

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



БАЙГИЛЬДИЕВ ТИМУР МУРАТОВИЧ

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ
ЖИДКОСТНОЙ ТАЦДЕМНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ**

02.00.02 – Аналитическая химия

22 Июль 2017

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук



008712773

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель

Родин Игорь Александрович

доктор химических наук, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты

Савельева Елена Игоревна

доктор химических наук, заведующая лабораторией
аналитической токсикологии ФГУП «Научно-
исследовательский институт гигиесны, профпатологии и
экологии человека» ФМБА России

Григорьев Андрей Михайлович

доктор химических наук, судебный эксперт (химик-
эксперт), ГБУЗ МО «Бюро судебно-медицинской
экспертизы»

Аннолонова Светлана Александровна

кандидат химических наук, заведующая лабораторией
фармакокинетики и метаболомного анализа института
фармации и трансляционной медицины ФГАОУ ВО
«Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Министерства
здравоохранения РФ»

Защита состоится 20 декабря 2017 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.02.05 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет.

E-mail: dissovct02.00.02@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:
<http://istina.msu.ru/dissertations/83910480>

Автореферат разослан 15 ноября 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ананьевская И.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время в мире существует серьезная угроза применения химического оружия во время локальных вооруженных конфликтов и террористических атак. Химическое оружие – это один из видов оружия массового поражения, действие которого основано на использовании боевых отравляющих веществ, оказывающих поражающее действие на организм человека и животных.

Анализ объектов окружающей среды (различных типов вод, почв и грунто-пылевых смесей) позволяет судить о факте применения химического оружия, его хранении или утилизации, а анализ биологических образцов (крови и мочи) позволяет фиксировать степень воздействия на персонал, вовлеченный в мероприятия по ликвидации запасов химического оружия, а также людей, пострадавших во время террористических атак или локальных вооруженных конфликтов. Анализ биологических образцов становится особенно важным в условиях, когда доступ к месту предполагаемого применения химического оружия задерживается или невозможен, и результаты, полученные при проведении данного анализа, могут оказаться единственным источником информации для подтверждения или опровержения факта воздействия отравляющих веществ (ОВ).

Зарин, зоман, VX и российский (советский) VX (VR), относятся к классу нервно-паралитических отравляющих веществ (НПОВ). НПОВ необратимо связываются с ферментом ацетилхолинэстеразой, который отвечает за метаболизм ацетилхолина – медиатора, регулирующего работу нервной системы. В результате воздействия НПОВ на живые организмы вначале появляется сильное возбуждение, а затем паралл. внутренних органов, что приводит к смерти. В объектах окружающей среды и живых организмах фосфороганические НПОВ быстро гидролизуются с образованием характеристичных для данных отравляющих веществ алкилметилфосфоновых кислот (АМФК). АМФК, в свою очередь, медленно превращаются в конечный продукт гидролиза всех фосфороганических НПОВ (Рис. 1) – метилфосфоновую кислоту (МФК). Данные вещества принято рассматривать в качестве биомаркеров воздействия НПОВ на организм.

МФК является наиболее стабильным продуктом деструкции фосфороганических НПОВ. Период полураспада МФК в реакции с гидроксильными радикалами в воде составляет 18 лет. МФК является кислотой средней силы (pK_{a1} 2.12, pK_{a2} 7.29). При $pH > 5$ в водных растворах МФК существует преимущественно в диссоцииированной форме. МФК – малолетучее соединение, устойчивое к биоразложению, так как соединения, содержащие С-Р связь, не подвергаются расщеплению в процессе обмена веществ у млекопитающих и растений. Высокая стабильность МФК приводит к тому, что она может быть обнаружена в природных объектах или биологических образцах по прошествии длительного времени после воздействия НПОВ, что позволяет уверенно судить о факте применения, хранения и разработки химического оружия.

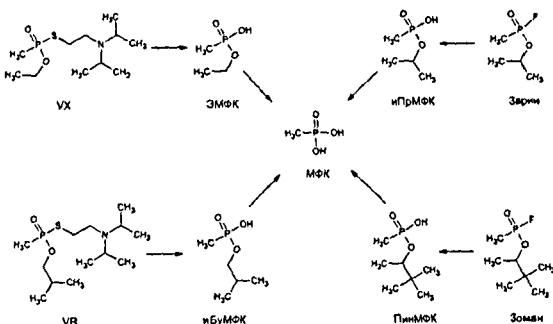


Рис. 1. Схема гидролиза НПОВ с образованием МФК (ЭМФК – этилметилфосфоновая кислота, иПрМФК – изопропилметилфосфоновая кислота, иБуМФК – изобутилметилфосфоновая кислота, ПинМФК – пинаколилметилфосфоновая кислота).

МФК является высокополярным соединением с низкой молекулярной массой ($M=96$ а.е.м.) и значительно отличается по свойствам от хорошо изученного класса алкилметилфосфоновых кислот. Высокая полярность и низкая молекулярная масса затрудняют определение МФК традиционными хроматографическими методами, такими как высокоеффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ), высокоеффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим или tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС-(МС)), газовая хроматография с масс-спектрометрическим или tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС-(МС)). Актуальная задача определения МФК на ультратонких (0.1 – 1 $\mu\text{г}/\text{мл}$) и низких (1 – 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$) уровнях в объектах окружающей среды и биологических образцах ранее не была решена.

Цель работы состояла в разработке новых подходов к хроматомасс-спектрометрическому определению МФК с пределами обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 $\mu\text{г}/\text{мл}$ в объектах окружающей среды и биологических образцах для надежного установления факта воздействия первично-паралитических отравляющих веществ.

Достижение поставленной цели предусматривало решение следующих задач:

1. Выбор реагентов для дериватизации, увеличивающих чувствительность хроматомасс-спектрометрического определения МФК в форме производного. Изучение закономерностей протекания реакции МФК с дериватизирующими агентами в водно-органических растворах и выбор условий проведения реакции.
2. Изучение особенностей удерживания МФК и производных МФК в условиях различных вариантов жидкостной хроматографии (обращенно-фазовая, гидрофильная, анионообменная).
3. Изучение ионизации и фрагментации МФК, а также производных МФК в условиях масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

4. Выбор условий пробоподготовки, обеспечивающих высокую степень извлечения МФК, а также эффективную очистку от мешающих определению компонентов в исследуемых объектах.
5. Разработка способов хроматомасс-спектрометрического обнаружения и определения МФК методом ВЭЖХ-МС/МС в объектах окружающей среды (природных водах и грунто-пылевых смесях) и биологических жидкостях (плазме крови и моче) с пределами обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл.
6. Апробация разработанных способов при анализе реальных образцов объектов окружающей среды и биологических жидкостей, в том числе изучение процессов выведения МФК после интоксикации лабораторных крыс несмертельными дозами ОВ.

Научная новизна.

Установлены особенности удерживания метилфосфоновой кислоты (МФК) в условиях обращенно-фазовой, гидрофильной и анионообменной жидкостной хроматографии.

Изучены реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом, позволяющей увеличить чувствительность масс-спектрометрического детектирования и минимизировать эффект подавления ионизации МФК, показана возможность проведения реакции дериватизации с п-метоксифенацилбромидом напрямую в водных объектах, установлены особенности масс-спектров первого и второго порядка производного МФК с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом в условиях электрораспылительной ионизации, позволяющие выбирать характеристические переходы для детектирования.

Установлены особенности удерживания производных МФК с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом в условиях обращенно-фазовой и гидрофильной хроматографии. Выбраны условия хроматографического анализа объектов, позволяющие в режиме гидрофильной хроматографии создать условия для ионизации электрораспылением, которые предполагают повышенное содержание органического растворителя в подвижной фазе для достижения высокой чувствительности масс-спектрометрического детектирования МФК.

Разработаны схемы пробоподготовки, позволяющие достичь высоких значений степени извлечения и/или обеспечивающие снижение матричных эффектов при определении МФК в природных водах, грунто-пылевых смесях, плазме крови и моче.

Показана возможность определения МФК в варианте гидрофильной и обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС в виде производного с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом в природных водах, грунто-пылевых смесях и плазме крови. Установлены критерии применения дериватизации п-бромфенацилбромидом или п-метоксифенацилбромидом в зависимости от объекта, способа пробоподготовки и необходимой экспрессности анализа.

Для определения МФК в моче предложен способ, основанный на применении анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Выбрана подвижная фаза, обеспечивающая высокий коэффициент емкости МФК в рамках анионообменной жидкостной хроматографии и совместимая с масс-спектрометрическим детектированием.

Показана высокая селективность определения МФК в природных водах, грунто-пылевых смесях и моче в присутствии алкилметилфосфоновых кислот и этилфосфоновой кислоты.

Установлены особенности выведения МФК у крыс после получения несмертельных доз ОВ.

Практическая значимость. Предложены способы высокочувствительного определения МФК в различных сложных объектах с пределами обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл. При разработке способов особое внимание удалено повышению чувствительности, селективности и воспроизводимости определения МФК.

Разработан высокочувствительный способ определения МФК в виде производного с п-бромфенацилбромидом, позволяющий методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием определять МФК в природных водах на уровне 0.1 нг/мл.

Разработан быстрый способ определения МФК в виде производного с п-метоксифенацилбромидом, позволяющий методом обращенно-фазовой высокоеффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием определять МФК в природных водах на уровне 2 нг/мл.

Разработан способ высокочувствительного определения МФК и алкилметилфосфоновых кислот с применением дериватизации методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в грунто-пылевых смесях, собранных с территории бывшего завода по производству химического оружия. Предел обнаружения аналитов находился в диапазоне от 0.005 до 0.2 нг/мл.

Разработан способ определения МФК в виде производного с п-бромфенацилбромидом методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в образцах плазмы крови. Предел обнаружения составил 3 нг/мл.

Разработан способ прямого определения МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в образцах мочи. Предел обнаружения составил 4 нг/мл.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Результаты исследования особенностей хроматографического удерживания МФК и производных МФК в условиях обращенно-фазовой, гидрофильной и анионообменной жидкостной хроматографии.

2. Условия пробоподготовки при определении МФК в природных водах, грунто-пылевых смесях, плазме крови и моче.
3. Результаты оценки возможности использования реакций дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом.
4. Способы, позволяющие проводить надежное обнаружение и определение МФК в образцах природных вод, грунто-пылевых смесей, плазмы крови, моче и обеспечивающие достижение пределов обнаружения в диапазоне от 0.1 до 10 нг/мл.
5. Результаты применения разработанных способов при анализе реальных образцов природных вод в рамках профессиональных тестов Организации по запрещению химического оружия, грунто-пылевых смесей, собранных с территории ликвидированного завода по производству химического оружия, а также результаты выявления закономерностей выведения МФК из организма крыс после их интоксикации несмертельными дозами ОВ.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на международном симпозиуме «Congress on clinical mass spectrometry MSACL EU-2017» (2017, Зальцбург, Австрия), III Всероссийской конференции с международным участием "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез" (2017, Краснодар, Россия), международном симпозиуме «Congress on clinical mass spectrometry MSACL US-2017» (2017, Палм-Спрингс, США), 5м Всероссийском симпозиуме с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов» (2016, Сочи, Россия), международном симпозиуме «Congress on clinical mass spectrometry MSACL EU-2016» (2016, Зальцбург, Австрия), Всероссийской конференции "Экоаналитика-2016" (2016, Углич, Россия), международном симпозиуме 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods (2015, Шиофок, Венгрия).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей в российских и зарубежных журналах, и 7 тезисов докладов.

Личный вклад автора состоял в общей постановке задач, систематизации литературных данных, подготовке и проведении всех экспериментальных этапов исследования, обработке, интерпретации и оформлении полученных экспериментальных данных, подготовке материалов к публикации и представлении полученных результатов на конференциях. Все исследования, описанные в диссертации, выполнены лично автором или в сотрудничестве с коллегами.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, главы обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы, изложена на 142 страницах машинописного текста и включает 51 рисунок, 29 таблиц и список цитируемой литературы из 138 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цель исследования и поставленные задачи, показаны научная новизна работы и ее практическая значимость.

Литературный обзор

В литературном обзоре, представленном в первой главе, рассмотрены и систематизированы способы определения метилфосфоновой кислоты (МФК) в объектах окружающей среды, плазме крови и моче человека и животных. Рассмотрены свойства и состав данных объектов, позволяющие правильно подойти к выбору способа пробоподготовки и метода анализа.

Во второй главе перечислены оборудование, реагенты и материалы, использованные в работе, а также описаны схемы (методики) экспериментов.

В работе использовали следующее аналитическое оборудование:

- ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из гибридного тандемного квадрупольного масс-спектрометрического детектора ABSciex Qtrap 3200 (Канада) с линейной ионной ловушкой, оснащенного источником электрораспылительной ионизации; и жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (США). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst 1.5.1 (Канада).
- ВЭЖХ-МС/МС систему, состоящую из тандемного квадрупольного масс-спектрометрического детектора Agilent 6460 Triple Quadrupole (США), оснащенного электрораспылительной ионизацией Jet Stream; и жидкостного хроматографа Agilent 1290 (США). Регистрацию хроматограмм и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Mass Hunter (США).

Разделение проводили на следующих хроматографических колонках:

Acclaim RSLC C18 120 Å (150 × 2.1 мм), диаметр зерна сорбента 2.2 мкм (Dionex, США), Luna HILIC 200 Å (150 × 4.6 мм), диаметр зерна сорбента 5 мкм (Phenomenex, США), разработанные в лаборатории МГУ анинообменные колонки на основе сополимера стирола и дивинилбензола с ковалентно-пришитыми четвертично-аммонийными группами (50 × 4 мм) и (100 × 4 мм), диаметр зерна сорбента 5.5 мкм, степень сшивки 50%, площадь поверхности 670 м²/г, средний размер пор 10 нм.

Третья глава диссертации посвящена разработке способов определения МФК в воде, грунто-пылевых смесях, плазме крови и моче. Описан выбор условий дериватизации и пробоподготовки, позволяющих достичь высоких значений степени извлечения МФК.

Рассмотрены условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования МФК и производных МФК, позволяющие избежать влияния матричных компонентов. Представлена процедура проверки и приведены результаты апробации разработанных способов при анализе воды, грунто-пылевых смесей и мочи крыс на содержание МФК.

В разделе “Изучение возможности прямого определения МФК в водных объектах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС” описан подбор условий хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования МФК в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных ионов были получены масс-спектры МФК (Рис. 2).

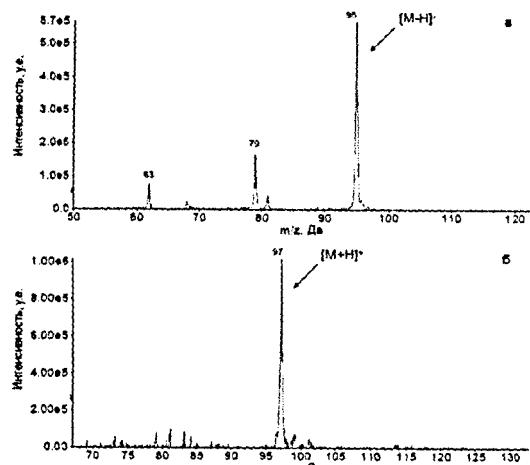


Рис. 2. Масс-спектры 10 мкг/мл МФК, полученные в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов (а) и в режиме регистрации положительно заряженных ионов (б).

Для режима регистрации отрицательно заряженных ионов ион-продукт с m/z 79 был выбран для определения, а ион-продукт с m/z 63 для подтверждения. Для режима регистрации положительно заряженных ионов ион-продукт с m/z 79 был выбран для определения, а ион-продукт с m/z 65 для подтверждения.

Подбирали условия хроматографического разделения. Так как МФК является высокополярным соединением, то в качестве подвижной фазы использовали смесь, состоящую из воды с добавками и ацетонитрила в соотношении 99:1 по объему, которую подавали в изократическом режиме элюирования при скорости потока 0.4 мл/мин. Применение в качестве водных добавок муравьиной, уксусной кислот, а также ацетата аммония не привело к сколько-нибудь значимому увеличению коэффициента емкости МФК ($k'=0.3$), однако наилучшая форма пика и отношение сигнал/шум были достигнуты при использовании в качестве водной добавки

В масс-спектре ионовых продуктов, образующихся из депротонированной молекулы МФК с m/z 95, наблюдаются два сигнала с m/z 79 и 63, которые соответствуют ионам $[\text{PO}_3]^-$ и $[\text{PO}_2]^-$. В масс-спектре ионовых продуктов, образующихся из протонированной молекулы МФК с m/z 97, наблюдаются два сигнала с m/z 79 и 65, которые соответствуют ионам $[\text{CH}_3\text{PO}_2\text{H}]^+$ и $[\text{PO}_2\text{H}_2]^+$.

0.1% муравьиной кислоты в режиме регистрации как отрицательно, так и положительно заряженных ионов. Отношение сигнал/шум в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов ($\text{С}/\text{Ш}=3000$) значительно превышало отношение сигнал/шум в режиме регистрации положительно заряженных ионов ($\text{С}/\text{Ш}=1952$). Таким образом, для определения МФК была выбрана подвижная фаза, состоящая из 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде и ацетонитрила, а также режим регистрации отрицательно заряженных ионов.

Изучали влияние матричных компонентов природных вод на масс-спектрометическое детектирование МФК. Для этого делали одинаковые добавки МФК в десионизованную воду, колодезную воду, речную и водопроводную воду и проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ. Матричный эффект (МЭ) рассчитывали по следующей формуле: $\text{МЭ, \%} = 100 \times \left(\frac{S_1}{S_2} - 1 \right)$, где S_1 -площадь пика МФК в реальных водах, а S_2 – площадь пика МФК в десионизированной воде. Значение матричного эффекта, близкое к 0%, указывает на практический полнос отсутствие влияния матричного эффекта, большее 0% указывает на усиление сигнала, а значение, меньшее 0%, на подавление сигнала. Результаты определения матричного эффекта при прямом определении МФК представлены в таблице 1.

Таблица 1. Матричный эффект при прямом определении МФК в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС/МС

Образец	Матричный эффект ($n = 3$, $p = 0.95$), %
Колодезная вода	-83±1
Речная вода	-81±2
Водопроводная вода	-81±1

Из представленных данных видно, что при прямом определении МФК наблюдался довольно сильный матричный эффект, что легко объясняется слабым удерживанием

МФК, которая элюируется со временем удерживания, почти равным мертвому времени колонки ($k' = 0.3$). В реальных образцах, в отличие от растворов МФК в десионизированной воде, присутствует большое количество матричных компонентов, в том числе полярных, которые находятся в большом избытке по отношению к МФК, также не удерживаются в условиях обращенно-фазовой хроматографии и могут оказывать влияние на масс-спектрометрический сигнал МФК. Поэтому для увеличения надежности определения МФК в водных и более сложных объектах необходимо применение подходов, позволяющих определять МФК с высоким коэффициентом емкости в диапазоне от 1 до 4.

В разделе *“Изучение возможности прямого определения МФК методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием”* описан подбор условий хроматографического разделения в условиях гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

В качестве подвижной фазы использовали 10 mM водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил. Подвижную фазу подавали со скоростью 1.5 мл/мин, использовали градиентный

режим элюирования (Табл. 2). Масс-спектрометрическое определение проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов по ранее выбранным реакциям: m/z 95 \rightarrow 79 (определение), m/z 95 \rightarrow 63 (подтверждение).

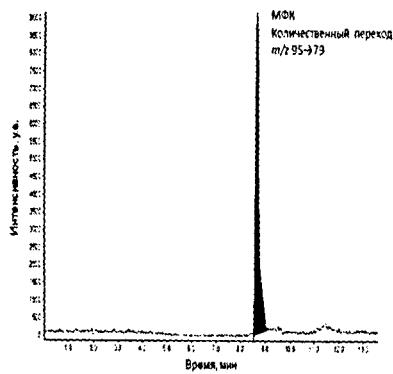
Известно, что высокое содержание ацетонитрила в подвижной фазе (от 90 до 95%) приводит к увеличению чувствительности масс-спектрометрического детектирования. В режиме градиентного элюирования МФК имела высокийкажущийся коэффициент емкости, равный 9 (Рис. 3).

Таблица 2. Программа градиентного элюирования в режиме гидрофильной ВЭЖХ

Время, мин	0	1.5	7	7.5	8.5	8.6	13.6
Содержание ацетонитрила, %	93	93	80	10	10	93	93

Также, как видно из программы градиентного элюирования (Табл. 2), время

удерживания МФК (Рис. 3) соответствовало низкому содержанию ацетонитрила и высокому содержанию 10 мМ водного раствора ацетата аммония в подвижной фазе. Таким образом, не



задействуется наиболее полезная для масс-спектрометрического детектирования область содержания ацетонитрила (90-95%) и значительно увеличивается время анализа. В результате, МФК имеет низкое значение коэффициента емкости ($k'=0.3$) в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии и очень высокое значение – в условиях гидрофильной хроматографии, даже при использовании режима градиентного элюирования ($k'=9$, кажущийся коэффициент емкости).

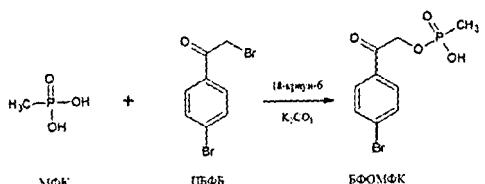
Рис. 3. Хроматограмма 1 мкг/мл МФК (раствор в ацетонитриле) по выбранной реакции m/z 95 \rightarrow 79 в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 2.

Для решения данной проблемы был предложен способ, включающий применение дериватизирующего агента, переводящего МФК в менее полярное соединение, пригодное для определения как в условиях обращенно-фазовой, так и гидрофильной хроматографии.

В разделе “Изучение реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом” предложен реагент для дериватизации МФК – п-бромфенацилбромид (ПБФБ), а также описан подбор условий реакции дериватизации МФК: температуры, времени проведения реакции, концентраций карбоната калия, 18-краун-6 и ПБФБ.

Реакцию дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом изучали при помощи гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием, так как

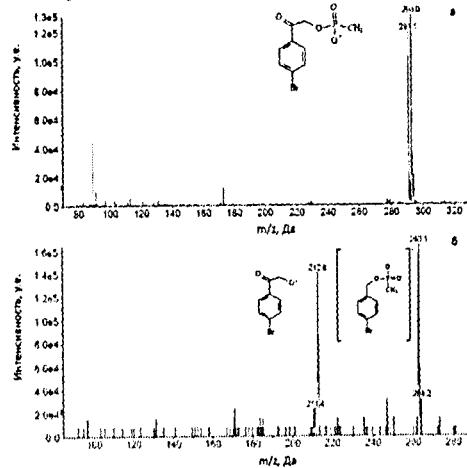
реакция протекает преимущественно в ацетонитриле. В полипропиленовых пробирках объемом 1,5 мл готовили 1 мл раствора МФК с концентрацией 500 нг/мл в смеси ацетонитрил-вода (93:7, по объему). К раствору добавляли 20 мкл раствора 18-краун-6 в ацетонитриле (20 мг/мл), 20 мкл водного раствора карбоната калия (20 мг/мл) и 100 мкл раствора ПБФБ в ацетонитриле. Пробирки помещали в термостат и выдерживали при 80 °C в течение 30 минут. В результате реакции дериватизации (Рис. 4) МФК превращается в 2-(4-бромфенил)-2-оксоэтилметилfosфоновую кислоту (БФОМФК).



Предложенная реакция дериватизации представляет классический S_N2 процесс, реализуемый за счет нуклеофильной атаки метиленовой группы ПБФБ анионом МФК.

Рис. 4. Схема реакции дериватизации МФК п-бромфенацилбромидом с образованием БФОМФК.

Слабощелочная среда за счет присутствия карбоната калия приводит к диссоциации МФК с образованием активного аниона. Поскольку известно, что α -позиция карбонильной группы является предпочтительной для S_N2 процессов, то замещение брома протекает эффективно и выход реакции высок. На рисунке 5 представлен масс-спектр БФОМФК, а также масс-спектр

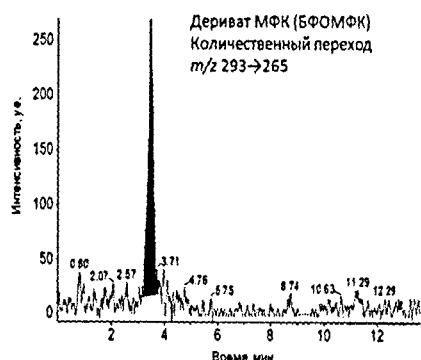


фрагментных ионов депротонированной молекулы БФОМФК в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. В режиме регистрации положительно заряженных ионов протонированные молекулы БФОМФК практически не образуются. Для масс-спектрометрического определения нами были выбраны 4 перехода: наиболее интенсивный переход m/z 293→265 для определения и переходы m/z 291→263, m/z 291→213, m/z 293→215 для качественного подтверждения.

Рис. 5. а) Масс-спектр производного МФК с ПБФБ (БФОМФК) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, б) Масс-спектр ионов-продуктов, образующихся в ячейке соударений масс-спектрометра из депротонированной молекулы БФОМФК.

В разделе “Разработка способа определения МФК в виде производного с ПБФБ в водных объектах методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен разработанный способ определения МФК с применением

дериватизации и метода гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ раствор ацетата аммония в



воде и ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы 1.5 мл/мин. Были выбраны условия хроматографического разделения (Рис. 6), позволяющие достичь приемлемого значения кажущегося коэффициента емкости ($k'=2.4$), кажущейся эффективности и формы хроматографического пика (3840 ТТ/м) при высоком содержании ацетонитрила в подвижной фазе. Использованная программа градиентного элюирования представлена в таблице 2.

Рис. 6. Хроматограмма 3 нг/мл МФК в виде БФОМФК (раствор в смеси ацетонитрил-вода, 93:7 по объему) без применения концентрирования, полученная в режиме мониторинга выбранных реакций. Подвижная фаза — 10 мМ водный раствор ацетата аммония и ацетонитрил. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 2.

Применение концентрирования, реакции дериватизации, гидрофильной хроматографии, выбранных условий хроматографического разделения с повышенным содержанием ацетонитрила в подвижной фазе, а также tandemного масс-спектрометрического детектирования привело к достижению ультра-низкого предела обнаружения МФК в водных объектах. Достигнутый предел обнаружения вместе с другими аналитическими характеристиками представлен в таблице 3.

Таблица 3. Метрологические характеристики при определении МФК в виде БФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии

Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	R ²	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл
БФОМФК	0.3 – 60	0.997	0.3	0.1

Оценивали матричный эффект, прецизионность и внутрилабораторную прецизионность. Матричные компоненты практически не влияли на tandemный масс-спектрометрический сигнал производного МФК (среднее значение матричного эффекта не превышало 2%), значения относительного стандартного отклонения при оценке прецизионности и внутрилабораторной прецизионности составили 6% и 25%, соответственно. Разработанный способ применяли к анализу реальных образцов воды, полученных в рамках официального теста, проводимого лабораторией Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО). Один образец воды

выступал в качестве тестового, второй образец представлял из себя холостую пробу, не содержащую МФК. Образцы воды анализировали согласно разработанному способу. По результатам анализа в тестовом образце воды была обнаружена и определена МФК, концентрация которой составила 10.6 нг/мл, в холостой пробе воды подтверждено отсутствие МФК.

В разделе “Разработка способа определения МФК в виде производного с ПБФБ в грунто-пылевых смесях методом гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен способ определения МФК в виде производного с ПБФБ совместно с алкилметилфосфоновыми кислотами (АМФК) в грунто-пылевых смесях при помощи метода гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Было обнаружено, что в выбранных условиях дериватизации МФК, АМФК не реагируют с ПБФБ. В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ раствор ацетата аммония в воде и ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы 1.5 мл/мин. Применили режим градиентного элюирования. Условия разделения подбирали таким образом, чтобы достичь приемлемой кажущейся эффективности разделения (N от 3840 до 16753 ТТ/м), а также значенияs кажущихся коэффициентов емкости определяемых соединений в диапазоне от 1 до 5. МФК и АМФК извлекали из измельченных грунто-пылевых смесей при помощи ультразвукового экстрагирования водой. Полученные водные экстракты упаривали на ротационном испарителе, остаток растворяли в ацетонитриле и проводили реакцию дериватизации. Разработанная процедура прошла проверку, в таблице 4 представлены некоторые аналитические характеристики разработанного способа.

Таблица 4. Сводные данные по аналитическим характеристикам при определении МФК и АМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме гидрофильной хроматографии

Вещество	МФК	ЭМФК	иПрМФК	иБуМФК	ПипМФК
Степень извлечения ($n=3$, $p=0.95$), %	90 ± 5	92 ± 7	99 ± 8	94 ± 6	94 ± 3
Коэффициент концентрирования ($n=3$, $p=0.95$)	9.0 ± 0.3	9.4 ± 0.7	9.7 ± 0.4	9.8 ± 0.9	9.3 ± 0.5
Среднее значение матричного эффекта ($n=3$), %	-40	-12	-6	-1	-2
Прецизионность (%OCO, $n=5$), %	6	9	5	8	12
Внутрилабораторная прецизионность (%OCO, $n=15$), %	25	15	18	22	22
Диапазон линейности, нг/мл	0.6 – 60	0.18 – 50	0.024 – 50	0.024 – 50	0.015 – 50
ПО, нг/мл (нг/г)	0.2 (2)	0.06 (0.72)	0.008 (0.078)	0.008 (0.083)	0.005 (0.049)

Разработанный способ применяли к четырем реальным образцам грунто-пылевых смесей, собранных в различных местах с территории бывшего завода по производству химического оружия, расположенного в городе Волгограде (закрыт более 25 лет назад). В реальных образцах грунто-пылевых смесей были обнаружены МФК и АМФК. Большие количества ПинМФК и иПрМФК свидетельствуют о том, что данные образцы в малой степени подвергались гидролизу из-за засушливого климата местности. Однако в некоторых образцах иПрМФК и ПинМФК не были обнаружены, либо были обнаружены на очень низком уровне. МФК была обнаружена во всех образцах, что свидетельствует о том, что она, как конечный продукт гидролиза всех АМФК, является наиболее универсальным маркером нервно-паралитических отравляющих веществ.

В разделе "Изучение реакции дериватизации МФК *n*-метоксифенацилбромидом" описан новый реагент для дериватизации МФК – *n*-метоксифенацилбромид (ПМФБ), позволяющий проводить реакцию дериватизации в водной фазе. При взаимодействии МФК и ПМФБ протекает реакция, представленная на рисунке 7, в результате которой образуется 2-(4-метоксифенил)-2-оксоэтилметилфосфоновая кислота (МФОМФК).

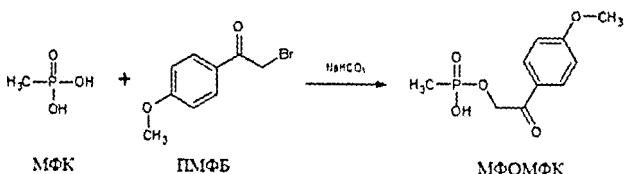


Рис. 7. Схема реакции дериватизации МФК пара-метоксифенацилбромидом.

Так как реакция протекает в однофазной среде, то использование 18-краун-6 не требуется. Действительно, площадь пика производного МФК в присутствии и в отсутствие 18-краун-6 одинакова. Таким образом, реакцию дериватизации проводили следующим образом: в полипропиленовых пробирках на 1.5 мл готовили 1 мл раствора МФК с концентрацией 200 нг/мл в денионизованной воде. К раствору добавляли 20 мкл водного раствора гидрокарбоната натрия (40 мг/мл) и 100 мкл раствора ПМФБ в ацетонитриле. Полипропиленовые пробирки термостатировали при 95 °С в течение 45 минут.

Для масс-спектрометрического определения были выбраны 2 реакции: m/z 243→150 для определения и m/z 243→215 для качественного подтверждения.

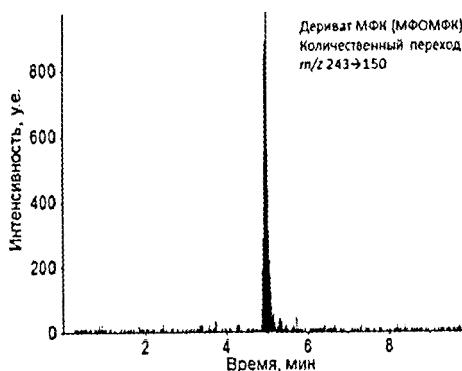
В разделе "Разработка способа определения МФК в водных объектах в виде производного с ПМФБ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием" рассмотрен способ определения МФК напрямую в водных объектах в виде производного с ПМФБ методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложенная реакция дериватизации МФК с ПМФБ, позволяющая проводить дериватизацию МФК напрямую в водных объектах, открыла возможность создания экспрессного, надежного и чувствительного ВЭЖХ-

МС/МС способа определения МФК. Данный способ включает в себя дериватизацию МФК в водной фазе после минимальной пробоподготовки, применение ОФЖХ, так как производное МФК находится в водной фазе, и tandemное масс-спектрометрическое детектирование. В качестве подвижной фазы использовали 0.1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы составила 0.4 мл/мин в режиме градиентного элюирования. Подбирали хроматографические условия для достижения приемлемого значения кажущегося коэффициента емкости (k' от 1.5 до 4), а также высокого значения числа теоретических тарелок.

Таблица 5. Программа градиентного элюирования в режиме обращенно-фазового разделения

Время, мин	0	2	4.7	6.7	6.8	10
Содержание ацетонитрила, %	10	10	80	80	10	10

В подобранных условиях (Табл. 5) для пика МФОМФК (Рис. 8) была достигнута высокая кажущаяся эффективность хроматографического разделения (109682 ТТ/м) и кажущийся коэффициент емкости ($k' = 3.8$), удовлетворяющий рекомендуемому в литературе значению.



Было изучено влияние матричного эффекта в 5 различных типах воды: вода из колодца, из скважины, из родника и два образца водопроводной воды, отобранные на Химическом факультете МГУ и в Главном Здании МГУ. При использовании раствора гидрокарбоната натрия в качестве катализатора вместо раствора карбоната калия удалось полностью избежать влияния матричного эффекта и в несколько раз увеличить выход реакции дериватизации.

Рис. 8. Хроматограмма 20 нг/мл МФК в виде МФОМФК в десорбированной воде по выбранной реакции $m/z 243\rightarrow150$. Подвижная фаза – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты и ацетонитрил. Скорость потока 0.4 мл/мин. Режим градиентного элюирования представлен в таблице 5.

Разработанная процедура прошла проверку, полученные метрологические характеристики представлены в таблице 6.

Таблица 6. Метрологические характеристики при определении МФК в виде МФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме обращенно-фазового разделения

Линейная область градуировочного графика, нг/мл	R^2	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	ПриCISIONНОСТЬ* (n=5), ОСО %	Внутрилабораторная прецизионность* (n=15), ОСО %
5 – 500	0.9995	5	2	9	14

*Значения ОСО были близки на трех уровнях концентраций

Разработанный способ применяли к анализу реальных образцов воды, полученных в рамках официального теста, проводимого лабораторией ОЗХО. Один образец воды выступал в качестве тестового, второй образец представлял из себя холостую пробу, не содержащую МФК. Образцы воды анализировали согласно разработанному способу. По результатам анализа в тестовом образце воды была обнаружена и определена МФК, концентрация которой составила 9.5 нг/мл, в холостой пробе воды подтверждено отсутствие МФК.

В разделе “Разработка способа определения МФК в плазме крови в виде производного с ПБФБ методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием” рассмотрен способ определения МФК в образцах плазмы человека с применением дериватизации и метода ВЭЖХ-МС/МС. Для дериватизации был выбран ПБФБ, так как при работе с образцами плазмы необходимой стадией пробоподготовки является осаждение белков. После осаждения белков имеется возможность проведения дериватизации напрямую в осаждающем органическом растворителе. Осаждение проводили при помощи 10 mM хлорной кислоты и 1,4-диоксана, в котором после отделения осажденных белков проводили реакцию дериватизации МФК. Плазма является более сложной матрицей по сравнению с природными водами и грунто-пылевой смесью, часть реагента вступала в реакцию с матричными компонентами, тем самым снижая выход целевой реакции. Увеличение концентрации ПБФБ в десять раз позволило увеличить выход реакции и достичь его максимального значения в данном растворителе. Дальнейшее увеличение концентрации ПБФБ

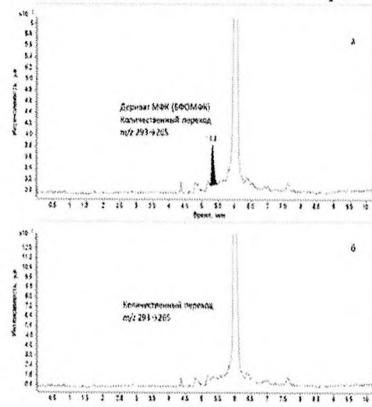


Рис. 9. Хроматограммы по выбранной реакции $m/z 293 \rightarrow 265$ образца плазмы с добавкой 10 нг/мл МФК (а) и холостой пробы плазмы без добавок МФК (б).

Разделение проводили в режиме градиентного элюирования. Подбирали наиболее подходящую программу. Критерием выбора программы являлось достижение высокой эффективности хроматографического разделения и кажущегося коэффициента емкости в диапазоне от 1.5 до 5. Полученный хроматографический пик производного (Рис. 9а)

не привело к изменению площади пика производного. Также было установлено, что реакцию целесообразно проводить в среде 1,4-диоксана, а не ацетонитрила. В среде 1,4-диоксана в выбранных условиях удалось в полтора раза увеличить выход реакции дериватизации. Реакция дериватизации протекает в экстракте плазмы, которая является сложной и многокомпонентной матрицей. Поэтому очень важной задачей является выбор подходящих условий разделения пика производного с матричными компонентами и возможными продуктами их реакции с ПБФБ (Рис. 9).

характеризуется высоким значением кажущейся эффективности разделения ($N=48000$ ТГ/м) и кажущегося коэффициента емкости ($k'=4.9$), мешающие пики с близким временем удерживания отсутствуют (Рис. 9б). Полученные метрологические характеристики представлены в таблице 7.

Таблица 7. Метрологические характеристики при определении МФК в виде БФОМФК методом ВЭЖХ-МС/МС

Диапазон линейности, нг/мл	R^2	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность* ($n=5$), ОСО %	Внутрилабораторная прецизионность* ($n=15$), ОСО %
10 – 500	0.9998	10	3	7	10

*Значения ОСО были близки на двух уровнях концентраций

В разделе "Разработка способа определения МФК в образцах мочи методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием" рассмотрен способ, позволяющий проводить определение МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. При нейтральном или слабокислом pH МФК находится в растворе в виде аниона ($pKa_1=2.12$), поэтому применение анионообменной жидкостной хроматографии для определения МФК является перспективным. Достоинствами анионообменной жидкостной хроматографии, по сравнению с гидрофильной, являются отсутствие необходимости перевода образца в органический растворитель и уменьшение количества мешающих компонентов матрицы, способных повлиять на разделение. Данный факт приводит к снижению требований к процедуре пробоподготовки и позволяет разрабатывать более экспрессные способы определения МФК. Ионную хроматографию и tandemное масс-спектрометрическое детектирование для анализа МФК в образцах мочи ранее не применяли.

В качестве неподвижной фазы использовали синтезированный в лаборатории МГУ анионообменник на основе сополимера стирола и дивинилбензола с привитыми четвертично-аммониевыми группами. Подбирали различные варианты подвижных фаз, способных выступать в качестве элюентов в ионной хроматографии и совместимых с масс-спектрометрическим детектированием. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании 200 mM муравьиной кислоты в воде и изократического режима (Рис. 10).

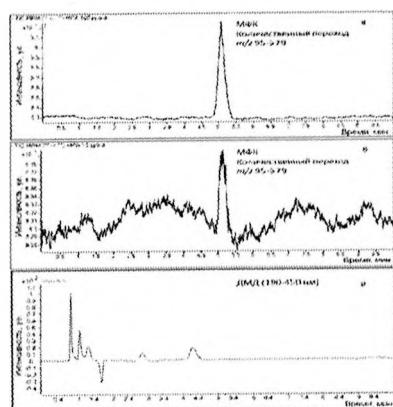
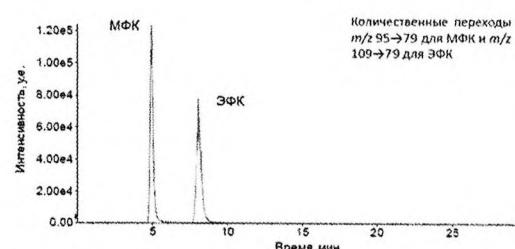


Рис. 10. а) Хроматограмма по выбранной реакции $m/z 95 \rightarrow 79$ образца холостой мочи крысы с добавкой МФК до концентрации 100 нг/мл; б) хроматограмма по выбранной реакции $m/z 95 \rightarrow 79$ образца холостой мочи крысы с добавкой МФК до концентрации 10 нг/мл; в) хроматограмма по диодно-матричному детектору в диапазоне длин волн от 190 до 450 нм.

Подвижную фазу подавали со скоростью потока 0.95 мл/мин. Масс-спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов по выбранным реакциям: m/z 95 \rightarrow 79 и m/z 95 \rightarrow 63. Применение выбранных условий элюирования обеспечило приемлемый коэффициент емкости (k' = 4,1), что позволило отделить МФК от основных матричных компонентов мочи, видимых при использовании диодно-матричного детектирования (Рис. 10в).

Так как приготовленный анионообменник оказался высокоселективным по отношению к МФК и обеспечивал хорошее разделение с матричными макрокомпонентами, то предварительное удаление матричных компонентов из анализируемого раствора перестало быть необходимым. Таким образом, процедура анализа образцов мочи не требовала применения трудоемкой и длительной стадии пробоподготовки.

Показано, что центрифugирование, фильтрование и двукратное разбавление образцов мочи достаточно для полного преодоления влияния матричного эффекта, который на трех уровнях концентраций находился в диапазоне от -2 до 1%. Разработанный способ также показал высокую



селективность по отношению к близким по структуре фосфоновым кислотам. На рисунке 11 представлена хроматограмма, демонстрирующая разделение МФК и близкой к ней по свойствам этилфосфоновой кислоты (ЭФК).

Рис. 11. Хроматограмма в режиме мониторинга выбранных реакций: m/z 95 \rightarrow 79 для МФК и m/z 109 \rightarrow 79 для ЭФК. Подвижная фаза – водный раствор 200 мМ муравьиной кислоты. Скорость потока 0.95 мл/мин.

Как видно из рисунка 11, с ЭФК достигнуто хорошее разделение ($R_s = 6.4$). Некоторые аналитические характеристики при определении МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием представлены в таблице 8.

Таблица 8. Метрологические характеристики при определении МФК методом анионообменной жидкостной хроматографии с MC/MC детектированием

Линейная область градуировочного графика, нг/мл	R^2	Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Прецизионность* ($n=5$), OCO %	Внутрилабораторная прецизионность* ($n=15$), OCO %
10 – 500	0.9998	10	4	8	12

*для прецизионности и внутрилабораторной прецизионности приведены значения, соответствующие 20 нг/мл МФК.

Разработанный способ применяли к анализу мочи крыс, которым подкожно вводили НПОВ в дозе $\frac{1}{2}$ LD₅₀. Наибольшая концентрация МФК, определенная в моче, составила 40 нг/мл, тогда как при воздействии более низких доз НПОВ и/или в более отдаленных по времени от момента воздействия точках отбора ожидаются существенно более низкие концентрации МФК, что еще раз указывает на важность разработки высокочувствительных способов определения МФК в биопробах.

Суммарные данные, отражающие характеристики разработанных способов, представлены в сводной таблице 9.

Таблица 9. Сводные данные по характеристикам разработанных способов

Объект	Процедура определения МФК	Предел обнаружения, нг/мл	Пределы обнаружения, описанные в литературе, нг/мл
Водные объекты	Гидрофильная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	0.1	9.4 (ГХ-ПИД) 10 (ВЭЖХ-МС/МС)
Водные объекты	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-метоксифенацилбромидом	2	9.4 (ГХ-ПИД) 10 (ВЭЖХ-МС/МС)
Экстракты грунто-пылевых смесей	Гидрофильная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	0.2	90 (ГХ-МС)
Плазма крови	Обращенно-фазовая жидкостная хроматография с МС/МС детектированием и дериватизацией п-бромфенацилбромидом	4	6 (ГХ-МС)
Моча	Анионообменная жидкостная хроматография с МС/МС детектированием	3	10 (ГХ-ПИД)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общие выводы

- Изучены масс-спектры электрораспылительной ионизации МФК и ее производных в режиме регистрации отрицательно и положительно заряженных ионов. Показано, что более высокая чувствительность масс-спектрометрического детектирования достигается в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.
- Установлены хроматографические параметры и особенности удерживания МФК в условиях обращенно-фазовой, гидрофильной и анионообменной жидкостной хроматографии. Показано, что приемлемый коэффициент емкости МФК ($k' = 4.1$) достигается только в условиях

анионообменной жидкостной хроматографии. Предложена неподвижная фаза на основе сopolимера стирола и дивинилбензола с привитыми четвертично-аммониевыми группами, позволяющая полностью избежать влияния матричных компонентов мочи. В качестве подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометрическим детектированием и обеспечивающей достижение высоких коэффициентов емкости МФК в условиях анионообменной жидкостной хроматографии, использовали водный раствор муравьиной кислоты.

3. Предложены реагенты для дериватизации МФК – п-бромфенацилбромид и п-метоксифенацилбромид, выбраны условия ее проведения. Реагент п-метоксифенацилбромид позволяет проводить дериватизацию МФК непосредственно в водных средах.

4. Установлены хроматографические параметры и особенности удерживания производных МФК в условиях обращению-фазовой и гидрофильной жидкостной хроматографии. Получены приемлемые значения кажущихся коэффициентов емкости производных МФК (k' от 2.4 до 4.9) и выбраны условия хроматографического анализа образцов. Показано, что повышенное содержание органического растворителя в подвижной фазе увеличивает чувствительность масс-спектрометрического детектирования производного МФК в режиме гидрофильной хроматографии и ионизации электрораспылением.

5. Разработаны способы хроматомасс-спектрометрического определения МФК в водных объектах, грунто-пылевых смесях и плазме крови в виде производных с п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом методами ОФЖХ и гидрофильной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Разработан способ определения МФК в моче методом анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. За счет применения оригинальных способов пробоподготовки, дериватизации п-бромфенацилбромидом и п-метоксифенацилбромидом, создания подходящих условий ионизации электрораспылением, а также сочетания анионообменной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием достигнуты пределы обнаружения МФК в диапазоне от 0.1 нг/мл до 10 нг/мл.

6. Разработанные способы успешно апробированы при анализе образцов воды, полученных в рамках межлабораторных испытаний ОЗХО, грунто-пылевых смесей, собранных с территории бывшего завода по производству химического оружия в г. Волгограде, мочи крыс, подвергшихся воздействию несмертельных доз НПОВ. Получены данные о выведении МФК из организма лабораторных крыс.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Baygildiev T.M. Hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry methylphosphonic acid determination in water samples after derivatization with p-bromophenacyl bromide / Rodin I.A., Baygildiev T.M., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // *Chromatographia*. – 2015. – V. 78, № 7 – 8. – P. 585 – 591.
2. Baygildiev T.M. Hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination in environmental samples after pre-column derivatization with p-bromophenacyl bromide / Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Lebedev A.T., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // *Journal of Chromatography A*. – 2016. – V. 1442. – P. 19 – 25.
3. Байгильдиев Т.М. Определение метилfosфоновой кислоты в образцах плазмы крови человека методом высокоеффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием / Байгильдиев Т.М., Родин И.А., Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В // *Масс-спектрометрия*. – 2016. – Т. 13, № 4. – С. 241 – 246.
4. Baygildiev T.M. Rapid LC-MS/MS determination of methylphosphonic acid in urine of rats exposed to organophosphorus nerve agents / Baygildiev T.M., Zatirakha A.V., Rodin I.A., Braun A.V., Stavrianidi A.N., Koryagina N.L., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // *Journal of Chromatography B*. – 2017. – V. 1058. – P. 32 – 39.
5. Baygildiev T.M. Novel analytical approaches to determination of chemical warfare agents and related compounds for verification of nonproliferation of chemical weapons / Rybalchenko I.V., Rodin I.A., Baygildiev T.M., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Morozik Y.I., Shpigun O.A. // *Pure and Applied Chemistry*. – 2017. doi: <https://doi.org/10.1515/pac-2016-1208>
6. Baygildiev T.M. Simultaneous hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry methylphosphonic and alkyl methylphosphonic acids determination after derivatization with p-bromophenacyl bromide in environmental samples / Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods. – Siofok, Hungary, 2-4 September 2015, – P. 79.
7. Байгильдиев Т.М. Определение метилфосфоновой кислоты в природных водах при помощи анионообменной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием / Байгильдиев Т.М., Родин И.А., Затираха А.В., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. // Тезисы докладов X Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2016". – Углич, Россия, 26 июня – 2 июля 2016. – С. 14.
8. Baygildiev T.M. Anion-exchange LC-MS/MS analysis of the most stable nerve agent biomarker in urine / Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianiidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko

И.В., Ананьева И.А., Шпигун О.А. // MSACL 2016 EU congress on clinical mass spectrometry. Long Abstracts. – Salzburg, Austria, 12-15 September 2016. – Р. 180.

9. Байгильдиев Т.М. Определение полярных биомаркеров боевых отравляющих веществ с применением ВЭЖХ / Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Байгильдиев Т.М., Родин И.А., Рыбальченко И.В. // Тезисы докладов 5 Всероссийского симпозиума с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов». – Сочи, Россия, 30 октября – 6 ноября 2016. – С.268 – 269.

10. Байгильдиев Т.М. Новые подходы к определению МФК различными видами высокоеффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием / Байгильдиев Т.М., Родин И.А., Шпигун О.А., Рыбальченко И.В. // Материалы III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар, Россия, 21 – 27 мая 2017. – С. 61.

11. Baygildiev T.M. Novel approaches for methylphosphonic acid determination by various LC-MS/MS techniques / Baygildiev T.M., Rodin I.A., Stavrianiidi A.N., Braun A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // MSACL 2017 US book of abstracts. – Palm Springs, USA, 22 – 27 January 2017.

12. Baygildiev T.M. Determination of organophosphorus nerve agents biomarkers in urine by ion chromatography tandem mass spectrometry / Baygildiev T.M., Rodin I.A., Zatirakha A.V., Rybalchenko I.V., Shpigun O.A. // MSACL 2017 EU congress on clinical mass spectrometry. Long Abstracts. – Salzburg, Austria, 10-14 September 2017.

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю д.х.н. Родину И.А., а также чл.-корр. РАН, проф. д.х.н. Шпигуну О.А., проф., д.х.н. Рыбальченко И.В., к.х.н. Ставрианиди А.Н., к.х.н. Брауну А.В., к.х.н. Затирахе А.В. и Байгильдиевой Д.И. за помощь в работе и обсуждении результатов.

Подписано в печать: 10.11.2017

Объем: 1,0 п.л.

Тираж 110 экз. Заказ № 1057

Отпечатано в типографии «Реглет»
г. Москва, пр-кт Вернадского, д.39
(495) 661-60-89, www.reglet.ru

