



**НИИ ГИГИЕНЫ,
ПРОФПАТОЛОГИИ
И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**



Уколов Антон Игоревич

**ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТОДОЛОГИЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ОБСТОЯТЕЛЬСТВ
ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЕНИЙ**

диссертация на соискание учёной степени

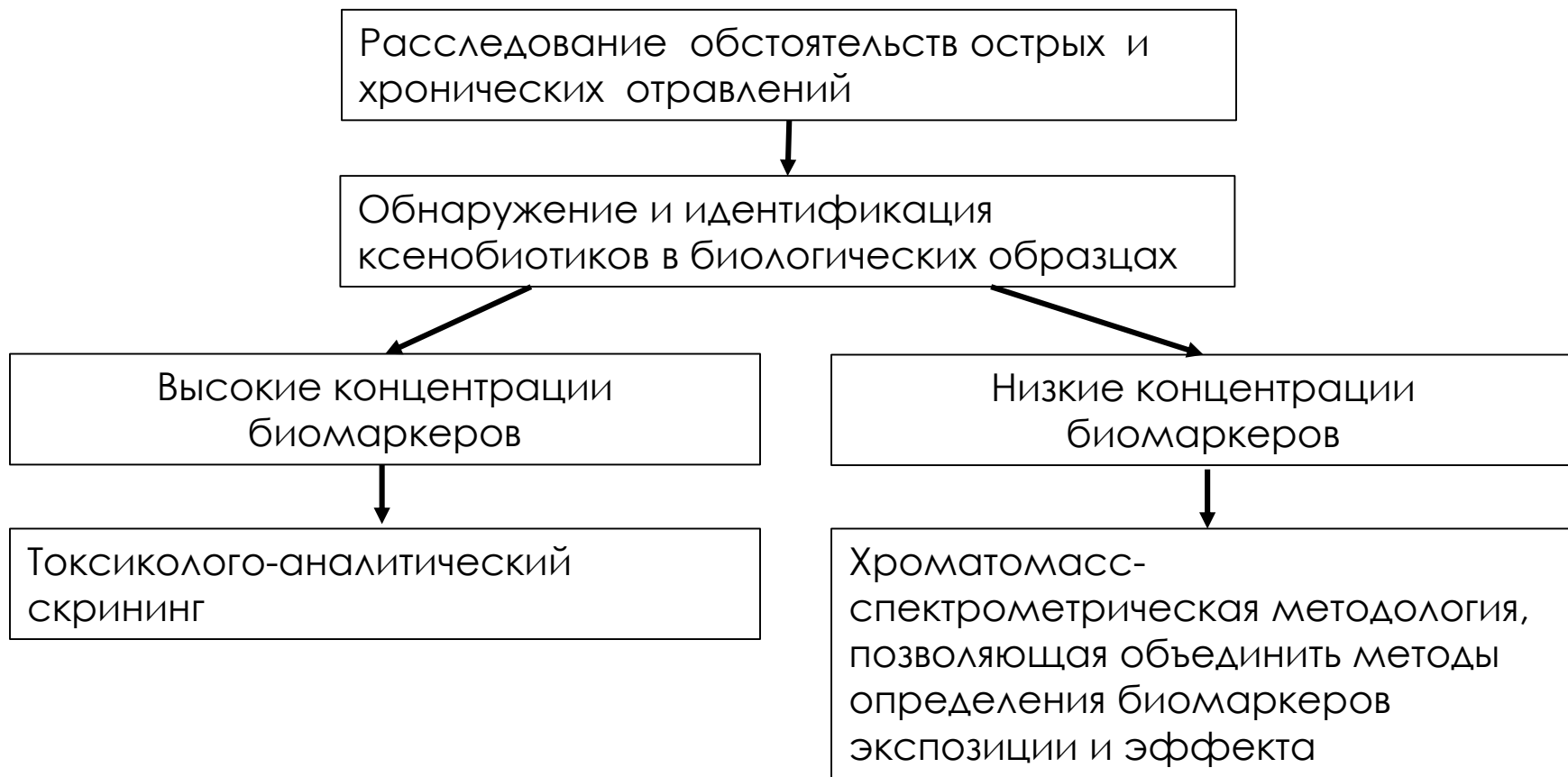
доктора химических наук

по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Научный консультант:

д.м.н., профессор Радилев Андрей Станиславович

Краснодар, 2019



“Биомаркер экспозиции” - экзогенное вещество/метаболит, определяемые в организме.

“Биомаркер эффекта” – регистрируемое изменение в организме, наступающее в результате воздействия ксенобиотика (в частности, изменение профилей биогенных соединений).



Разработка подходов к повышению надежности идентификации органических соединений и метаболического профилирования биологических образцов на основе хроматомасс-спектрометрических методов анализа, позволяющих определять пути биотрансформации ксенобиотиков и биоаналитического мониторинга при расследовании обстоятельств острых и хронических отравлений.

Выявление и разработка подходов к обнаружению биомаркеров вредных химических веществ в биологических объектах на уровне их нетоксических концентраций, базирующиеся на совместной интерпретации результатов определения ксенобиотиков и метаболического профилирования биологических образцов.



1. Обосновать и разработать методологию определения биомаркеров ксенобиотиков, включающую метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга, методики определения экзогенных веществ и их метаболитов в биологических объектах, а также метаболического профилирования биологических образцов.
2. Развить методологию применения ГХ-МС низкого разрешения при анализе образцов крови, мочи и гомогенатов органов для изучения их метаболического профилирования.
3. Разработать методики определения биомаркеров летучих промышленных загрязнителей, фосфорорганических пестицидов, алифатических углеводородов, гидроксилamina и 1,4-дихлоргексафторбутена-2 в крови и моче, позволяющие установить пути биотрансформации и особенности механизма их действия.
4. Усовершенствовать метод расширенного скрининга биологических объектов для повышения надежности безэталонной идентификации при выявлении экзогенных веществ или их метаболитов.



5. Предложить подходы к уточнению структур позиционных изомеров алкилфенолов с использованием различных вариантов ГХ-МС.
6. Применить методологию хроматомасс-спектрометрического скрининга биообъектов для расширения объема сведений о токсикокинетических параметрах ксенобиотиков, обуславливающих требования к методикам определения биомаркеров ксенобиотиков в биообразцах.
7. Апробировать разработанные аналитические схемы при установлении путей биотрансформации и механизма действия алифатических углеводородов, гидроксилamina (ГА), 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 (ДХГФ) и О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил)-метилтиофосфоната (RVX).
8. Оценить эффективность применения обнаруженных биомаркеров для оценки воздействия и дозы экспозиции вредных химических веществ, отражающих их содержание в окружающей среде.



1. Методология хромато-масс-спектрометрического анализа биологических объектов, включающая метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга, методики определения экзогенных веществ и методики метаболического профилирования биологических образцов, позволяющая устанавливать пути биотрансформации и механизмы действия ранее не изученных ксенобиотиков в организме.
2. Возможность безэталонной идентификации экзогенных веществ, их метаболитов в биологических образцах при расширенном токсиколого-аналитическом скрининге с применением твердофазной микроэкстракции из паровой фазы и экстракционного вымораживания.
3. Возможность эффективного применения ГХ-МС низкого разрешения для метаболического профилирования плазмы крови, мочи, органов и тканей путем выделения в отдельные базы данных масс-спектров ионизации электронами и газохроматографических индексов удерживания аналитов, составляющих метаболические профили.



4. Количественное определение профилей жирных кислот и их производных в биологических образцах для выявления ранее неизвестных аспектов токсического действия фосфорорганических соединений и алифатических углеводов на организм животных.
5. Выявление характеристических различий в масс-спектрах орто- и пара-изомеров алкилфенолов в условиях химической ионизации с регистрацией положительно заряженных ионов с последующей диссоциацией, индуцированной соударениями.
6. Определение зависимости концентраций биомаркеров ксенобиотиков от времени в биологических образцах при моделировании интоксикаций позволяет повышать эффективность биоаналитического мониторинга за счет оценки поглощенной дозы химических веществ.
7. Обнаруженные биомаркеры экспозиции и эффекта промышленных загрязнителей позволяют устанавливать факт воздействия смесей алифатических углеводов с числом атомов углерода от 1 до 10, гидроксилamina и ДХГФ от порога хронического действия и выше.



1. Впервые предложена методология, сочетающая целевые и нецелевые методы определения ксенобиотиков, целевые и нецелевые методы метаболического профилирования.
2. Выявлены ранее неизвестные механизмы воздействия смесей алифатических углеводов на головной мозг крыс. Предложены биомаркеры воздействия УВ на липидный состав головного мозга.
3. Определены пути биотрансформации RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2), а также выявлено его влияние на метаболические профили плазмы крови и мочи крыс. Выявлены наиболее чувствительные биомаркеры.
4. Определены пути биотрансформации гидроксилamina, а также выявлено его влияние на метаболические профили плазмы крови и мочи крыс. Выявлены наиболее чувствительные биомаркеры.
5. Выявлено влияние RVX на профили свободных и этерифицированных жирных кислот плазмы крови крыс в том числе в условиях антидотной терапии.
6. Впервые разработаны хроматомасс-спектрометрические методики количественного определения гидроксилamina и хладона RL 316 в биологических образцах.



Результаты работы использованы при выполнении 7 научно-исследовательских работ по государственному и отраслевому заказам: "Биопроба-09", "Биопроба-10", "Биопроба-11", "Биопроба-12", "Углеводороды", "ГН-ДХГФ" и "Биотест", проведенных в том числе в рамках ФЦП "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации" и ФЦП "Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации"

Результаты работы использованы при обосновании предельно допустимых концентраций смесей алифатических углеводородов C₁-C₅ и C₆-C₁₀ (ГН 2.1.6.1338-03 с изм. от 30.08.16), хладона R1316 (ГН 2.2.5.3532-18 с изм. от 13.02.18), и водно-метанольного раствора нитрата гидроксилamina.

По результатам работы опубликованы методические рекомендации ФМБА: МР ФМБА России 4.1.23-2014 и МР ФМБА России 12.038-2016.

"Методика количественного хромато-масс-спектрометрического анализа пестицидов в биологических образцах крови и мочи человека" зарегистрирована в качестве секрета производства (ноу-хау).

Две методики количественного анализа прошли метрологическую аттестацию: № 222.0319/01.00258/2013 и № 222.0320/01.00258/2013.

Предложенная методология позволяет выявлять:

- факт ингаляционного поступления УВ C₆-C₁₀ в организм на уровне концентраций от 5.2 мг/м³, УВ C₁-C₅ на уровне концентраций от 50.2 мг/м³, ДХГФ на уровне концентраций от 18.8 мг/м³;
- факт перорального поступления 22.6 мкг/кг гидроксилamina, летучих промышленных токсикантов в период от суток до 6 дней после отравления дозами 0.22 мг/кг, эквивалентными от 3×10⁻⁵ DL₅₀ до 9×10⁻³ DL₅₀, фосфорорганических пестицидов (ФОП) - в течение 6 дней после отравления дозами 1-50 мг/кг, эквивалентными от 1/50 DL₅₀ до 1/10 DL₅₀, а также RVX - в течение 7 дней после отравления дозами 9.6 мкг/кг, эквивалентными от 2×0.4 DL₅₀ даже в условиях антидотной терапии.



Методология выявления негативного воздействия химического фактора:

Выявление биомаркеров экспозиции, установление причин отравления и/или идентификация неизвестного химического фактора методом расширенного токсиколого-аналитического скрининга биологических образцов



Разработка количественных методов определения биомаркеров экспозиции



Выявление биомаркеров эффекта методами:
- нецелевого ГХ- и ВЭЖХ-МС анализа плазмы крови, мочи и внутренних органов (лабораторных животных);
- целевого определения свободных и этерифицированных жирных кислот плазмы крови и внутренних органов.



Выявление наиболее чувствительных биомаркеров, определение их токсикокинетических параметров и разработка методик биомониторинга токсичных органических соединений



Токсиколого-аналитический скрининг

это аналитическая стратегия, предназначенная для детектирования и идентификации ксенобиотиков в биологических жидкостях

Метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга был успешно внедрен в практику лаборатории аналитической токсикологии НИИ ГПЭЧ, вошел в **Методические рекомендации** “Процедура проведения количественного хромато-масс-спектрометрического анализа токсичных и сильнодействующих веществ в биологических объектах” утверждены ФМБА (МР ФМБА России 4.1.23-2014).

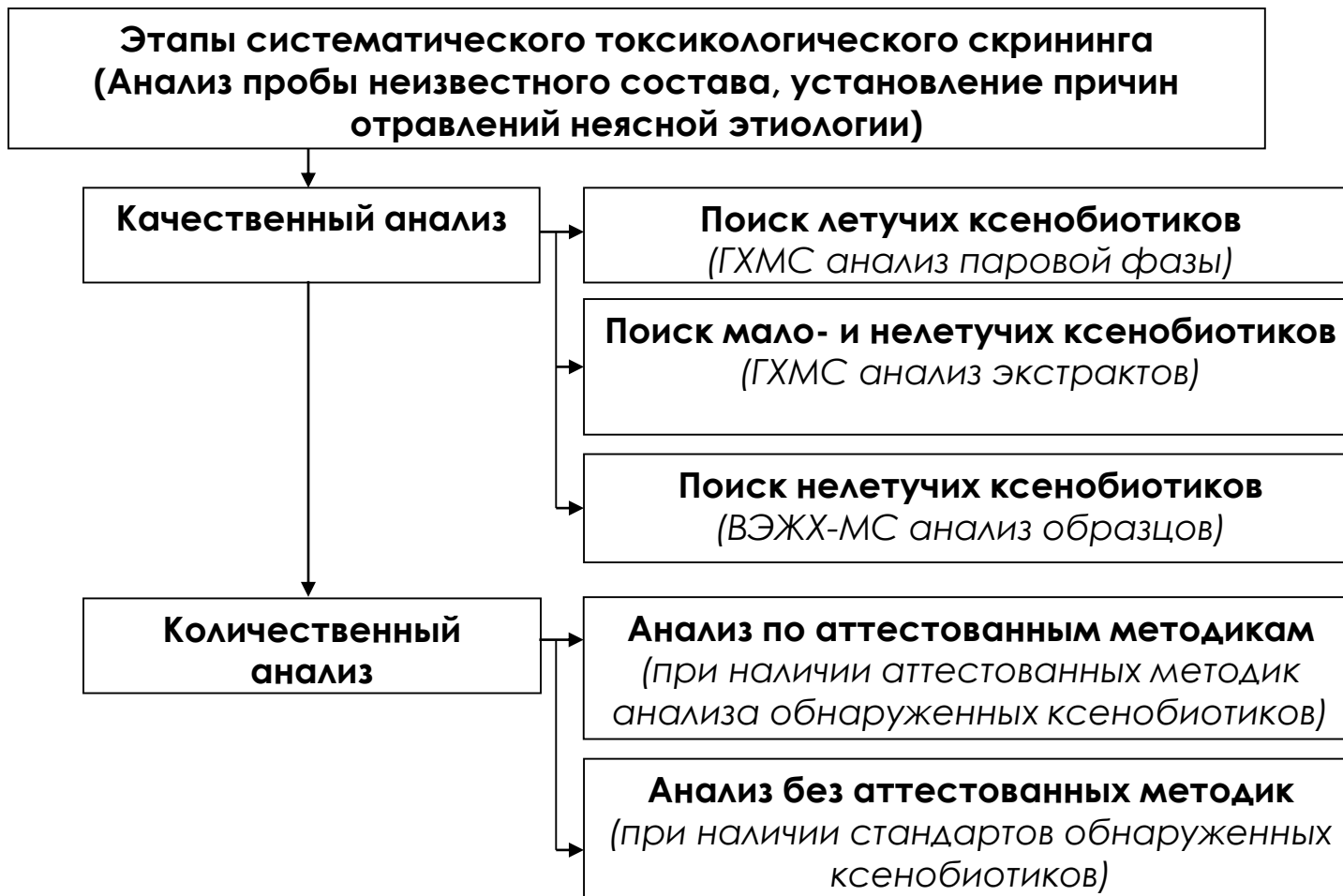
Метод использован при анализе:

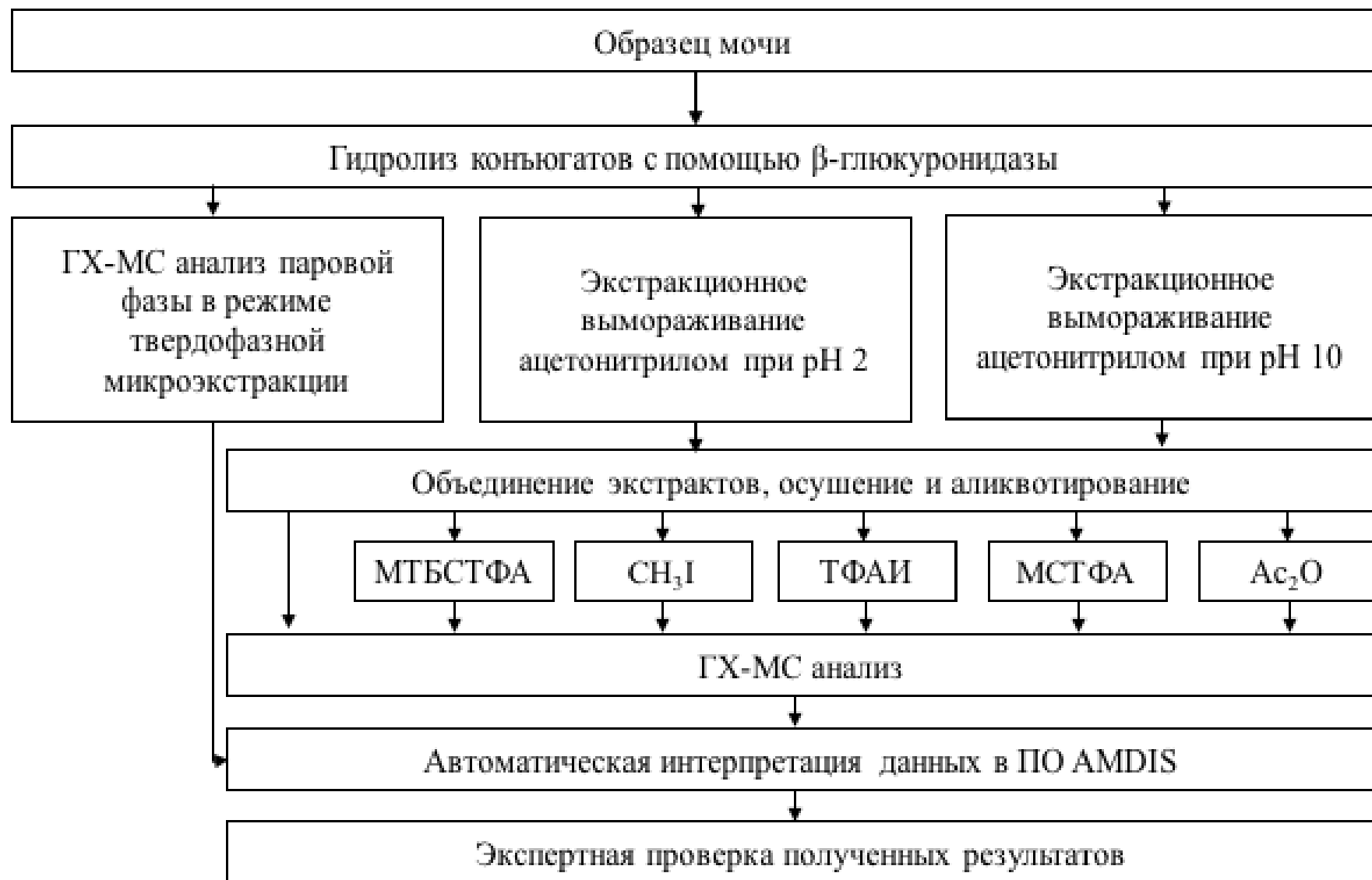
1. Образцов биологических проб пациентов с признаками острых отравлений неясной этиологии.
2. Образцов пациентов токсикологического отделения НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе.
3. Образцов в рамках межлабораторного теста.



Расширенный метод токсиколого-аналитического скрининга

12







Подтверждение
и количественный анализ

Сопоставление данных автоматической интерпретации полученных при анализе экстрактов дериватизированных различными агентами

Сравнение экспериментальных и библиотечных газохроматографических индексов удерживания

Поиск и идентификация маркеров ксенобиотиков в других биологических образцах

Анализ положительной пробы с использованием ГХ-МС/МС или ВЭЖХ-МС высокого разрешения

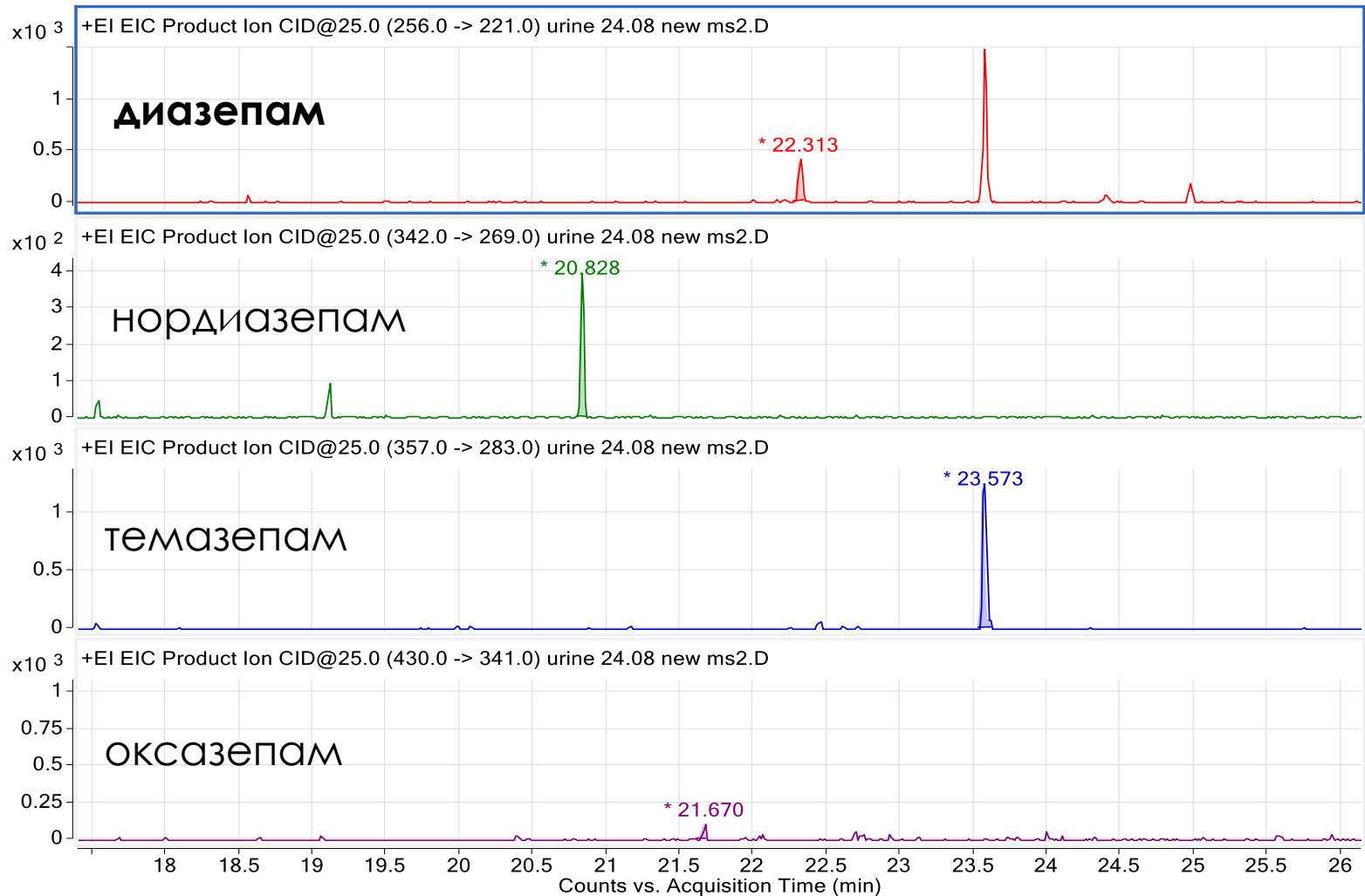
Количественный анализ с использованием стандарта обнаруженного соединения



№	Предполагаемая причина отравления	Ксенобиотики, выявленные в биологических образцах
1	Неустановленная смесь лекарств	Этиловый спирт
2	Феназепамом	Дифенилгидрамин (димедрол) Толуол и пара-крезол
3	Анаприлин и дономил	Донормил (доксиламин) Фенобарбитал
5	Нет данных	Этиловый спирт. Амфетамин.
6	Феназепамом	Этиловый спирт.
7	Гамма-оксибутират	Диэтилтиокарбаминовой кислоты метиловый эфир метаболит дисульфирама (Эспераль)
8	Феназепамом	Феназепам
9	Нет данных	Корвалол
10	Аминазином	Аминазин
11	Опиаты	Карбпромал

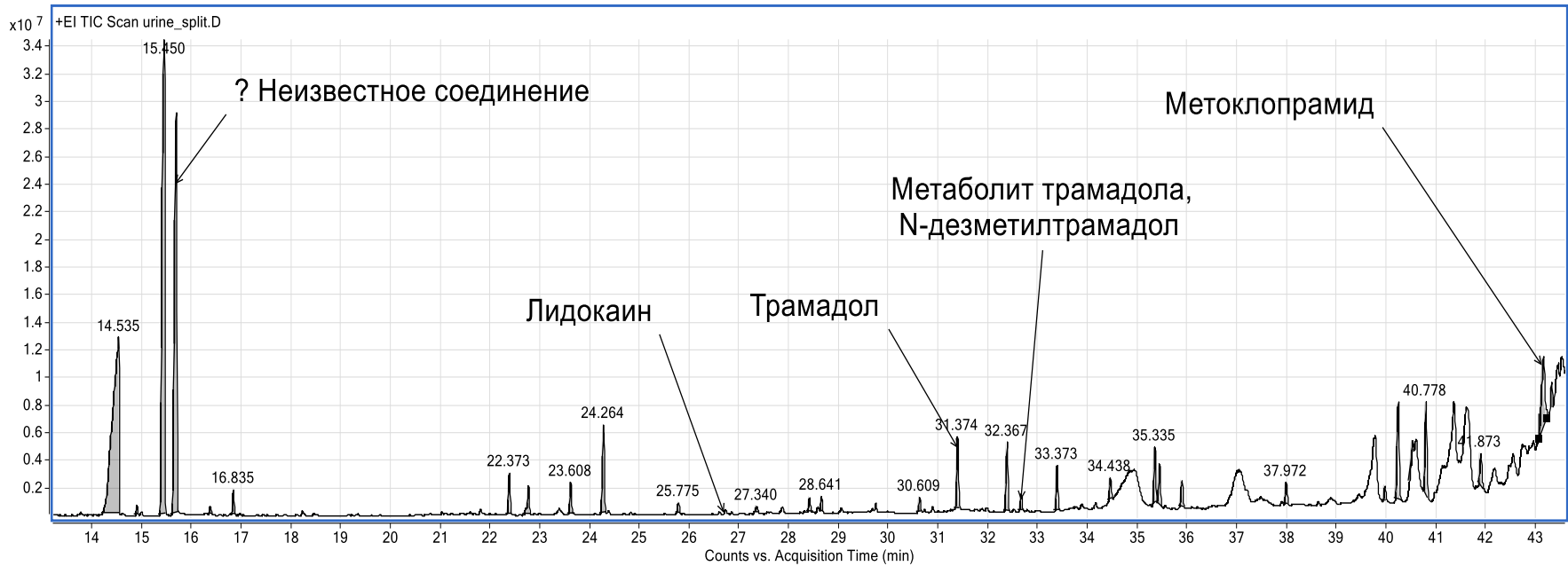


Реконструированные масс-хроматограммы по МРМ-переходам диазепама и его метаболитов

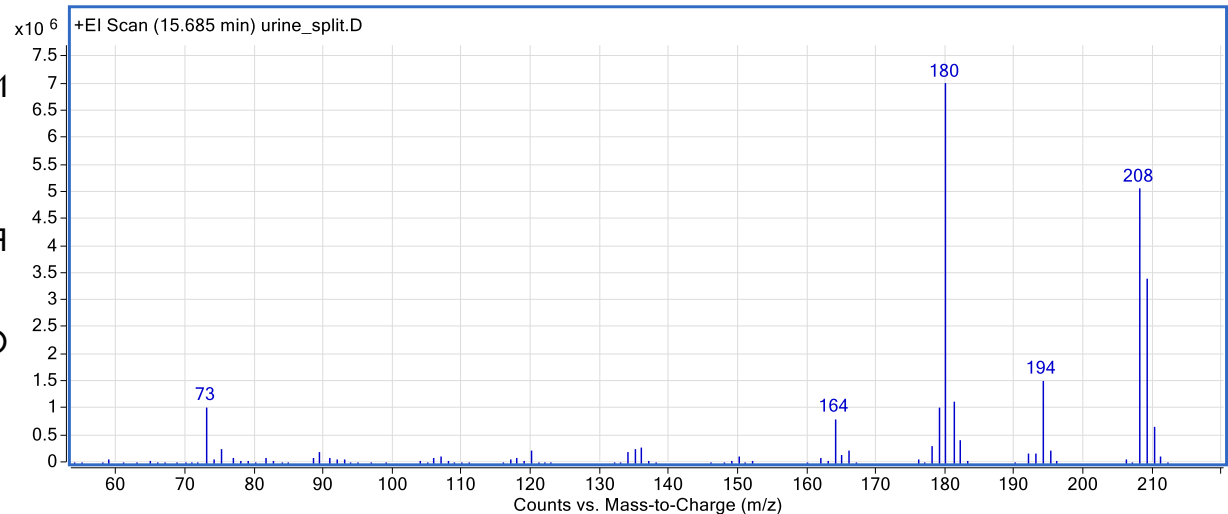




Масс-хроматограмма ТИС силилированного экстракта мочи

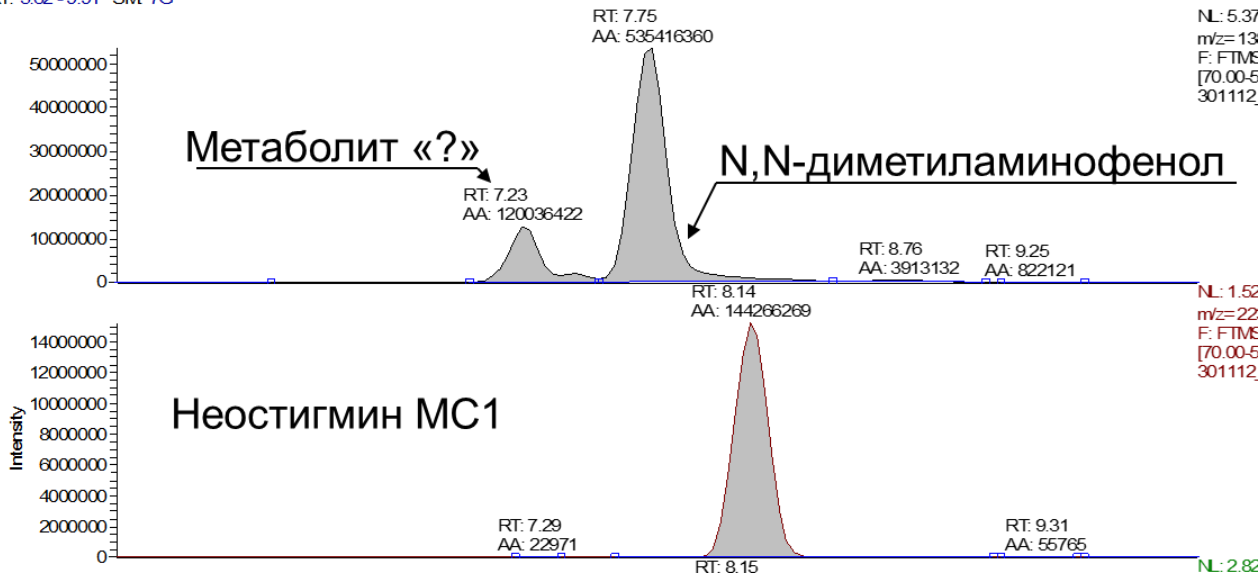


Масс-спектр ионизации электронами неизвестного экзогенного соединения (триметилсилильный эфир), обнаруженного в моче пациента



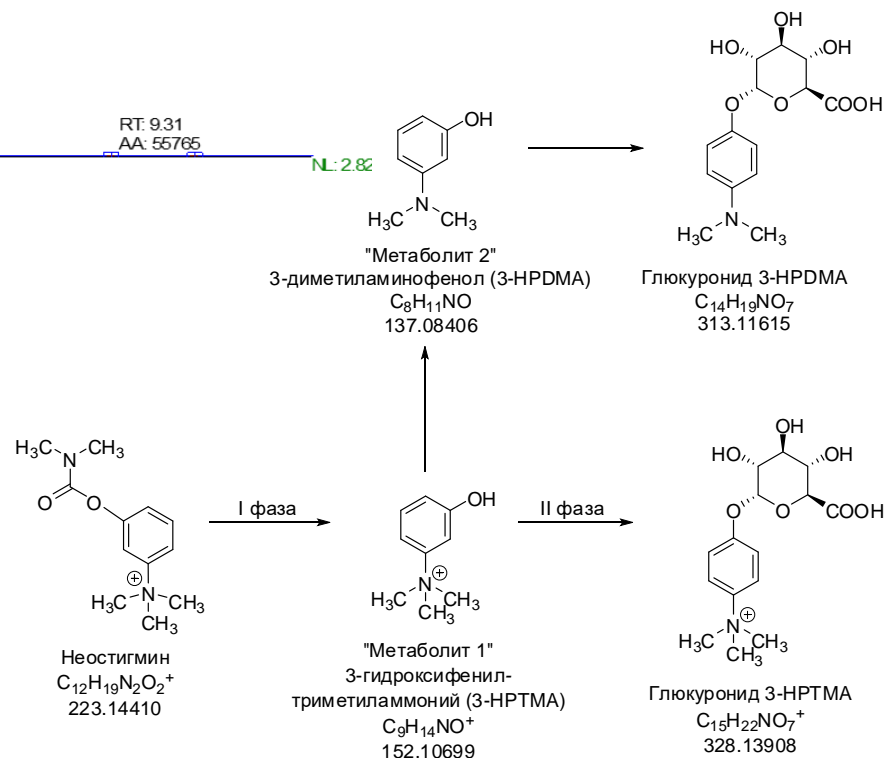


RT: 5.62-9.91 SM 7G



Подтверждение обнаружения неостигмина с использованием ВЭЖХ-МС высокого разрешения

Схема метаболизма неостигмина. Показано образование метаболитов первой и второй фазы метаболизма (глюкурониды).

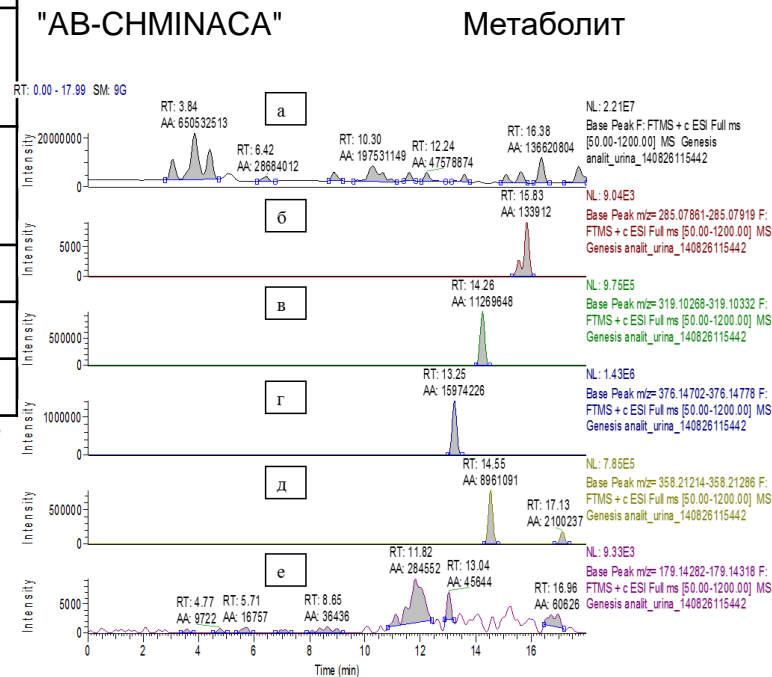
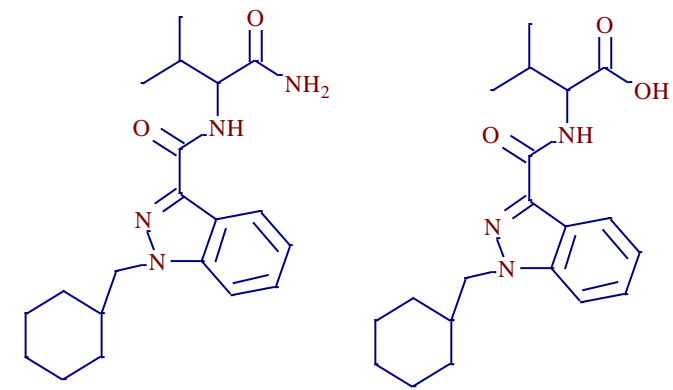




Результаты обнаружения ксенобиотиков в образце мочи

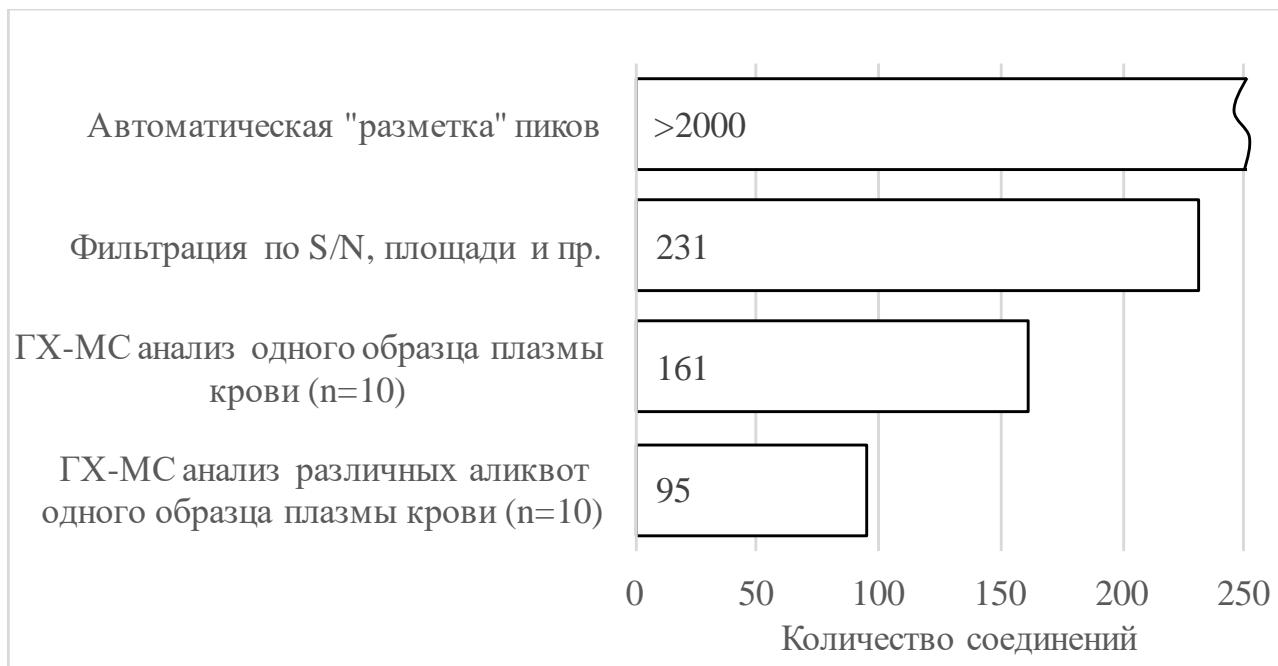
Название	Библ. ИУ	Эксп. ИУ
Папаверин**	2825	1659
Пропофол	1346	1447
Диазепам	2436	2536
Хлорпромазин	2525	2612
Галоперидол-ТМС	2965	2992
Метаболит (1) хлорпромазина	2100	2335
Метаболит (2) хлорпромазина	2990	3073
Галоперидол-Н2О	2915	2981
Пировалерон	1882	1794
АВ-СНМІNАСА	3162	3212

Примечание: ** - Идентификация папаверина впоследствии трактована как ложная по результатам интерпретации ИУ и проверки независимым методом (ВЭЖХ-МС/МС)



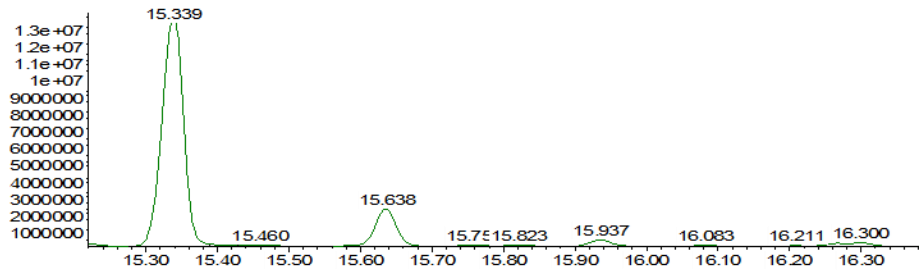
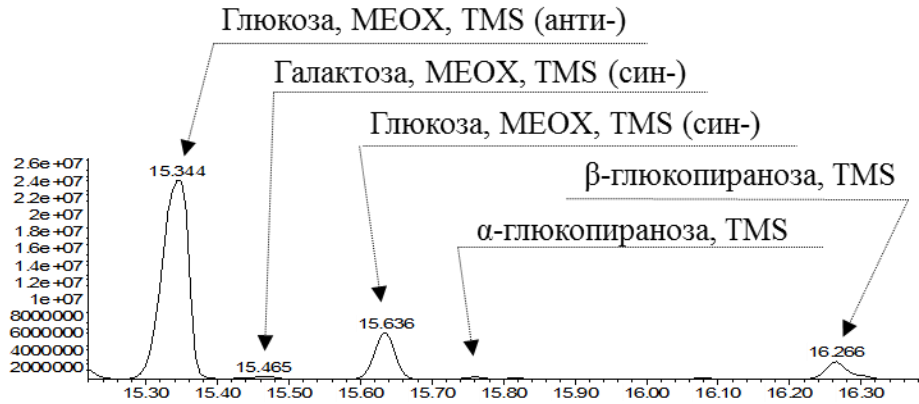


- Создание оптимизированных баз данных;
- Идентификация и отнесение пиков;
- Количественный анализ;
- Обоснование размеров экспериментальных групп при нецелевом метаболическом профилировании.



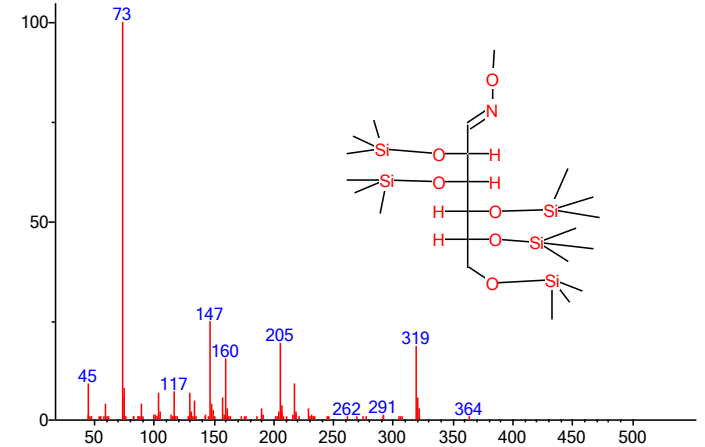
Результаты фильтрации и оптимизации перечня
метаболитов в плазме крови крыс

Идентификация и отнесение пиков



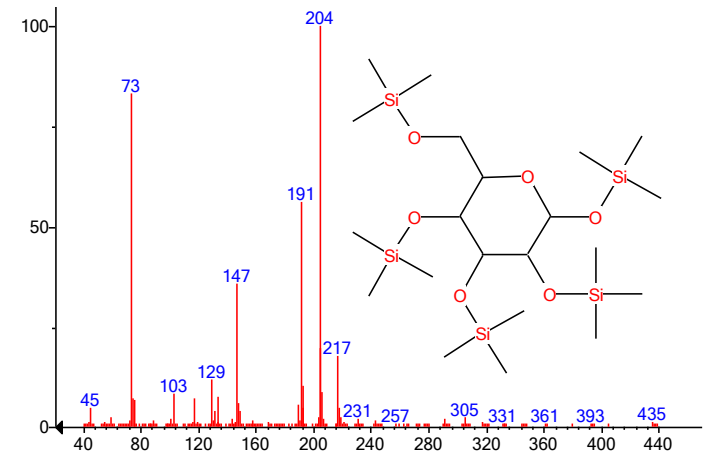
Time-->

Хроматографические пики моносахаридов.
Вверху: метоксимирование при 70°C в течение часа.
Внизу: при комнатной температуре в течение 16 часов



(replib) d-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1E)-

ТМС-эфир метилоксима цепной формы ГЛЮКОЗЫ



(mainlib) 6-D-(+)-Mannopyranose, 5TMS derivative

ТМС-эфир пиранозы



Усовершенствованная методика нецелевого метаболического профилирования

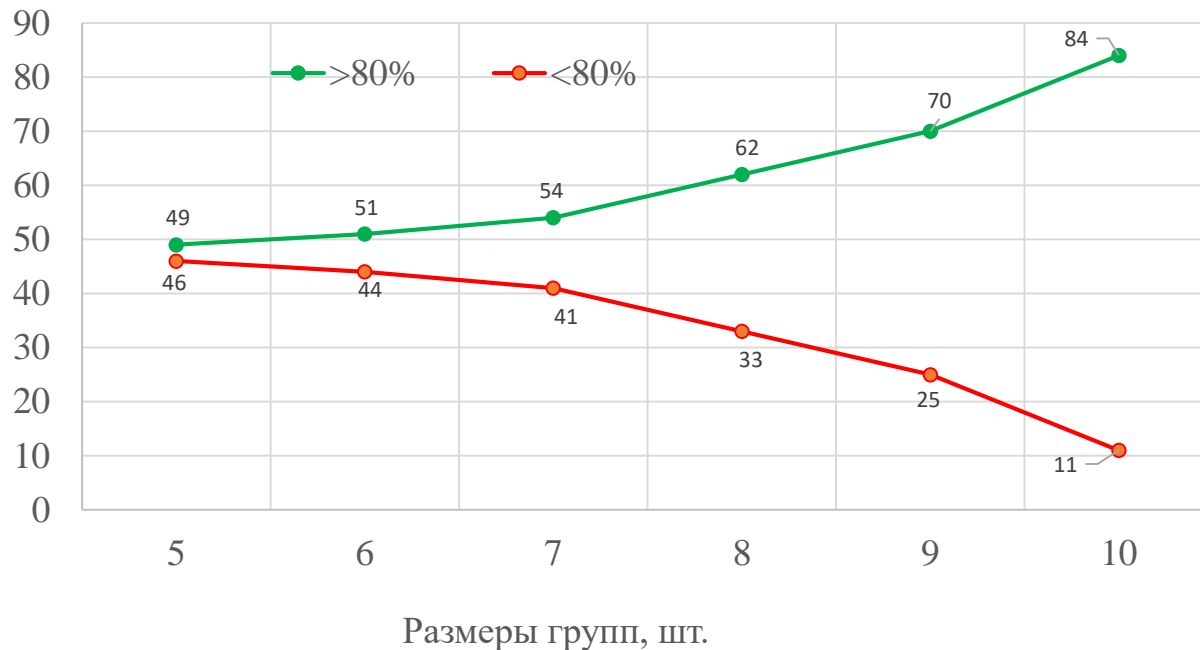
22

Количественный анализ

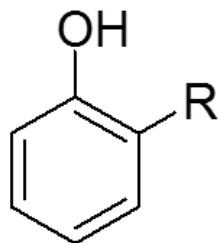
Соединение	Структурная формула	Вр.уд-я, мин	<i>m/z</i>
Циклогексанол		11.571	129, 157
Бутиламин		13.149	128, 174 , 202
Глицин-d ₅		13.231	104 , 147
4-(диметиламино)масляная кислота		13.844	58, 114, 142
3-фторбензойная кислота		14.955	197 , 153, 123
4- <i>трет</i> -бутилфенол		16.794	207 , 222
Трибутилфосфат		20.382	99 , 155, 211
Пальмитиновая кислота-d ₃₁		24.231	344
17 α -метилтестостерон		36.117	313, 403 , 143



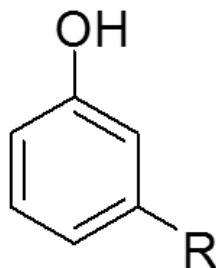
Обоснование размеров экспериментальных групп при нецелевом метаболитическом профилировании



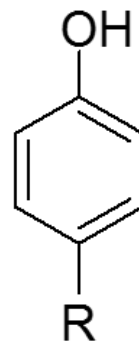
Результаты оценки статистической мощности при нецелевом метаболитическом профилировании образцов плазмы крови методом ГХ-МС



орто-алкилфенол



мета-алкилфенол



пара-алкилфенол

R = алкил

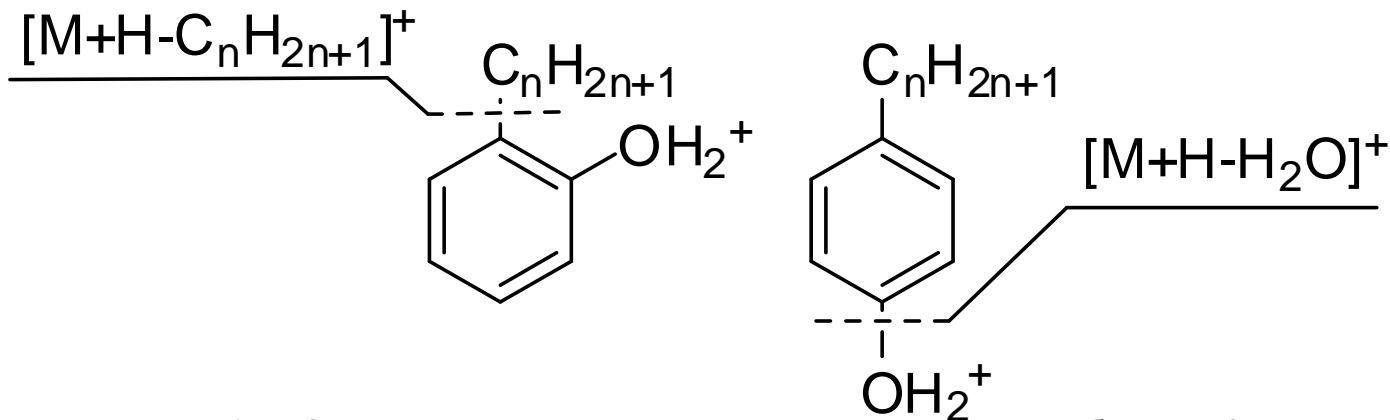
Гомологические инкременты индексов удерживания простейших алкилзамещенных фенолов

Подгруппа алкилзамещенных фенолов	Число соединений	$i_1 \pm s_i$
Нет заместителей в о-положениях	35	348 ± 44
Один заместитель	39	316 ± 44
Два заместителя	22	285 ± 71

гомологические инкременты индексов удерживания:

$$i_1 = \text{ИУ} - 100x$$

где $x = \text{int}(M/14)$.



Масс-спектры ДИС протонированных изомерных бутилфенолов с m/z 151. Энергия соударений 5 В

Изомер	Масс-спектр ДИС [5 В, $m/z \geq 40$, $I_{отн.} \geq 2\%$], ион-прекурсор $[M + H]^+$ с m/z 151
2-(1-Метилпропил)фенол	149(41), 135(10), 122(8), 121(61), 107(52), 105(1), 95(100) , 91(59), 57(36), 41(2)
4-(1-Метилпропил)фенол	133 (100) , 131(1), 122(2), 121(1), 105(11), 95(41), 93(1), 91(17), 57(16), 55(1), 41(2)
2-Бутилфенол	149(1), 133(5), 121(32), 108(3), 107(50), 95(100), 91(40), 77(2), 57(88), 41(7)
4-Бутилфенол	133 (100) , 108(3), 105(3), 95(67), 91(36), 57(61), 41(6)
2-(1,1- Диметилэтил)фенол	136(5), 135(80), 107(10), 95(16), 91(100) , 81(2), 57(14)
4-(1,1- Диметилэтил)фенол	136(3), 133(100) , 131(1), 105(9), 91(10), 57(8)



Для оценки токсических свойств смеси нормальных алифатических углеводородов C₆-C₁₀, был проведен хронический 90-суточный эксперимент

Группа	Суммарное содержание смеси УВ	Углеводород	Содержание УВ, мг/м ³
Группа 1 (высокая доза)	160.0 ± 20.5 мг/м³	гексан C ₆ H ₁₄	25.9
		гептан C ₇ H ₁₆	104.7
		октан C ₈ H ₁₈	25.9
		нонан C ₉ H ₂₀	1.8
		декан C ₁₀ H ₂₂	1.8
Группа 2 (средняя доза)	31.4 ± 5.6 мг/м³	гексан C ₆ H ₁₄	5.0
		гептан C ₇ H ₁₆	20.3
		октан C ₈ H ₁₈	5.0
		нонан C ₉ H ₂₀	0.34
		декан C ₁₀ H ₂₂	0.34
Группа 3 (низкая доза)	5.2 ± 1.1 мг/м³	гексан C ₆ H ₁₄	0.84
		гептан C ₇ H ₁₆	3.4
		октан C ₈ H ₁₈	0.84
		нонан C ₉ H ₂₀	0.06
		декан C ₁₀ H ₂₂	0.06

Общая схема метаболизма *n*-гексана

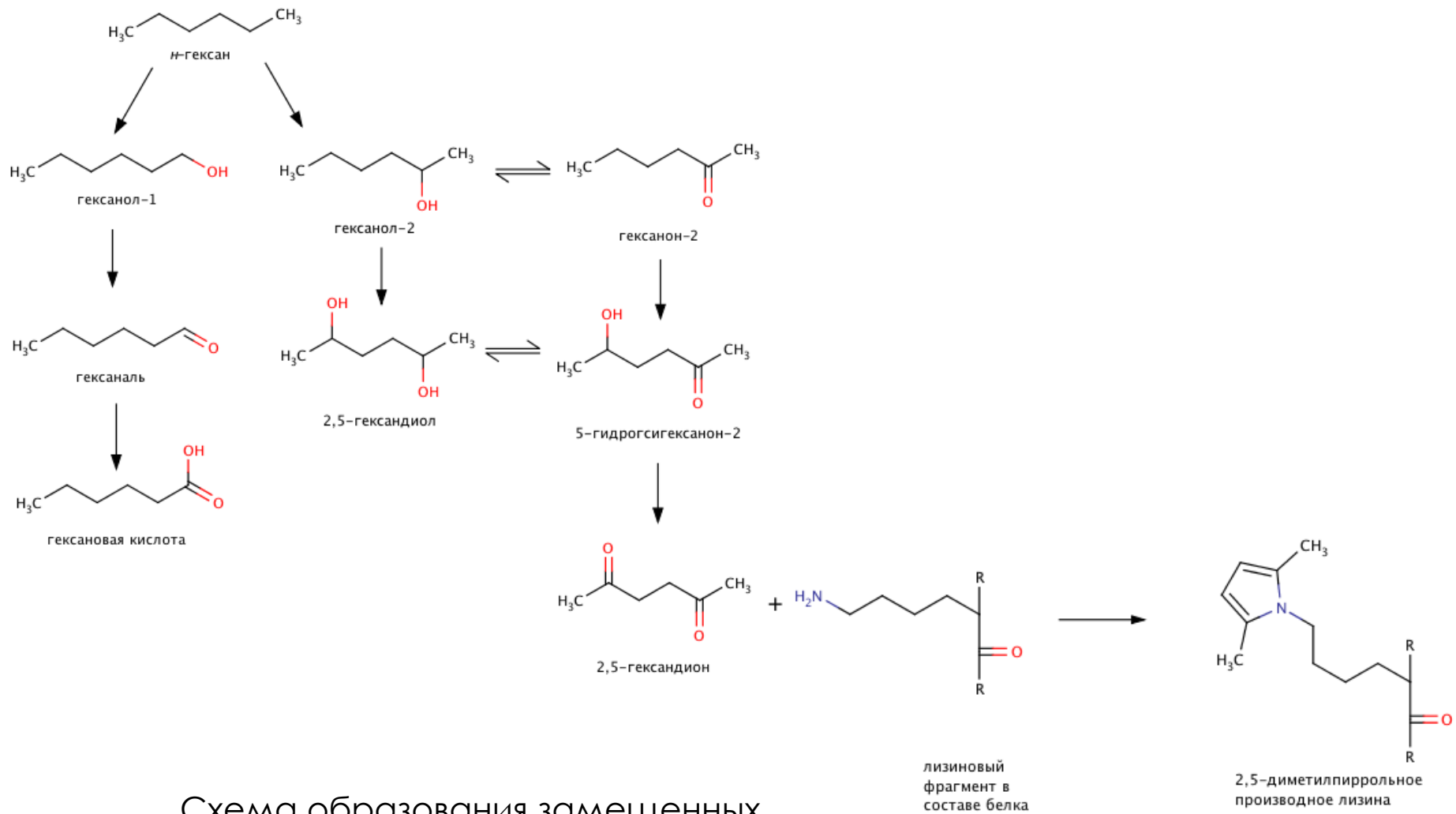


Схема образования замещенных пирролов при реакции 2,5-гександиона с аминогруппами в белке

лизиновый фрагмент в составе белка

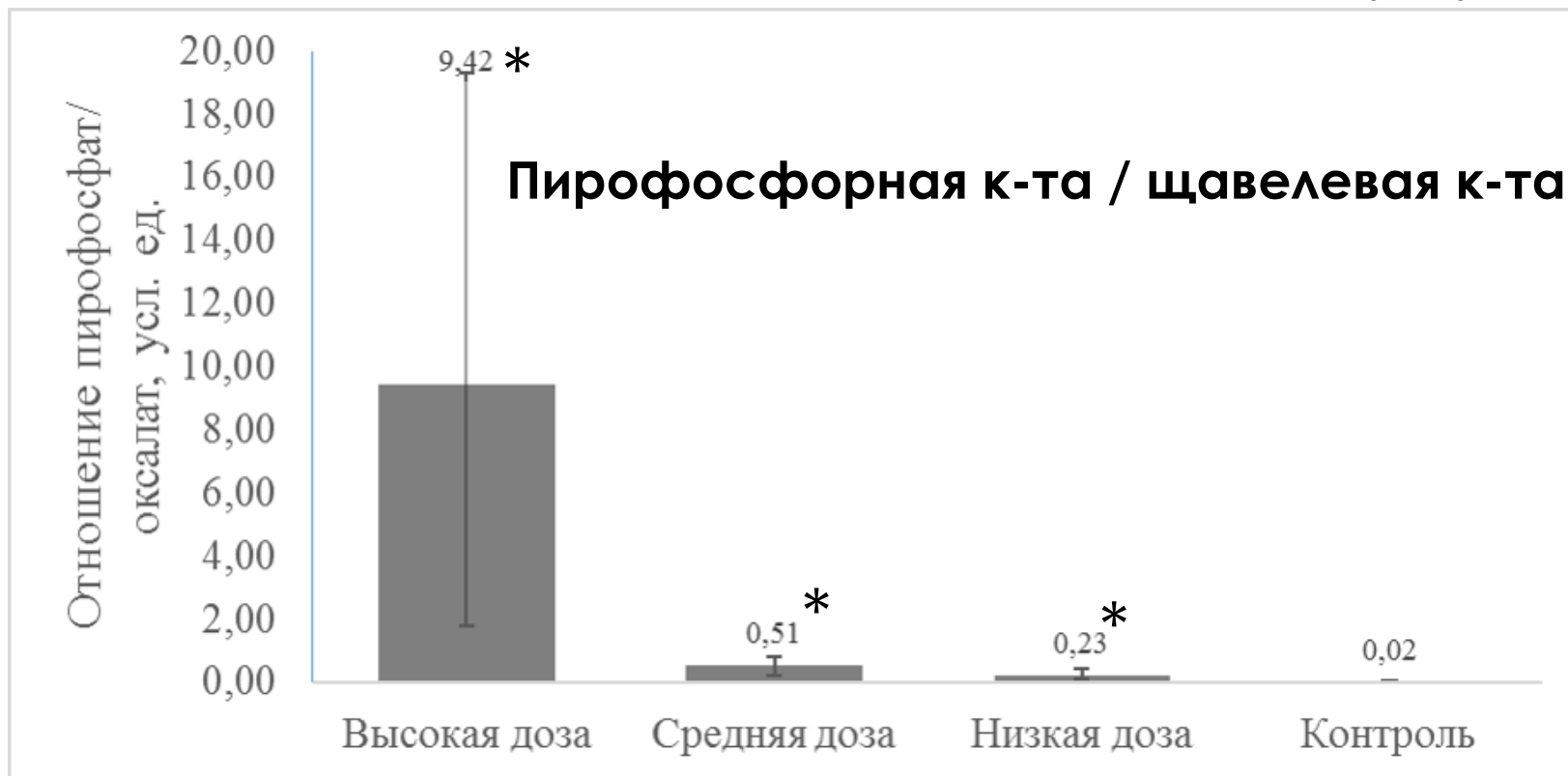
2,5-диметилпиррольное производное лизина



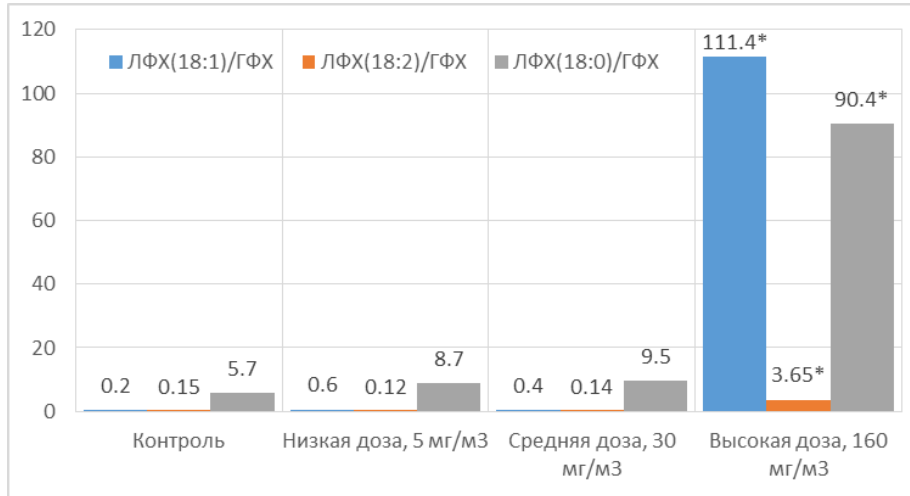
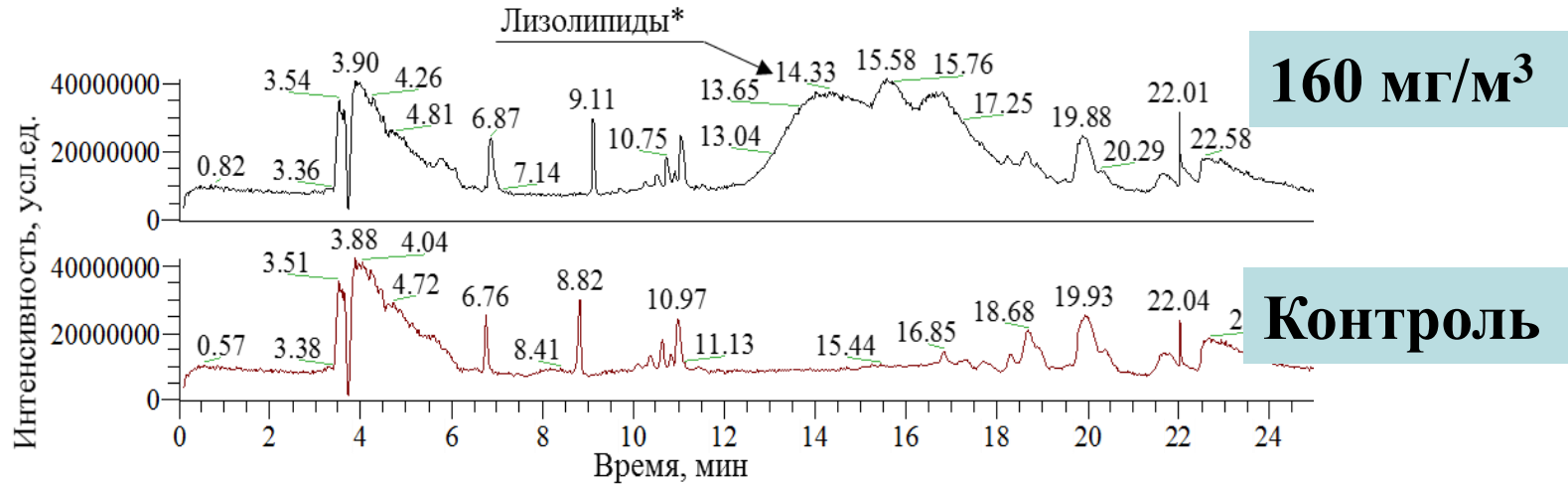
Метаболит	Методы обнаружения	Тип образца
Гексан C_6H_{14}		
Гексанон-2	ГХ-МС ВЭЖХ-МС/МС	Плазма (следы), Мозг (1252 нг/мг), Печень (325 нг/мг)
Гексано-1	ГХ-МС	Мозг (272 нг/мг)
2,5-гександион	ВЭЖХ-МС/МС	Плазма*
Диметилпиррол- норлейцин	ВЭЖХ-МС/МС	Плазма*
Гептан C_7H_{16}		
Гептанон-2	ГХ-МС ВЭЖХ-МС/МС	Плазма (следы), Мозг (17 нг/мг), Печень (40 нг/мг)
Октан C_8H_{18}		
Октанол-1	ГХ-МС	Плазма (4 нг/мл)



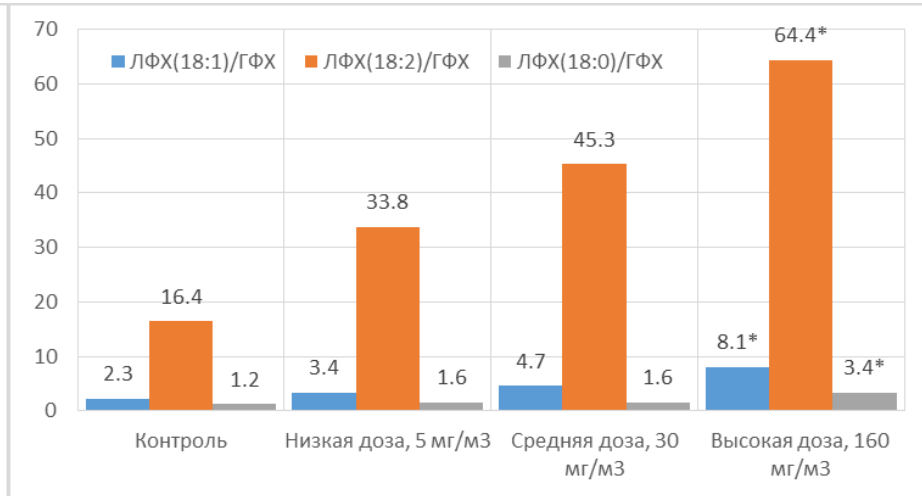
Наиболее чувствительные биомаркеры углеводов C_6-C_{10}



Отношение концентраций пирофосфорной и щавелевой кислот в крови крыс, экспонированных различными концентрациями углеводов C_6-C_{10}



Головной мозг

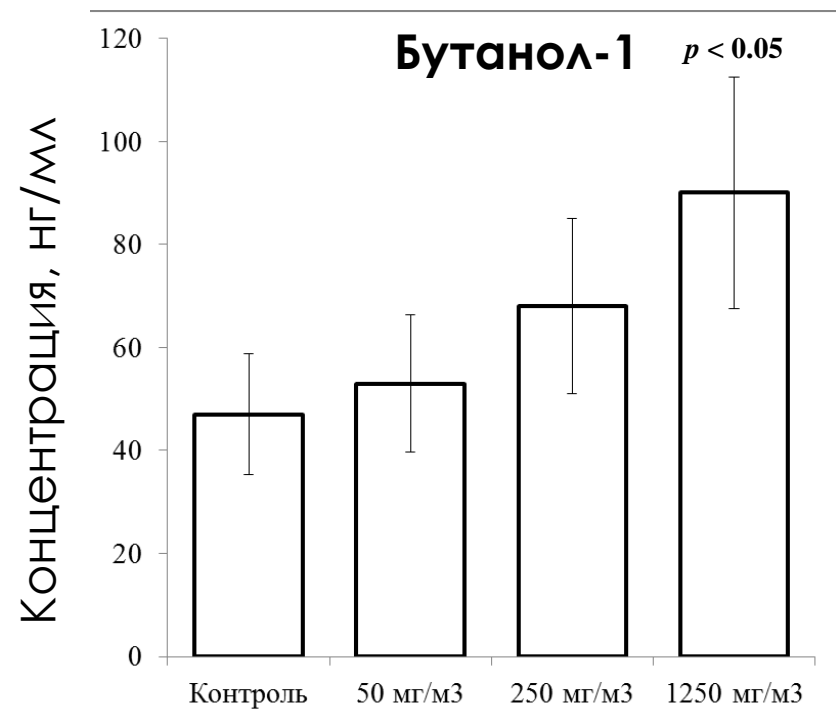
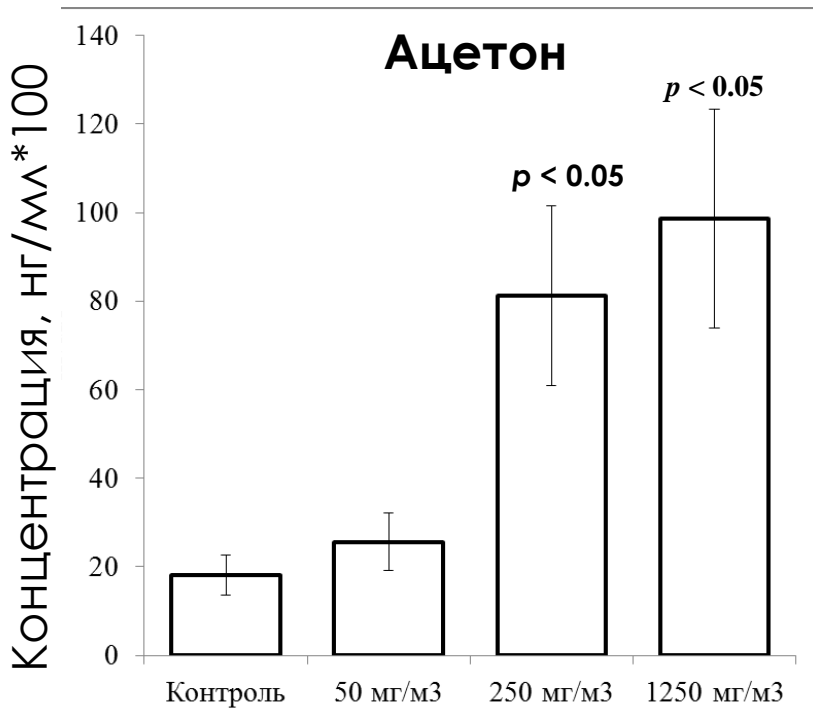


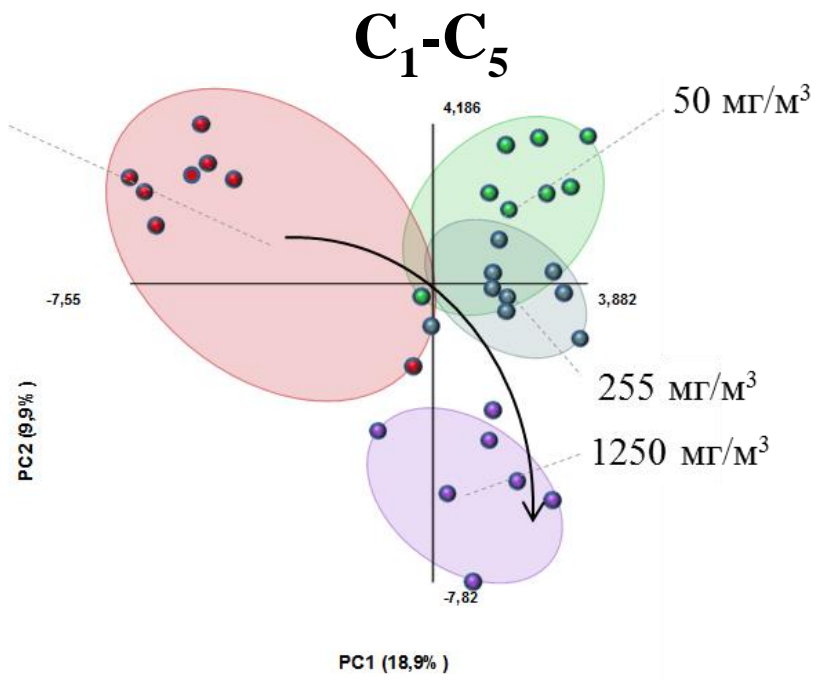
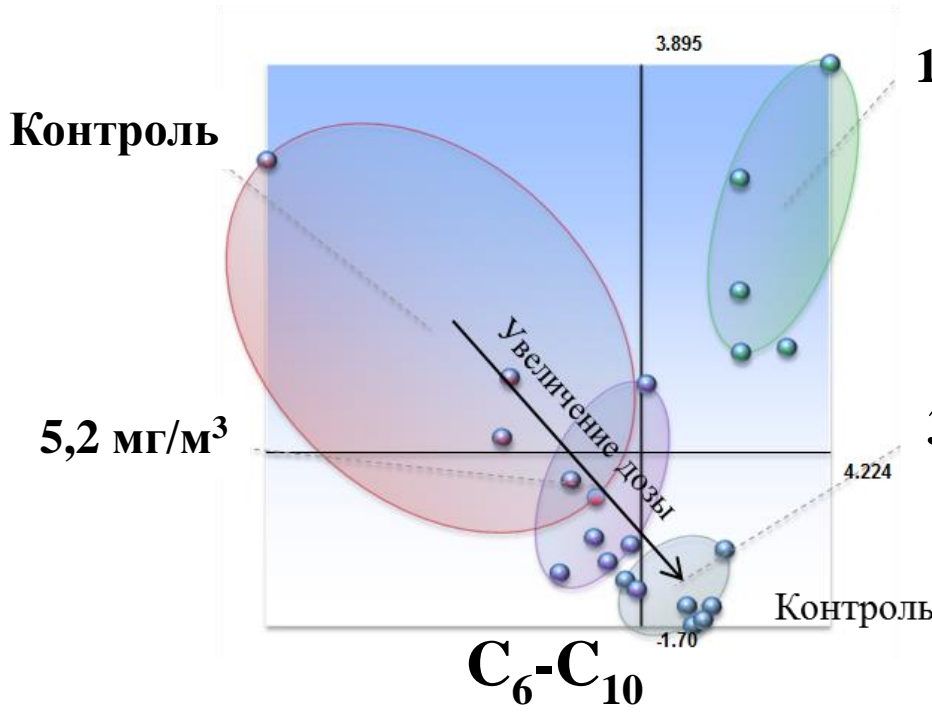
Плазма крови

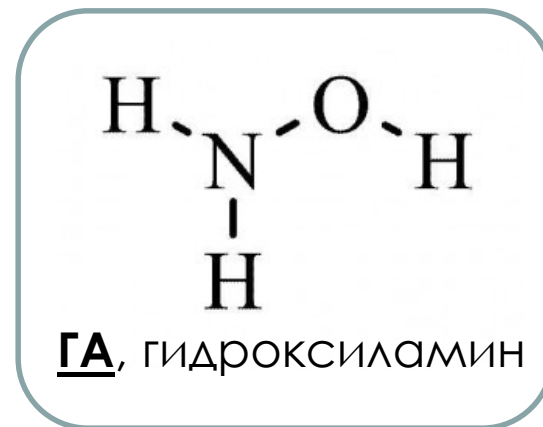
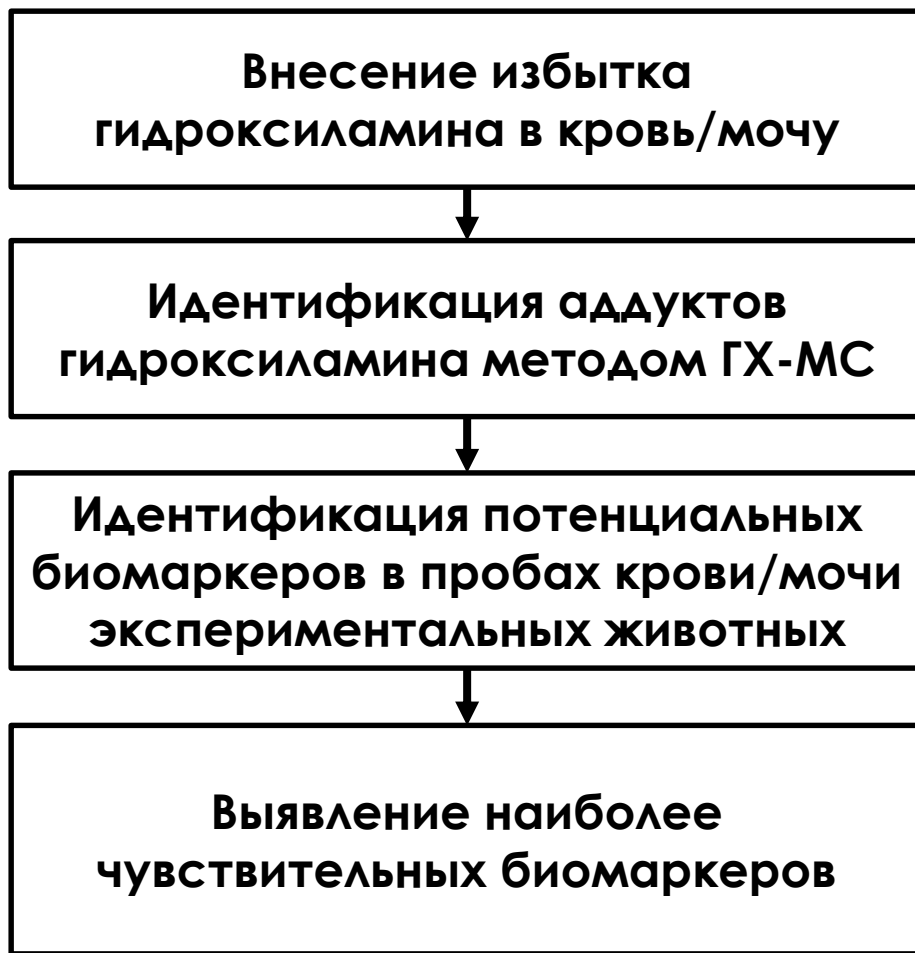
ЛФХ(18:1)/ГФХ – отношение концентраций лизофосфатидилхолина 18:1 (олеил-) и глицерофосфохолина



Метаболит	Контроль	50 мг/м ³	250 мг/м ³	1250 мг/м ³
Ацетон	1803 ± 410	2514 ± 522	8187 ± 2010*	9836 ± 2478*
трет-Бутанол	-	-	<10	<10
Бутанон	-	-	-	<10
Бутанол-1	47 ± 10	53 ± 13	68 ± 10	90 ± 22*



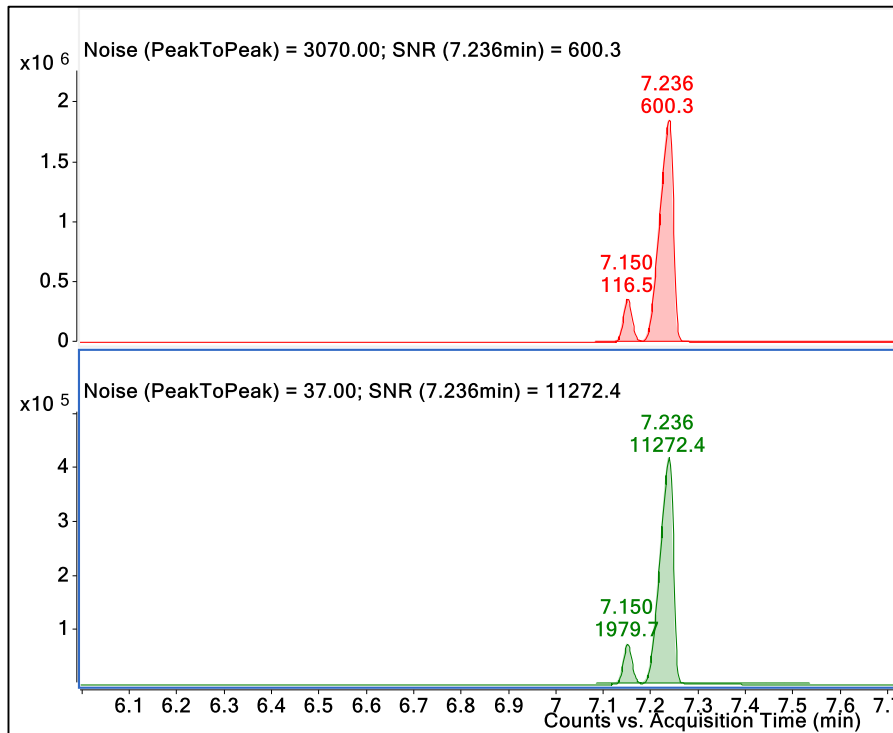




Оценка токсических свойств водно-метанольного раствора нитрата гидроксилamina

Группа	Доза водно-метанольного раствора нитрата гидроксилamina
Группа 1	449 мг/кг однокр.
Группа 2	2,5 мг/кг × 30 д.
Группа 3	0,5 мг/кг × 30 д.
Группа 4	0,1 мг/кг × 30 д.

Производное оксима бензальдегида после извлечения из мочи крыс 1 группы (2,5 мг/кг)



Результаты определения ГА

Серия	Проба (время отбора проб)	Доза	ГА, нг/мл
Однокр.	Плазма (2 ч)	449 мг/кг	4321 ± 1080
	Плазма (24 ч)		421 ± 131
	Моча (24 ч)		29400 ± 7056
Многокр.	Плазма	2,5 мг/кг	304 ± 155
	Моча		3555 ± 640
	Плазма	0,5 мг/кг	12 ± 8
	Моча		106 ± 30
	Плазма	0,1 мг/кг	8 ± 4
	Моча		34 ± 18

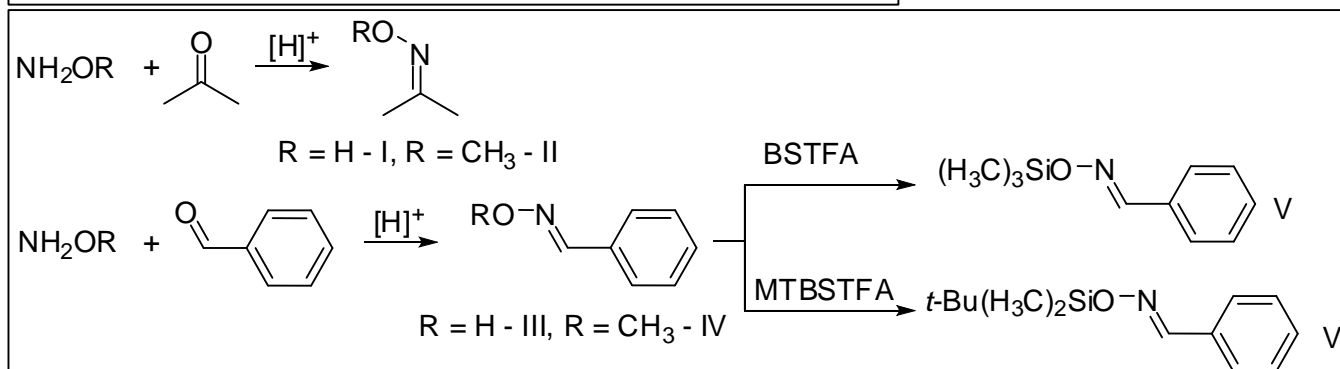
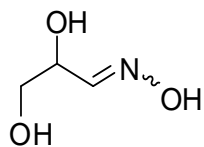
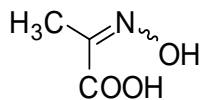


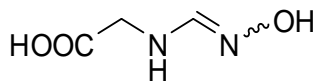
Схема образования различных производных гидроксиламина и метоксиламина



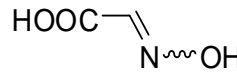
I



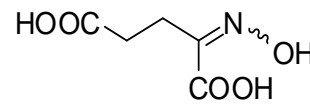
II



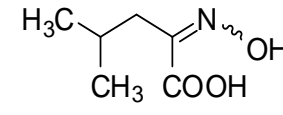
III



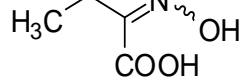
IV



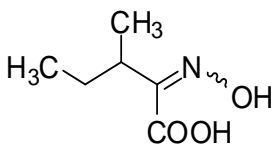
V



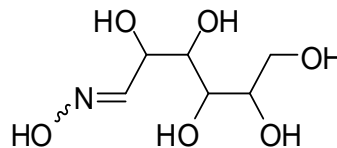
VI



VII



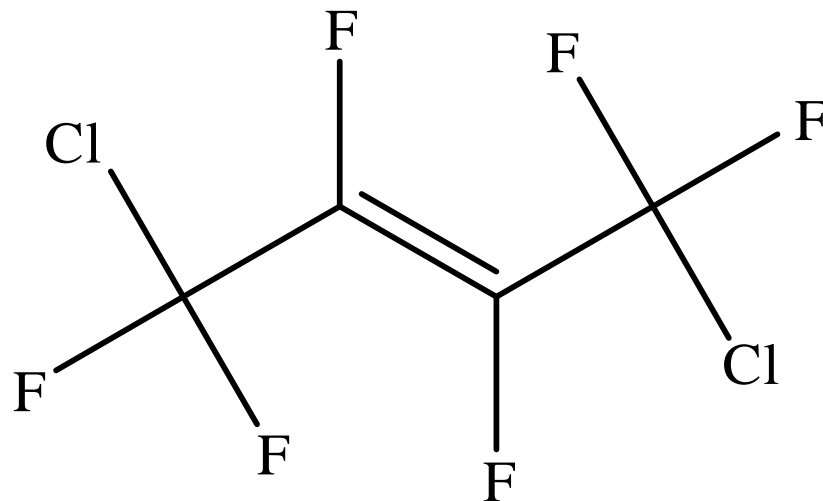
VIII



IX-XI

Структурные формулы идентифицированных метаболитов гидроксилamina в крови и моче

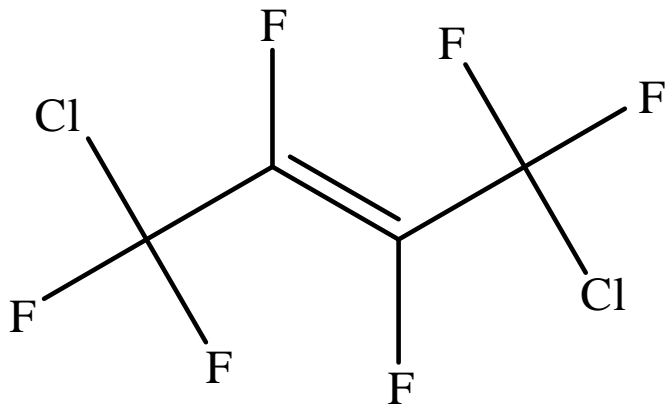
Соединение	Концентрация*, нг/мл		
	101.6 мг/кг (1/2 DL ₅₀) в/ж		
	Плазма крови		Моча
	2 ч	24 ч	24 ч
Гидроксиламин	4321 ± 1080	421 ± 131	29400 ± 7056
I — оксим глицеральдегида	476 ± 286	следы	35820 ± 19343
II — оксим пировиноградной к-ты	259 ± 194	266 ± 173	97982 ± 85244
III — оксим N-формилглицина	106 ± 52**	29 ± 8	-
IV — оксим глиоксалевой к-ты	46 ± 26	38 ± 28	-
V — оксим 2-кетоглутаровой к-ты	-	-	473 ± 121
VI — оксим 2-кетоизокапроновой к-ты	-	-	1466 ± 289
VII — оксим 2-кетомасляной к-ты	-	-	390 ± 98
VIII — оксим 3-метил-2-кетопентановой к-ты	-	-	80 ± 24
IX-XI — оксимы моносахаридов	-	-	>500000** *



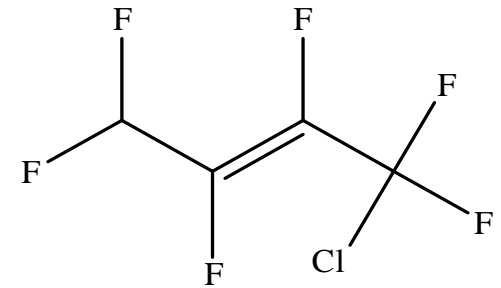
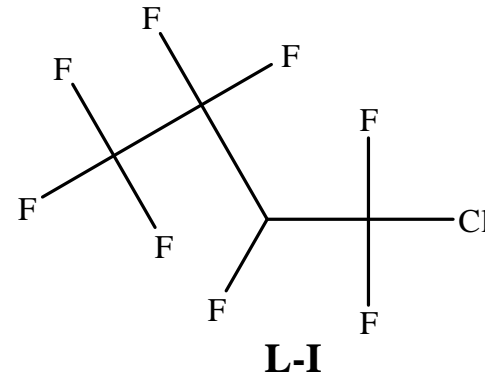
ДХГФ, 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, хладон RL316

Оценка токсических свойств ДХГФ

Группа	Концентрации ДХГФ
Группа 1	600 мг/м³ 4 ч.
Группа 2	84,4 мг/м³ × 4 ч. × 30 д.
Группа 3	18,8 мг/м³ × 4 ч. × 30 д.
Группа 4	4,7 мг/м³ × 4 ч. × 30 д.



ДХГФ, 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, хладон RL316



L-II

Летучие метаболиты хладона

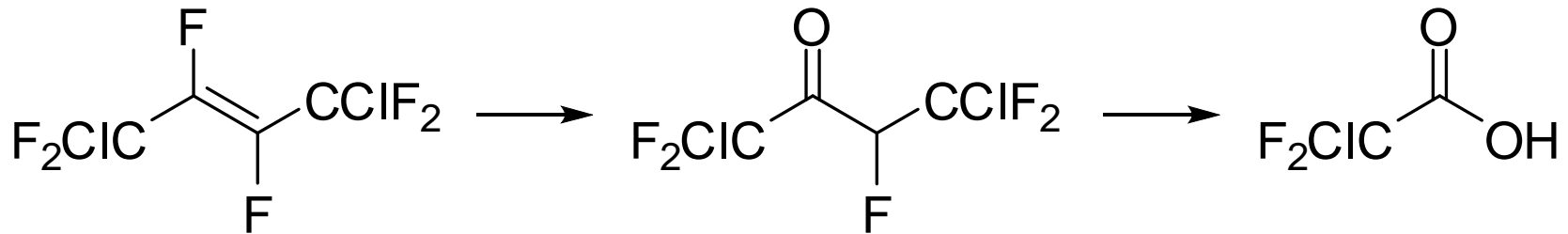
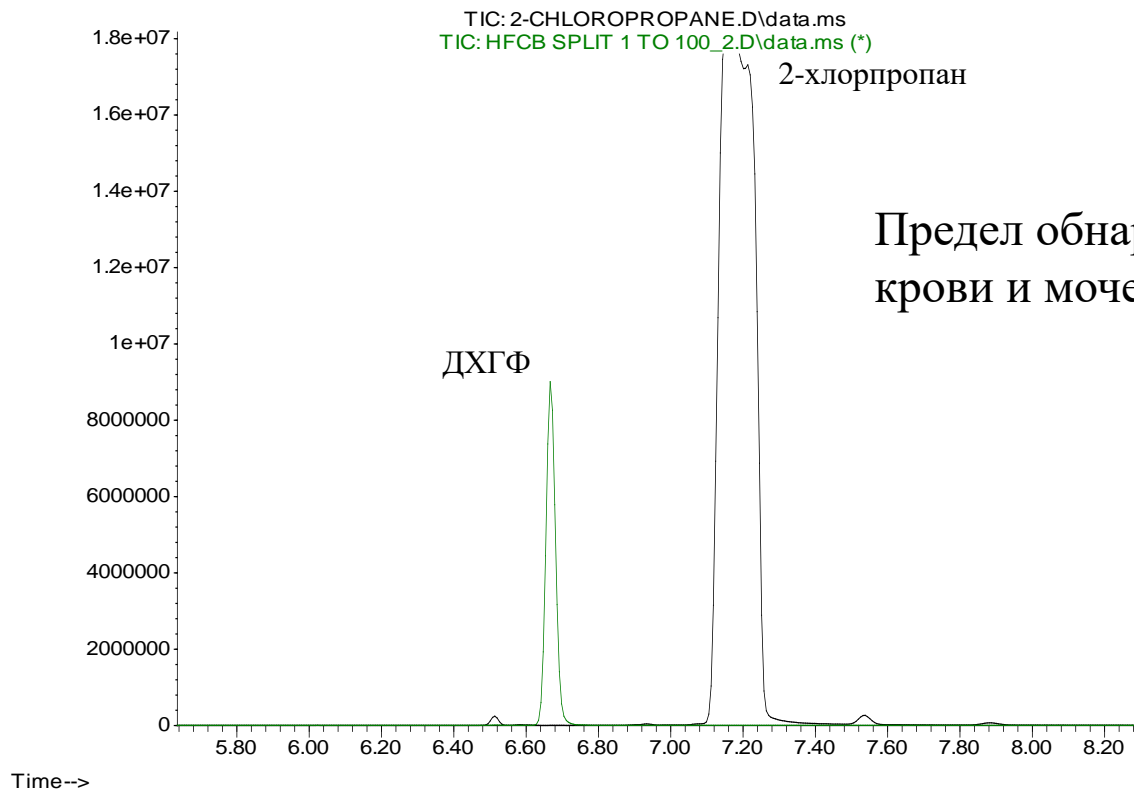


Схема образования кетона и кислоты при гидролизе хладона



Масс-хроматограммы образца ДХГФ и внутреннего стандарта – 2-хлорпропана

Abundance



Предел обнаружения ДХГФ в крови и моче: **5 нг/мл**

Результаты извлечения ДХГФ микроволоконнами с различными типами покрытий из паровой фазы

Тип микроволокна	ДХГФ	2-хлорпропан
85 мкм полиакрилат ("белое")	Не обнаружен	Не обнаружен
60 мкм полиэтиленгликоль ("фиолетовое")	Не обнаружен	Не обнаружен
50/30 мкм дивинилбензол, карбоксен, полидиметилсилоксан ("серое")	3048 ± 610	1488 ± 179
85 мкм карбоксен, полидиметилсилоксан StableFlex ("голубое")	1893 ± 284	1530 ± 260

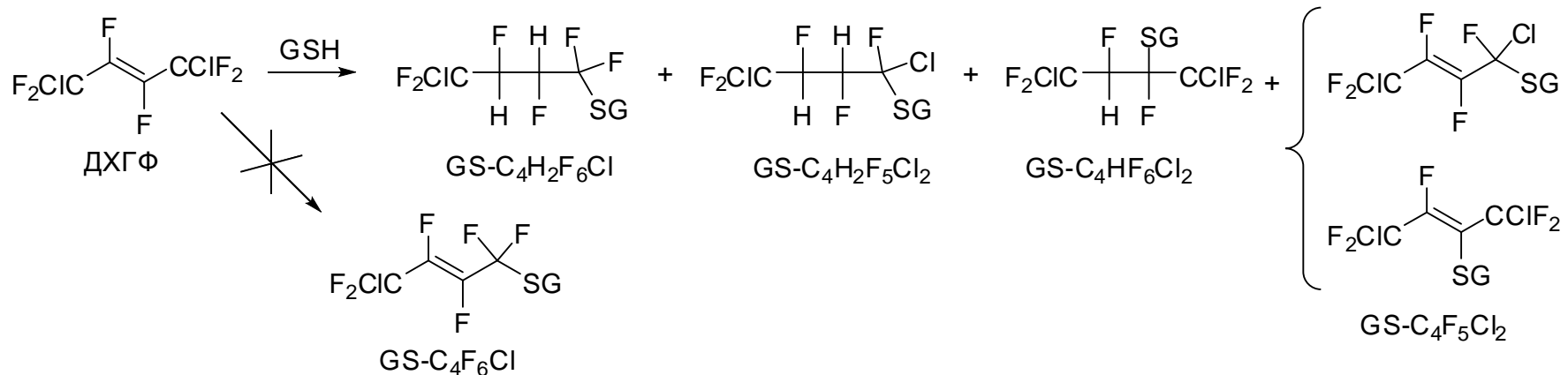


Схема образования аддуктов хлорона с глутатионом

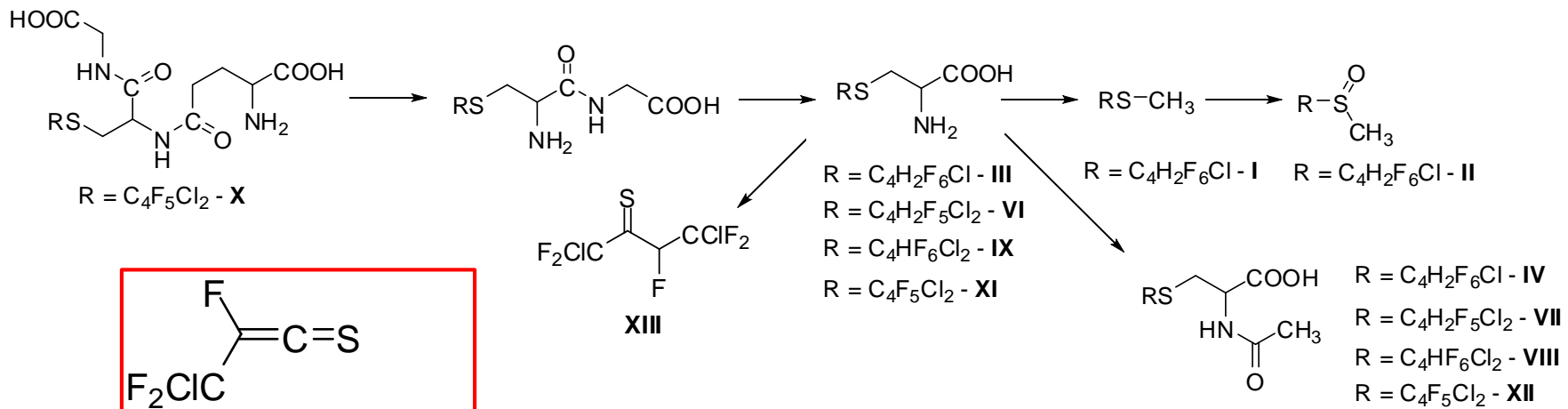
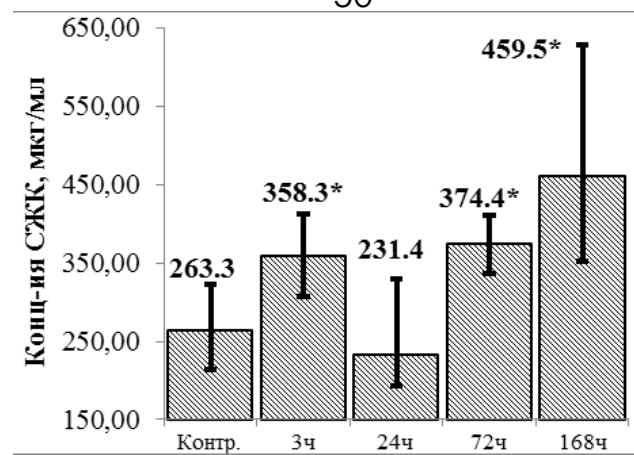


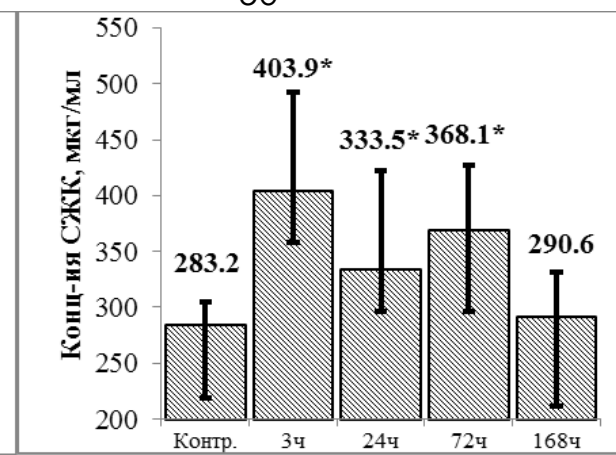
Схема деградации различных аддуктов хлорона с глутатионом

Свободные
жирные кислоты

2x0.4 DL₅₀ RVX

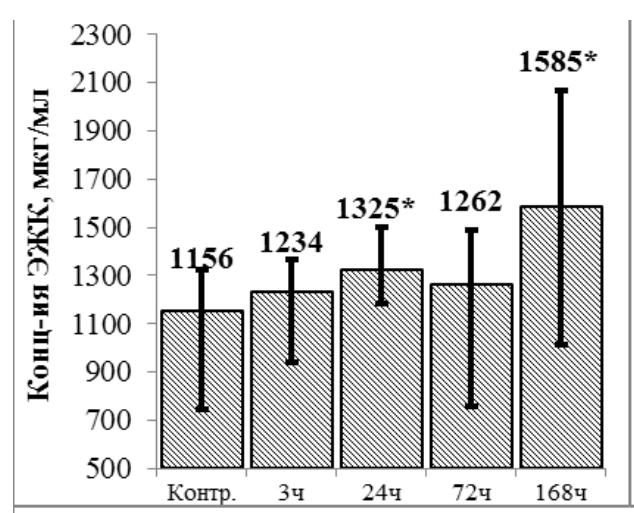


2x0.4 DL₅₀ RVX + карбоксим

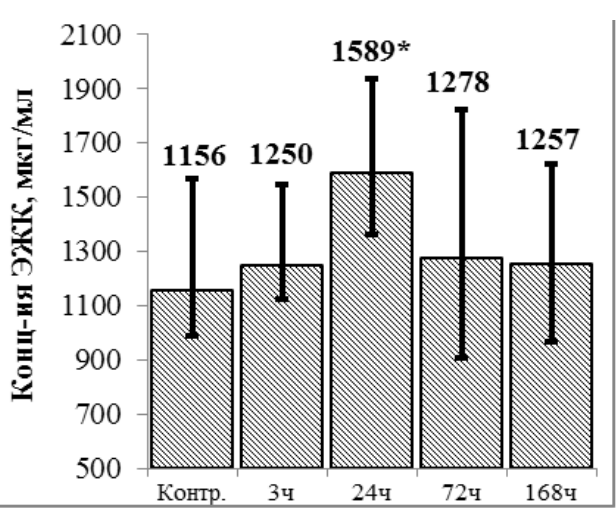


Этерифицированные
жирные кислоты

2x0.4 DL₅₀ RVX

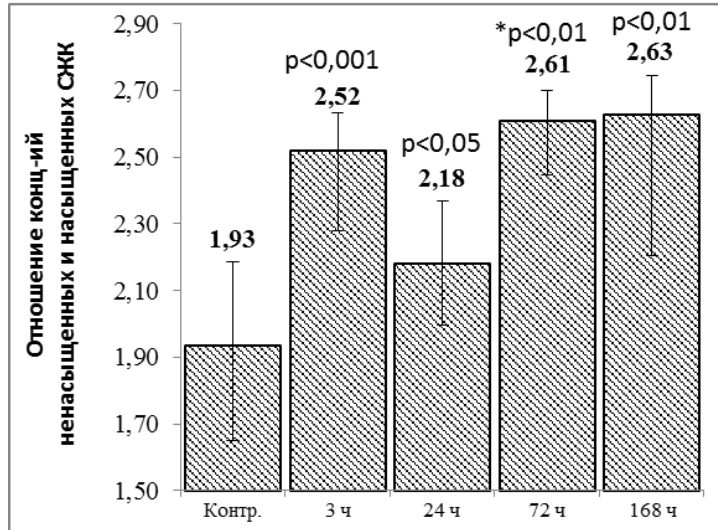


2x0.4 DL₅₀ RVX + карбоксим

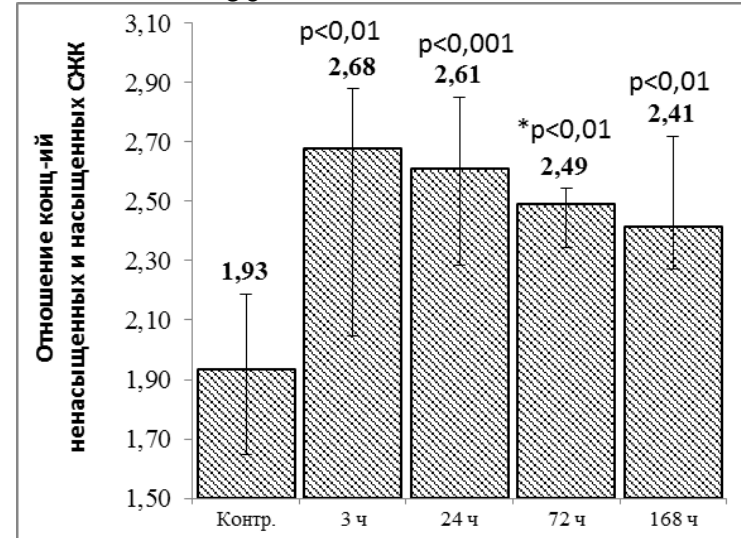




2×0.4 DL₅₀ RVX



2×0.4 DL₅₀ RVX + карбоксим



$$P/S_F = \frac{НСЖК_F}{СЖК}$$

СЖК – суммарная концентрация свободных ЖК в мкг/мл;
НСЖК – суммарная концентрация свободных ненасыщенных ЖК.



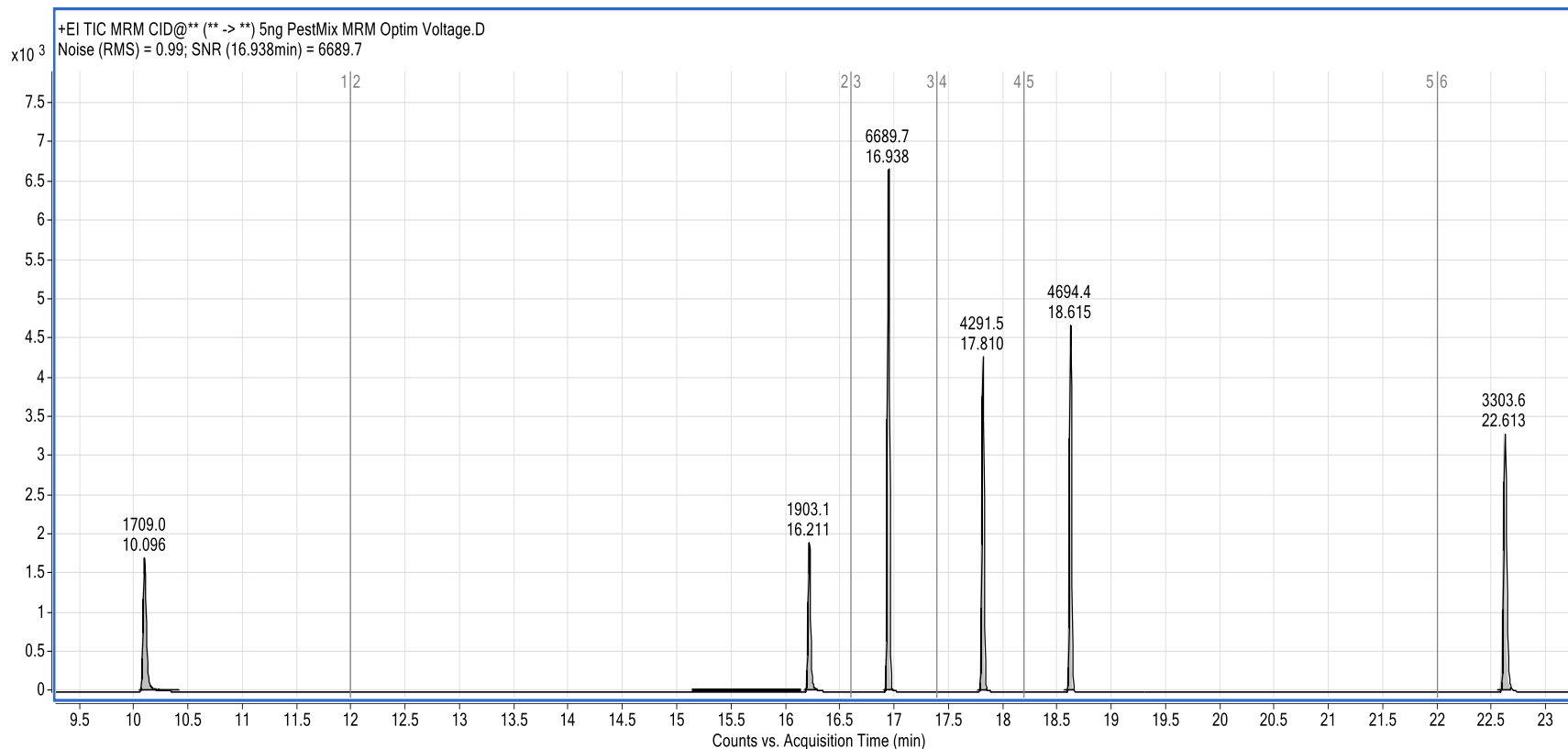
1. Методика измерений массовых концентраций **гидроксиламина** в моче и крови с пределом обнаружения 0.1 нг/мл.
2. Методика измерений массовых концентраций **1,4-дихлоргексафторбутена-2** в моче и крови с пределом обнаружения 5 нг/мл.
3. Методика измерений массовых концентраций **16 летучих промышленных загрязнителей** (аллилхлорид, акрилонитрил, бутилхлорид, дисульфид углерода, хлороацетонитрил, гексахлорэтан, нитробензол, метакрилонитрил, этилметакрилат, метилакрилат, пентахлорэтан, транс-1,4-дихлор-2-бутен, диэтиловый эфир, метилметакрилат, 2-нитропропан, тетрагидрофуран) в биологических пробах в диапазоне концентраций 1 – 20 нг/мл.
4. Методика измерений массовых концентраций **фосфорорганических пестицидов** (диметоат, диазинон, метил паратион, хлорпирифос, фозалон, дихлофос) в моче и крови в диапазоне концентраций 1 – 20 нг/мл.



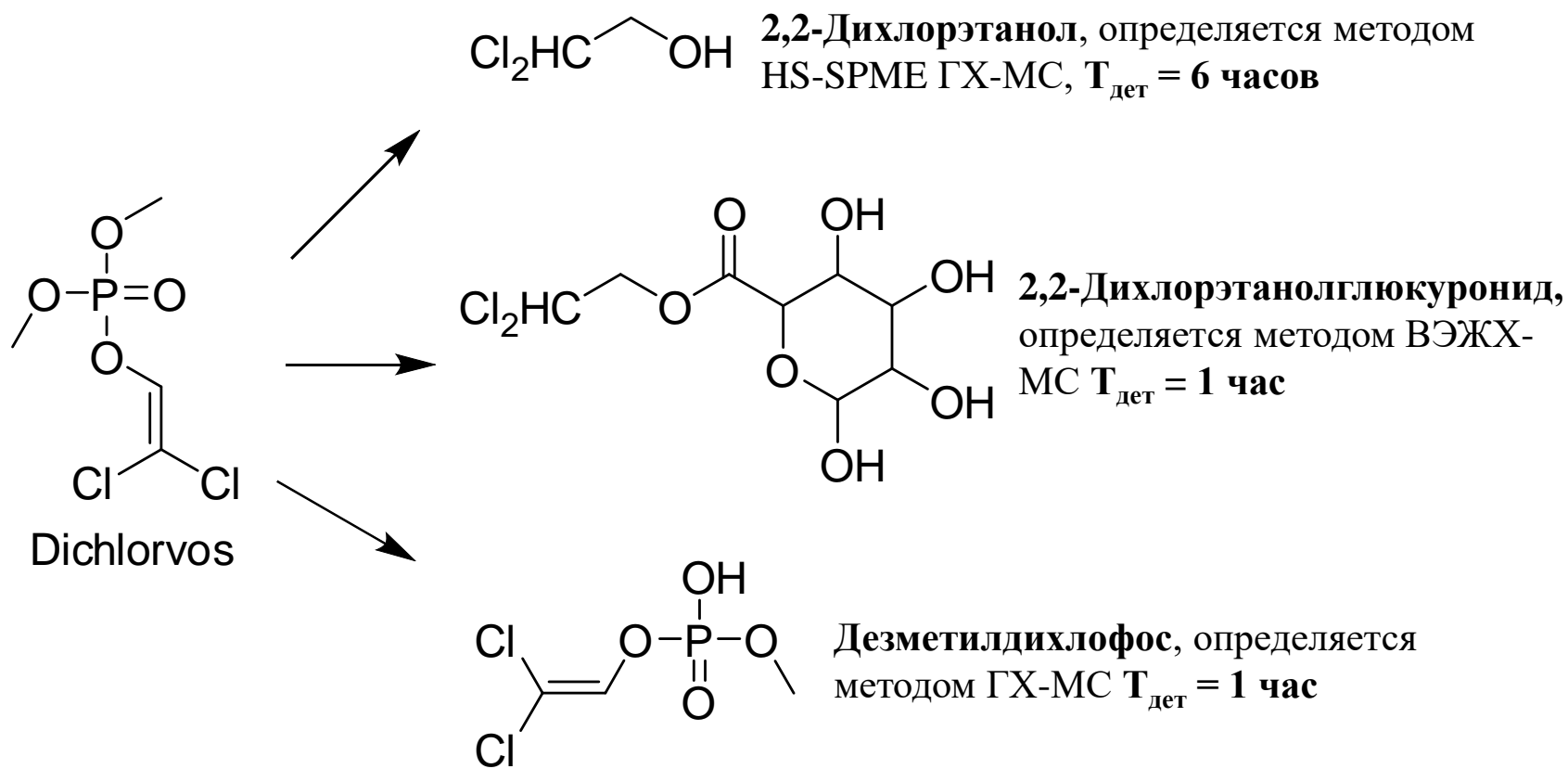
№ п/п	Название соединения	Время удерживания на колонке SPB 1701, мин	Время удерживания на колонке DB-624, мин	Характеристичные ионы, m/z
1	Этиловый эфир	1.76	3.39	59, 45, 74
2	Дисульфид углерода	1.86	3.99	76
3	Аллилхлорид	1.95	4.21	41, 76
4	Акрилонитрил	2.29	4.75	52, 53
5	Метилакрилат	2.67	6.67	55
6	Тетрагидрофуран	2.71	6.84	42, 72
7	Метакрилонитрил	2.79	7.49	67
8	Бутилхлорид	2.92	7.49	56
9	Метилметакрилат	4.12	9.56	69, 100
10	2-Нитропропан	5.19	10.15	41, 43
11	Хлорацетонитрил	5.85	10.22	48, 75, 77
12	Этилметакрилат	5.95	11.59	69
13	Пентахлорэтан	11.02	15.52	117, 167
14	<i>транс</i>-1,4-Дихлор-2-бутен	11.98	16.47	75, 89, 124
15	Гексахлорэтан	12.13	18.17	117, 201
16	Нитробензол	14.78	19.36	77, 123



№ п/п	Временной интервал, мин	Название соединения	Время удерживания, мин	МРМ для количественного анализа	Энергия коллизии, В ¹
1	8.00 – 13.00	Дихлофос	10.082	109 =>79	5
2	14.00 – 16.60	Диметоат	16.199	87 =>46	15
3	16.85 – 17.40	Диазинон	16.942	137 => 84	15
4	17.40 – 18.20	Паратион метил	17.796	263 => 109	15
5	18.20 – 21.50	Хлорпирифос	18.601	197 =>169	15
6	22.30 – 30.60	Фозалон	22.600	182 =>111	15



Идентификация метаболитов фосфорорганических пестицидов и определение периода их детектирования.





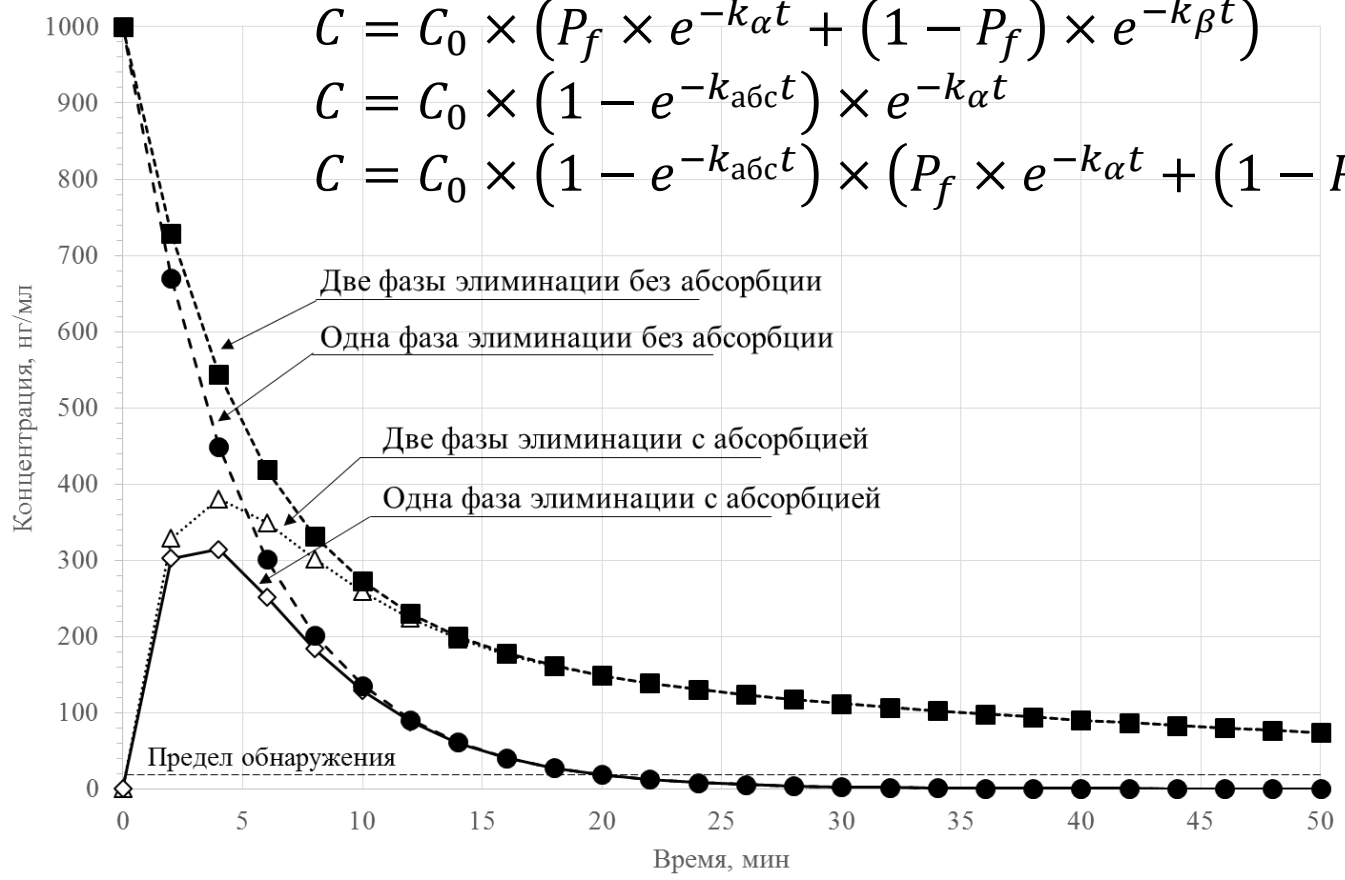
Уравнения зависимости концентрации ксенобиотика в крови от времени:

$$C = C_0 \times e^{-k_{\alpha} \cdot t}$$

$$C = C_0 \times (P_f \times e^{-k_{\alpha} t} + (1 - P_f) \times e^{-k_{\beta} t})$$

$$C = C_0 \times (1 - e^{-k_{абс} t}) \times e^{-k_{\alpha} t}$$

$$C = C_0 \times (1 - e^{-k_{абс} t}) \times (P_f \times e^{-k_{\alpha} t} + (1 - P_f) \times e^{-k_{\beta} t})$$



Графики зависимости концентраций ксенобиотика от времени при различных формах абсорбции и элиминации



Модель	Уравнение
Одна фаза элиминации без абсорбции	$C_0 = \frac{C}{e^{-k_\alpha t}}$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \frac{C_0}{k_\alpha}$
Две фазы элиминации без абсорбции	$C_0 = \frac{C}{P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1 - P_f) \times e^{-k_\beta t}}$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \left(\frac{P_f}{k_\alpha} + \frac{1 - P_f}{k_\beta} \right)$
Одна фаза элиминации с абсорбцией	$C_0 = \frac{C}{(1 - e^{-k_{абс}t}) \times e^{-k_\alpha t}}$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \frac{2k_\alpha + k_{абс}}{k_\alpha(k_\alpha + k_{абс})}$
Две фазы элиминации с абсорбцией	$C_0 = \frac{C}{(1 - e^{-k_{абс}t}) \times (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1 - P_f) \times e^{-k_\beta t})}$
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \left(\frac{P_f}{k_\alpha} + \frac{1 - P_f}{k_\beta} - \frac{P_f}{k_{абс} + k_\alpha} - \frac{1 - P_f}{k_{абс} + k_\beta} \right)$



Время	Доза _{ист} - Доза _{оценка} , %*				
	Диметоат (Доза _{ист} = 40 мг/кг)	Диазинон (Доза _{ист} = 15 мг/кг)	Метилпаратион (Доза _{ист} = 40 мг/кг)	Хлорпирифос (Доза _{ист} = 20 мг/кг)	Фозалон (Доза _{ист} = 30 мг/кг)
20 мин	+26	+7	+16	+20	-20
30 мин	-65	0	-38	-65	+2
1 час	+33	+17	+1	+20	-30
2 часа	-53	-40	-65	-70	-75
3 часа	-38	+13	-3	+10	+27
4 часа	-69	+37	+70	+165	+1
6 часов	-92	-11	-31	+20	+50
1 день	-	+67	+458	-30	+150

Примечание: * Отклонение вычисляли следующим образом: (Оценка дозы - Истинная доза) / Истинная доза × 100%



В общем виде, порядок действий, предпринимаемых для экстраполяции основных токсикокинетических параметров включает:

1. Определение типа кинетического уравнения (внутри- или внесосудистое, одна фаза элиминации или две).
2. Вычисление отношения площадей под кривыми для одинаковых доз ксенобиотика для человека и животного [Tang H., et al, 2011].
3. Масштабирование периода полувыведения для одной или нескольких фаз элиминации [Bachmann K. et al, 1996, Sarver J.G. et al, 1997].
4. При необходимости, масштабирование константы абсорбции [Hao K. et al, 2014, Kagan L. et al, 2014].
5. Вычисление периода возможного обнаружения.



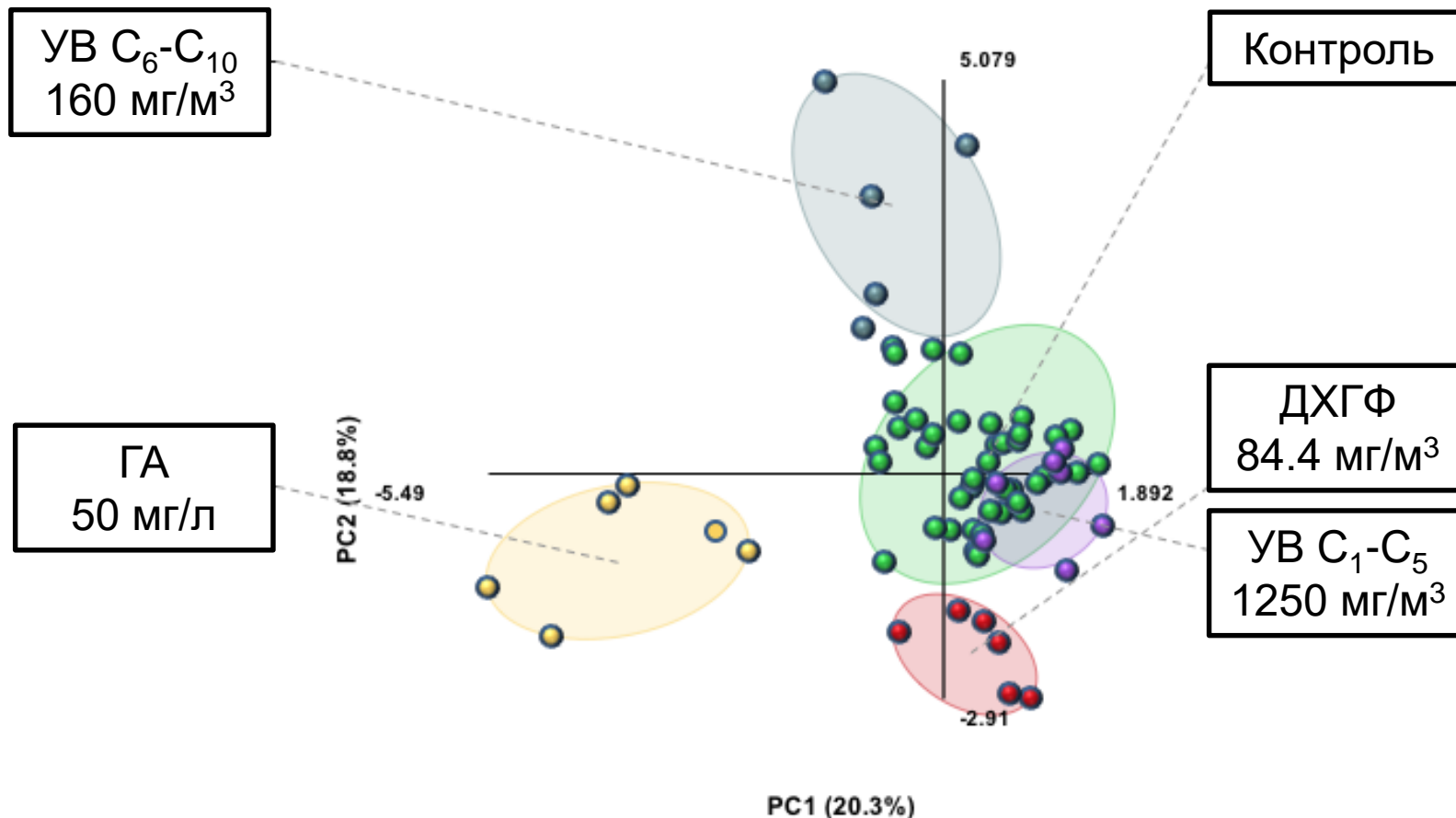
Соединение	Экспериментальные периоды детектирования, сутки		Масштабированные периоды детектирования
	Кровь	Моча	Кровь
Дихлофос	<1	<1	-
Диметоат	3	3	4.3 дня
Диазинон	3	3	9 дней
Метил паратион	2	3	4.1 дня
Хлорпирифос	3	3	4.4 дня
Фозалон	5	>6	18 ч
Этиловый эфир	5	>5	3.9 дня
CS ₂	2	1	32 ч
Аллилхлорид	1	1	7 ч
Акрилонитрил	1	5	1.5 ч
Метилакрилат	1	>5	2.3 дня
Метакрилонитрил	1	5	2.2 дня
Бутилхлорид	2	>5	19 ч
Метилметакрилат	1	1	-
2-нитропропан	1	5	16 ч
Хлорацетонитрил	1	1	2 ч
Этилметакрилат	1	5	-
1,4-дихлор-2-бутен	1	5	12 ч
Пентахлорэтан	1	5	9.5 ч
Гексахлорэтан	1	5	-
Нитробензол	1	>5	2.9 дня



Вещество	Пороговая конц-я	Наиболее чувствительные биомаркеры (порог обнаружения)	
		Экспозиции	Эффекта
Хладон RL316	18.2 мг/м ³	ДХГФ и 1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантион-2 в крови (18.2 мг/м ³)	Гулоновая к-та / инозитолфосфат в крови (18.2 мг/м ³)
Гидроксиламин	22.6 мкг/кг	ГА и пируватоксим в моче (22.6 мкг/кг)	3-Метил-2-кетопентановая к-та в моче (22.6 мкг/кг)
Смесь углеводородов С₆-С₁₀	5.2 мг/м ³	Кетоны и спирты С ₆ -С ₈ в крови и моче (160 мг/м ³)	Пирофосфат / щавелевая к-та в крови (5.2 мг/м ³)
Смесь углеводородов С₁-С₅	50.2 мг/м ³	Ацетон и <i>n</i> -бутанол в крови и моче (250 мг/м ³)	Глицерол-3-фосфат в крови (50.2 мг/м ³)



Сравнение воздействия различных химических факторов на метаболические профили плазмы крови крыс





1. Обоснована и реализована хромато-масс-спектрометрическая методология анализа биологических объектов, включающая метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга, методики определения экзогенных веществ и методики метаболического профилирования биологических образцов. Методология позволяет устанавливать пути биотрансформации в организме и механизмы действия ранее неизученных ксенобиотиков.

2. Разработаны аналитические схемы безэталонной идентификации биомаркеров токсикантов, включающие твердофазную микроэкстракцию определяемых компонентов из паровой фазы, экстракционное вымораживание биологических образцов при различных значениях pH, получение различных производных и автоматизированную обработку данных.

3. Предложено выделить в специализированные базы данных масс-спектры ионизации электронами и газохроматографические индексы удерживания аналитов, составляющие метаболические профили. Обращение к этим базам данных повышает эффективность газовой хроматографии с масс-селективным детектированием низкого разрешения для метаболического профилирования плазмы крови, мочи, органов и тканей. Для минимизации ошибок II рода при количественном определении потенциальных биомаркеров проведено обоснование необходимого размера экспериментальной выборки биологических образцов для нецелевого метаболического профилирования.

4. Сочетание предложенных хроматографических методик одновременной регистрации профилей свободных и связанных жирных кислот плазмы крови позволили пересмотреть токсикологические эффекты RVX в максимально переносимых дозах, включающие дозозависимое повышение суммарных концентраций этерифицированных и свободных форм жирных кислот, а также отношений концентраций ненасыщенных и насыщенных свободных жирных кислот в плазме крови. Данные отношения являются биомаркером эффекта RVX и служат показателем эффективности антидотной терапии карбоксимом.

5. Разработана высокочувствительная хромато-масс-спектрометрическая методика определения гидроксилamina в плазме крови и моче с двухстадийной дериватизацией бензальдегидом и БСТФА. Методика обеспечивает предел обнаружения на уровне 30 нг/мл при использовании ГХ-МС с одним квадруполом и 0,1 нг/мл при использовании ГХ-МС с системой трех квадруполов.
6. Разработанные методики определения лизофосфолипидов, в частности, арахиниллизофосфатидилэтанолamina, а также стеарил-, олеил-, линолил- и арахидонилфосфатидилхолинов в системном кровотоке и тканях головного мозга позволили изучить механизм хронического ингаляционного воздействия алифатических углеводов с числом атомов углерода от 6 до 10, приводящим к значительному повышению их концентраций.
7. Проведена идентификация и количественное определение оксимов, образующихся при взаимодействии гидроксилamina с 2-кетокислотами, глицеральдегидом, глиоксальной кислотой, N-формилглицином и несколькими моносахаридами в биологических средах. Таким образом, установлен основной механизм биотрансформации гидроксилamina в организме.
8. Проведена идентификация и определение аддуктов 1,4-дихлоргексафторбутена-2 с глутатионом в различных биосредах, что позволило выявить основной механизм его биотрансформации, включающий восстановительное замещение атомов хлора, образование указанных аддуктов и их дальнейшую деградацию до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов.
9. Выявлены подходы для более детальной структурной характеристики аналитов класса алкилфенолов, характеризующихся недостаточно информативными масс-спектрами ИЭ. При изучении структур позиционных изомеров алкилфенолов с использованием масс-спектров диссоциации, индуцированной соударениями протонированных молекул пара-замещенных алкилфенолов C₄-C₉, в условиях положительной химической ионизации регистрируются характеристические ионы [M+H-H₂O]⁺, не свойственные другим позиционным изомерам.
10. Разработанные аналитические подходы позволили создать методики, обеспечивающие чувствительность, достаточную для биоаналитического мониторинга пороговых концентраций алифатических углеводов с числом атомов углерода от 1 до 10, 1,4-дихлоргексафторбутена-2 и гидроксилamina, а также для ретроспективной диагностики однократных отравлений максимально переносимыми дозами RVX и сублетальными дозами летучих промышленных загрязнителей и фосфорорганических пестицидов.

Спасибо за
внимание!

Полный перечень соединений, рассматриваемых в данной работе 56

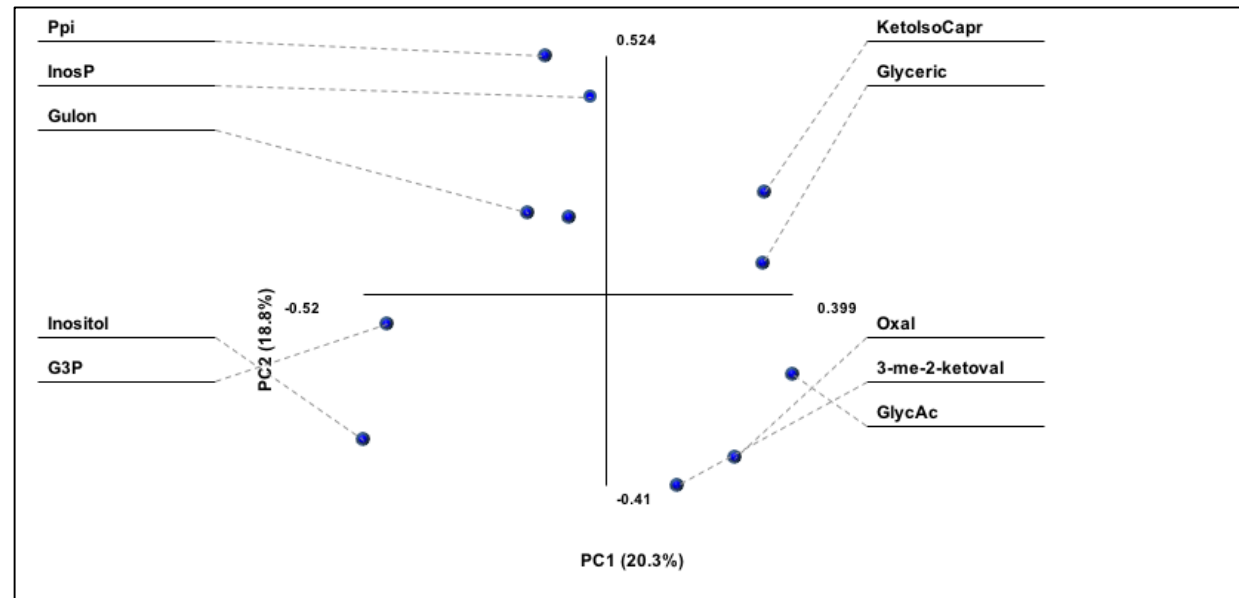
Химический фактор	LD ₅₀ крысы, в/ж, мг/кг	Биомаркеры экспозиции	Методика опр-я биомаркеров экспозиции
Алифатические углеводороды			
Смесь УВ C ₆ -C ₁₀ : гексан, гептан, октан, нонан и декан	Не дост.	ДМПН ²	ВЭЖХ-МС
		Гексанон-2	ГХ-МС
		Гептанон-2	
Смесь УВ C ₁ -C ₅ : метан, этан, пропан, бутан, изобутан, пентан, изопентан	Не дост.	Октанол-1	ГХ-МС-SPME
		Ацетон	
		Бутанол-1	
		<i>трет</i> -Бутанол	
		Бутанон-2	
Чрезвычайно опасные токсиканты			
Зарин	0.55	Аддукты с АСhE и HSA	ВЭЖХ-МС и ГХ-МС
Зоман	0.16		
RVX	0.02		
Иприт	0.7	Аддукты с ДНК и глобином	ВЭЖХ-МС и ГХ-МС
Монофторуксусная кислота	0.22	Монофторуксусная кислота	ГХ-МС
Фосфорорганические пестициды			
Дихлофос	25-80	Дихлорэтанол	ГХ-МС-SPME
Диметоат	28-30	Диметоат.	ГХ-МС/МС
Диазинон	250-400	Пиримидиндиол	ГХ-МС
Метилпаратион	6-50	4-нитрофенол	ГХ-МС
Хлорпирифос	95-270	Хлорпирифос	ГХ-МС/МС
Фозалон	82-205	Фозалон	ГХ-МС/МС
Летучие токсиканты			
Гидроксиламин	898	Гидроксиламин	ГХ-МС/МС
		Пируватоксим	ГХ-МС
ДХГФ	86	ДХГФ	ГХ-МС-SPME
Аллилхлорид	460	Аллилхлорид	
Акрилонитрил	25-186	Акрилонитрил	
Бутилхлорид	2670	Бутилхлорид	
Дисульфид углерода	2780	Дисульфид углерода	
Хлорацетонитрил	220	Хлорацетонитрил	
Гексахлорэтан	4460	Гексахлорэтан	
Нитробензол	780	Нитробензол	
Метакрилонитрил	200	Метакрилонитрил	
Этилметакрилат	14800	Этилметакрилат	
Метилакрилат	300	Метилакрилат	
Пентахлорэтан	920	Пентахлорэтан	
<i>транс</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	89	<i>транс</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	
Диэтиловый эфир	1215	Диэтиловый эфир	
Метилметакрилат	7872	Метилметакрилат	
2-Нитропропан	720	2-Нитропропан	
Тetraгидрофуран	1650	Tetraгидрофуран	



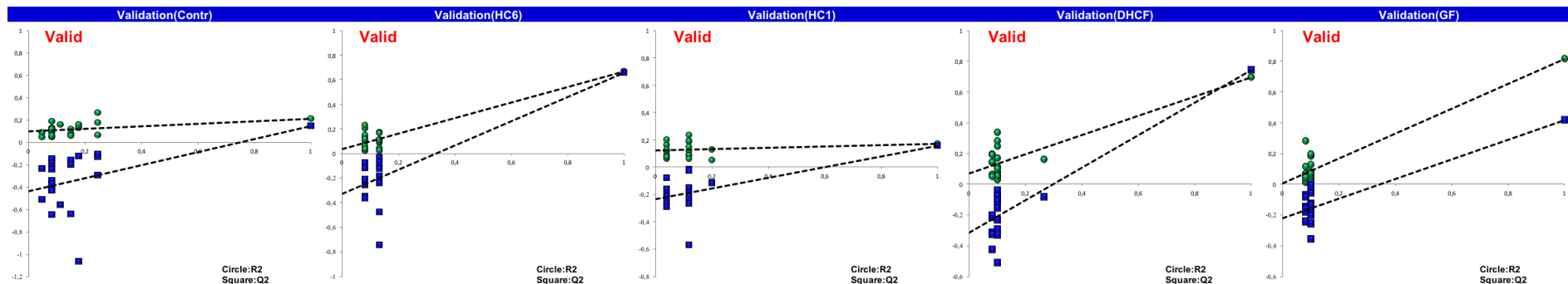
Биомаркеры различных органических соединений

Вычисление нагрузок на главные компоненты

$$PC1 = \sum_{i=1}^n p_i \times C_i$$

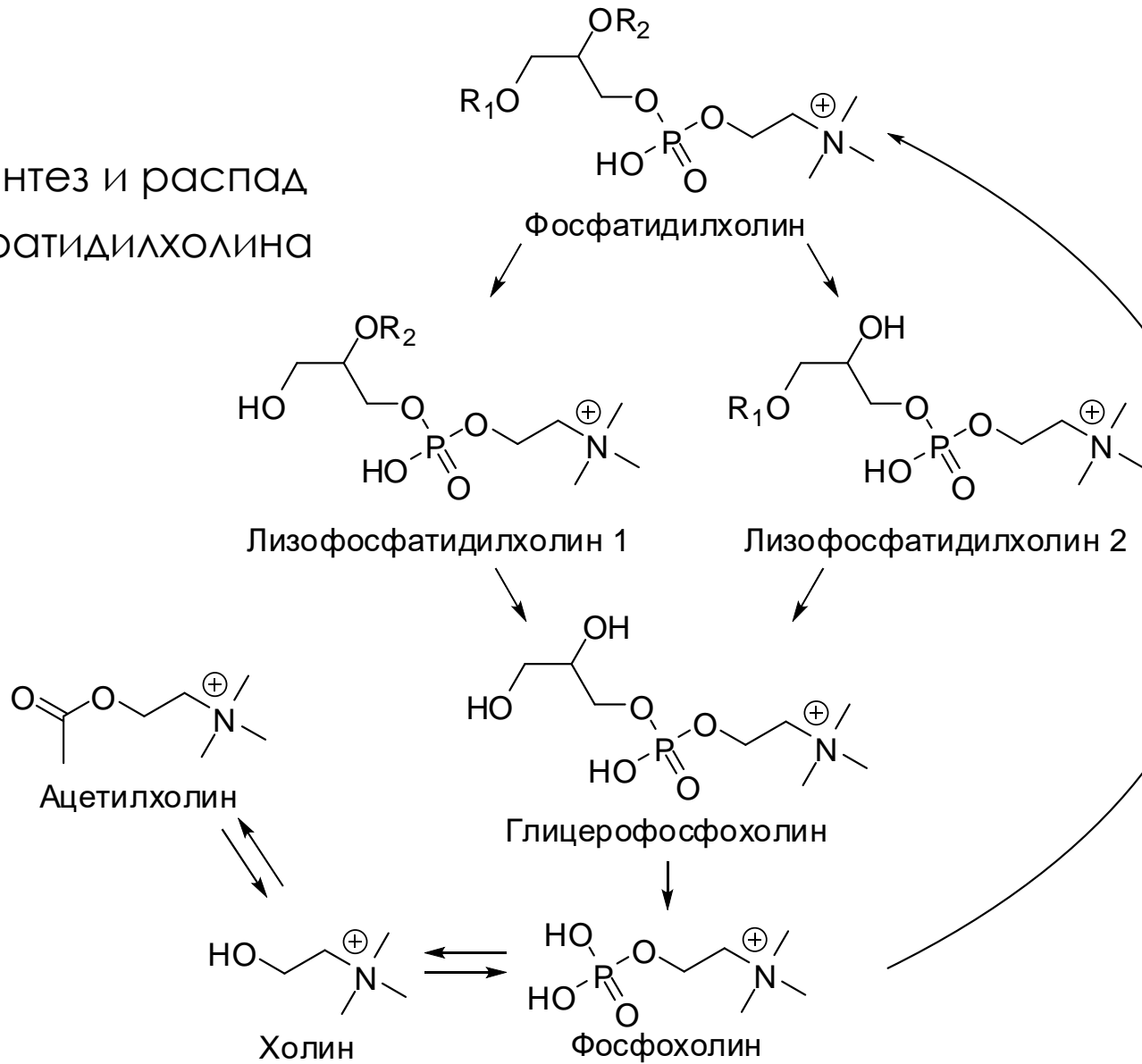


Variables	pi	Comp 1	Comp 2
GlycAc	p1	0,400	-0,175
Oxal	p2	0,276	-0,359
KetolsoCapr	p3	0,338	0,225
Glyceric	p4	0,336	0,069
3-me-2-ketoval	p5	0,150	-0,419
Ppi	p6	-0,130	0,525
G3P	p7	-0,471	-0,065
Mannonic	p8	-0,081	0,171
Inositol	p9	-0,522	-0,319
Gulon	p10	-0,168	0,180
InosP	p11	-0,033	0,434



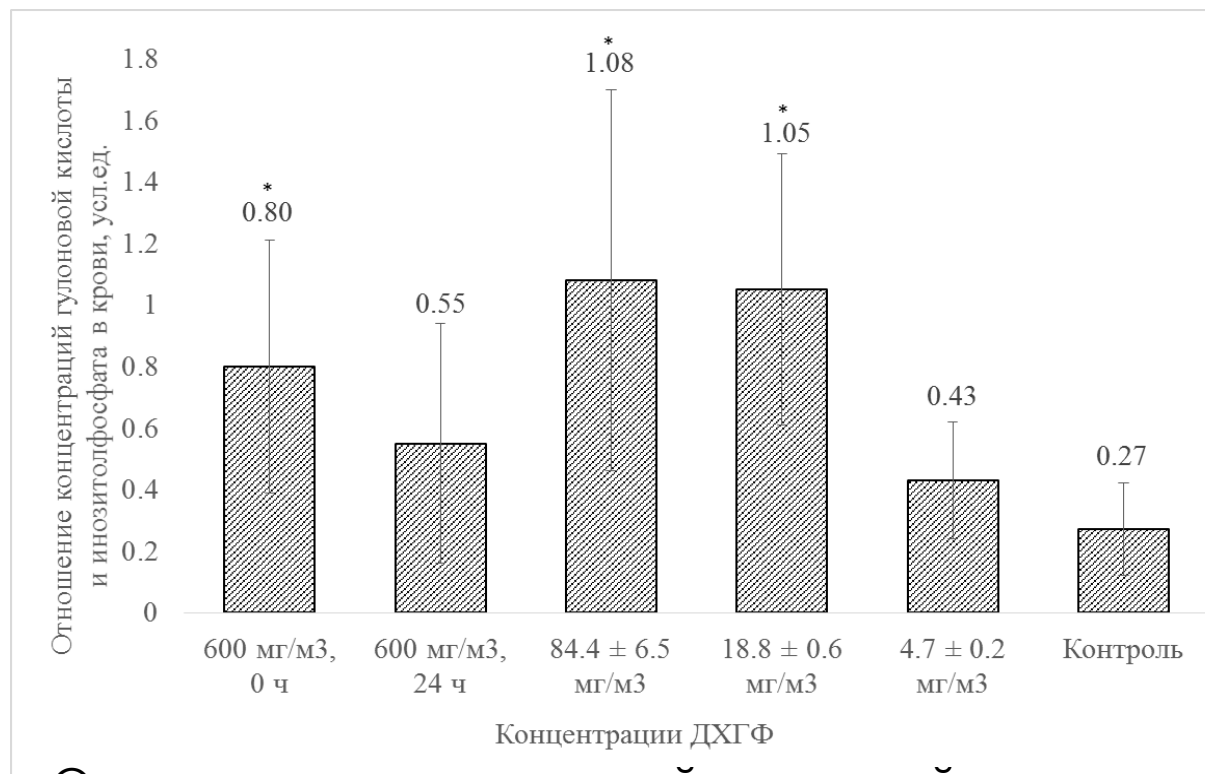


Биосинтез и распад
фосфатидилхолина



Наиболее чувствительные биомаркеры ДХГФ

Биомаркеры экспозиции	84.4 мг/м ³	18.8 мг/м ³	4.7 мг/м ³
ДХГФ	6 нг/мл	~1 нг/мл	<1 нг/мл*
1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантион-2	Есть	Есть	-



Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата в крови крыс, экспонированных различными концентрациями хладона



Две фазы элиминации без абсорбции:

Е-1,4-Дихлор-2-бутен, 0.22 мг/кг
Диазинон, 15 мг/кг
Дисульфид углерода, 0.22 мг/кг
Метакрилонитрил, 0.22 мг/кг
Метилпаратин, 40 мг/кг
Пентахлорэтан, 0.22 мг/кг

Одна фаза элиминации без абсорбции:

Аллилхлорид, 0.22 мг/кг
Акрилонитрил, 0.22 мг/кг
Бутилхлорид, 0.22 мг/кг
Диметоат, 40 мг/кг
Хлорацетонитрил, 0.22 мг/кг
Этилметакрилат, 0.22 мг/кг

Две фазы элиминации с абсорбцией:

Диэтиловый эфир, 0.22 мг/кг
Метилакрилат, 0.22 мг/кг
Метилметакрилат, 0.22 мг/кг
Нитробензол, 0.22 мг/кг
Хлорпирифос, 20 мг/кг

Одна фаза элиминации с абсорбцией:

2-Нитропропан, 0.22 мг/кг
Гексахлорэтан, 0.22 мг/кг
Фозалон, 30 мг/кг