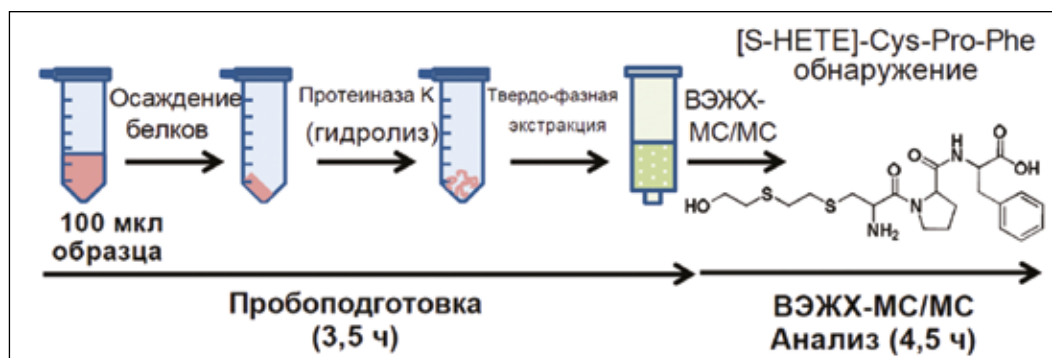


Оптимизация метода определения биомаркера иприта в плазме крови человека с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии

А.В. Браун, И.В. Рыбальченко, В.Н. Фатеенков, М.А. Понсов,
Я.В. Ставитская, Д.В. Орешкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 105005,
Российская Федерация, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13

Поступила 26.12.2016 г. Принята к публикации 04.04.2017 г.



С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС) оптимизирован метод определения в плазме крови биомаркера иприта – S-гидроксиэтилтиоэтилового аддукта с альбумином, основанный на его гидролизе ферментом протеиназой К с образованием устойчивого трипептида с цистеином, пролином и фенилаланином: S-HETE-Cys-Pro-Phe. Предел обнаружения иприта в плазме крови человека составил 2 нг/мл. Предложенный подход опробован при анализе образцов плазмы крови человека методом «введено-найденно», а также в рамках Первого официального биомедицинского теста, проведенного в 2016 г. международной Организацией по запрещению химического оружия (ОЗХО), он показал хорошую точность, воспроизводимость и специфичность определения.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; высокоэффективная жидкостная хроматография; плазма крови человека; альбуминовый аддукт иприта.

Библиографическое описание: Браун А.В., Рыбальченко И.В., Фатеенков В.Н., Понсов М.А., Ставитская Я.В., Орешкин Д.В. Оптимизация метода определения биомаркера иприта в плазме крови человека с использованием жидкостной хромато-масс-спектрометрии // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 3. С. 7–17.

Иприт [бис(2-хлорэтил)сульфид] представляет собой отравляющее вещество кожно-нарывного действия, впервые примененное германской армией на Западном фронте

в июле 1917 г. Иприт внесен в Список 1 Конвенции о запрещении химического оружия [1]. Несмотря на то, что массированное применение иприта в боевых действиях относится

к временам Первой мировой войны, вопросы защиты от его воздействия, в частности, диагностики отравлений остаются весьма актуальными. Известно, что большие запасы этого вещества были захоронены и затоплены в разных частях мира в послевоенные годы, что не исключает возможности поражения людей и животных при случайных контактах с ним. В последние годы имели место доказанные случаи применения иприта в локальных военных конфликтах и в террористических актах на Ближнем Востоке [2].

Исследованиями, проведенными по инициативе Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО), показано, что важнейшим инструментом при расследовании фактов возможного применения химического оружия является отложенный по времени (ретроспективный) лабораторный анализ биомедицинских проб, отобранных у людей и животных в местах вероятного применения химического оружия. С учетом этого обстоятельства многочисленные работы последних лет посвящены способам выявления характерных признаков экспозиции ипритом по результатам анализа биологических сред.

Попадая в живой организм, иприт проявляет свойства алкилирующего агента, быстро взаимодействуя с нуклеофилами, такими как ДНК, РНК, вода, жиры, пептиды и белки, через промежуточную стадию образования эписульффониевого иона [3, 4]. Ранее факт попадания иприта в организм в основном определяли, исследуя такие биомаркеры, как его аддукты с ДНК и низкомолекулярные метаболиты, присутствующие в моче [5–8], используя иммуноферментный анализ или масс-спектрометрию [8, 9]. Однако указанные биомаркеры быстро выводятся из живого организма и присутствуют в нем не более двух недель с момента интоксикации, ограничивая таким образом возможность долгосрочных исследований фактов поражения ипритом (ретроспективность анализа) [10].

В случаях, когда мочевые метаболиты иприта не могут быть обнаружены спустя несколько недель с момента интоксикации организма ипритом, предпочтительным способом подтверждения факта поражения ипритом является исследование аддуктов с белками крови. Известно, что аддукты иприта с гемоглобином присутствуют в крови живого организма вплоть до 120 суток [11]. Однако аддукты с гемоглобином обычно не используются в качестве биомаркеров из-за их недостаточной стабильности [8].

Попадая в организм, иприт также образует аддукты с аминокислотами. В результате взаимодействия с Цис-34 остатком образу-

ется характерный аддукт, определяемый в моче методом ВЭЖХ/МС [9], однако ввиду относительно короткого периода полувыведения из организма (20–25 суток) использование его для долгосрочных исследований затруднительно.

Наряду с этим, иприт, связываясь с реакционноспособным остатком цистеина, образует в крови стабильный аддукт S-гидроксиэтилтиоэтила с альбумином сыворотки крови человека (ЧСА). При ферментативном гидролизе ЧСА возможно выделение характерного трипептида S-гидроксиэтилтиоэтила с цистеином, пролином и фенилаланином (рисунок 1), который определяют методом ВЭЖХ путем масс-спектрометрического детектирования. Данный аддукт, ввиду его стабильности, признан наиболее предпочтительным при расследовании фактов возможного применения иприта для поражения людей [12, 13].

В доступной литературе описаны несколько подходов для разделения и определения исследуемого трипептида S-гидроксиэтилтиоэтила с цистеином, пролином и фенилаланином (S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe) методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии [12, 13]. В работе [13] описан упрощенный способ определения альбуминового аддукта иприта в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС низкого разрешения. В качестве фермента для гидролиза альбуминового аддукта иприта использовали протеиназу К, объем плазмы крови для исследования составлял 50 мкл. Предел обнаружения альбуминового аддукта иприта данным методом составил 1,74 нг/мл. Однако достижение более низких пределов обнаружения остается актуальным, поскольку именно этот показатель определяет степень ретроспективности анализа.

Цель данной работы состояла в оптимизации процедуры подготовки экспонированной ипритом плазмы крови человека, условий ВЭЖХ анализа, а также в исследовании масс-спектральных характеристик S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe в варианте тандемной масс-спектрометрии в интересах повышения чувствительности и селективности определения биомаркера иприта при ретроспективном мониторинге образцов крови человека для выявления фактов поражения ипритом.

Материалы и методы

Растворы и реагенты. В работе использовали раствор иприта (ГСО 8248-2003, интервал и границы допускаемой погрешности аттестованного значения содержания основного

компонента (91,0–97,0) % (масс.) в изопропанол (10 мг/мл), муравьиную кислоту (х.ч., «Химмед», Россия), ацетон (ч.д.а., «Химмед», Россия), ацетонитрил (конц., «Panreac», Испания), метанол («Sigma-Aldrich», кат. № 34860), бикарбонат аммония (фирмы «Sigma-Aldrich», кат. № 09830), протеиназу К («QIAGEN», партия № 148036747), протеиназу К («Applichem Panreac», партия № 5K010307), протеиназу К («СибЭнзим», партия № 4), проназу («Sigma-Aldrich», партия № SLBL9004V), картриджи для твердофазной экстракции «HLB «Oasis» 30 mg/1 ml» (фирма «Waters», кат. № WAT094225), деионизованную воду (после очистки системой Milli-Q («Millipore», США)). Аддукт S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe с массовой долей основного вещества не менее 98 % (методом ЯМР-спектроскопии) синтезировали по методике [14].

Рабочие буферные растворы и другие необходимые растворы готовили растворением точных навесок в соответствующих растворителях в день проведения анализа.

Образцы плазмы крови. В работе использовали образцы донорской плазмы человеческой крови (предоставлены Главным военным клиническим госпиталем имени Н.Н. Бурденко, партия № 111045) с внесением раствора иприта в изопропанол с итоговой концентрацией в плазме 100 нг/мл. После внесения иприта образцы инкубировали в течение 6 ч при температуре 37 °С. Перед анализом образцы хранили при температуре минус 20 °С.

Оборудование. Использовали аналитическую станцию, состоящую из жидкостного хроматографа Agilent Infinity 1260 («Agilent», США), оборудованного системой автоматического ввода пробы, с масс-селективным tandemным анализатором Agilent 6420 («Agilent», США), оснащенную источником ионов с электрораспылительной ионизацией. Выделение S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe проводили на колонке Acquity UPLC BEH C18 (100×2,1 мм), диаметр зерна сорбента – 1,7 мкм («Waters», США). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программных пакетов «MassHunter» (США).

Определение маркера применения иприта

Пробоподготовка.

100 мкл плазмы вносили в пробирку эппендорф на 1,5 мл, добавляли 300 мкл ацетона для осаждения белка, перемешивали в течение 30 с при 5000 g. Далее центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин, затем удаляли надосадочную жидкость и оставшийся белок высушивали на открытом воздухе. К белку добавляли 50 мкл 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде и гомогенизировали раствор путем интенсивного перемешивания. Далее добав-

ляли 400 мкл раствора бикарбоната аммония (50 мМ, рН 7,8) и 200 мкл раствора фермента концентрацией 10 мг/мл в среде бикарбоната аммония (50 мМ, рН 7,8), смесь интенсивно перемешивали. Полученный раствор ставили на ферментативный гидролиз на 90 мин при температуре 500 °С в термостате, закрепленном на шейкере для интенсивного перемешивания. Кондиционировали картридж «HLB «Oasis» 30 mg/1 ml» пропуская 1 мл метанола и 1 мл воды под вакуумом. Далее пропускали через картридж анализируемый раствор, после чего промывали картридж 1 мл 20 % раствора метанола в воде, а затем элюировали аналит пропуская 500 мкл ацетонитрила. Элюат сушили в токе азота досуха, перерастворяли в 50 мкл 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде и переносили во вставку в виале 2,0 мл для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Условия хромато-масс-спектрометрического определения. Определение проводили с использованием источника ионов с ионизацией электрораспылением в режиме регистрации выбранных ионных реакций положительных ионов m/z 470 → m/z 105 при определении S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe. В качестве выбранных ионных переходов, которые использовали для надежного обнаружения аддукта S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe, использовали m/z 470 → m/z 137.

Температура переходного капилляра составляла 300 °С, напряжение на распыляющем капилляре 3500 В, давление газа для распыления подвижной фазы в источнике ионов 420 кПа. Разделение пробы проводили в режиме градиентного элюирования, скорость потока составляла 0,35 мл/мин. Температура термостата колонки составляла 70 °С. Подвижная фаза А – 0,1 % (об.) HCOOH в воде, подвижная фаза В – 0,1 % (об.) HCOOH в ацетонитриле. Программа градиентного элюирования: 0–2 мин: 95 % А; 2–10 мин: 5–100 % В; 10–11 мин: 100 % В; 11–23 мин: 95 % А. Объем вводимой пробы составлял 0,05 мл.

Результаты и обсуждение

Выбор условий масс-спектрометрического детектирования

В ходе исследования использовали электрораспылительную ионизацию в режиме регистрации положительных ионов, поскольку аддукт S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe в своем составе имеет аминокислотные группы, которые отвечают за образование протонированных положительно заряженных молекул в ходе ионизации (рисунок 1).

Оптимизацию условий масс-спектрометрического детектирования с варьирова-

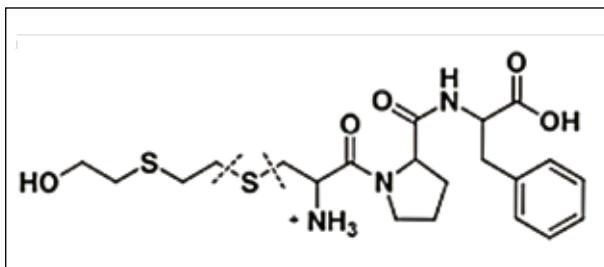


Рисунок 1 — Структурная формула трипептида *S*-гидроксиэтилтиоэтила с цистеином, пролином и фенилаланином (в протонированной форме)[10]

нием напряжения на распыляющем капилляре проводили в режиме прямого ввода, непосредственно вводя раствор стандарта исследуемого соединения с концентрацией 100 нг/мл в источник ионов, минуя хроматографическую колонку.

На первом этапе работы исследовали влияние напряжения источника ионизации на величину сигнала протонированного молекулярного иона аддукта S-HETE-Cys-Pro-Phe ($m/z = 470$). Для этого использовали параметры работы масс-спектрометрического детектора, рекомендуемые производителем и прописанные в файле автоматической настройки системы – автотюнинга. Напряжение источника ионизации варьировали в диапазоне 2500–4500 В. Установлено, что при увеличении напряжения источника ионизации с 3500 до 4500 В происходит увеличение интенсивности сигнала на 20–30 %, однако при этом величина шума увеличива-

ется на 50 %, поэтому на следующих этапах оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования использовали напряжение источника ионизации 3500 В.

На следующем этапе проводили выбор оптимальных пар ионных реакций при определении исследуемого соединения. Поскольку в масс-спектре аддукту S-HETE-Cys-Pro-Phe соответствует интенсивный сигнал протонированного молекулярного иона, исследовали его фрагментацию. На рисунке 2 представлен масс-спектр фрагментации протонированного молекулярного иона S-HETE-Cys-Pro-Phe.

Как следует из анализа брутто-формулы, фрагмент с $m/z = 263$ не содержит в своей структуре серу, относящуюся к тиодигликолиевому остатку (маркер, доказывающий присутствие иприта в пробе плазмы крови), поэтому в дальнейшем для достоверного определения факта интоксикации ипритом использовали только две ионные реакции: $m/z 470 \rightarrow m/z 105$ (для количественного анализа) и $m/z 470 \rightarrow m/z 137$ (для достоверного подтверждения). После выбора характерных пар фрагментных ионов исследовали влияние энергии фрагментаций на величину аналитического сигнала этих ионов. В итоге, при энергии фрагментации, равной 30 В, удалось достичь максимальной интенсивности сигналов выбранных ионных реакций.

Выбор условий хроматографического разделения

В методе ВЭЖХ-МС/МС назначение хроматографической системы и требо-

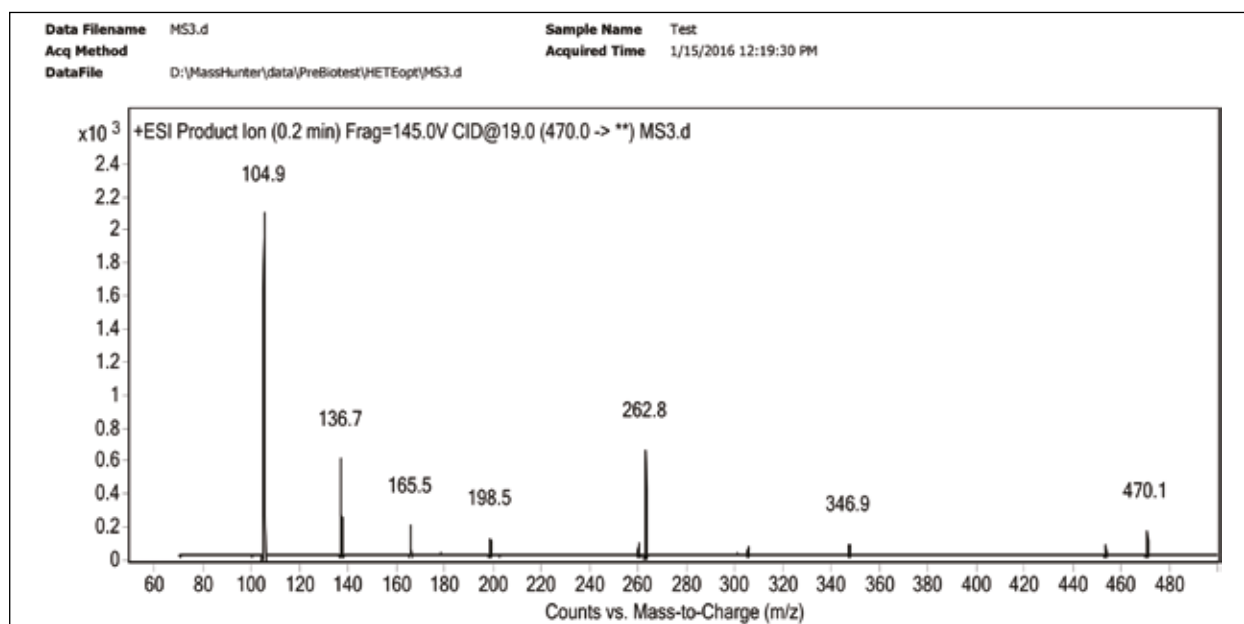


Рисунок 2 — Масс-спектр фрагментации протонированного молекулярного иона *S*-HETE-Cys-Pro-Phe с $m/z = 470$. Режим регистрации положительно заряженных ионов

вания, предъявляемые к ней, несколько отличаются от таковых в традиционных вариантах ВЭЖХ. В отличие от традиционных универсальных детекторов, характеризующихся низкой селективностью, tandemный масс-спектрометр позволяет регистрировать строго специфический параметр каждого определяемого соединения – набор отношений m/z образующихся ионов. При работе в режиме выбранных ионных реакций для большинства соединений не возникает необходимости полного хроматографического разделения компонентов смеси, поскольку набор выбранных ионных реакций для каждого соединения специфичен и влияние сигнала от посторонних компонентов на сигнал аналита в этом случае ничтожно мало. Также необходимо учитывать, что для подвижной фазы в варианте ВЭЖХ-МС можно применять только летучие компоненты.

В качестве неподвижной фазы при определении аддукта S-NETE-Cys-Pro-Phe в пробах плазмы крови человека использовали колонку с обращенно-фазовым сорбентом Acquity UPLC VEN C18 длиной 100 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размером зерна сорбента 1,7 мкм, фирмы «Waters».

Аддукт S-NETE-Cys-Pro-Phe обладает кислотными свойствами, поэтому для увеличения доли незаряженных частиц аддукта S-NETE-Cys-Pro-Phe и уменьшения размытия хроматографических пиков использовали подвижную фазу, состоящую из 0,1 % раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (B) и 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде (A). Поскольку использовался режим регистрации положительно заряженных ионов, присутствие муравьиной кислоты в подвижной фазе способствовало увеличению доли положительно заряженных ионов в камере ионизации за счет протонирования аминокрупп S-NETE-Cys-Pro-Phe.

При хроматографическом разделении S-NETE-Cys-Pro-Phe использовали специально разработанную программу градиентного элюирования (см. выше), в условиях которой коэффициент емкости и эффективность хроматографической колонки (ТТ/м) составили 7,4 и 61000 соответственно, и явились приемлемыми для данного анализа (время удерживания S-NETE-Cys-Pro-Phe составило $5,9 \pm 0,2$ мин; при расчетах использовали значение «мертвого времени», равное 0,7 мин).

В качестве критериев установления присутствия аддукта S-NETE-Cys-Pro-Phe в пробах плазмы крови человека использовали время удерживания и совпадение двух пар выбранных ионных реакций.

Оптимизация процедуры пробоподготовки

На следующем этапе проводили оптимизацию процедуры пробоподготовки образцов плазмы крови человека, искусственно зараженной ипритом, с целью максимального извлечения биомаркера иприта S-NETE-Cys-Pro-Phe с использованием процедуры гидролиза ЧСА с помощью протеолитических ферментов. При оптимизации процедуры пробоподготовки варьировали два основных параметра, влияющие на величину аналитического сигнала S-NETE-Cys-Pro-Phe – объем аликвоты плазмы крови (влияет на коэффициент концентрирования пробы) и тип фермента для гидролиза альбуминового аддукта иприта (влияет на глубину протекания реакции гидролиза). Для этих целей использовали образец плазмы крови человека, искусственно зараженной 100 нг/мл иприта (для связывания иприта с альбумином пробу предварительно инкубировали при температуре 37 °С в течение 6 ч).

Первоначально исследовали влияние объема аликвоты плазмы крови при проведении процедуры выделения биомаркера альбуминового аддукта иприта. Варьировали объем аликвоты в диапазоне 50–200 мкл, при этом на последнем этапе во всех случаях проводили перерастворение образца в 50 мкл 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде. Меняя объем аликвоты плазмы,кратно увеличивали объем фермента для проведения гидролиза (при 50 мкл использовали 100 мкл фермента, при 100 мкл – 200 мкл и т.д.). Оказалось, что при отборе аликвоты плазмы более 100 мкл не удастся полностью растворить осадок после упаривания ацетонитрила в 50 мкл 0,1 % раствора муравьиной кислоты, в то же время переход от объема аликвоты в 50 мкл к объему в 100 мкл приводит к двукратному увеличению площади пика S-NETE-Cys-Pro-Phe на хроматограмме, что и обусловило выбор объема плазмы крови 100 мкл в качестве оптимального.

Было установлено, что на результаты анализа существенно влияют не только тип и активность фермента, но и источник его происхождения, а также способ выделения, которые разнятся для препаратов различных фирм-производителей. Для оценки этого влияния готовили растворы 10 мг/мл в растворе бикарбоната аммония (рН 7,8) следующих ферментных препаратов:

- Протеиназа К («QIAGEN», Голландия);
- Протеиназа К («Applichem Panreas», Испания);
- Протеиназа К («СибЭнзим», Россия);
- Проназа («Sigma-Aldrich», США).

При сравнении эффективности действия фермента рассчитывали отношение

Таблица 1 — Значения степени извлечения аддукта S-HETE-Cys-Pro-Phe из пробы плазмы крови человека, искусственно загрязненной 100 нг/мл иприта при использовании различных типов ферментов ($P=0,95$, $n=3$)

Фермент	Степень извлечения S-HETE-Cys-Pro-Phe, %
Протеиназа К («QIAGEN»)	62±9
Протеиназа К («Applichem Panreac»)	42±8
Протеиназа К («СибЭнзим»)	30±9
Проназа («Sigma Aldrich»)	Не обнаружено

площади пика биомаркера альбуминового аддукта S-HETE-Cys-Pro-Phe после процедуры пробоподготовки проб плазмы крови к площади пика теоретически рассчитанной концентрации S-HETE-Cys-Pro-Phe, соответствующей заданной концентрации иприта, внесенной в бланковую (не экспонированную ипритом) пробу плазмы крови (данная величина в таблице 1 представлена как степень извлечения S-HETE-Cys-Pro-Phe).

Из представленных в таблице 1 данных следует, что в случае использования фермента Проназа («Sigma-Aldrich») на хроматограмме пробы не наблюдали сигнала от аддукта S-HETE-Cys-Pro-Phe, что, по-видимому, связано с низкой активностью данного фермента при гидролизе альбуминового аддукта иприта. Максимальная степень извлечения S-HETE-Cys-Pro-Phe из плазмы крови была достигнута при использовании фермента Протеиназа К («QIAGEN»), который в дальнейшем и использовали при проведении

пробоподготовки образцов плазмы человеческой крови, экспонированных ипритом.

На рисунке 3 представлена хроматограмма образца плазмы человеческой крови с внесением 100 нг/мл иприта, полученная после проведения описанной выше процедуры пробоподготовки, также представлена хроматограмма бланкового образца плазмы, не содержащей иприта.

На хроматограммах приведены величины аналитического сигнала по каждому из соответствующих выбранных ионных переходов (верхняя хроматограмма – для выбранного ионного перехода для количественного анализа, нижняя хроматограмма – для подтверждения). Как видно из представленных данных, использование tandemного масс-спектрометра приводит к отсутствию мешающего влияния матрицы на аналитический сигнал целевого аналита, что, наряду с повышением чувствительности, обуславливает и высокую специфичность определения.

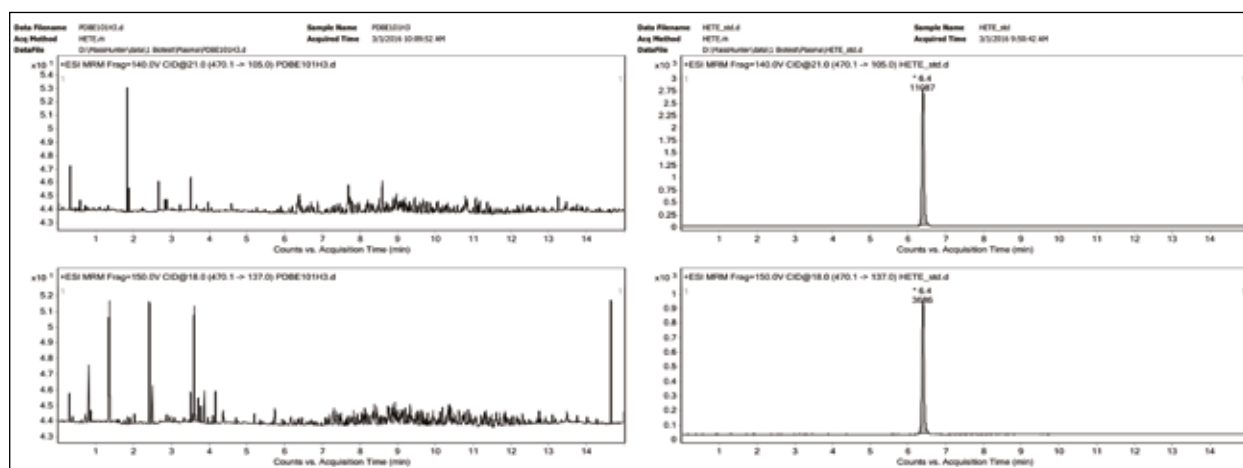


Рисунок 3 — Хроматограммы бланковой пробы плазмы крови, не содержащей иприта (вверху), и образца плазмы крови, искусственно зараженной 100 нг/мл иприта (внизу), полученные в выбранных оптимальных условиях процедур пробоподготовки и ВЭЖХ-МС/МС анализа при определении аддукта S-HETE-Cys-Pro-Phe. Режим регистрации выбранных ионных реакций

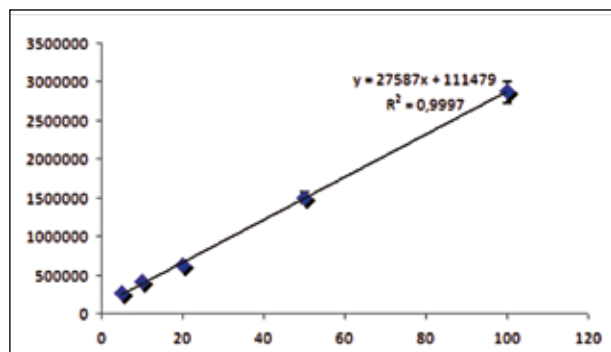


Рисунок 4 — Градуировочная зависимость в диапазоне концентраций иприта в человеческой плазме 5–100 нг/мл, построенная в выбранных условиях ВЭЖХ-МС/МС

Оценка метрологических характеристик и апробация на реальных объектах

В выбранных условиях разделения S-NETE-Cys-Pro-Phe построена градуировочная зависимость в диапазоне концентраций 5–100 нг/мл иприта в человеческой плазме крови (рисунок 4), рассчитаны метрологические характеристики (таблица 2).

Предел обнаружения рассчитывали при условии соблюдения соотношения интенсивности сигнала пика S-NETE-Cys-Pro-Phe и величины шума $S/N > 5$. Матричный эффект рассчитывали, сравнивая площади пика плазмы крови, не зараженной ипритом, с добавкой

50 нг/мл S-NETE-Cys-Pro-Phe после процедуры пробоподготовки с площадью пика 50 нг/мл S-NETE-Cys-Pro-Phe модельного водного раствора. При концентрации иприта в плазме крови менее 2 нг/мл происходит резкое уменьшение интенсивности сигнала (по-видимому, вследствие термической деструкции молекул S-NETE-Cys-Pro-Phe в камере ионизации), поэтому, несмотря на высокий коэффициент чувствительности градуировочной зависимости, предел обнаружения иприта в плазме крови человека ограничен значением 2 нг/мл.

Проверку правильности разработанного подхода проводили методом «введено-найдено» (таблица 3).

На рисунке 5 представлена хроматограмма образца плазмы крови человека с внесением 5 нг/мл иприта после описанной выше процедуры пробоподготовки. Также апробацию разработанного подхода к определению факта заражения ипритом плазмы человеческой крови проводили в рамках Первого официального биомедицинского теста ОЗХО.

Целью данного теста являлось установление факта присутствия и количества биомаркера иприта в трех зашифрованных пробах плазмы крови человека. В результате наших исследований удалось установить факт присутствия и содержание иприта (в виде аддукта S-NETE-Cys-Pro-Phe) в двух зашифро-

Таблица 2 — Метрологические характеристики разработанного подхода

Вещество	Уравнение градуировочного графика	r^2	Матричный эффект, %	Предел обнаружения, нг/мл	Диапазон определяемых концентраций, нг/мл	S_r , %
Иприт (в виде S-NETE-Cys-Pro-Phe)	$S_i = 27587 \times C_i + 111479$	0,9997	93±7	2,0	5–100	10

Таблица 3 — Проверка правильности разработанного подхода определения иприта в человеческой плазме методом «введено-найдено» и в рамках Первого официального биотеста ОЗХО ($P=0,95$, $n=3$)

Проба плазмы	Введено иприта, нг/мл	Найдено иприта, нг/мл
Модельная	5	5,3±0,5
Проба «D»	40	37±4
Проба «F»	50	48±4

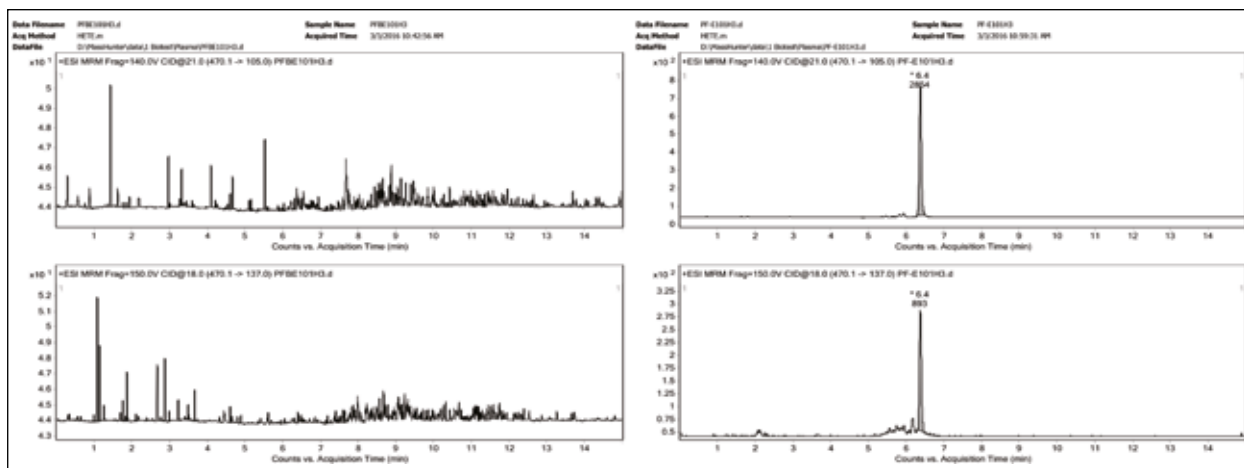


Рисунок 5 — Хроматограммы плазмы крови человека, экспонированной 5 нг/мл иприта (внизу), и не содержащей иприта (вверху). Режим регистрации выбранных ионных реакций

ванных пробах, что совпало с данными независимого анализа методом ГХ-МС/МС (CI) и было подтверждено положительной оценкой ОЗХО результатов анализа, представленных нашей лабораторией.

Заключение

Оптимизирован и апробирован на экспонированных образцах плазмы крови человека способ определения факта интоксикации

ипритом (в виде биомаркера S-НЕТЕ-Cys-Pro-Phe) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием, который характеризуется высокой чувствительностью (2 нг/мл иприта в плазме), специфичностью и приемлемыми метрологическими характеристиками. Предложенный способ успешно апробирован отечественной лабораторией в рамках Первого официального биомедицинского теста ОЗХО.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. GE.92-61926, Париж. 1993. С. 52–55.
2. Комментарий Департамента информации и печати МИД России к докладом Миссии по установлению фактов применения химоружия в Сирии и НПО «Хьюман Райтс Уотч» / Министерство иностранных дел Российской Федерации, 06.05.2017. URL: http://www.mid.ru/foreign_policy/news/-/asset_publisher/cKNonkJE02Bw/content/id/2746077.
3. Capacio B.R., Smith J.R., Lawrence R.J., Boyd B.L., Witriol A.M., Conti M.L., Collins J.L., Sciuto A.M. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of sulfur mustard-plasma protein adduct: validation and use in a rat inhalation model // J. Anal. Toxicol. 2008. V. 32. P. 37–43.
4. Noort D., Benschop H.P., Black R.M. Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review // Toxicol. Appl. Pharm. 2002. V. 184. P. 116–126.
5. Barr J.R., Pierce C.L., Smith J.R., Capacio B.R., Woolfitt A.R., Solano M.I., Wooten J.V., Lemire S.W., Thomas J.D., Ash D.H., Ashley D.L. Analysis of urinary metabolites of sulfur mustard in two individuals after accidental exposure // J. Anal. Toxicol. 2008. V. 32. P. 10–16.
6. Newmark J., Langer J.M., Capacio B., Barr J., McIntosh R.G. Liquid sulfur mustard exposure // Military Med. 2007. V. 172. P. 196–198.

7. Benschop H.P., Van der Schans G.P., Noort D., Fidder A., Mars-Groenendijk R.H., de Jong L.P. Verification of exposure to sulfur mustard in two casualties of the Iran-Iraq conflict // *J. Anal. Toxicol.* 1997. V. 21. P. 249–251.
8. Xu H., Nie Z., Zhang Y., Li C., Yue L., Yang W., Chen J., Dong Y., Liu Q., Lin Y., Wu B., Feng, J., Lia H., Guo L., Xie J. Four sulfur mustard exposure cases: overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring // *Toxicol. Reports.* 2014. V. 1. P. 533–543.
9. Van der Schans G.P., Mars-Groenendijk R., de Jong L.P., Benschop H.P., Noort D. Standard operating procedure for immunoslotblot assay for analysis of DNA/Sulfur mustard adducts in human blood and skin // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 316–319.
10. Noort D., Hulst A.G., Trap H.C., de Jong L.P., Benschop H.P. Synthesis and mass spectrometric identification of the major amino acid adducts formed between sulphur mustard and haemoglobin in human blood // *Arch. Toxicol.* 1997. V. 71. P. 171–178.
11. Black M.R., Read W.R. Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chrom. B.* 1995. V. 665. P. 97–105.
12. Noort D., Fidder A., Hulst A.G., Woolfitt A.R., Ash D., Barr J.R. Retrospective detection of exposure to sulfur mustard: improvements on an assay for liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of albumin/sulfur mustard adducts // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 333–338.
13. Pantazides B., Crow B., Garton J., Quinones-Gonzales J., Blake T., Thomas J., Johnson R.A. A simplified method for quantifying sulfur mustard adducts to blood proteins by ultra-high pressure liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry // *J. Chemical Research in Toxicology.* 2015. V. № 2. P. 256–261.
14. Noort D., Hulst A.G., De Jong L.P., Benschop H.P. Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard *in vitro* and *in vivo*: mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure // *Chem. Res. Toxic.* 1999. V. 12. P. 715–721.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации. 105005, Российская Федерация, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13.

Браун Аркадий Владимирович. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук.

Рыбальченко Игорь Владимирович. Ведущий научный сотрудник, д-р хим. наук, проф.

Фатеенков Владимир Николаевич. Начальник отдела, канд. воен. наук.

Понсов Михаил Александрович. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук.

Ставитская Яна Вадимовна. Научный сотрудник.

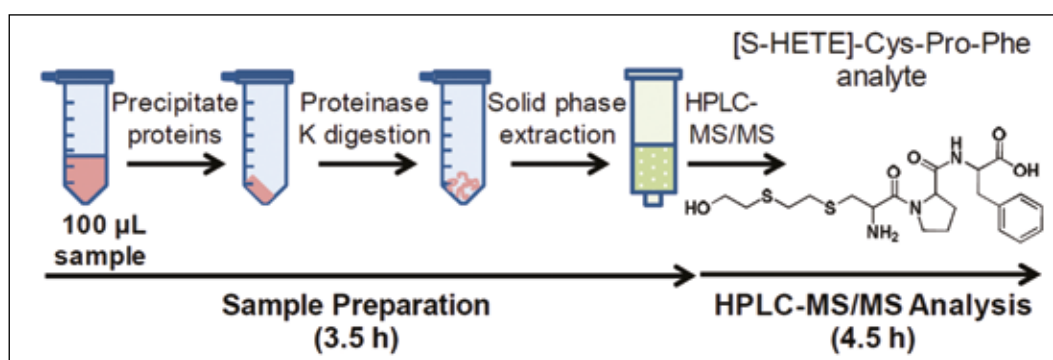
Орешкин Дмитрий Владимирович. Научный сотрудник.

Адрес для переписки: Браун Аркадий Владимирович; 27nc@mil.ru.

Optimization of a Method for the Determination of a Mustard Gas Biomarker in Human Blood Plasma by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

A.V. Braun, I.V. Rybalchenko, V.N. Fateenkov, M.A. Ponsov,
Y.V. Stavitskay, D.V. Oreshkin

Federal State Budgetary Establishment
«27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation,
Brigadirskii Lane 13, Moscow 105000, Russian Federation



A method for the determination of a mustard gas biomarker (an S-hydroxyethylthioethyl adduct with albumin) in blood plasma was optimized with the use of HPLC with tandem mass-spectrometric detection. This method is based on the hydrolysis of this adduct by the proteinase K enzyme with the formation of the following stable tripeptide with cysteine, proline, and phenylalanine: S-HETE-Cys-Pro-Phe. The detection limit of mustard gas in human blood plasma was 2 ng/ml. The approach proposed was tested in the analysis of human blood plasma samples by the standard addition technique and also within the framework of the first official biomedical test carried out by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW) in 2016, and it exhibited a good accuracy, reproducibility, and specificity of determination.

Keywords: mass spectrometry; high performance liquid chromatography; human blood plasma; sulfur mustard adduct to albumin.

For citation: Braun A.V., Rybalchenko I.V., Fateenkov V.N., Ponsov M.A., Stavitskay Y.V., Oreshkin D.V. Optimization of a method for the determination of a mustard gas biomarker in human blood plasma by liquid chromatography–mass spectrometry // *Journal of NBC Protection Corps*. 2017. V. 1. № 3. P. 7–17.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Convention on the prohibition of the development, production, stockpiling and use of chemical weapons and on their destruction. GE.92-61926, Paris. 1993. P. 52–55 (in Russian).
2. Comment of the information department of the Russian Foreign Ministry to the reports of the Mission on the establishment of facts of the use of chemical weapons in Syria and the NGO «Human Rights Watch» / MFA of the Russian Federation, 06.05.2017. URL: http://www.mid.ru/foreign_policy/news/-/asset_publisher/cKNonkJE02Bw/content/id/2746077 (in Russian).
3. Capacio B.R., Smith J.R., Lawrence R.J., Boyd B.L., Witriol A.M., Conti M.L., Collins J.L., Sciuto A.M. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of sulfur mustard-plasma protein adduct: validation and use in a rat inhalation model // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. P. 37–43.
4. Noort D., Benschop H.P., Black R.M. Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review // *Toxicol. Appl. Pharm.* 2002. V. 184. P. 116–126.
5. Barr J.R., Pierce C.L., Smith J.R., Capacio B.R., Woolfitt A.R., Solano M.I., Wooten J.V., Lemire S.W., Thomas J.D., Ash D.H., Ashley D.L. Analysis of urinary metabolites of sulfur mustard in two individuals after accidental exposure // *J. Anal. Toxicol.* 2008. V. 32. P. 10–16.
6. Newmark J., Langer J.M., Capacio B., Barr J., McIntosh R.G. Liquid sulfur mustard exposure // *Military Med.* 2007. V. 172. P. 196–198.
7. Benschop H.P., Van der Schans G.P., Noort D., Fidder A., Mars-Groenendijk R.H., de Jong L.P. Verification of exposure to sulfur mustard in two casualties of the Iran-Iraq conflict // *J. Anal. Toxicol.* 1997. V. 21. P. 249–251.
8. Xu H., Nie Z., Zhang Y., Li C., Yue L., Yang W., Chen J., Dong Y., Liu Q., Lin Y., Wu B., Feng J., Lia H., Guo L., Xie J. Four sulfur mustard exposure cases: overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring // *Toxicol. Reports.* 2014. V. 1. P. 533–543.
9. Van der Schans G.P., Mars-Groenendijk R., de Jong L.P., Benschop H.P., Noort D. Standard operating procedure for immunoslotblot assay for analysis of DNA/Sulfur mustard adducts in human blood and skin // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 316–319.
10. Noort D., Hulst A.G., Trap H.C., de Jong L.P., Benschop H.P. Synthesis and mass spectrometric identification of the major amino acid adducts formed between sulphur mustard and haemoglobin in human blood // *Arch. Toxicol.* 1997. V. 71. P. 171–178.
11. Black M.R., Read W.R. Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chrom. B.* 1995. V. 665. P. 97–105.
12. Noort D., Fidder A., Hulst A.G., Woolfitt A.R., Ash D., Barr J.R. Retrospective detection of exposure to sulfur mustard: improvements on an assay for liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of albumin/sulfur mustard adducts // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 333–338.
13. Pantazides B., Crow B., Garton J., Quinones-Gonzales J., Blake T., Thomas J., Johnson R.A. A simplified method for quantifying sulfur mustard adducts to blood proteins by ultra-high pressure liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry // *J. Chemical Research in Toxicology.* 2015. V. № 2. P. 256–261.
14. Noort D., Hulst A.G., De Jong L.P., Benschop H.P. Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard *in vitro* and *in vivo*: mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure // *Chem. Res. Toxic.* 1999. V. 12. P. 715–721.

Authors

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Brigadirskii Lane 13, Moscow 105000, Russian Federation.

Braun A.V. Senior Researcher. Candidate of Chemical Sciences.

Rybalchenko I.V. Leading Researcher. Doctor of Chemical Sciences. Professor.

Fateenkov V.N. Chief of the Department. Candidate of Military Sciences.

Ponsov M.A. Senior Researcher. Candidate of Chemical Sciences.

Stavitskay Y.V. Researcher.

Oreshkin D.V. Researcher.

Adress: Braun A.V.; 27nc@mil.ru