
**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ.
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ, МЕТОДОЛОГИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ**

УДК 621.384.668.8: 615

© Е. П. Подольская, В. Н. Бабаков

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ С МЯГКИМИ МЕТОДАМИ
ИОНИЗАЦИИ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ (ОБЗОР)**

В обзоре рассмотрено применение масс-спектрометрии с мягкими методами ионизации в ретроспективном токсикологическом анализе высокоопасных отравляющих веществ. Описаны преимущества и недостатки методов LC-MS и MALDI-MS при выявлении отравляющих веществ и биомаркеров интоксикации.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации является одним из наиболее интенсивно развивающихся методов анализа. Этот метод отличается высокой чувствительностью, что позволяет его использование во многих областях, касающихся биохимии и протеомики человека, в том числе и токсикологии. Ряд токсикологических задач, в которых масс-спектрометрия может являться основным или даже единственным средством решения, весьма широк, и в последнее время особое внимание уделяется такой значимой области, как поиск биомаркеров интоксикации [1]. Термин "биомаркер" включает в себя представление о результате взаимодействия биологической системы с агентом окружающей среды и используется для обозначения биологических, биохимических и молекулярных свидетелей, которые могут быть измерены с помощью химических, биохимических или молекулярных технологий. В случае интоксикации биомаркеры должны присутствовать в легкодоступных тканях, таких как кровь, клетки ротовой полости или моча [1] и по возможности могли бы быть достаточно легко выделены и определены.

Одно из многих преимуществ масс-спектрометрии с мягкими методами ионизации состоит в том, что для успешного детектирования искомого соединения, выступающего в роли биомаркера, не всегда необходимо выделять его из смеси остальных веществ, составляющих биологический образец или же подвергать дериватизации. Особенно это касается метода ионизация лазерной десорбцией в присутствии матрицы (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). Этот метод на сегодняшний день является наиболее широко используемым для анализа высокомолекулярных соединений, в особенности белков, но также хорошо подходит и для детекции соединений, имеющих среднюю и низкую с точки зрения протеомики молекулярную массу (600–5000 Да). К основным

преимуществам метода MALDI можно отнести низкую чувствительность к засоленности анализируемой пробы, высокий предел определения по молекулярной массе (400–500 кДа), реализацию быстрого анализа большого количества образцов, достаточно легкую интерпретируемость масс-спектра, а также возможность точечного MS/MS анализа соединений, представляющих интерес в ключе проводимого исследования, без получения лишнего фактического материала. В то же время при использовании данного метода могут возникнуть проблемы с определением биомаркеров, являющихся органическими молекулами и имеющими невысокую молекулярную массу (100–400 Да), поскольку соответствующий диапазон масс в спектре обычно заселен сигналами, привнесенными матрицей. Кроме того, при анализе биологических образцов зачастую возникает перекрытие сигналов спектра за счет близкого значения масс соединений, содержащихся в пробе, что значительно усложняет интерпретацию данных и корректный MS/MS-анализ каждого из этих соединений. Для анализа таких образцов более удобен масс-спектрометр, снабженный таким источником ионов, как электроспрей (Electrospray Ionization, ESI), несмотря на то что данный метод имеет свои ограничения, например ограничение по массе анализируемого вещества (~20 кДа). Также следует отметить, что одним из основных требований к образцу при использовании данного метода анализа является растворимость соединений в воде и отсутствие в пробе солей или других примесей в концентрациях, превышающих концентрацию искомого биомаркера более чем на два порядка. Соответственно для проведения успешного масс-спектрометрического анализа требуется дополнительная стадия пробоподготовки — обессоливание. К тому же из-за образования многозарядных ионов в процессе ионизации регистрируемый масс-спектр становится гораздо более сложным для восприятия, чем в случае MALDI, и для его обработки требуется привлечь дополнитель-

ные программные ресурсы. Но несмотря на перечисленные недостатки метод ионизации "электроспрей" является не менее широко используемым, чем MALDI, поскольку масс-спектрометр, оснащенный таким источником ионов, может быть соединен с жидкостным хроматографом, в результате чего происходит дополнительное фракционирование компонентов пробы непосредственно перед анализом, и дает возможность осуществлять потоковый MS/MS-анализ. Дополнительным преимуществом этого метода также является отсутствие заселенности диапазона низких масс, и биомаркеры, имеющие низкую молекулярную массу, могут быть успешно проанализированы.

Таким образом, в представляемом обзоре будут продемонстрированы возможности масс-спектрометрии с мягкими методами ионизации для поиска и идентификации биомаркеров интоксикации различными высокоопасными отравляющими веществами (ОВ), относящимися к химическому оружию.

Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия (далее Конвенция) [2], которая стала международным законом 29 апреля 1997 г., является одним из наиболее комплексных и всеобъемлющих договоров по разоружению и контролю над вооружениями. Контроль за выполнением Конвенции возложен на Организацию по запрещению химического оружия (ОЗХО). Основные рекомендуемые ОЗХО процедуры в идентификации веществ, находящиеся в приложении к Конвенции, основываются на поиске самих веществ или продуктов их деструкции в окружающей среде и биопробах методами GC-MS (газовая хроматография—масс-спектрометрия) и LC-MS (высокоэффективная жидкостная хроматография—масс-спектрометрия).

Конец 20 и начало 21 века характеризуются возрастающей угрозой терроризма, и в частности возможности применения особо опасных химических веществ в террористических целях. В настоящее время считавшиеся ранее незначительными в военном отношении количества химикатов могут оказаться эффективными средствами уничтожения в случае их применения в местах массового скопления людей. Применение химического оружия в террористических целях имело место в 1995 г. в Японии. С того времени, когда секта "Аум Синрикё" произвела и применила зарин в населенном пункте и в метро, ранив сотни людей и убив двенадцать пассажиров метро, повторения подобной атаки, к счастью, не было. Тем не менее вызывают тревогу сообщения о попытках произвести либо накопить отравляющие вещества, которые могут быть использованы отдельными лицами или группами лиц в террористических целях.

К отравляющим веществам (ОВ), оборот кото-

рых находится под контролем Конвенции, относятся вещества различного спектра действия. К ним относятся вещества нервно-паралитического действия, получившие названия по международной классификации, как G-агенты (GA-табун, GB-зарин, GD-зоман, GF-циклозарин) и V-агенты (вещества VX и VR) и являющиеся эфирами кислот пентавалентного фосфора (фосфорорганическими веществами, ФОВ). Большинство этих агентов родственны фосфорорганическим пестицидам и ингибируют активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ), важнейшего фермента нервно-мышечной передачи, контролирующего нейротрансмиттер ацетилхолин. К веществам кожно-нарывного действия относятся алкилирующие агенты, такие как сернистый и азотистый иприты и люизит. Эти вещества менее токсичны, чем ФОВ, но также контролируются Конвенцией.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ДЕСТРУКЦИИ МЕТОДАМИ LC-MS

Отравляющие вещества, попадающие в организм, могут быть выявлены в биологических образцах в виде продуктов их деструкции, метаболитов или же в неизменной форме. В большинстве случаев образуются полярные продукты, которые могут быть проанализированы с помощью масс-спектрометра с источником ионизации "электроспрей" без дополнительной дериватизации и трудоемкой пробоподготовки. В последние годы метод LC-MS находит все более широкое применение в области анализа ОВ, постепенно вытесняя общепринятый GC-MS-анализ [3].

Впервые возможности использования LC-MS для анализа продуктов деструкции были показаны на примере нервно-паралитических газов [4, 5]. Важное преимущество LC-ESI-MS состоит в том, что данный метод позволяет идентифицировать интактные ФОВ одновременно с продуктами их деструкции [6–8], например алкилфосфоновые кислоты, образующиеся в процессе гидролиза различных ФОВ. Однако необходимо отметить, что сернистый иприт в нативной форме не определяется этим методом, но продукты его деструкции — тиодигликоль и длинноцепочечные диолы — являются подходящими объектами для анализа методом LC-ESI-MS. Основные соединения, определяемые методами масс-спектрометрии, представлены в таблице [9–14].

Несмотря на то что описанный метод очень удобен для использования, он имеет значительные ограничения, т. к. ОВ и их метаболиты достаточно быстро выводятся из организма. То есть возможность установления факта интоксикации по перечисленным соединениям существует только несколько дней.

Использование масс-спектрометрии с мягкими методами ионизации для выявления маркеров интоксикации ОВ

Среда	Вид ионизации	Условия хроматографического анализа	Анализируемые соединения	Ссылка
Плазма крови	APCI (PI)	Сорбент — [–OD –H]; колонка — 250 × 4.6 мм; элюент — гексан/изопропанол; режим элюирования — изократический; скорость потока — 800 мкл/мин	Энантимеры RVX	[9]
Сыворотка крови	ESI (PI), MALDI	Сорбент — [–C ₁₈]; колонка — 150 × 0.30 мм; элюент — ацетонитрил/вода с 0.2 % муравьиной кислотой; режим элюирования — градиентный; скорость потока — 6 мкл/мин	Аддукты альбумина с сернистым ипритом	[10]
Сыворотка крови	ESI (PI/NI)	Сорбент — [–C ₁₈]; колонка — 150 × 1.5 мм; элюент — ацетонитрил/вода с 0.005 М ацетатом аммония; режим элюирования — изократический; скорость потока — 100 мкл/мин	Производные алкилфосфоновой кислоты	[11]
Сыворотка крови	ESI (PI/NI)	Сорбент — [–PRP–X100]; колонка — 200 × 0.32 мм; элюент — ацетонитрил/вода с 0.5 % муравьиной кислотой; режим элюирования — изократический; скорость потока — 20 мкл/мин	Изопропил метилфосфоновая кислота	[12]
Моча	ESI (PI/NI)	Сорбент — [–C ₁₈]; колонка — 150 × 2.0 мм; элюент — ацетонитрил/вода с 0.05 % муравьиной кислотой; режим элюирования — градиентный; скорость потока — 200 мкл/мин	Метаболиты сернистого иприта	[13]
Моча	ESI (PI)	Сорбент — [–C ₁₈]; колонка — 250 × 2.0 мм; элюент — метиловый спирт/вода с 0.02 % формиатом аммония; режим элюирования — градиентный; скорость потока — 200 мкл/мин	— ” —	[14]

Известно, что многие белки могут образовывать прямые ковалентные аддукты с остатками отравляющих веществ и эти аддукты могут быть выявлены и идентифицированы методами масс-спектрометрии в течение всего времени жизни белка.

АДДУКТЫ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ С БЕЛКАМИ

Фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) по клинической классификации являются ОВ нервно-паралитического действия. Чрезвычайно высокая токсичность и особенности физико-

химических свойств, позволяющие быстро создавать обширные очаги химического заражения, делают ФОВ наиболее опасными из всех известных ОВ. История развития ФОВ связана с именем академика Арбузова А.Е., который открыл в 1905 г. способ получения амилфосфиновых кислот, что способствовало прогрессу в химии ФОВ. Первые сообщения о токсичности ФОВ относятся к 1932 г. Было установлено, что ФОВ вызывают удушье, нарушение сознания, зрения. Исследования ФОВ в Германии накануне и в годы II мировой войны связаны с именем профессора Шрадера. Среди различных структурных аналогов ацетилхолина были найдены в 50-х годах V-газы. И наконец, 80-е годы XX века: в США были созданы бинарные боеприпасы ФОВ — зарина и V-газов. ФОВ рассматриваются как наиболее опасные средства ведения химической войны, т. к. они обладают высокой токсичностью при любых способах попадания в организм и вызывают многосторонние симптомы поражения организма [15].

Воздействие ФОВ на организм может протекать по двум механизмам:

- 1) подавление активности АХЭ;
- 2) нехолинергические механизмы действия ФОВ.

Классическим методом выявления воздействия ФОВ является измерение активности холинэстеразы в крови. Обычно АХЭ локализуется в мембранах эритроцитов, а родственный фермент бутирилхолинэстераза (БХЭ) присутствует в сыворотке или плазме крови. Для мониторинга действия ФОВ используется колориметрический/фотометрический метод Элмана [16] или его модификации. Этот метод обычно используется для контроля здоровья персонала, работающего с ФОВ, но рассмотрение холинэстераз в качестве биомаркеров накладывает ряд ограничений. Например, по уровню активности холинэстераз невозможно сказать о веществе, которое вызвало ингибирование фермента. Более того, ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза являются специфичными в основном в случае острых отравлений. Диагностика интоксикации ФОВ при действии малых доз затруднена отсутствием подавления активности АХЭ и появления холинергических симптомов.

В этой связи более перспективным методом установления факта интоксикации рассматривается детектирование аддукта, образованного активным центром бутирилхолинэстеразы с остатком ФОВ. Так, например, фосфонилированный пептид, принадлежащий БХЭ и содержащий серин 226, может быть получен путем ферментативного гидролиза БХЭ, выделенной из плазмы крови [17] и выявлен методами масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Определение аддукта масс-спектрометрическими методами имеет ряд преимуществ перед методом Элмана: он более специфичен и позволяет не

только выявить факт ингибирования активного центра холинэстеразы, но и установить соединение, которым ингибирование было вызвано. Биомаркером интоксикации при реализации описанного метода является модифицированный фосфонилированный пептид.

Кроме того, биомаркером интоксикации ФОВ может являться сам модифицирующий остаток, полученный путем реактивации фермента фторидом и детектированный в виде производных метилфосфоновой кислоты в ходе LC-MS-анализа [18]. Такой метод является достаточно чувствительным для детекции ингибирования холинэстераз и позволяет определить факт интоксикации даже при ингибировании менее 1 % БХЭ.

Однако фосфонилированный серин активного центра холинэстераз может подвергаться спонтанному деалкилированию, при котором отщепляется O-алкильная группа ("старение", или "эйджинг") [19]. Это приводит к потере информации о структуре действующего ФОВ, поскольку остатки таких соединений, как зарин, зоман, VX, в результате старения образуют одинаковый продукт — остаток метилфосфоновой кислоты. Различные остатки ФОВ подвергаются старению с разной скоростью; например, остаток зомана, присоединенный к холинэстеразе, стареет в течение нескольких минут [20], в то время как старение остатка VX занимает более 72 ч [21], после чего перечисленными методами очень сложно установить тип примененного ОВ. Соответственно при ретроспективном анализе, когда невозможно установить вид действующего агента по остатку, присоединенному к активному центру холинэстераз, следует рассматривать другие белки-мишени.

Кроме холинэстераз, целый ряд ферментов и структурных белков способен ковалентно присоединять различные ФОС. К этим белкам относятся сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин, эластаза, тромбин), цистеиновые протеазы (папаин, бромелаин), сериновые амидазы (арилформамидаза, амидгидролаза жирных кислот), фосфолипазы (фосфолипаза A2, нейротоксиэстераза), мускариновые и никотиновые рецепторы, канабионидный СВ1 рецептор, сывороточный альбумин и др.

Одним из наиболее перспективных биомаркеров интоксикации ФОВ является аддукт ФОС с сывороточным альбумином. Инкубация изотопно- и радиоактивно-меченных зарина и зомана с плазмой крови человека с последующим масс-спектрометрическим анализом (LC-MS/MS) позволила выявить новый сайт фосфонилирования альбумина по тирозину 411. Зарин, зоман, циклозарин и табун способны формировать аддукт с указанным остатком тирозина при инкубации плазмы человека *in vitro*. VX также способен образовывать аддукт, но только при высоких конечных концентрациях [22]. Были разработаны чувстви-

тельные аналитические методы, основанные на LC-MS/MS по выявлению и идентификации этих аддуктов, которые позволяют детектировать аддукты зомана, циклозарина и табуна с альбумином при 10–20 % ингибировании БХЭ и 70 % ингибировании БХЭ для зарина. Еще одно отличие аддуктов ФОВ с тирозином от аддуктов с серином активного центра БХЭ — отсутствие старения остатков метилфосфоновой кислоты, что позволяет однозначно установить тип примененного ФОВ. Аддукты с зоманом и табуном были идентифицированы через 7 дней после однократного подкожного введения ФОВ в дозе $\frac{1}{2}$ ЛД₅₀ морским свинкам. Более того, эти аддукты сохраняются и после терапии оксимами, которые вызывают реактивацию активного центра холинэстераз после ингибирования ФОВ.

АДДУКТЫ СЕРНИСТОГО ИПРИТА С ДНК И БЕЛКАМИ

Сернистый иприт $[S(CH_2-CH_2-Cl)_2]$ относится к отравляющим веществам кожно-нарывного действия, которые способны вызывать местные воспалительно-некротические изменения кожи и слизистых оболочек.

Сернистый иприт известен с начала XIX века, но получен химически чистым веществом и подробно был изучен в 1886 г. в Германии в лаборатории В. Мейера совместно с академиком Н.Д. Зеллинским. Впервые иприт был применен как ОВ германской армией против британских войск в июле 1917 г. неподалеку от бельгийского города Ипр. В этом сражении англичане потеряли 6000 человек, были и повторные применения против французских войск. При этом ввиду разносторонности действия иприта защита от него была весьма затруднительна. Затем в 1936 г. иприт применяла Италия против Абиссинии, а в 1943 г. Япония использовала иприт в Китае [15]. Последние боевое использование этого газа было зафиксировано во время ирано-иракского конфликта в 80-е годы 20-го века.

Механизм действия и патогенез ипритных поражений весьма сложен и полностью до конца не изучен. Сернистый иприт — активный алкилирующий агент, который способен достаточно быстро формировать ковалентные аддукты с белками и ДНК в физиологических условиях. Целый ряд аддуктов сернистого иприта с белками и ДНК был обнаружен масс-спектрометрическими методами [23]. Некоторые из аминокислот в белках содержат нуклеофильные группы: цистеин, серин, тирозин, лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Ковалентные аддукты с белками часто являются долгоживущими биологическими индикаторами отравления, на период существования белка

с аддуктом в организме. Наряду с альбумином вторым долгоживущим белком крови, доступным для анализа, является гемоглобин, период жизни которого составляет около 120 суток [24, 25]. Эти два белка легко взаимодействуют своими аминокислотными остатками с электрофильными соединениями, что успешно определяется методами масс-спектрометрии.

Сернистый иприт способен алкилировать ДНК в положении N7 остатков деоксигуанозина. После процедуры депуринизации можно обнаружить N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-деоксигуанозин и N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-деоксигуанин. Минорными компонентами являются N7-гуанин аддукт и аддукт N3-аденина [26, 27].

Так как эти аддукты плохо поддаются GC-MS-анализу, был предложен способ определения этих аддуктов в моче с использованием LC-MS (привитая фаза C₁₈ в качестве сорбента) [28]. N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-деоксигуанозин был обнаружен этим способом в моче морских свинок при воздействии сернистого иприта, однако уровень этого аддукта значительно снижается через 36–48 часов после экспозиции. По сходной методологии N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-гуанин был обнаружен в органах крыс [29].

Гемоглобин — основной белок эритроцитов, который способен образовывать аддукты с сернистым ипритом, сохраняющиеся на протяжении всего времени жизни белка [30].

Определение специфичных сайтов алкилирования гемоглобина было проведено как традиционными [31], так и современными масс-спектрометрическими методами [32]. LC-MS/MS-анализ триптических пептидов гемоглобина, алкилированного радиоактивным сернистым ипритом, позволил определить 6 различных остатков гистидина, 3 остатка глутамата и оба N-концевых валина, с которыми может связываться иприт. Также были обнаружены и другие аминокислоты, алкилированные ипритом: цистеин, аспарат, лизин и триптофан при гидролизе гемоглобина ферментом проназой [32, 11].

Алкилированные аддукты гистидина являются наиболее распространенными в гемоглобине, обработанном сернистым ипритом, и остаются стабильными после гидролиза белка в 6 N HCl. Полученные гистидины плохо подходят для GC-MS-анализа. Чувствительный метод определения таких аддуктов был разработан на основе LC-MS/MS-анализа после дериватизации [33].

Недавно была опубликована методика прямого определения интактного алкилированного гемоглобина с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии [34]. Был обнаружен целый ряд алкилированных форм гемоглобина после воздействия сернистого иприта. Однако в настоящее время нет данных о применении этого метода для диаг-

ностики отравления, хотя данный подход очень перспективен с точки зрения быстроты и массовости анализа.

Также сернистый иприт способен алкилировать остаток цистеина-34 сывороточного альбумина человека [35–36]. Участок алкилирования был обнаружен после трипсинолиза альбумина из крови, обработанной радиоактивным ^{14}C сернистым ипритом. Цистеин-34 является единственным свободным остатком цистеина в альбумине и имеет относительно низкое значение рКа.

Чувствительный метод определения аддукта сернистого иприта с альбумином был разработан на основе расщепления алкилированного альбумина ферментом проназой, и трипептид S-[2-(дигидроксиэтил)тио]этил-Cys-Pro-Phe выявлялся методом micro-LC-MS/MS [35]. Предел обнаружения для сернистого иприта в крови, обработанной *in vitro*, был определен в 1 нМ. Преимуществом этого метода является возможность быстрого выделения альбумина из крови методами аффинной хроматографии. Необходимо отметить, что по подобному механизму к Cys34 альбумина могут присоединяться различные цитостатики на основе азотистого иприта, такие как мелфалан и циклофосфамид [37].

Аналитическая процедура для определения S-[2-(дигидроксиэтил)тио]этил-Cys-Pro-Phe была успешно применена на образцах крови от 9 пострадавших в ирано-иракском конфликте, которые получили отравление через кожу. Образцы крови были получены через 8–9 дней после отравления и хранились при -70°C . Аддукты альбумина были обнаружены во всех случаях, концентрация иприта соответствовала 0.4–1.8 мкМ по калибровке, построенной на образцах крови, обработанных ипритом *in vitro* [35]. Выявлены также аддукты сернистого иприта с глобином и альбумином по остаткам аспарагиновой и глутаминовой кислот [38], а также с кератином кожи [39], однако методы идентификации аддуктов с использованием методов LC-MS/MS или MALDI пока не разработаны.

В культуре эпидермальных кератиноцитов человека при действии сернистого иприта меченым ^{14}C *in vitro* был выявлен также ряд белков, которые способны образовывать аддукты с ипритом. После разделения белков клеточного лизата с помощью 2D-электрофореза был проведен масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF) белков из пятен, имеющих радиоактивность. Был идентифицирован ряд белков, образующих аддукты с сернистым ипритом, включающий в себя актин, несколько цитокератинов I и II типа, стратифин (14-3-3сигма) и галестин-7. Полученная информация позволит лучше понять молекулярные основы патогенеза, вызванного сернистым ипритом [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрый анализ биологических образцов, который стал возможным с развитием масс-спектрометрии с мягкими методами ионизации, имеет большое значение, поскольку в последние годы появилось несколько новых направлений в поиске биомаркеров интоксикации ОБ и возможности их клинического применения. Например, потоковый анализ большого количества образцов при определении аддуктов ОБ с нативными белками методом MALDI-TOF или же поиск новых белков-мишеней.

Кроме того, методы масс-спектрометрии способствуют улучшению методологии химического и биохимического мониторинга ОБ в объектах окружающей среды и в биологических образцах, изучению новых молекулярных и функциональных механизмов патогенеза интоксикации различными ОБ, а также разработке новых эффективных средств профилактики и терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smith W.J., Salem H.* Biomarkers of Chemical Warfare Agents // *Toxicologic biomarkers* / Ed. A.P. DeCaprio. N.Y.: Taylor and Francis, 2006. P. 259–272.
2. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия. Подписана в Париже 13 января 1993 г. (<http://www.un.org/russian/documen/convents/chemweapons.pdf>).
3. *Рыбальченко И.В.* Роль аналитической химии в обеспечении международного контроля исполнения Конвенции о запрещении химического оружия // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)*. 2007. LI. С. 103–108.
4. *Black R.M.* Tandem Mass Spectrometry: Applications in the Trace Analysis of Chemical Warfare Agents // *J. Defence Sci.* 1996. V. 1. P. 219–226.
5. *Black R.M., Brewster K., Clarke R.J., Harrison J.M.* The Chemistry of 1,1'-thiobis(2-chloroethane) (sulphur mustard) Part II. The Synthesis of Some Conjugates with Cysteine, n-acetylcysteine and n-acetylcysteine methyl ester // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 1992. V. 71. P. 49–58.
6. *Bell A.J., Murrell J., Timperley C.M., Watts P.* Fragmentation and Reactions of Two Isomeric O-alkyl S-(2-dialkylamino)ethyl methylphosphonothiolates Studied by Electrospray Ionization/Ion Trap Mass Spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001. V. 12. P. 902–910.
7. *Benschop H.P., Bijleveld E.C., Otto M.F., et al.* Stabilization and Gas Chromatographic Analysis

- of the Four Stereoisomers of 1,2,2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate (soman) in Rat Blood // *Anal. Biochem.* 1985. V. 151. P. 242–253.
8. *Black R.M., Read R.W.* Biological Fate of Sulfer Mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane): Identification of b-lyase Metabolites and Hydrolysis Products in Human Urine // *Xenobiotica.* 1995. V. 25. P. 167–173.
 9. *Bossle P.C., Martin J.J., Sarver E.W., Sommer H.Z.* High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Alkyl Methylphosphonic Acids by Derivatization // *J. Chromatogr.* 1983. V. 267. P. 209–212.
 10. *Borrett V.T., Mathews R.J., Mattsson E.R.* Verification of the Chemical Weapons Convention: Mass Spectrometry of Alkyl Methylphosphonofluoridates // *Aust. J. Chem.* 1994. V. 47. P. 2065–2074.
 11. *Black R.M., Harrison J.M., Read R.W.* Biological Fate of Sulphur Mustard: in vitro Alkylation of Human Haemoglobin by Sulphur Mustard // *Xenobiotica.* 1997. V. 27. P. 11–32.
 12. *Borrett V.T., Mathews R.J., Colton R., Traeger J.C.* Verification of the United Nations Chemical Weapons Convention: The application of electrospray mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996. V. 10. P. 114–118.
 13. *Borrett V.T., Gan T.H., Lakeland B.R., et al.* Gas Chromatographic Mass Spectrometric Characterisation of Amiton and the Recovery of Amiton from Concrete, Paint, Rubber and Soil Matrices // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 1003. P. 143–155.
 14. *Borrett V.T., Colton R., Traeger J.C.* The Electrospray Mass Spectra of Phosphonic Acid, Methyl Phosphonic Acid and Its Alkyl Esters, and Their Complexes with Alkali and Alkali earth Metal Ions // *Eur. J. Mass Spectrom.* 1995. V. 1. P. 131–140.
 15. *Куценко С.А.* Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита. СПб.: ФОЛИАНТ, 2004. 528 с.
 16. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Feather-Stone R.M.* A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 7. P. 88–95.
 17. *Doorn J.A., Talley T.T., Thompson C.M., Richardson R.J.* Probing the Active Sites of Butyrylcholinesterase and Cholesterol Esterase with Isomalathion: Conserved Stereoselective Inactivation of Serine Hydrolases Structurally Related to Acetylcholinesterase // *Chem. Res. Toxicol.* 2001. V. 14. P. 807–813.
 18. *Degenhardt C.E., Pleijsier K, et al.* Improvements of the Fluoride Reactivation Method for the Verification of Nerve Agent Exposure // *J. Anal. Toxicol.* 2004. V. 28. P. 364–371.
 19. *Li H., Schopfer L.M., Nachon F., et al.* Aging Pathways for Organophosphate-Inhibited Human Butyrylcholinesterase, Including Novel Pathways for Isomalathion, Resolved by Mass Spectrometry // *Toxicol. Sci.* 2007. V. 100. P. 136–145.
 20. *Worek F., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P.* Kinetic Analysis of Interactions between Human Acetylcholinesterase, Structurally Different Organophosphorus Compounds and Oximes // *Biochem. Pharmacol.* 2004. V. 68. P. 2237–2248.
 21. *Aurbek N., Thiermann H., Szinicz L., Eyer P., Worek F.* Analysis of Inhibition, Reactivation and Aging Kinetics of Highly Toxic Organophosphorus Compounds with Human and Pig Acetylcholinesterase // *Toxicology.* 2006. V. 224. P. 91–99.
 22. *Black R.M., Harrison J.M., Read R.W.* The Interaction of Sarin and Soman with Plasma Proteins: the Identification of a Novel Phosphonylation Site // *Arch. Toxicol.* 1999. V. 73. P. 123–126.
 23. *Noort D., Benschop H.P., Black R.M.* Biomonitoring of Exposure to Chemical Warfare Agents: a Review // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002. V. 184. P. 116–126.
 24. *Tornqvist M., Fred C., Haglund J., et al.* Protein Adducts: Quantitative and Qualitative Aspects of Their Formation, Analysis and Applications // *J. Chromatogr., B.* 2002. V. 778. P. 279–308.
 25. *Boogaard P.J.* Use of Haemoglobin Adducts in Exposure Monitoring and Risk Assessment // *J. Chromatogr., B.* 2002. V. 778. P. 309–322.
 26. *Brookes P., Lawley P.D.* The Reaction of Mustard Gas with Nucleic Acids in vitro and in vivo // *Biochem. J.* 1960. V. 77. P. 478–484.
 27. *Fidder A., Moes G.W.H., Scheffer A.G., et al.* Synthesis, Characterization and Quantitation of the Major Adducts Formed between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood // *Chem. Res. Toxicol.* 1994. V. 7. P. 199–204.
 28. *Fidder A., Noort D., De Jong L.P.A., Benschop H.P. and Hulst A.G.* N7-(2-Hydroxyethylthioethyl)-guanine: a Novel Urinary Metabolite Following Exposure to Sulfur Mustard // *Arch. Toxicol.* 1996. V. 70. P. 854–855.
 29. *Rao M.K., Bhadbury P.S., Sharma M., et al.* A Facile Methodology for the Synthesis and Detection of N7-guanine Adduct of Sulfur Mustard as a Biomarker // *Can. J. Chem.* 2002. V. 80. P. 504–509.
 30. *Hambrook J.L., Howells D.J., Schock C.* Biological Fate of Sulfur Mustard (1,1'-Thiobis(2-chloroethane)): Uptake, Distribution and Retention of ³⁵S in Skin and in Blood after Cutaneous Application of ³⁵S-sulfur Mustard in Rat and Comparison with Human Blood in vitro // *Xenobiotica.* 1993. V. 23. P. 537–561.
 31. *Wheeler G.P.* Studies Related to the Mechanisms of Action of Cytotoxic Alkylating Agent: a Review // *Cancer Res.* 1962. V. 22. P. 651–688.
 32. *Noort D., Verheij E.R., Hulst A.G.,*

- De Jong L.P.A., Benschop H.P.* Characterization of Sulfur Mustard Induced Structural Modifications in Human Hemoglobin by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. V. 9. P. 781–787.
33. *Noort D., Hulst A.G., Trap H.C., De Jong L.P.A., Benschop H.P.* Synthesis and Mass Spectrometric Identification of the Major Amino Acid Adduct Formed between Sulfur Mustard and Hemoglobin in Human Blood // *Arch. Toxicol.* 1997. V. 71. P. 171–178.
34. *Price E.G., Smith J.R., Clark C.R., Schlager J.J., Shih M.L.* MALDI-TOF/MS as a Diagnostic Tool for the Confirmation of Sulfur Mustard Exposure // *J. Appl. Toxicol.* 2002. V. 20, P. S193–S197.
35. *Noort D., Hulst A.G., De Jong L.P.A., 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. Toxicol.* 1999. V. 12. P. 715–721.
36. *Bechtold W.E., Willis J.K., Sun J.D., Griffith W.C., Reddy T.V.* Biological Markers of Exposure to Benzene: S-phenylcysteine in Albumin // *Carcinogenesis.* 1992. V. 13. P. 1217–1220.
37. *Noort D., Hulst A.G., Jansen R.* Covalent Binding of Nitrogen Mustards to the Cysteine-34 Residue in Human Serum Albumin // *Arch. Toxicol.* 2002. V. 76. P. 83–88.
38. *Korte W.D., Smith J.R., Capacio B.R., DeLion M. and Anderson D.R.* Monitoring Sulfur Mustard Exposure by the GC-MS Analysis of Thiodiglycol Cleaved from Blood Proteins¹, U.S. Army medical research and material command // *Proceedings of the 2002 Bioscience Review.* Hunt Valley, MD. P. 269.
39. *Van der Schans G.P., Noort D., Mars-Groenendijk R.H., et al.* Immunochemical Detection of Sulfur Mustard Adducts with Keratins in the Stratum Corneum of Human Skin // *Chem. Res. Toxicol.* 2003. V. 15. P. 21–25.
40. *Mol M.A., Van den Berg R.M., Benschop H.P.* Proteomic Assessment of Sulfur Mustard-Induced Protein Adducts and Other Protein Modifications in Human Epidermal Keratinocytes // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008. V. 230. P. 97–108.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Подольская Е.П.)

ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" ФМБА России, Санкт-Петербург (Бабаков В.Н.)

Материал поступил в редакцию 17.10.2008.

SOFT IONIZATION MASS-SPECTROMETRY IN TOXICOLOGICAL ANALYSIS

E. P. Podolskaya¹, V. N. Babakov²

¹*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

²*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint-Petersburg*

The review deals with soft ionization mass-spectrometry use in retrospective toxicological analysis of highly dangerous toxicological. Advantages and disadvantages of LC-MS and MALDI-MS in detection of both toxic agents and biomarkers of intoxication are described.