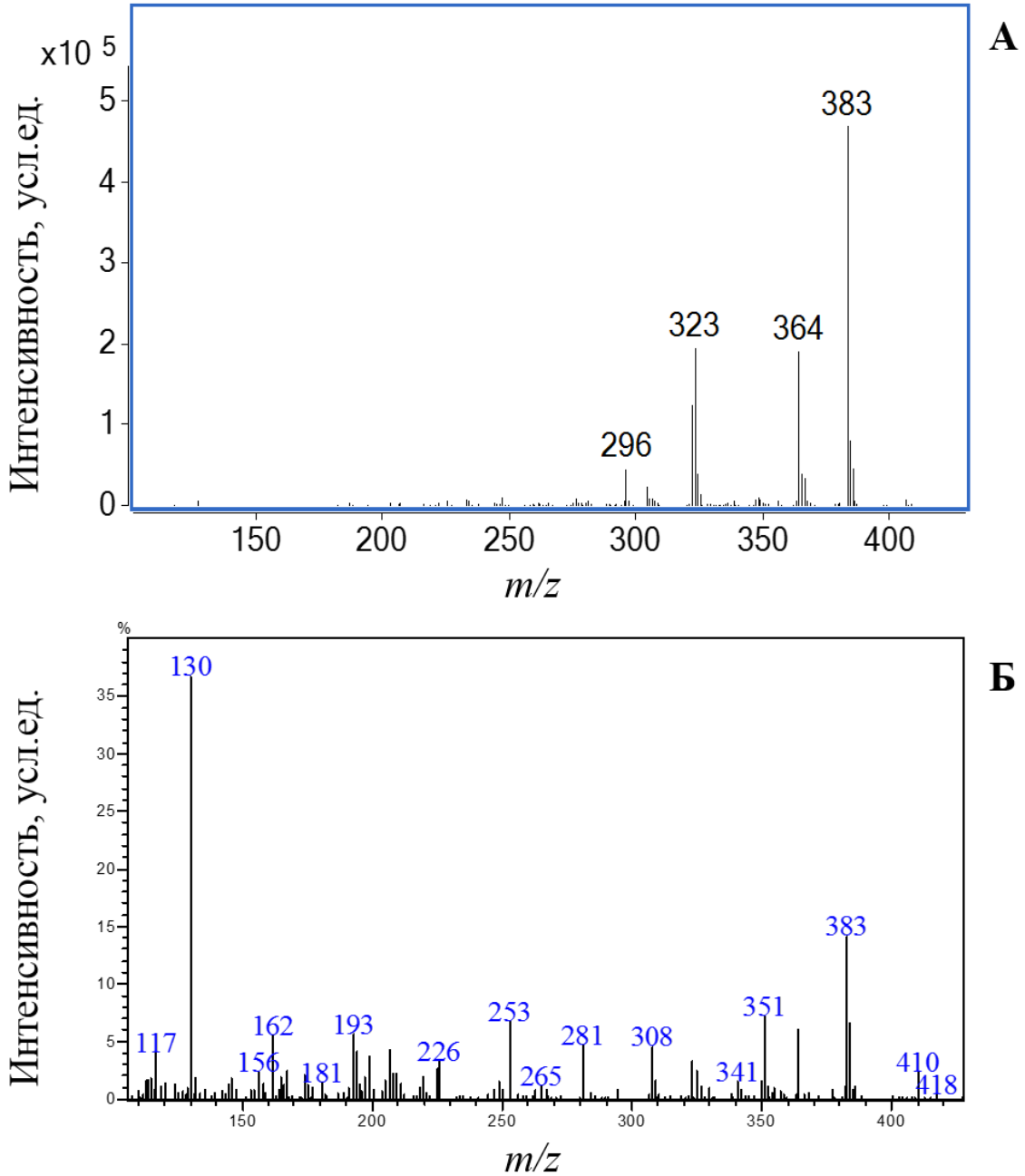


Рисунок 19 – Масс-спектры производного НЕТЕ-Val-P, полученные в режимах ОХИ (А) и ИЭ (Б)

Для подбора характеристичных MRM-переходов ион с m/z 383 [M-CH₂CH₂OH] был подвергнут дополнительной фрагментации при варьировании энергии соударений от 3 до 30 эВ с шагом 3 эВ. В полученных

масс-спектрах ОХИ наиболее интенсивными являются продукт-ионы с m/z 323 [$M-CH_2CH_2SCH_2CH_2OH$] и m/z 363 [$M-CH_2CH_2OH-HF$], а в масс-спектрах ИЭ – продукт-ионы с m/z 130 [$CH_3CCH_3CN_2OS$] и m/z 162 [$CH_3CCH_3CN_2OS_2$].

Определение НЕТЕ-Val-P методом ГХ-МС/МС-ОХИ осуществляли по MRM-переходам m/z 383 \rightarrow 323 (9 эВ) и m/z 383 \rightarrow 363 (9 эВ). Для идентификации НЕТЕ-Val-P методом ГХ-МС/МС-ИЭ использовали MRM-переходы m/z 383 \rightarrow 130 (18 эВ) и m/z 383 \rightarrow 162 (18 эВ).

На следующем этапе исследования проводили вторую стадию дериватизации. В качестве дериватирующего агента был выбран ГФМА. Перфторированные производные, в отличие от силильных, могут быть определены методом ГХ-МС не только в режиме ЭИ, но также и ОХИ, что значительно повышает чувствительность анализа. Преимуществом перфторированных производных также является их стабильность в присутствии воды, что позволяет проводить дополнительную очистку проб перед анализом с целью удаления избытка дериватирующего агента.

К аликвоте раствора НЕТЕ-Val-P объемом 500 мкл добавляли 20 мкл ГФМА и термостатировали в течение 30 мин при 60 °С. После охлаждения до комнатной температуры смесь промывали 300 мкл деионизированной воды и упаривали досуха под током азота при 60 °С. Сухой остаток (производное НЕТЕ-Val-P-P) перерастворяли в 100 мкл толуола и анализировали методом ГХ-МС-ОХИ и ГХ-МС-ИЭ в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z 45-650. На рисунке 20 представлены полученные масс-спектры производного НЕТЕ-Val-P-P.

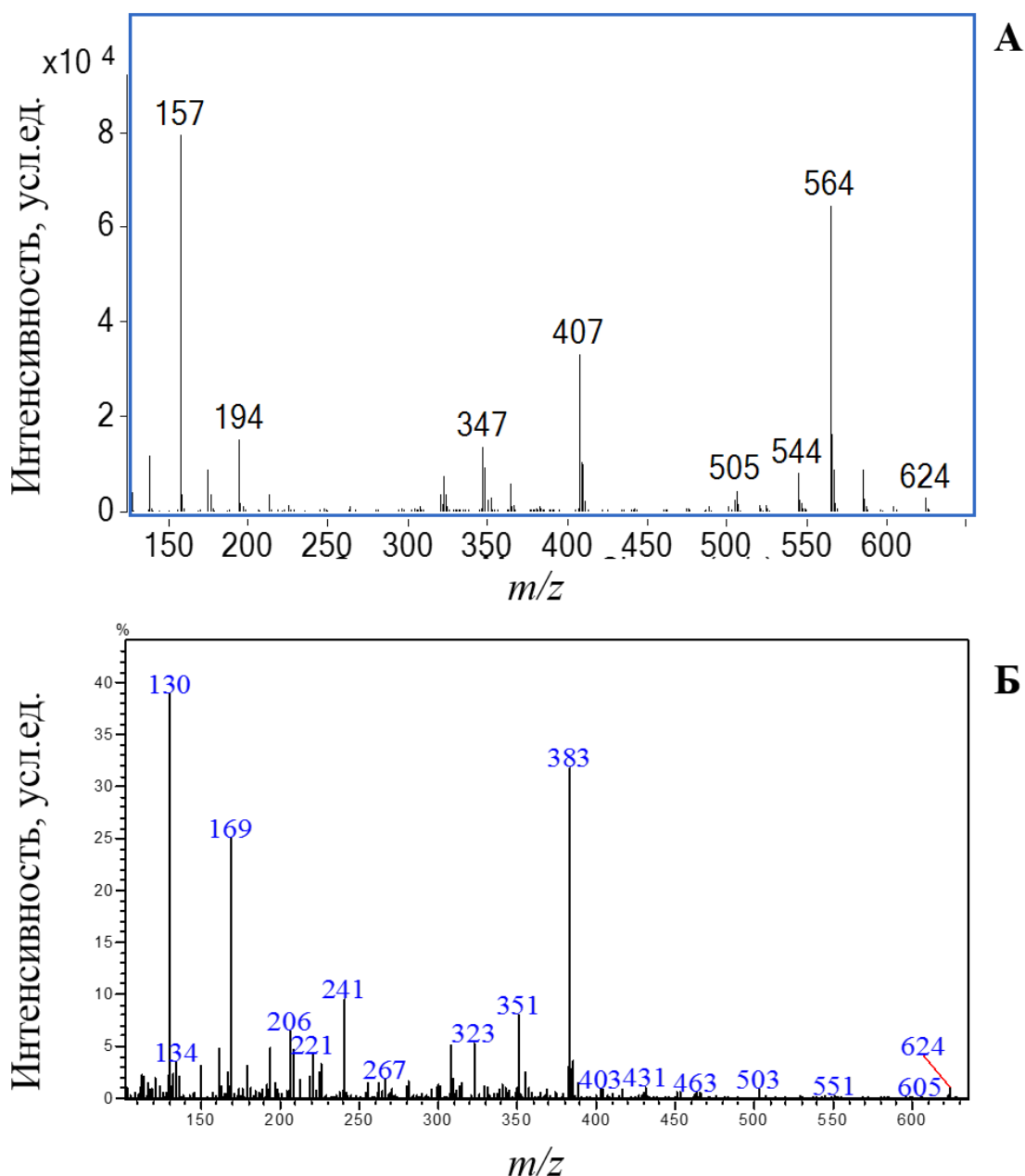


Рисунок 20 – Масс-спектры производного HETE-Val-P-P, полученные в режимах ОХИ (А) и ИЭ (Б)

Как видно из рисунка 20(А) масс-спектр производного HETE-Val-P-P, в отличие от большинства масс-спектров ОХИ, содержит большое число пиков: m/z 624 $[M]^-$, m/z 564 $[M-3HF]^-$, m/z 544 $[M-4HF]^-$, m/z 407 $[M-HF-COCF_2CF_2CF_3]^-$ и др. Для наиболее интенсивных ионов с m/z 564 и m/z 407 были получены масс-спектры диссоциации, индуцированной соударениями, при варьировании энергии соударений от 3 до 24 эВ с шагом 3 эВ. При фрагментации иона с m/z 564 при энергии 9 эВ образуется

мажорный продукт-ион с m/z 544, а при фрагментации иона с m/z 407 при энергии 15 эВ – продукт-ион с m/z 320. Таким образом были подобраны следующие MRM-переходы для определения НЕТЕ-Val-P-P методом ГХ-МС/МС-ОХИ: m/z 564 \rightarrow 544 (9 эВ) и m/z 407 \rightarrow 320 (15 эВ).

Масс-спектр производного НЕТЕ-Val-P-P, полученный в режиме ИЭ, существенно не отличается от масс-спектра производного НЕТЕ-Val-P: одним из наиболее интенсивных пиков является ион с m/z 383, при дополнительной фрагментации которого также образуются продукт-ионы с m/z 130 [$\text{CH}_3\text{CCH}_3\text{CN}_2\text{OS}$] и m/z 162 [$\text{CH}_3\text{CCH}_3\text{CN}_2\text{OS}_2$]. Таким образом характеристичные MRM-переходы для определения НЕТЕ-Val-P-P методом ГХ-МС/МС-ИЭ: m/z 383 \rightarrow 130 (18 эВ) и m/z 383 \rightarrow 162 (18 эВ).

На рисунке 21 представлены ГХ-МС-ОХИ-хроматограммы, полученные при анализе растворов НЕТЕ-Val-P и НЕТЕ-Val-P-P.

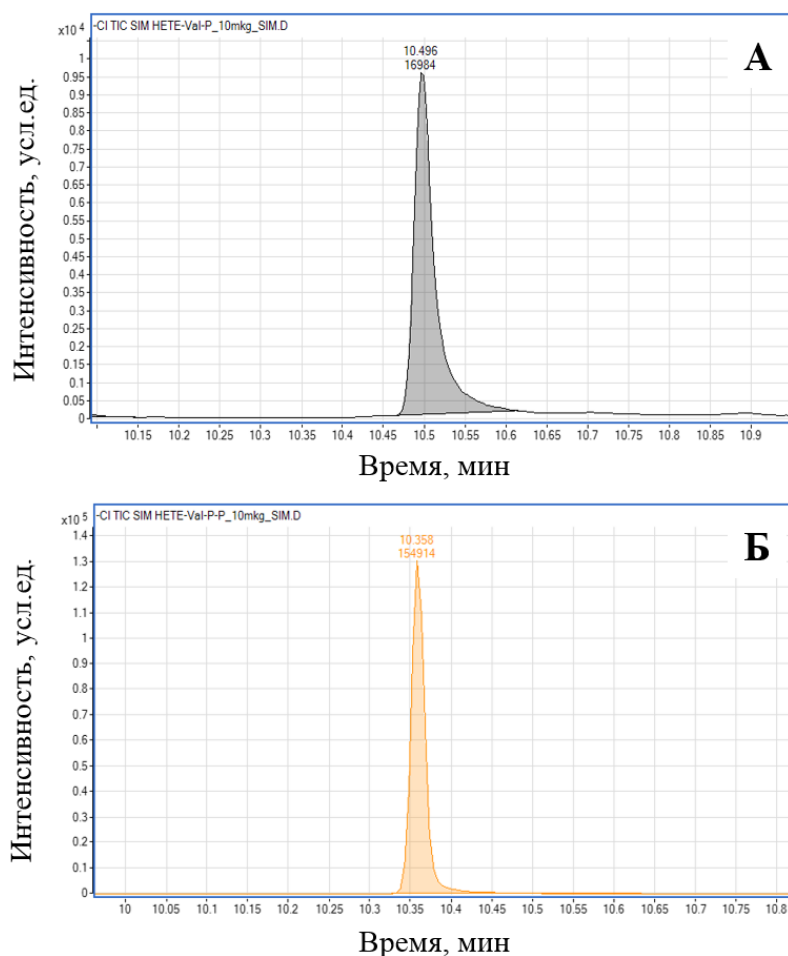


Рисунок 21 – ГХ-МС-ОХИ-хроматограммы НЕТЕ-Val-P (А) и НЕТЕ-Val-P-P (Б)

Хроматографический пик НЕТЕ-Val-P (рисунок 21А) имеет асимметричную форму с размытым задним фронтом. Для целей идентификации допустима небольшая асимметрия хроматографического пика, причиной которой может быть недостаточно полное разделение соседних зон. Однако при проведении количественного анализа даже незначительная асимметричность может стать источником ошибок. Хроматографический пик НЕТЕ-Val-P-P (рисунок 21Б) имеет правильную гауссову форму и, таким образом, для проведения количественного анализа целесообразно получать производное НЕТЕ-Val-P-P [125].

Критерии надежной идентификации глобинового аддукта в образцах цельной крови были аналогичны представленным в п.3.1.1. В качестве образца сравнения использовали синтезированный аналитический стандарт НЕТЕ-Val после дериватизации ПФИТЦ и ГФМА.

Для определения RI растворы НЕТЕ-Val-P и НЕТЕ-Val-P-P с внесением смеси н-алканов C₅–C₄₄ анализировали методом ГХ-МС в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z от 45-650. Величины RI на слабополярной фазе для НЕТЕ-Val-P и НЕТЕ-Val-P-P составили 2512±2 и 2455±2 ед. инд. соответственно.

3.2.2 Определение глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах цельной крови

Оптимизированные условия ГХ-МС/МС анализа были апробированы при анализе образцов цельной крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрациях от 1 до 100 нг/мл. На рисунке 22 в качестве примера представлена ГХ-МС/МС-ИЭ-хроматограмма, полученная при анализе образца цельной крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрации 100 нг/мл.

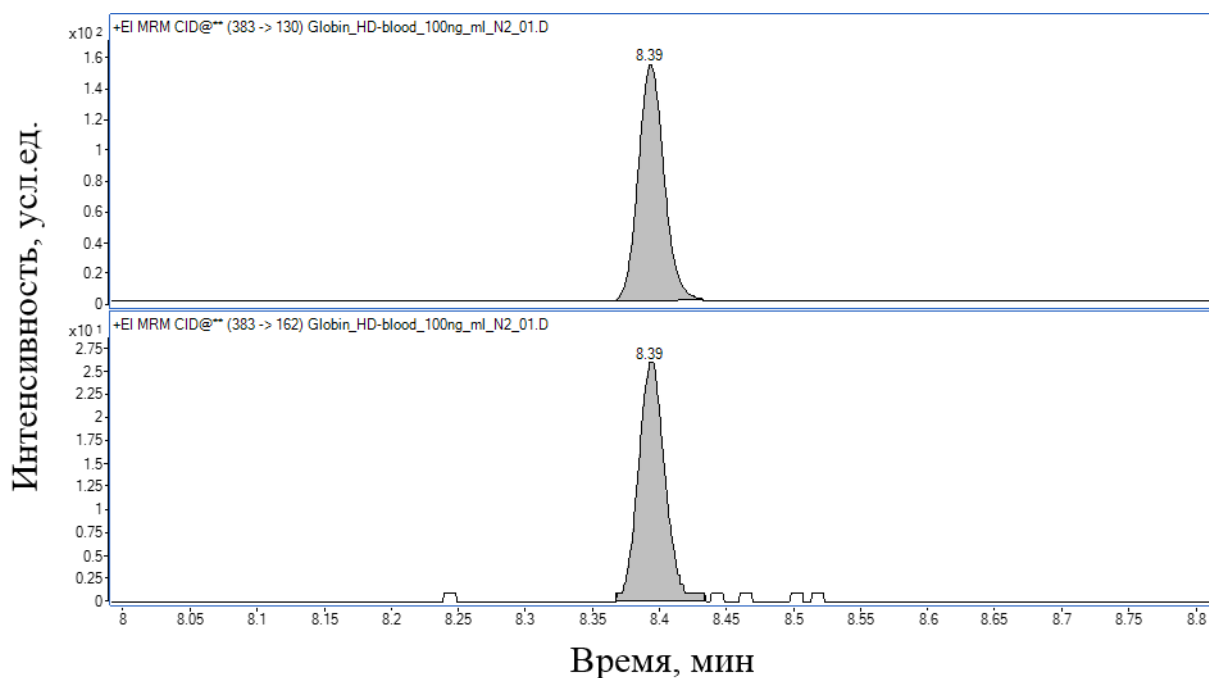


Рисунок 22 – ГХ-МС/МС-ИЭ-хроматограмма образца цельной крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрации 100 нг/мл, реконструированная по MRM-переходам для производного HETE-Val-P-P

Подготовка образцов цельной крови к анализу состоит из следующих стадий:

- центрифугирование цельной крови для разделения плазмы и эритроцитарной массы;
- выделение глобина из эритроцитарной массы;
- получение летучих производных глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

Схема пробоподготовки представлена на рисунке 23.

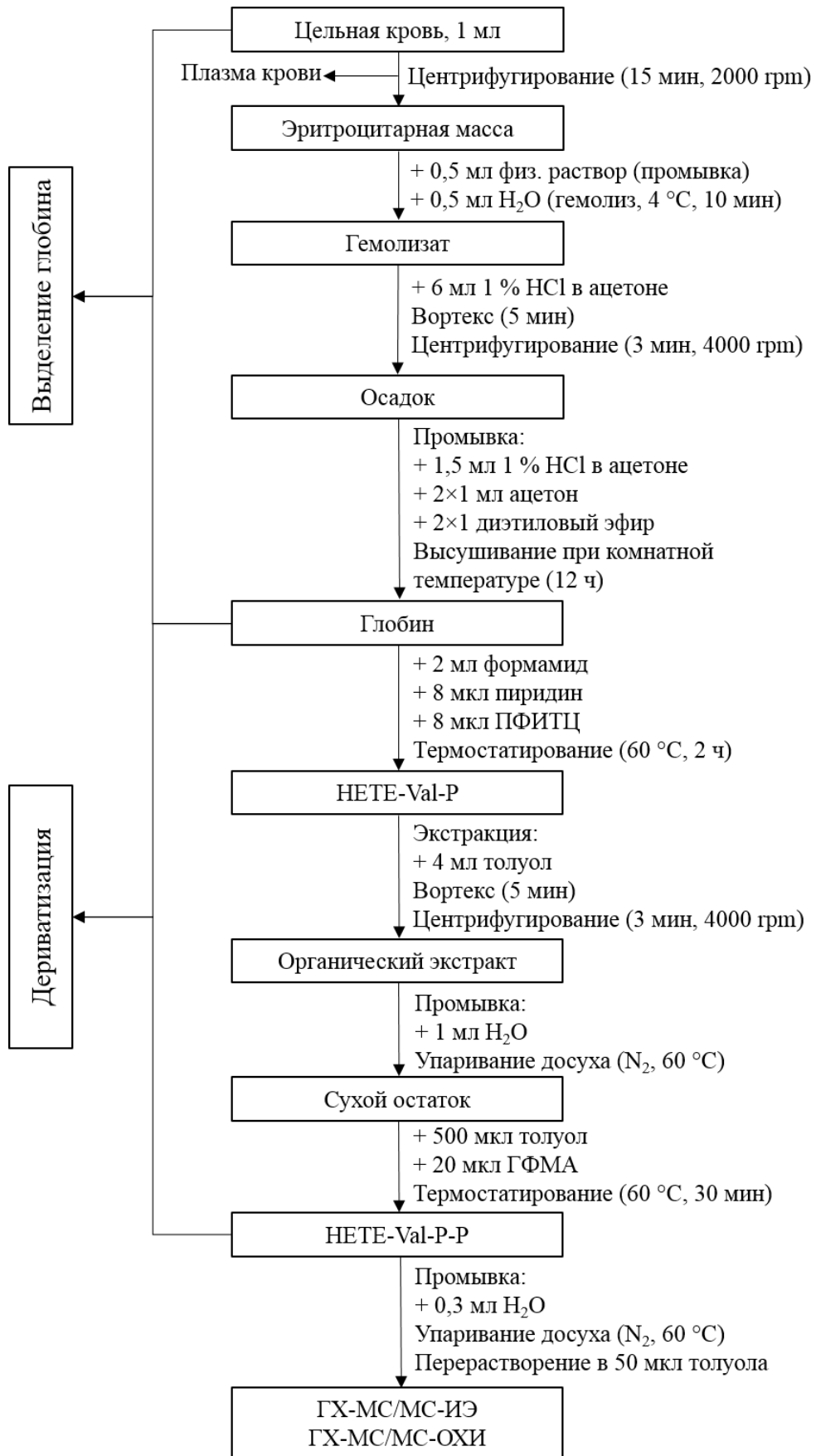


Рисунок 23 – Схема пробоподготовки образцов цельной крови для определения глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида методом ГХ-МС/МС

3.2.3 Оценка селективности методики определения глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах цельной крови методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ

Селективность методики определения глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида была оценена путем анализа бланковых образцов цельной крови от пяти добровольцев после процедуры пробоподготовки. На профиле хроматограмм экстрактов из всех бланковых образцов посторонние сигналы коэлюируемых матричных соединений со временем удерживания НЕТЕ-Val-P-P отсутствовали.

3.2.4 Градуировочная характеристика

Для построения градуировочной характеристики анализировали серию растворов НЕТЕ-Val-P-P с концентрациями от 0,1 до 10 нг/мл методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ. Все растворы готовили путем разбавления толуолом исходного раствора НЕТЕ-Val-P-P с концентрацией 10 мг/мл, приготовленного из синтезированного стандартного образца НЕТЕ-Val после двухстадийной дериватизации ПФИТЦ и ГФМА. Аликвоту раствора каждой градуировочной точки объемом 1 мл упаривали досуха под током азота при 60 °С и перерастворяли в 50 мкл толуола. В таблице 14 представлены градуировочные характеристики определения НЕТЕ-Val-P-P в модельных растворах методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ.

Таблица 14 – Градуировочные характеристики определения глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида в модельных растворах методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ

Метод анализа	Уравнение линейной регрессии	R ² (n=5)	ПД, нг/мл
ГХ-МС/МС-ОХИ	$S = 1227,6 \times C - 43,68$	0,9998	0,1
ГХ-МС/МС-ИЭ	$S = 41,7 \times C - 37,52$	0,9985	1,0

Примечания: ПД – предел детектирования стандартного образца НЕТЕ-Val-P-P в растворе

3.2.5 Метрологические характеристики методики определения глобинового аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Линейный диапазон концентраций, предел обнаружения и предел количественного определения оценивали при анализе серии образцов цельной крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в диапазоне концентраций от 5 до 100 нг/мл.

ПО методики считали минимальную концентрацию внесенного в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфида, при которой был зарегистрирован хроматографический пик НЕТЕ-Val-P-P с соотношением сигнал:шум не менее 3:1.

ПКО считали минимальную концентрацию внесенного в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфида, при которой было зарегистрировано хроматографический пик НЕТЕ-Val-P-P с соотношением сигнал:шум более 10:1.

В таблице 15 представлены установленные метрологические характеристики.

Таблица 15 – Линейный диапазон концентраций, предел обнаружения и предел количественного определения НЕТЕ-Val-P-P в цельной крови

Метод анализа	ЛД, нг/мл	R ² (n=5)	ПО, нг/мл	ПКО, нг/мл
ГХ-МС/МС-ОХИ	5-100	0,9956	5	10
ГХ-МС/МС-ИЭ	15-100	0,9895	15	20

Примечания: ЛД – линейный диапазон (по внесенному в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду); ПО – предел обнаружения (по внесенному в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду); ПКО – предел количественного определения (по внесенному в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду)

Оценку прецизионности результатов осуществляли при анализе образцов цельной крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрациях 40 и 100 нг/мл. Анализировали четыре параллельных образца в течение одного дня и по четыре параллельных образца каждый день в течение двух дней, после чего рассчитывали коэффициенты вариации. Результаты исследования представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Прецизионность результатов определения НЕТЕ-Val-P-P в цельной крови

Внесено бис(2-хлорэтил)сульфида, нг/мл	Найдено НЕТЕ-Val-P-P, нг/мл	КВ (1 день), % n=4	КВ (2 дня), % n=8
40	1,6	4,6	10,5
100	3,1	9,4	16,2

Примечания: КВ – коэффициент вариации

Как видно из таблицы 16 с сайтом N-концевого валина в глобине взаимодействует ориентировочно 3-4 % внесенного в пробу цельной крови бис(2-хлорэтил)сульфида, что является вполне достаточным для оценки уровня экспозиции человека или животных по содержанию НЕТЕ-Val в глобине при воздействии несмертельных доз бис(2-хлорэтил)сульфида.

3.3 Разработка методики определения бис(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови

При разработке методики определения регенерированного из белковых аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида за основу была взята предложенная авторами [93] методика, которая была модифицирована в части процедуры пробоподготовки, а также масс-спектрометрического детектирования.

3.3.1 Подбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования регенерированного из состава белковых аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида

Определение бис(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови, осуществляли по оптимизированным параметрам ГХ-МС/МС анализа, представленным в п.3.1.1. Идентификацию ананта проводили по MRM-переходам 109 → 63 (6 эВ) и 158 → 109 (3 эВ), а также по времени удерживания – 9,2 мин.

В качестве внутреннего стандарта в настоящей работе использовали нафталин-d₈ [126]. Использование дейтерированного стандарта обусловлено

его заведомым отсутствием в плазме крови, в то время как нафталин в крови может присутствовать. Время удерживания нафталина-d₈ при анализе по указанным в п.2.2.3 условиям составило 9,4 мин. Идентификацию осуществляли по следующим MRM-переходам: m/z 136 → 84 (27 эВ) и m/z 136 → 108 (18 эВ). На рисунке 24 представлена ГХ-МС/МС-хроматограмма, полученная при анализе стандартного раствора бис(2-хлорэтил)сульфида и нафталина-d₈.

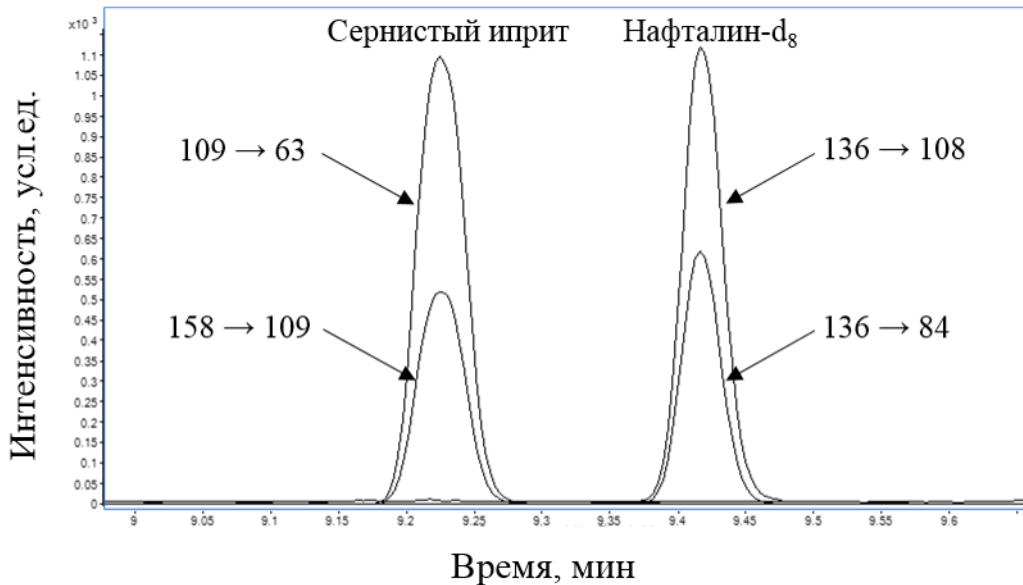


Рисунок 24 – Хроматограмма стандартного раствора бис(2-хлорэтил)сульфида и нафталина-d₈, реконструированная по характеристичным MRM-переходам

Как видно из рисунка 24 бис(2-хлорэтил)сульфид и нафталин-d₈ образуют хорошо разрешенные пики на хроматограмме и обладают близкими значениями факторов отклика.

3.3.2 Оптимизация условий пробоподготовки для определения регенерированного из состава белковых аддуктов бис(2-хлорэтил)сульфида

При оптимизации процедуры пробоподготовки оценивали такие параметры как влияние ДМП (связывающий воду реагент) и время проведения гидролиза.

На первом этапе было проверено влияние ДМП на выход регенерированного *бис*(2-хлорэтил)сульфида. Для этого к белку выделенному из 500 мкл плазмы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрации 30 нг/мл добавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты, ДМП (0, 100, 200 или 500 мкл) и термостатировали образцы при 80 °С в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры в гидролизат добавляли 10 мкл раствора нафталина-d₈ с концентрацией 200 нг/мл, 1 мл гексана и встряхивали на устройстве Вортекс в течение 5 мин. После этого пробы центрифугировали в течение 5 мин при 4000 об/мин, отобранный органический экстракт концентрировали под током азота до ±50 мкл и анализировали методом ГХ-МС/МС. На рисунке 25 представлены результаты исследования влияния ДМП на выход реакции.

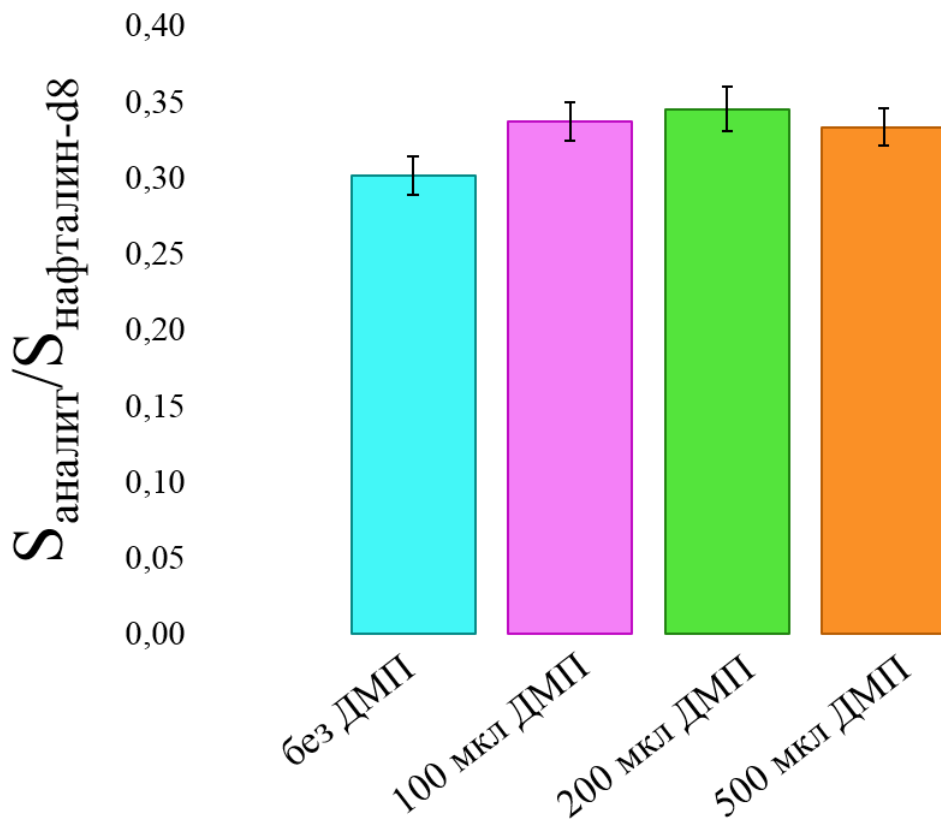


Рисунок 25 – Влияние диметоксипропана на выход реакции регенерования *бис*(2-хлорэтил)сульфида из состава белковых аддуктов

Как видно из рисунка 25 применение диметоксипропана, рекомендованного авторами [93] для связывания воды, не приводило к существенному увеличению выхода регенерированного *бис*(2-хлорэтил)сульфида. По этой причине дальнейшие исследования проводились без добавления ДМП.

Следующим этапом исследования был подбор оптимального времени гидролиза. Для этого к белку выделенному из 500 мкл плазмы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрации 30 нг/мл добавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты и термостатировали образцы при 80 °С в течение 7, 15, 30 и 60 мин. После добавления внутреннего стандарта и экстракции гексаном сконцентрированный до ± 50 мкл экстракт анализировали методом ГХ-МС/МС. На рисунке 26 показана зависимость нормализованной на внутренний стандарт площади пика *бис*(2-хлорэтил)сульфида от времени гидролиза.

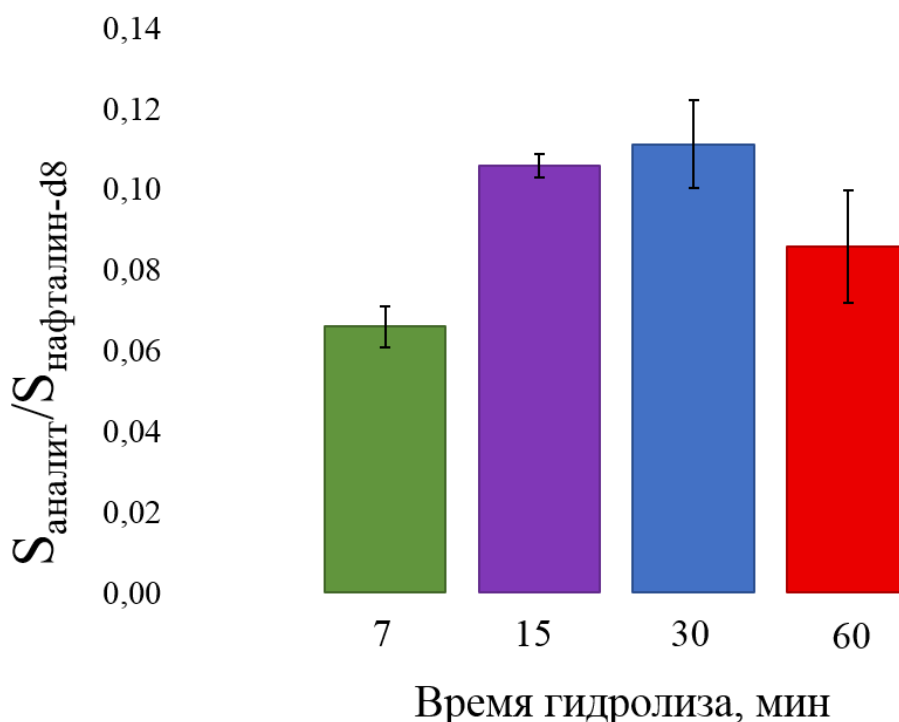


Рисунок 26 – Влияние времени гидролиза на выход реакции регенерования *бис*(2-хлорэтил)сульфида из состава белковых аддуктов

Как видно из рисунка 26 осуществление гидролиза в течение 7 мин недостаточно для полного регенерирования *бис*(2-хлорэтил)сульфида из состава белковых аддуктов плазмы крови. Термостатирование образцов в течение 30 и 60 мин не приводило к увеличению выхода регенерированного *бис*(2-хлорэтил)сульфида, а воспроизводимость результатов анализа была хуже. Оптимальное время гидролиза составило 15 мин.

Дальнейшие исследования проводились по оптимизированной процедуре пробоподготовки, представленной на рисунке 27.

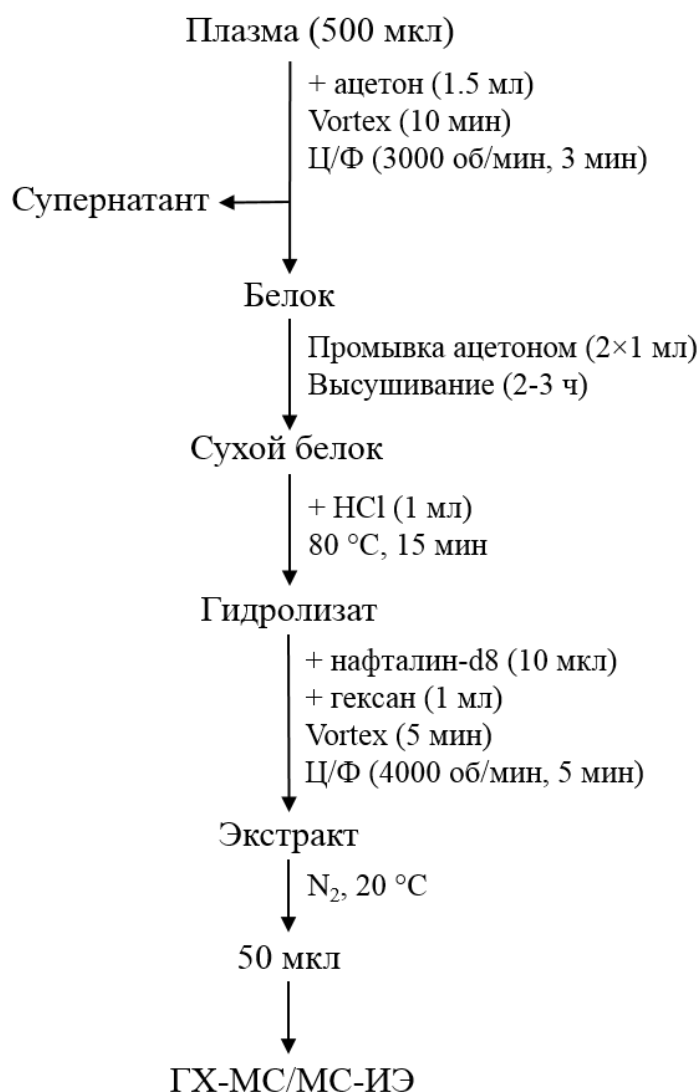


Рисунок 27 – Схема пробоподготовки для определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови

В рамках отдельных экспериментов установлено, что после внесения в плазму крови *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрации до 100 нг/мл он полностью связывается с белками, таким образом весь определяемый *бис*(2-хлорэтил)сульфид получается в результате регенерации соляной кислотой.

3.3.3 Оценка селективности методики определения регенерированного *бис*(2-хлорэтил)сульфида методом ГХ-МС/МС

Оценку селективности процедуры осуществляли при анализе экстрактов из бланковых образцов плазмы крови от 5 разных добровольцев после проведения пробоподготовки. На профиле хроматограмм посторонние сигналы коэлюируемых матричных соединений с временем удерживания *бис*(2-хлорэтил)сульфида и нафталина-d₈ не обнаружены.

3.3.4 Метрологические характеристики методики определения регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Установление линейного диапазона концентраций и построение градуировочной характеристики осуществляли при анализе образцов плазмы крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в диапазоне концентраций 0,5-100 нг/мл. Анализировали по три параллельных образца каждой концентрации и строили график зависимости площади пика *бис*(2-хлорэтил)сульфида, нормализованной на площадь пика внутреннего стандарта, от внесенного количества аналита. Уравнение линейной регрессии $S = 0,0203 \times C + 0,0051$; коэффициент детерминации $R^2=0,9998$ (n=6).

ПО считали минимальную концентрацию, по внесенному в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфиду, при которой был зарегистрирован хроматографический пик аналита с соотношением сигнал:шум более 3:1. ПО по внесенному в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфиду составил 0,5 нг/мл.

ПКО считали минимальную концентрацию, по внесенному в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфиду, при которой был зарегистрирован хроматографический пик аналита с соотношением сигнал:шум не менее 10:1

(нижняя точка на градуировочной прямой). ПКО по внесенному в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфиду составил 1 нг/мл.

Оценку правильности и прецизионности методики осуществляли при анализе образцов плазмы крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрациях 1-100 нг/мл. Анализировали по пять параллельных образцов в течение одного дня и по пять параллельных образцов каждый день в течение трех дней, после чего рассчитывали коэффициенты вариации, таблица 17.

Таблица 17 – Метрологические характеристики методики определения регенерированного из состава белковых аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Концентрация <i>бис</i> (2-хлорэтил)сульфида в плазме, нг/мл	$\pm\delta$, % n=5	Коэффициент вариации (1 день), % n=5	Коэффициент вариации (3 дня), % n=15
1	12,4	6,5	15,5
5	8,3	3,9	10,6
10	3,4	8,5	7,2
20	0,4	4,6	6,7
50	0,5	5,6	9,3
100	2,0	3,4	7,1

Как видно из таблицы 17 относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 10 %, кроме результатов анализа образцов плазмы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида на уровне ПКО.

3.3.5 Стабильность образцов плазмы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида

Стабильность проб исследовали на образцах плазмы крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида при хранении в течение 1, 3 и 5 недель [127]:

- при температуре 4 °С;
- при температуре 30 °С;
- при температуре –20 °С (три цикла заморозки/оттаивания).

Также исследовалась стабильность экстрактов при хранении в морозильной камере в течение месяца и в автосамплере с проколотой септой в течение 24 ч.

Для целей исследования готовили 4 сета образцов плазмы крови объемом 20 мл каждый с внесением бис(2-хлорэтил)сульфида в концентрациях 2, 5, 20 и 50 нг/мл. Из каждого сета отбирали по три аликвоты объемом 500 мкл, проводили пробоподготовку по оптимизированным условиям и анализировали методом ГХ-МС/МС. Анализ осуществляли в день приготовления образцов (день 1), на 7-ой, 21-ый и 35-ый день исследования. Полученные результаты представлены на рисунке 28.

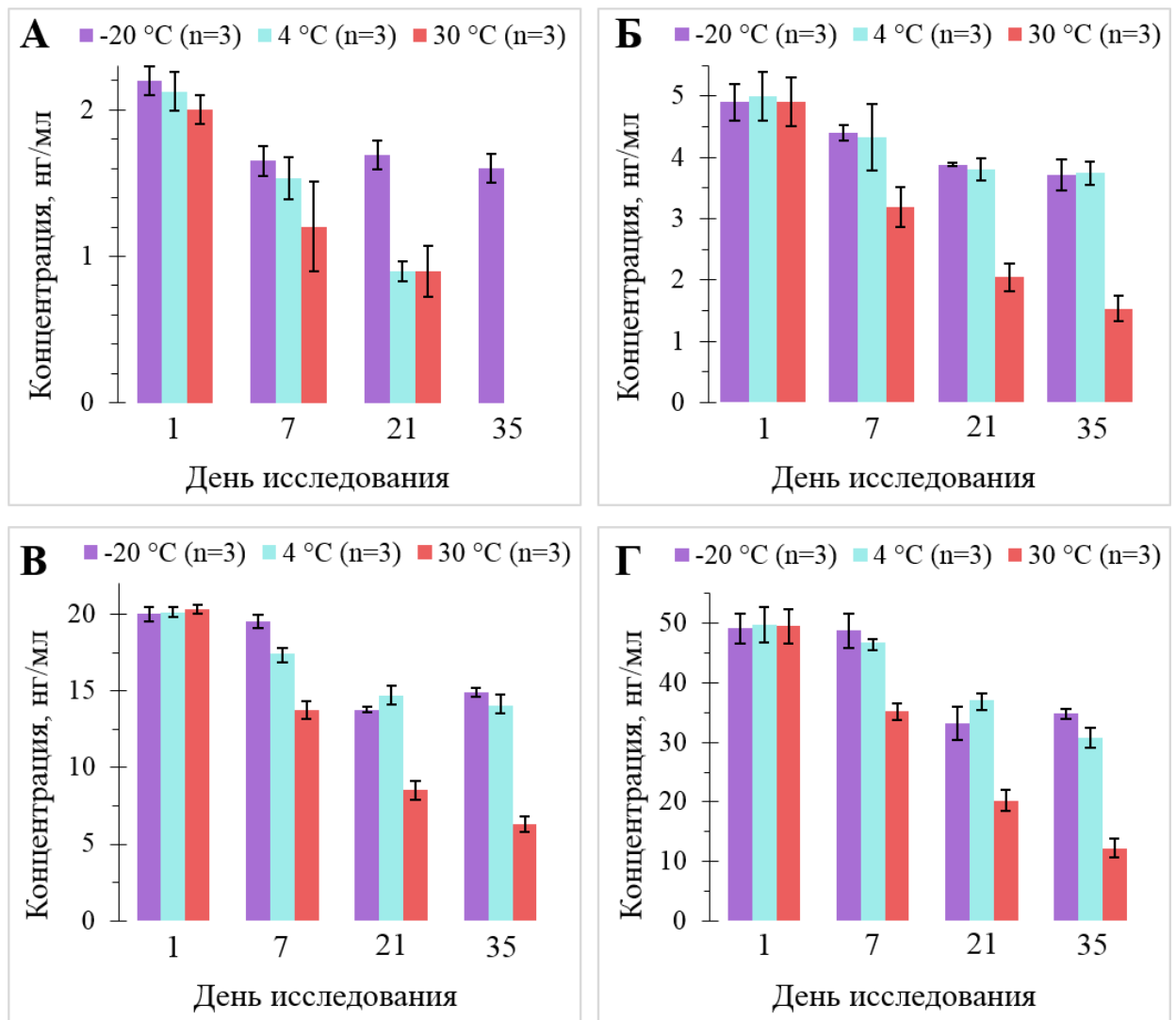


Рисунок 28 – Результаты исследования стабильности образцов плазмы с внесением бис(2-хлорэтил)сульфида при хранении в разных температурных условиях

В образцах плазмы крови с концентрацией 2 нг/мл по внесенному *бис*(2-хлорэтил)сульфиду, рисунок 28(А), обнаружение аналита возможно до 3-х недель при хранении в условиях повешенной температуры и при 4 °С. Через 3 недели после внесения содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах было на уровне 40 % от исходного. После трех циклов заморозки/оттаивания содержание аналита составило 1,6 нг/мл (73 % от исходного).

Содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов, в образцах плазмы крови, *in vitro* экспонированной *бис*(2-хлорэтил)сульфидом в концентрации 5 нг/мл, рисунок 28(Б), после хранения в течение 35 дней при 4 °С и трех циклов заморозки/оттаивания составило 3,7 нг/мл (75 % от исходного содержания в образцах). Остаточное содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах, хранившихся при 30 °С, было на уровне 1,5 нг/мл (30 % от исходного содержания).

В образцах плазмы крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрации 20 нг/мл, рисунок 28(В), содержание аналита на 35-ый день хранения при 4 °С, 30 °С и после трех циклов заморозки/оттаивания составило 14,0 нг/мл, 6,3 нг/мл и 14,9 нг/мл (70 %, 30 % и 75 % от исходного содержания в образцах соответственно).

В образцах плазмы крови с концентрацией 50 нг/мл по внесенному *бис*(2-хлорэтил)сульфиду, рисунок 28(Г), концентрация аналита после трех циклов заморозки/оттаивания составила 34,8 нг/мл (70 % от исходной концентрации). Остаточное содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида в образцах, хранившихся при 4 °С и 30 °С, было установлено на уровне 27,7 нг/мл и 12,3 нг/мл (56 % и 25 % от изначального содержания).

При хранении экстрактов в автосамплере в течение 24 ч и в морозильной камере в течение месяца содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида изменилось менее чем на 5 %.

3.3.6 Оценка абсолютной концентрации *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерируемого из состава белковых аддуктов

Градуировочная характеристика, используемая в настоящем исследовании, была построена с использованием образцов плазмы с внесением известного количества *бис*(2-хлорэтил)сульфида. Такой подход удобен для мониторинга стабильности образцов, т.к. позволяет без дополнительных перерасчетов наблюдать снижение способности аддуктов к регенерированию с увеличением срока и температуры хранения, а также снимает проблему учета влияния компонентов матрицы на результаты анализа. Однако рассчитанные концентрации *бис*(2-хлорэтил)сульфида в экстрактах из образцов плазмы крови не являются абсолютными, а даются в пересчете на количество *бис*(2-хлорэтил)сульфида, изначально внесенного в плазму.

Для установления абсолютной концентрации *бис*(2-хлорэтил)сульфида, образующегося после обработки соляной кислотой выделенного из плазмы крови белка, градуировочная характеристика строилась следующим образом: выделяли белок из бланковых образцов плазмы крови, не содержащих *бис*(2-хлорэтил)сульфид, после чего проводили его гидролиз соляной кислотой, в гидролизат вносили 10 мкл раствора нафталина-d₈ с концентрацией 200 нг/мл и стандартные растворы *бис*(2-хлорэтил)сульфида в диапазоне концентраций 0,03-10 нг/мл. Проводили экстракцию гексаном и анализировали сконцентрированные до ±50 мкл экстракты методом ГХ-МС/МС. По полученным данным строили градуировочную зависимость площади пика *бис*(2-хлорэтил)сульфида, нормализованной на площадь пика внутреннего стандарта, от количества аналита, внесенного в гидролизат. Уравнение линейной регрессии $S = 0,2437 \times C + 0,0201$; коэффициент детерминации $R^2=0,9997$ (n=9).

Абсолютную концентрацию *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов, рассчитывали по полученному уравнению линейной регрессии после анализа образцов плазмы

крови с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в диапазоне концентраций от 1 до 100 нг/мл. На рисунке 29 представлена зависимость концентрации регенерированного из состава белковых аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида от внесенного в плазму крови количества аналита.

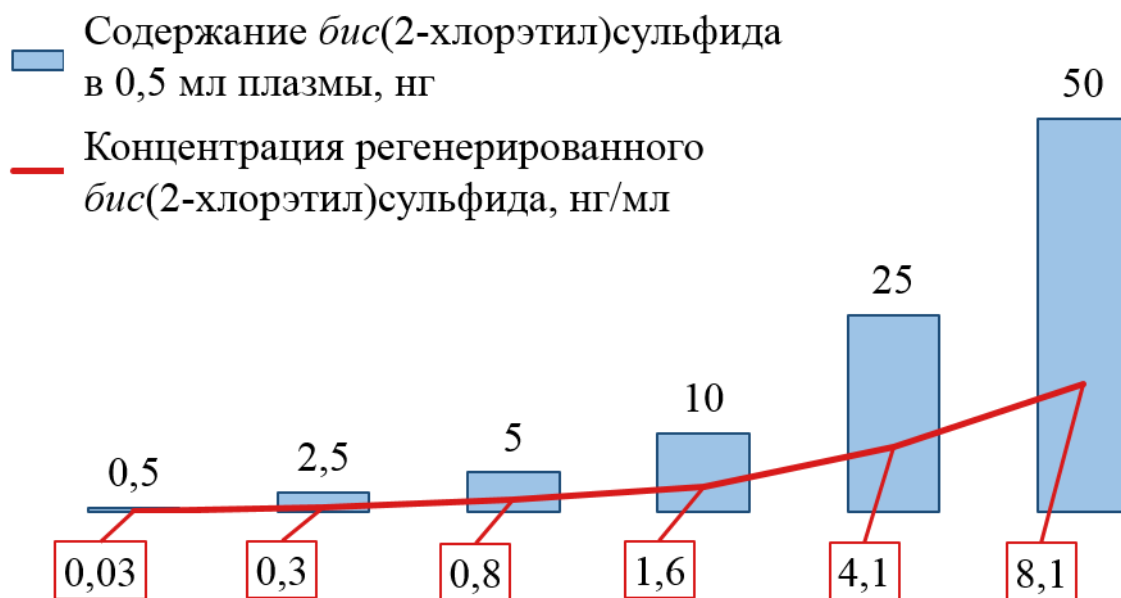


Рисунок 29 – Зависимость концентрации регенерированного из состава белковых аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида от количества внесенного в плазму крови аналита

Как видно из рисунка 29 с остатками глутаминовой и аспарагиновой кислот связывается около 16 % от изначально внесенного в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфида. При повышении концентрации *бис*(2-хлорэтил)сульфида, попавшего в плазму крови, от 1 до 100 нг/мл его количество, связанное с белками плазмы, пропорционально повышается, т.е. насыщения активных центров не происходит. Определение абсолютной концентрации *бис*(2-хлорэтил)сульфида, который регенерируется из белковых аддуктов плазмы крови, важно для реконструкции полученной дозы в случае экспозиции *бис*(2-хлорэтил)сульфидом.

3.3.7 Апробация разработанной методики определения

бис(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов

Апробацию разработанной методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови, осуществляли в рамках участия лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» в 6-м квалификационном тесте ОЗХО по анализу биомедицинский проб (BioPT-6, 2021 г.) в качестве лаборатории, ответственной за разработку сценария и оценку стабильности разосланных участникам теста проб.

Исследовали 4 случайно выбранных лабораторией ОЗХО набора по три образца плазмы: один бланковый образец и два образца с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида в концентрациях 20 и 50 нг/мл. Необходимо было подтвердить, что образцы, полученные участниками, стабильны в течение срока проведения испытаний (41 день). По правилам квалификационных тестов ОЗХО образцы хранились при 4 °С (три набора) и при 30 °С (один набор). Анализ осуществляли на 13-ый, 19-ый, 23-ий, 35-ый и 41-ый день после приготовления проб. В каждом образце проводили количественное определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов, методом ГХ-МС/МС. Результаты исследования стабильности образцов плазмы крови, разосланных участникам BioPT-6, представлены на рисунке 30. Критерием стабильности являлось сохранение содержания добавленных соединений в процессе хранения в разных температурных условиях на уровне не менее 25 % от начальной концентрации.

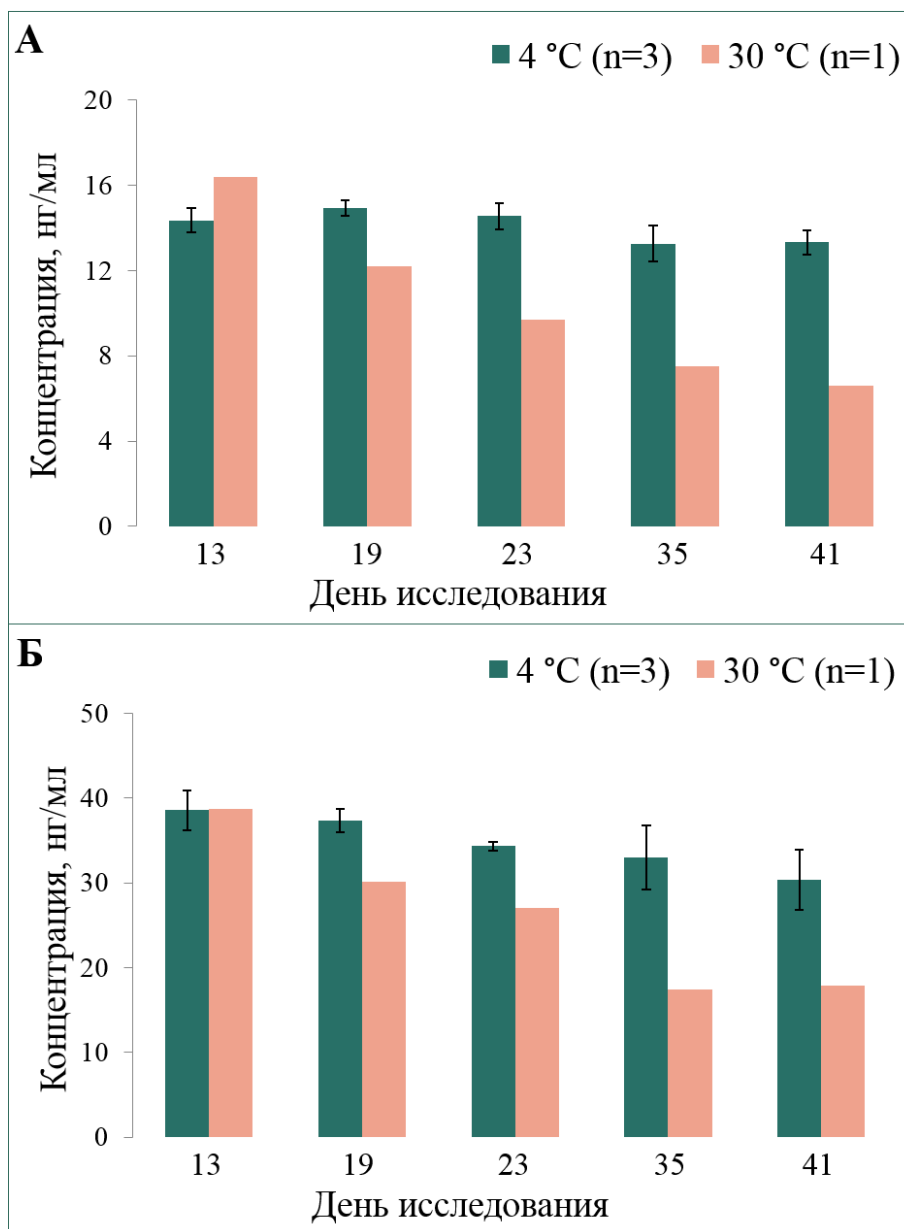


Рисунок 30 – Результаты исследования стабильности образцов плазмы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида при хранении в разных температурных условиях в рамках BioPT-6

Определение аналитов было возможно вплоть до 41 дня после приготовления образцов независимо от условий хранения. В образцах плазмы крови с концентрацией по внесённому *бис*(2-хлорэтил)сульфиду 20 нг/мл (рисунок 30А) содержание *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава белковых аддуктов, при температурах хранения образцов 4 °C и 30 °C составило 13,3 нг/мл и 6,6 нг/мл соответственно.

Остаточное содержание аналита в образцах плазмы крови с изначальной концентрацией по внесенному *бис*(2-хлорэтил)сульфиду 50 нг/мл (рисунок 30Б) после 41 дня хранения при 4 °С и 30 °С было на уровне 30,4 и 17,9 нг/мл.

Таким образом была проведена успешная апробация разработанной методики определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови, в рамках 6-го квалификационного теста ОЗХО по анализу биомедицинских проб. В результате проведенных исследований расширен допустимый временной интервал хранения образцов плазмы с внесением *бис*(2-хлорэтил)сульфида и установлена возможность количественного определения аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида остатками глутаминовой и аспарагиновой кислот в образцах плазмы крови после хранения в охлажденном виде и при повышенной температуре в течение, по крайней мере, 41 дня после приготовления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении диссертационного исследования достигнута поставленная цель, а именно: разработаны аналитические схемы определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его трансформации в строительных материалах и биомедицинских пробах методом тандемной газовой хроматомасс-спектрометрии. При валидации методик, положенных в основу предложенных схем, оценены границы их применения.

Показано, что анализ смывов с поверхностей для контроля остаточных количеств *бис*(2-хлорэтил)сульфида в конструкционных материалах малоинформативен, поэтому необходимо также исследовать «глубинные пробы» конструкционных материалов.

Схема контроля элементов инженерной инфраструктуры бывших объектов УХО при их подготовке к перепрофилированию заключается в:

1. отборе проб смывов с поверхностей технологического оборудования марлевыми тампонами, смоченными хлористым метиленом, экстракции целевых соединений из тампонов хлористым метиленом при обработке ультразвуком, концентрировании экстракта под током азота до 200 мкл и анализе методом ГХ-МС/МС-ИЭ. Пределы обнаружения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана были установлены на уровне 0,2 нг/дм² и 0,05 нг/дм² соответственно при ПДУ для *бис*(2-хлорэтил)сульфида 200 нг/дм²;

2. отборе «глубинных проб» строительных материалов и полимерных элементов инфраструктуры, измельчении/гомогенизировании проб, экстракции 2-хлорпропаном целевых соединений при обработке ультразвуком, концентрировании экстракта под током азота до 200 мкл и анализе методом ГХ-МС/МС-ИЭ. Пределы обнаружения *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана для разных матриц были установлены на уровне 0,7-0,9 нг/г и 0,2-1,0 нг/г соответственно при ПДК для *бис*(2-хлорэтил)сульфида 100 нг/г.

Для установления факта экспозиции к *бис*(2-хлорэтил)сульфиду были выбраны наиболее ретроспективные и, в то же время, наименее изученные биомаркеры. На сегодняшний день наиболее высокая чувствительность при определении этих биомаркеров достигается при использовании метода ГХ-МС/МС.

Схема определения глобинового аддукта заключается в обработке выделенного из эритроцитарной массы глобина пентафторфенилизотиоцианатом с последующей дериватизацией полученного производного по гидроксильной группе гептафтормасляным ангидридом для улучшения хроматографических характеристик. Анализ осуществляется методом ГХ-МС/МС в режимах отрицательной химической ионизации и ионизации электронами. Пределы обнаружения по внесенному в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду при анализе методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ были установлены на уровне 5 нг/мл и 15 нг/мл соответственно. Показано, что с сайтом N-концевого валина в глобине взаимодействует ориентировочно 3-4 % внесенного в пробу цельной крови *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

Схема определения регенерированного из состава белковых аддуктов плазмы крови *бис*(2-хлорэтил)сульфида заключается в обработке концентрированной соляной кислотой выделенного из плазмы белка, добавлении в гидролизат нафталина-d₈ в качестве внутреннего стандарта, экстракции аналита и ВС гексаном, концентрировании экстракта под током азота до 50 мкл и анализе методом ГХ-МС/МС-ИЭ. Установлено, что с остатками глутаминовой и аспарагиновой кислот связывается около 16 % от изначально внесенного в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфида.

Все аналитические схемы могут быть реализованы на одном приборе без замены хроматографической колонки, что обеспечивает быстрое проведение комплексных расследований инцидентов, связанных с *бис*(2-хлорэтил)сульфидом.

ВЫВОДЫ

1. Предложена схема аналитического контроля строительных материалов и объектов инженерной инфраструктуры бывших предприятий по уничтожению *бис*(2-хлорэтил)сульфида на этапе конверсии, основанная на определении *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в смывах с поверхностей и измельченных образцах строительных материалов. Показано, что после их нанесения на плитку ПВХ в количестве 100 нг/дм² и взятии смывов через 30 мин извлекается лишь 9 % *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 5 % 1,4-дителиана. С металлических поверхностей и ламината аналиты практически не извлекались, в ретроспективном режиме информативен анализ «глубинных» проб.

2. Установлено, что матричные факторы практически не влияют на ГХ-МС/МС определение *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в строительных материалах различной природы, что обеспечивает возможность унифицированного подхода к их анализу.

3. При проведении исследования стабильности *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана в образцах строительных материалов во времени установили, что более 50 % исходной концентрации *бис*(2-хлорэтил)сульфида сохраняется в полимерных материалах как минимум в течение 5 месяцев. 1,4-дителиан идентифицировали во всех образцах, кроме керамической плитки. Можно предположить, что полимерные материалы являются наиболее перспективными объектами для ретроспективной идентификации *бис*(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дителиана.

4. Проведена апробация разработанных методик при анализе проб, отобранных на бывшем предприятии по уничтожению химического оружия. *Бис*(2-хлорэтил)сульфид обнаружили в 15 % «глубинных проб» в концентрациях, не превышавших 5×10^{-2} мг/кг, что значительно ниже ПДК, и в 30 % смывах в количествах, не превышавших 2×10^{-6} мг/дм², что также существенно ниже ПДУ.

5. Разработана методика определения аддукта *бис*(2-хлорэтил)сульфида с глобином (НЕТЕ-Val). Для производных НЕТЕ-Val, полученных после дериватизации ПФИТЦ (НЕТЕ-Val-P) и двухстадийной дериватизации ПФИТЦ и ГФМА (НЕТЕ-Val-P-P) получены масс-спектрометрические и хроматографические характеристики. При апробации методики в условиях оптимизированной пробоподготовки пределы обнаружения НЕТЕ-Val-P-P методами ГХ-МС/МС-ОХИ и ГХ-МС/МС-ИЭ составили 5 и 15 нг/мл по внесённому в кровь *бис*(2-хлорэтил)сульфиду.

6. Разработана и валидирована методика определения *бис*(2-хлорэтил)сульфида, регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови. Предел обнаружения по внесённому в плазму *бис*(2-хлорэтил)сульфиду составил 0,5 нг/мл. Экспериментально установлено, что обнаружение аналита возможно, по крайней мере, в течение 35 суток при хранении плазмы в разных температурных условиях. Методика и сведения о стабильности аддуктов *бис*(2-хлорэтил)сульфида с белками плазмы и их способности к регенерации в зависимости от длительности и температурных условий хранения образцов применили при разработке сценария и подготовке проб для 6-го международного профессионального теста ОЗХО по анализу биопроб.

Автор выражает глубокую благодарность и.о. директора Радилову Андрею Станиславовичу и ведущему научному сотруднику лаборатории аналитической токсикологии Корягиной Надежде Леонидовне за ценные рекомендации, а также коллективу лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России за сотрудничество, помощь и поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. OPCW Quality Management System Document No.: QDOC_LAB_WI_BioPT04. 25 November 2021. Available from the OPCW Laboratory: proficiency@opcw.org (дата обращения 10.05.2022).
2. Convention on the Prohibition of the Development, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction. Technical Secretariat of the Organisation for Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, 1997. <http://www.opcw.org>. (дата обращения 11.05.2022)
3. Ellison, D. H. Handbook Of Chemical And Biological Warfare Agents // CRC Press. – 2008. – 800p.
4. Munro, N.B. The sources, fate and toxicity of chemical warfare agent degradation products / N.B. Munro, S.S. Talmage, G.D. Griffin [et al.] // Environmental Health Perspectives. – 1999. – V. 107., № 12. – P. 933-974.
5. Pesonen, M. Capsaicinoids, chloropicrin and sulfur mustard: possibilities for exposure biomarkers / M. Pesonen, K. Vähäkangas, M. Halme [et al.] // Front. Pharmacol. – 2010. – V. 1. – 12 p.
6. Ghabili, K. P.S. Agutter., M. Ghanei., K. Ansarin., Y. Panahi., M.M. Shoja. Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics / K. Ghabili, P.S. Agutter, M. Ghanei [et al] // Crit. Rev. Toxicol. – 2011. – P. 1-19.
7. Paromov, V. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy / V. Paromov, Z. Suntres, M. Smith [et al] // J. Burns Wounds. – 2007. – P. 60-85.
8. Balali-Mood, M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning / M. Balali-Mood, M. Hefazi // Fundam. Clin. Pharmacol. – 2005. – P. 297-315.
9. Ashmore, M.H. A critical evaluation of the implications for risk based land management of the environmental chemistry of Sulphur Mustard / M.H. Ashmore, P.C. Nathanail // Environ. Internat. – 2008. – V. 34. – P. 1192-1203.

10. Bizzigotti, G.O. Parameters for Evaluation of the Fate, Transport, and Environmental Impacts of Chemical Agents in Marine Environments / G.O. Bizzigotti, H. Castelly, A.M. Hafez [et al.] // *Chem. Rev.* – 2009. – V. 109. – P. 236-256.

11. Missiaen, T. Evaluation of a chemical munition dumpsite in the Baltic Sea based on geophysical and chemical investigations / T. Missiaen, M. Soderstrom, I. Popescu [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2010. – V. 408. – P. 3536-3553.

12. Roen, B.T. Headspace-trap gas chromatography–mass spectrometry for determination of sulphur mustard and related compounds in soil / B.T. Roen, E. Unneberg, J.A. Tornes [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – V. 1217. – P. 2171-2178.

13. Magnusson, R. Development of a dynamic headspace gas chromatography–mass spectrometry method for on-site analysis of sulfur mustard degradation products in sediments / R. Magnusson, T. Nordlander, A. Östin // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1429. – P. 40-52.

14. Hemstrom, P. Identification and toxicological evaluation of cyclic sulfonium ion degradation products of sulphur mustard / P. Hemstrom, K.H. Holmgren, B.E. Hammarstrom [et al.] // *Marine Environ. Res.* – 2020. – V. 162. – P. 105047.

15. Black, R.M. Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products / R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – V. 662. – P. 301-321.

16. Radilov, A.S. Toxicological and Public Health Aspects of Two-Stage Technology of Chemical Warfare Agents Destruction in Russia // *NATO Security through Science Series.* – 2006. – P. 211–215.

17. Кондратьев, В.Б. Битумирование как метод переработки реакционных масс, полученных при детоксикации люизита и ипритно-

люизитных смесей / В.Б. Кондратьев, В.В. Шелученко, М.В. Корольков [и др.] // Рос. хим. ж. – 2010. – Т. 54, №4. – С. 42-46.

18. Шкодич, П.Е. Эколого-гигиенические аспекты проблемы уничтожения химического оружия / П.Е. Шкодич, В.Ф. Желтобрюхов, В.В. Клаучек // Волгоград, 2004. 233 с.

19. Чупис, В.Н. Исследование продуктов реакционных масс, полученных в результате этаноламинной детоксикации иприта / В.Н. Чупис, О.Ю. Растегаев, В.И. Марьин [и др.] // Журнал прикладной химии. – 2007. – Т. 80., Вып.11. – С. 1853-1857.

20. Савельева, Е.И. Исследование состава газовыделений битумно-солевых масс, включающих продукты уничтожения иприта / Е.И. Савельева, А.С. Радилов, Т.А. Кузнецова [и др.] // Журнал прикладной химии. 1999. – Т.72, № 9. – С. 1501-1505.

21. Британов, Н.Г. Гигиенические аспекты перепрофилирования или ликвидации объектов по хранению и уничтожению химического оружия: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Британов Николай Григорьевич: Волгоградский государственный медицинский университет. – 2015. – 298 с.

22. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16/items/289936> (дата обращения 12.05.2022).

23. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16/items/288804> (дата обращения 12.05.2022).

24. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16/items/288811> (дата обращения 12.05.2022).

25. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16/items/289940> (дата обращения 12.05.2022).

26. Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16/items/289942> (дата обращения 12.05.2022).

27. Федеральный реестр. Отдельный раздел «1-ХО». «Аттестованные методики измерений содержания отравляющих веществ, токсичных химикатов, других вредных и загрязняющих веществ, подлежащих контролю в сфере химического разоружения».

28. Новиков, С.В. Аналитическое сопровождение работ по ликвидации химического оружия. // Рос. хим. ж. – 2007. – Т.1, №2. – С. 109-118.

29. Коваленко, И.В. Методическое обеспечение контроля отравляющих веществ кожно-нарывного действия и продуктов их деструкции в объектах техногенной и природной сред / И.В. Коваленко, С.В. Садовников, М.В. Ферезанова [и др.] // Рос. хим. ж. – 2010, Т.54, №4. – С. 167-172.

30. МВИ 031-05-234-07. Методика выполнения измерений содержания иприта в материалах строительных конструкций газохроматографическим методом с применением пламенно- фотометрического детектора. – Саратов: СВИ РХБЗ, 2007. – ФР.1-ХО.31.2007.234А.

31. Британов, Н.Г. Токсиколого-гигиеническое обеспечение безопасности процесса ликвидации и перепрофилирования объектов по хранению и уничтожению химического оружия / Н.Г. Британов, Б.Н. Филатов, В.В. Клаучек [и др.] // Токс. вестник. – 2013. –Т.118, №1. – С. 35-46.

32. Федеральный закон от 02.05.1997 № 76-ФЗ (ред. от 08.12.2020) «Об уничтожении химического оружия» [Электронный ресурс]. – <http://www.consultant.ru/> (дата обращения 16.03.2022).

33. Федеральная целевая программа «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации». Утверждена Постановлением Правительства РФ от 21.03.1996 № 305 (ред. от 16.11.2018) [Электронный ресурс]. – <http://www.consultant.ru/> (дата обращения 16.03.2022).

34. Hernon-Kenny, L.A. Comparison of latex body paint with wetted gauze wipes for sampling the chemical warfare agents VX and sulfur mustard from common indoor surfaces / L.A. Hernon-Kenny, D.L. Behringer, M.D. Crenshaw // *Forensic Science International*. – 2016. – V. 262. – P. 143-149.

35. Ma, B. Optical detection of sulfur mustard contaminated surfaces based on a sprayable fluorescent probe / B. Ma, G. Zuo, B. Dong [et al.] // *New J. Chem.* – 2021. – V. 45. – P. 20569-20574.

36. Stone, H. Surface decontamination for blister agents Lewisite, sulfur mustard and agent yellow, a Lewisite and sulfur mustard mixture / H. Stone, D. See, A. Smiley [et al.] // *J. Hazard. Mater.* – 2016. – V. 314. – P. 59-66.

37. Wils, E.R.J. Determination of mustard gas and related vesicants in rubber and paint by gas chromatography-mass spectrometry / E.R.J. Wils, A.G. Hulst, A.L. de Jong // *J. Chromatogr.* – 1992. – V. 625. – P. 382-386.

38. Brevett, C.A.S. Degradation of the blister agent sulfur mustard, bis(2-chloroethyl) sulfide, on concrete / C.A.S. Brevett, K.B. Sumpter, G.W. Wagner [et al.] // *J. Hazard. Mater.* – 2007. – V. 140. – P. 353-360.

39. Annesley, T.M. Ion suppression in mass spectrometry // *Clin. Chem.* – 2003. – V. 49, №7. – P. 1041-1044.

40. Xu, B. A novel approach for high sensitive determination of sulfur mustard by derivatization and isotope-dilution LC-MS/MS analysis / B. Xu, C. Zong, Z. Nie [et al.] // *Talanta*. – 2015. – V. 132. – P. 245-251.

41. Prihed, H. A novel approach for the detection and identification of sulfur mustard using liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry based on its selective oxidation to sulfur mustard monoxide with N-iodosuccinimide / H. Prihed, A. Shifrovich, T. Shamai Yamin [et al.] // *J. Mass Spectr.* – 2021. – V. 56, №5. – 5 p.

42. Davison, C. Metabolism of bis-2-chloroethyl sulfide (sulfur mustard) / C. Davison, R.S. Rozman, P.K. Smith // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – V. 7. – P. 65-74.

43. Roberts, J.J. Studies of the mode of action of alkylating agents. VI. The metabolism of bis-2-chloroethylsulfide (mustard gas) and related compounds / J.J. Roberts, G.P. Warwick // *Biochem. Pharmacol.* – 1963. – V. 12. – P. 1329-1334.

44. Maisonneuve, A. Biological fate of sulfur mustard in rat: Toxicokinetics and disposition / A. Maisonneuve, I. Callebat, L. Debordes [et al.] // *Xenobiotica.* – 1993. – V. 23. – P. 771-780.

45. Hambrook, J.L. Biological fate of sulfur mustard (1,1-thiobis(2-chloroethane)): Uptake, distribution and retention of ³⁵S in skin and in blood after cutaneous application of ³⁵S-sulfur mustard in rat and comparison with human blood in vitro / J.L. Hambrook, D.J. Howells, C. Schock // *Xenobiotica.* – 1993. – V. 23. – P. 537-561.

46. Davison, C. Studies on the metabolic fate of bis(2-chloroethyl)sulfide (mustard gas) in the mouse and human / C. Davison, R.S. Rozman, L. Bliss [et al.] // *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* – 1957. – V. 2. – P. 195.

47. Noort, D. Biomonitoring of Exposure to Chemical Warfare Agents: A Review / D. Noort, H.P. Benschop, R.M. Black // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2002. – V. 184. – P. 116-126.

48. Орлова, О.И. Методы обнаружения метаболитов сернистого иприта в объектах биологического происхождения. Аналитический обзор / О.И. Орлова, Е.И. Савельева, Н.С. Хлебникова // *Журн. аналит. хим.* – 2013. – Т. 68, №1. – С. 4-14.

49. Рыбальченко, И.В. Хромато-масс-спектрометрические методы определения маркеров и биомаркеров отравляющих веществ / И.В. Рыбальченко, Т.М. Байгильдиев, И.А. Родин // *Журн. аналит. хим.* – 2021. – Т. 76. № 1. – С. 32-50.

50. Witkiewicz, Z. Analysis of the Precursors, Simulants and Degradation Products of Chemical Warfare Agents / Z. Witkiewicz, S. Neffe, E. Sliwka [et al.] // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2018. – V. 48, №5. – P. 337-371.

51. Ленинский, М.А. Методы разделения и концентрирования при определении высокотоксичных органических соединений (отравляющих веществ) / М.А. Ленинский, М.Д. Шачнева, Е.И. Савельева [и др.] // Журн. аналит. хим. – 2021. – Т. 76, № 9 – С. 771-787. (Leninskii, M.A. Separation and preconcentration methods for the determination of highly toxic organic compounds (poisons) / M.A. Leninskii, M.D. Shachneva, E.I. Savel'eva [et al.] // J. Anal. Chem. – 2021. – Т. 76. № 9. – С. 1029-1042.

52. Родин, И.А. Определение продуктов трансформации отравляющих веществ в биологических объектах и объектах окружающей среды методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии: диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук / Родин Игорь Александрович: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. – 2017. – 277 с.

53. Mohammadi, A. Synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles coated with thiodiglycol / A. Mohammadi, M. Barikani // Mater. Charact. – 2014. – V. 90. – P. 88–93.

54. Nowak, B.P. Mediating Oxidation of Thioethers with Iodine—A Mild and Versatile Pathway to Trigger the Formation of Peptide Hydrogels / B.P. Nowak, L. Schlichter, B.J. Ravoo. // Angew. Chem. Int. Ed. – 2022. – 202201791.

55. Jiang, D. Selective synthesis of thiodiglycol dicarboxylic acid esters via p-TsOH/C-catalysed direct esterification / D. Jiang, M. Huang // J. Chem. Sci. – 2012. – V. 124, №5. – P. 1087-1090.

56. Wils, E.R.J. Analysis of thiodiglycol in urine of victims of an alleged attack with mustard gas / E.R.J. Wils, A.G. Hulst, A.L. de Jong [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 1985. – V. 9. – P. 254-257.

57. Wils, E.R.J. Analysis of thiodiglycol in urine of victims of an alleged attack with mustard gas, Part II / E.R.J. Wils, A.G. Hulst, J. van Laar // J. Anal. Toxicol. – 1988. – V. 12. – P. 15-19.

58. Black, R.M. Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry / R.M. Black, R.W. Read // *J. Chromatogr. B.* – 1995. – V. 665. – P. 97-105.

59. Black, R.M. Analysis of 1,1'-sulphonylbis[2-(methylsulphinyl)ethane] and 1-methylsulphinyl-2-[2-(methylthio)ethylsulphonyl]ethane, metabolites of sulphur mustard, in urine using gas chromatography-mass spectrometry / R.M. Black, R.J. Clarke, R.W. Read // *J. Chromatogr.* – 1991. – V. 558. – P. 405-414.

60. Браун, А.В. Обнаружение продуктов трансформации отравляющих веществ жидкостной хромато-масс-спектрометрией: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Браун Аркадий Владимирович: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. – 2013. – 161 с.

61. Eyison, R.K. Optimized Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio) ethane] Quantification in Human Urine / R.K. Eyison, S. Sezigen, M. Ortatatli [et al.] // *J. Chrom. Sci.* – 2019. – P. 1-6.

62. Koryagina, N.L. Determination of Thiodiglycol and Its Oxide in Biomedical Samples by Gas Chromatography–Mass Spectrometry / N.L. Koryagina, E.I. Savel'eva, N.S. Khlebnikova [et al.] // *J. Anal. Chem.* – 2018. – V. 73. – P. 1209-1216.

63. Sezigen, S. Evidence of sulfur mustard exposure in victims of chemical terrorism by detection of urinary β -lyase metabolites / S. Sezigen, R.K. Eyison, E. Kilic [et al.] // *Clin. Toxicol.* – 2019. – 9 p.

64. Boyer, A.E. Quantitation of the sulfur mustard metabolites 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] and thiodiglycol in urine using isotope-dilution Gas chromatography-tandem mass spectrometry / A.E. Boyer, D. Ash, D.B. Barr, [et al.] // *J Anal Toxicol.* – 2004. – V. 28, №5. – P. 327-332.

65. Daly, J.D. A sensitive method for quantitation of beta-lyase metabolites of sulfur mustard as 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] (SBMTE) in human urine by isotope dilution liquid chromatography-positive ion-electrospray-tandem mass spectrometry / J.D. Daly, C.M. O'Hehir, G.M. Frame // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – V. 850. – P. 120-127.

66. Riches, J. Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry / J. Riches, R.W. Read, R.M. Black // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – V. 845. – P. 114-120.

67. Bevan, M.J. High throughput quantitative analysis of the β -lyase sulfur mustard metabolite, 1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethane] in urine via high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry / M.J. Bevan, M.T. Wogen, M.D. Lunda [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2017. – V. 1051. – P. 1-8.

68. Xu, H. Four sulfur mustard exposure cases: Overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring / H. Xu, Z. Nie, Y. Zhang [et al.] // *Tox. Reports.* – 2014. – V. 1. – P. 1533-543.

69. Read, R.W. Analysis of the Sulfur Mustard Metabolite 1,1'-Sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethane] in Urine by Negative Ion Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / R.W. Read, R.M. Black // *J. Anal. Toxicol.* – 2004. – V. 28. – P. 352-356.

70. Rodin, I.A. Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1'-sulfonylbis[2-s-(n-acetylcysteinyl)ethane] in plasma and urine by liquid chromatography-negative electrospray-tandem mass spectrometry / I.A. Rodin, A.V. Braun, E.I. Savelieva [et al.] // *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* – 2011. – V. 34. – P. 1676-1685.

71. Liu, C.C. Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction / C.C. Liu, S.L. Liu, H.L. Xi [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – V. 1492. – P. 41-48.

72. Orlova, O.I. Simultaneous Determination of Sulfur Mustard Adducts with Guanine and Acetylcysteine in Urine by High-Resolution High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry / O.I. Orlova, G.V. Karakashev, E.I. Savel'eva. // J. Anal. Chem. – 2020. – V. 75, №8. – P. 1011-1017.

73. Орлова, О.И. Исследование защитного действия N-ацетилцистеина при поражениях сернистым ипритом с учётом результатов биомониторинга / О.И. Орлова, Е.И. Савельева, Г.В. Каракашев [и др.] // Мед. экстр. сит. – 2019. – Т. 21, №1. – С. 145-154.

74. Zhang, Y. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry / Y. Zhang, Z. Nie, J. Chen [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2014. – V. 961. – P. 29-35.

75. Орлова О.И. Хромато-масс-спектрометрическое определение аддуктов алкилирующих агентов с ДНК и ацетилцистеином в биопробах / Орлова Ольга Игоревна: Кубанский государственный университет. – 2020. – 105 с.

76. Cheng, X. Advances in sulfur mustard-induced DNA adducts: Characterization and detection / X. Cheng, C. Liu, Y. Yang [et al.] // Toxicol. Let. – 2021. – V. 344. – P. 46-57.

77. Савельева, Е.И. Определение аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами как биомаркёров экспозиции/эффекта / Е.И. Савельева, Н.Л. Корягина, О.И. Орлова // Мед. экстр. сит. – 2018. – Т. 20, №3. – С. 451-463.

78. Wang, P. Analysis of Different Fates of DNA Adducts in Adipocytes Post-sulfur Mustard Exposure in Vitro and in Vivo Using a Simultaneous UPLC-MS/MS Quantification Method / P. Wang, Y. Zhang, J. Chen [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 2015. – V. 28, №6. – P. 1224-1233.

79. Noort, D. Alkylation of Human Serum Albumin by Sulfur Mustard in Vitro and in Vivo: Mass Spectrometric Analysis of a Cysteine Adduct as a

Sensitive Biomarker of Exposure / D. Noort, A.G. Hulst, L.P.A. de Jong [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 1999. – V. 12, №8. – P. 715-721.

80. Steinritz, D. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations / D. Steinritz, E. Striepling, K.D. Rudolf [et al.] // Toxicol. Let. – 2016. – V. 244. – P. 112-120.

81. Gandor, F. Evidence of Sulfur Mustard Exposure in Human Plasma by LC–ESI–MS–MS Detection of the Albumin-Derived Alkylated HETE–CP Dipeptide and Chromatographic Investigation of Its Cis/Trans Isomerism / F. Gandor, M. Gawlik, H. Thiermann [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2015. – V. 39. – P. 270-279.

82. John, H. Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys34 using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis / H. John, M. Siegert, F. Gandor [et al.] // Toxicol. Let. – 2016. – V. 244. – P. 103-111.

83. John, H. Novel procedures for analysis of dried plasma using microsampling devices to detect sulfur mustardalbumin adducts for verification of poisoning / H. John, S. Willoh, P. Hörmann [et al.] // Anal. Chem. – 2016. – V. 88, №17. – P. 8787-8794.

84. John, H. Forensic evidence of sulfur mustard exposure in real cases of human poisoning by detection of diverse albumin-derived protein adducts / H. John, M. Koller, F. Worek [et al.] // Arch. Toxicol. – 2019. – V. 93. – P. 1881-1891.

85. Andacht, T.M. An Enhanced Throughput Method for Quantification of Sulfur Mustard Adducts to Human Serum Albumin Via Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry / T.M. Andacht, B.G. Pantazides, B.S. Crow [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2014. – V. 38. – P. 8-15.

86. Smith J.R. Analysis for Plasma Protein Biomarkers Following an Accidental Human Exposure to Sulfur Mustard / J.R. Smith, B.R. Capacio, W.D. Korte // J. Anal. Toxicol. – 2008. – V. 32. – P. 17-24.

87. Pantazides, B.G. A Simplified Method for Quantifying Sulfur Mustard Adducts to Blood Proteins by Ultra-High Pressure Liquid Chromatography-Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry / B.G. Pantazides, B.S. Crow, J.W. Garton [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 2015. – V. 28, №2. – P. 256-261.

88. John, H. Evidence of sulfur mustard poisoning by detection of the albumin-derived dipeptide biomarker C(-HETE)P after nicotinylation / H. John, A. Richter, H. Thiermann // Drug Test Anal. – 2021. – V. 13. – P. 1593-1602.

89. Richter, A. Alkylated albumin-derived dipeptide C(-HETE)P derivatized by propionic anhydride as a biomarker for the verification of poisoning with sulfur mustard / A. Richter, M. Siegert, H. Thiermann [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2021. – V. 413. – P. 4907-4916.

90. Capacio, B.R. Monitoring Sulfur Mustard Exposure by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Thiodiglycol Cleaved from Blood Proteins / B.R. Capacio, J.R. Smith, M.T. DeLion [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2004. – V. 28, № 5. – P. 306-310.

91. Lawrence, R.J. Improvements in the methodology of monitoring sulfur mustard exposure by gas chromatography-mass spectrometry analysis of cleaved and derivatized blood protein adducts / R.J. Lawrence, J.R. Smith, B.R. Capacio // J. Anal. Toxicol. – 2008. – Vol. 32, № 1. – P. 31-36.

92. Capacio, B.R. Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Sulfur Mustard-Plasma Protein Adducts: Validation and Use in a Rat Inhalation Model / B.R. Capacio, J.R. Smith, R.J. Lawrence [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2008. – V. 32, № 1. – P. 37-43.

93. Young, S.A. Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Verification of Sulfur Mustard Exposure in Humans through the Conversion of Protein Adducts to Free Sulfur Mustard / S.A. Young, B.R. Capacio // Chem. Res. Toxicol. – 2020. – V. 33, № 7. – P. 1941-1949.

94. Chen, B. A Quantitative Approach for Retrospective Analysis of Sulfur Mustard Exposure Based on Multiple Novel-Adduct Biomarkers in Plasma by Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass

- Spectrometry / B. Chen, Z. Ren, Q. Zhang [et al.] // URL: <https://ssrn.com/abstract=3981368>.
95. Schmeisser, W. Transthyretin as a target of alkylation and a potential biomarker for sulfur mustard poisoning: Electrophoretic and mass-spectrometric identification and characterization / W. Schmeisser, R. Lueling, D. Steinritz [et al.] // *Drug Test Anal.* – 2022. – V. 14, №1. – P. 80-91.
96. Farmer, P.B. Monitoring human exposure to ethylene oxide by the determination of haemoglobin adducts using gas chromatography–mass spectrometry / P.B. Farmer, E. Bailey, S.M. Gorf [et al.] // *Carcinogenesis.* – 1986. – V. 7, №4. – P. 637-640.
97. Schettgen, T. Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population / T. Schettgen, B. Rossbach, B. Kütting [et al.] // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* – 2004. – V. 207, №6. – P. 531-539.
98. Boogaard, P.J. Use of haemoglobin adducts in exposure monitoring and risk assessment // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – V. 778. – P. 309–322.
99. Perez, H.L. Haemoglobin adducts of epoxybutanediol from exposure to 1,3-butadiene or butadiene epoxides / H.L. Perez, J. Lahdetie, H.H. Landin [et al.] // *Chem. Bio. Interact.* – 1997. – V. 105, №3. – P. 181-198.
100. Camacho, O.M. Use of the Acrylonitrile Haemoglobin Adduct N-(2-cyanoethyl)valine as a Biomarker Of Compliance in Smokers Switching to Tobacco Heating Products / O.M. Camacho, M. McEwan, N. Gale [et al.] // *Preprints.* – 2021. – 2021080085.
101. Pedersen, M. Hemoglobin adducts of acrylamide in human blood – What has been done and what is next? / M. Pedersen, E. Vryonidis, A. Joensen [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – V. 161. – 112799.
102. Black, R.M. Biological fate of sulphur mustard: in vitro alkylation of human haemoglobin by Sulphur mustard / R.M. Black, J.M. Harrison, R.W. Read // *Xenobiotica.* – 1997. – V. 27, №1. – P. 11-32.

103. Noort, D. Characterization of Sulfur Mustard Induced Structural Modifications in Human Hemoglobin by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / D. Noort, E.R. Verheij, A.G. Hulst [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 1996. – V. 9. – P. 781-787.

104. Noort, D. Synthesis and mass spectrometric identification of the major amino acid adducts formed between sulphur mustard and haemoglobin in human blood / D. Noort, A.G. Hulst, H.C. Trap [et al.] // Arch. Toxicol. – 1997. – V. 71. – P.171-178.

105. Hallez, F. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of tryptic digest of human hemoglobin exposed to sulfur mustard / F. Hallez, A. Combes, C. Desoubries [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2021. – V. 1163. – 122518.

106. Hallez, F. Analysis of long-lived sulfur mustard-human hemoglobin adducts in blood samples by red blood cells lysis and on-line coupling of digestion on an immobilized-trypsin reactor with liquid chromatography-tandem mass spectrometry / F. Hallez, A. Combes, C. Desoubries [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2022. – V. 1665. – 462830.

107. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия. Москва: Просвещение. 1987. – 816 с.

108. Fidder, A. Monitoring of in vitro and in vivo exposure to sulfur mustard by GC/MS determination of the N-terminal valine adduct in hemoglobin after a modified Edman degradation / A. Fidder, D. Noort, A. L. de Jong [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 1996. – V. 9. – P. 788-792.

109. Törnqvist, M. Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method / M. Törnqvist, J. Mowrer, S. Jensen [et al.] // Anal. Biochem. – 1986. – V. 154, №1. – P. 255-266.

110. Noort, D. Procedure for Monitoring Exposure to Sulfur Mustard Based on Modified Edman Degradation of Globin / D. Noort, A. Fidder, H.P. Benschop [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2004. – V. 28, №5. – P. 311-315.

111. Nie, Z. Improvements in monitoring the N-terminal valine adduct in human globin after exposure to sulfur mustard and synthesis of reference chemicals / Z. Nie, Q. Liu, J. Xie // *Talanta*. – 2011. – Vol. 85. – P. 1154–1159.

112. Benschop, H.P. Verification of exposure to sulfur mustard in two casualties of the Iran–Iraq conflict / H.P. Benschop, G.P. van der Schans, D. Noort [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 1997 – V. 21. – P. 249-251.

113. Black, R.M. Biological fate of sulphur mustard: identification of valine and histidine adducts in haemoglobin from casualties of sulphur mustard poisoning / R.M. Black, R.J. Clarke, J.M. Harrison [et al.] // *Xenobiotica*. – 1997. – V. 27. – P. 499-512.

114. Benschop, H.P. Diagnosis and dosimetry of exposure to sulfur mustard: development of standard operating procedures: exploratory research on albumin and keratin adducts / H.P. Benschop, D. Noort, G.P. van der Schans [et al.] // *J. Appl. Toxicol.* – 2000. – P. 187-192.

115. Noort, D. Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass-spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study / D. Noort, A. Fidder, C.E. Degenhardt-Langelaan [et al.] // *J. Anal. Toxicol.* – 2008. – V. 32. – P. 25-30.

116. Walker, V.E. Molecular dosimetry of ethylene oxide: formation and persistence of N-(2-hydroxyethyl)valine in hemoglobin following repeated exposures of rats and mice / V.E. Walker, J.R. MacNeela, J.A. Swenberg [et al.] // *Cancer Res.* – 1992. – V. 52. – P. 4320-4327.

117. Шачнева, М.Д. Определения бис(2-хлорэтил)сульфида и 1,4-дигидроксиана в объектах техногенного происхождения методом ГХ-МС/МС-ИЭ / М.Д. Шачнева, Е.И. Савельева. Сборник материалов IV Всероссийской конференции с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». 27 сентября-3 октября 2020 г., Краснодар, с. 64.

118. Shachneva, M.D. Development of a unified method for determining sulfur mustard in objects of various matrix composition by gas chromatography-tandem mass spectrometry / M.D. Shachneva, E.I. Savelieva. Book of abstracts

Vth international conference «Actual scientific & technical issues of chemical safety». October 6-8, 2020 Kazan, Russia, P. 200-201.

119. Шачнева, М.Д. Возможности и ограничения анализа смывов с поверхностей для контроля контаминации объектов высокотоксичными органическими соединениями / М.Д. Шачнева, М.А. Ленинский, Е.И. Савельева // Мед. экстр. сит. 2021. – № 2. – С. 41-47.

120. Шачнева, М.Д. Совершенствование процедуры определения бис(2-хлорэтил)сульфида в материалах с высокой сорбционной активностью / М.Д. Шачнева, Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева // Аналитика и контроль. – 2021. – Т. 25, № 2. – С. 110-116.

121. Шачнева, М.Д. Определение бис(2-хлорэтил)сульфида и продуктов его трансформации в строительных материалах и биологических образцах методом тандемной газовой хроматомасс-спектрометрии / М.Д. Шачнева, Е.И. Савельева. Сборник материалов VI Всероссийского симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». 26 сентября-2 октября 2021 г., с. 226.

122. Корягина, Н.Л. Эколого-токсикологический мониторинг 2,2'-дихлордиэтилсульфида / Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, М.Д. Шачнева Сборник материалов Всероссийского симпозиума и школы-конференции молодых ученых «Физико-химические методы в междисциплинарных экологических исследованиях». 27 октября-3 ноября 2021 г. Севастополь. с. 41-42.

123. Rao, M.K. Synthesis, Characterization and Mass Spectrometric Analysis of Cysteine and Valine Adducts of Sulphur Mustard / M.K. Rao, M. Sharma, S.K. Raza [et al.] // Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. – 2003. – V. 178, №3. – P. 559–566.

124. Корягина, Н.Л. Усовершенствованный способ обнаружения глобинового аддукта сернистого иприта методом тандемной газовой хроматомасс-спектрометрии / Н.Л. Корягина, М.Д. Шачнева, А.И. Уколов [и др.] // Масс-спектрометрия. – 2017. – Т. 14, № 4. – С. 266-272.

(Koryagina, N.L. An Improved Procedure for the Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Detection of the Globin Adduct of Sulfur Mustard / N.L. Koryagina, M.D. Shachneva, A.I. Ukolov [et al.] // J. Anal. Chem. – 2018. – V. 73, № 13. – P. 1269–1274.

125. Корягина, Н.Л. Определение аддуктов глобина с сернистым ипритом методом газовой хроматографии тандемной масс-спектрометрии / Н.Л. Корягина, М.Д. Шачнева, А.И. Уколов [и др.]. Сборник материалов Всероссийской научной конференции «Медико-биологические проблемы обеспечения химической безопасности Российской Федерации». 17 февраля 2017 г., Санкт-Петербург, с. 166-169.

126. Шачнева, М.Д. Определение сернистого иприта, регенерированного из состава аддуктов с белками плазмы крови, методом ГХ-МС/МС / М.Д. Шачнева, Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева. Сборник материалов XI Всероссийской Научной конференции и школы «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», посвященной 100-летию со дня рождения И.Г. Юделевича. 16-20 августа 2021 г., Новосибирск. С. 157.

127. Шачнева, М.Д. Исследование стабильности аддуктов сернистого иприта с белками плазмы крови методом тандемной газовой хроматомасс-спектрометрии / М.Д. Шачнева, Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева // Масс-спектрометрия. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 115-120.