

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОСФОНИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАЛДИ-МИШЕНИ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННОЙ СТЕАРАТОМ ЛАНТАНА

В. Н. Бабаков¹✉, А. Ю. Горбунов¹, А. С. Гладчук^{2,4}, Я. К. Калниня², В. В. Шиловских⁴, Н. В. Томилин², Н. Г. Суходолов^{3,4}, А. С. Радилов¹, Е. П. Подольская^{2,3}

¹ Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-клинический центр токсикологии имени С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аддукты белков крови с фосфорорганическими соединениями (ФОС) как маркеры интоксикации позволяют не только установить факт отравления, но и идентифицировать ФОС по присоединившемуся остатку. Целью работы было разработать методику специфичной и селективной экстракции аддуктов белков крови с ФОС на поверхности матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) мишени, функционализированной мультимолекулярными структурами на основе стеарата лантана, с помощью металл-аффинной хроматографии. Показано, что сорбент способен удерживать как полноразмерные, так и деалкилированные аддукты белков крови с ФОС. С помощью предложенной методики были экстрагированы и идентифицированы пептиды сывороточного альбумина и бутирилхолинэстеразы человека, модифицированные различными ФОС, после инкубации плазмы крови человека с ФОС в диапазоне концентраций 1×100 нг/мл, что позволяет использовать этот подход для идентификации ФОС при расследовании реальных случаев интоксикаций.

Ключевые слова: стеарат лантана, пленки Ленгмюра–Блоджетт, фосфорорганические соединения (ФОС), аддукты сывороточного альбумина, аддукты бутирилхолинэстеразы

Благодарности: авторы выражают благодарность за техническую поддержку ресурсным центрам «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Геомодель» Научного парка СПбГУ, а также А. А. Селютину за возможность работы с МАЛДИ масс-спектрометрическим оборудованием.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Николаевич Бабаков
г.п. Кузьмолковский, ст. Капитолово, корп. 93, Ленинградская обл, Россия; babakov@gpetch.ru

Статья получена: 11.11.2022 **Статья принята к печати:** 11.01.2023 **Опубликована онлайн:** 28.01.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.002

IDENTIFICATION OF PHOSPHONYLATED PEPTIDES USING A MALDI TARGET FUNCTIONALIZED WITH LANTHANUM STEARATE

Babakov VN¹✉, Gorbunov AY¹, Gladchuk AS^{2,4}, Kalninya Ya², Shilovskikh VV⁴, Tomilin NV², Sukhodolov NG^{3,4}, Radilov AS¹, Podolskaya EP^{2,3}

¹ Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

² Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

³ Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

As markers of intoxication, adducts of blood proteins with organophosphorus compounds (OPs) allow establishing the fact of poisoning and, furthermore, enable identification of the OPs by the attached residue. This study aimed to develop a method of specific and selective extraction of blood protein adducts carrying OPs on the surface of a matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) target functionalized with multimolecular structures based on lanthanum stearate using metal affinity chromatography. We have shown the ability of adsorbent to retain both full-size and dealkylated adducts of blood proteins with OPs. The developed method allowed extraction and identification of peptides of human serum albumin and human butyrylcholinesterase modified with various OPs (after incubation of human blood plasma with OPs in concentrations from 1 to 100 ng/mL), which makes this approach applicable for the purposes of OPs identification in the context of investigation of real cases of intoxication.

Keywords: Lanthanum stearate, Langmuir–Blodgett films, serum albumin adducts, butyrylcholinesterase adducts, organophosphorus compounds

Acknowledgments: the authors express their gratitude for technical support to the resource centers Development of Molecular and Cellular Technologies and Geomodel of the Research Park of St. Petersburg State University, and to A.A. Selyutin for the opportunity to use the MALDI mass spectrometer.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir Nikolaevich Babakov
Kuzmolovsky, st. Kapitolovo, str. 93, Leningradsraja oblast, Russia; babakov@gpetch.ru

Received: 11.11.2022 **Accepted:** 11.01.2023 **Published online:** 28.01.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.002

Фосфорорганические соединения (ФОС) — большой класс используемых в промышленности и сельском хозяйстве соединений, которые могут ингибировать сериновые эстеразы и протеазы [1]. Высокотоксичные представители ФОС внесены в список 1 Конвенции по запрещению химического оружия [2].

Аддукты ФОС с сывороточным альбумином (СА) и бутирилхолинэстеразой (БХЭ) человека являются основными долгоживущими биомаркерами интоксикации ФОС. Время полужизни аддуктов с ФОС составляет 20–25 дней для СА и 11–14 дней для БХЭ [3, 4], что позволяет определять агент в образцах крови спустя несколько

недель после отравления. При этом аддукты ФОС с БХЭ служат самыми надежными биомаркерами, позволяющими детектировать факт отравления при степени ингибирования фермента менее чем 1% [5]. Разработано множество подходов определения этих аддуктов в реальных образцах с помощью целевого анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [6–8]. Однако МАЛДИ масс-спектрометрия (МС), несмотря на более редкое использование, имеет преимущества для скринингового обзорного анализа аддуктов белков крови с ФОС в случаях идентификации

неизвестных ингибиторов БХЭ. Определение разницы масс (Δm) между модифицированным и нативным пептидами позволяет подобрать брутто-формулу ФОС.

МАЛДИ-МС приобрела популярность благодаря простоте, надежности, высокой чувствительности и большому диапазону анализируемых масс [9–11], но имеет значительные ограничения из-за эффекта подавления сигналов при большом количестве компонентов, что является существенным недостатком для обнаружения следовых количеств веществ. Поэтому метод зачастую требует предварительной подготовки образца, позволяющей либо снизить компонентность смеси, либо обогатить образец аналитом.

Недавно были предложены подходы, позволяющие не только применять мишень МАЛДИ в качестве носителя образца, но и использовать как часть протокола анализа, придавая ей дополнительную функциональную нагрузку [12]. Для этого поверхность стальной подложки функционализируют, придавая необходимые свойства [13, 14]. В этом случае перед проведением МС-анализа на поверхности мишени могут быть выполнены различные аналитические процедуры, повышающие эффективность всего анализа («лаборатория на мишени»). Формат «лаборатория на мишени» направлен на уменьшение количества образца, требуемого для анализа, и снижения потерь на сорбенте при экстракции, позволяет манипулировать очень малыми объемами проб, а также сводить пробоподготовку к нескольким простым этапам. Функционализированную сорбентом мишень можно использовать для прямого обогащения образца *in situ* с последующим анализом методом МАЛДИ-МС.

Коллапсированные монослои Ленгмюра — тонкопленочные сорбенты, которые имеют уникальную поверхность, состоящую из атомов металла [15], обладают как гидрофильными, так и гидрофобными свойствами [16] и достаточно устойчивы к внешнему воздействию [17]. Ранее было предложено использовать коллапсированные монослои стеарата лантана (FLa) в спинных колонках для экстракции ряда органических и биоорганических соединений [18], в том числе аддуктов СА человека с 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутаном. Нами был предложен подход, позволяющий проводить формирование как коллапсированного монослоя FLa, так и его мультимолекулярных структур непосредственно на МАЛДИ-мишени [19, 20]. Полученный материал имеет развитую поверхность, характеризуется высоким уровнем адгезии к поверхности, полированной МАЛДИ-мишени и при этом сохраняет свойства металл-аффинного сорбента. Целью работы было исследовать возможность специфичной экстракции аддуктов белков крови с ФОС на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной мультимолекулярными структурами FLa в формате «лаборатория на мишени».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение монослоев стеарата лантана на МАЛДИ-мишени

В качестве подложки использовали полированную МАЛДИ-мишень (MTP 384 target plate polished steel BC; Bruker Daltonics, ФРГ). На поверхность полированной МАЛДИ мишени наносили каплю объемом 0,6 мкл водного раствора соли лантана (III) с концентрацией 1 mM. На поверхность водной капли сверху наносили 0,6 мкл

насыщенного раствора стеариновой кислоты в н-гексане. Процедуру повторяли дважды. Получали три монослоя. Затем убрали остатки капли раствора соли лантана. На ту же ячейку мишени снова наносили каплю 0,6 мкл водного раствора соли лантана, и трижды наносили раствор стеариновой кислоты. В итоге ячейка МАЛДИ-мишени была модифицирована шестью монослоями FLa. Нанесенный сорбент трижды промывали деионизированной водой от соли лантана, для чего 8 мкл воды наносили на ячейку, оставляли на 1 мин, затем убрали дозатором.

Получение образцов белков, модифицированных ФОС

Для получения образцов модифицированного сывороточного альбумина к образцам донорской К2-ЭДТА плазмы крови человека в течение 2 ч после отбора была добавлена серия разведений в изопропиловом спирте 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутана, CAS № 96-64-0 (далее PFMP) до конечных концентраций 1 нг/мл – 1 мкг/мл, как было опубликовано ранее [5]. Для получения образцов модифицированного БХЭ фермент предварительно был выделен из донорской плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на прокаинамидсефарозе. К очищенному ферменту в концентрации 1 мг/мл добавили PFMP до конечных концентраций 100 мкг/мл, что приводило к более чем 90%-му ингибированию фермента. Инкубированную и контрольную плазму крови гидролизовали ферментом пепсином, инкубированный и контрольный фермент БХЭ — трипсином. Для оценки специфичности и селективности сорбции модифицированных пептидов на FLa гидролизованные инкубированную и контрольную плазму крови и фермент БХЭ смешивали в различных соотношениях. Для определения пределов обнаружения модифицированной БХЭ в плазме крови фермент выделяли из 250 мкл плазмы с помощью иммунопреципитации [21]. Все эксперименты проводили в четырех повторах.

МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ

Масс-спектры были получены с помощью тандемного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonics; Германия). Регистрацию спектров осуществляли в режиме рефлектрона с детектированием положительных ионов в диапазоне m/z 1000–3200. Число актов облучения при регистрации одного спектра составляло 20 000, частота выстрелов — 2000 Гц. Регистрацию и интерпретацию спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Flex Control 3.4 и Flex Analysis 3.4. Тандемные масс-спектры были получены в режиме LIFT, фрагментацию ионов-предшественников осуществляли в условиях диссоциации, активированной соударениями (CID).

Пробоподготовка и МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ образцов 7-го квалификационного биомедицинского теста ОЗХО

Образцы от ОЗХО были получены в рамках участия ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России в 7-м квалификационном биомедицинском тесте ОЗХО и представляли собой пулированную плазму крови человека. К образцам плазмы крови в лаборатории ОЗХО были добавлены вещества VX (О-этил-S-2-диизопропиламиноэтилметилфосфонотиолат, CAS № 50782-69-9) до конечной концентрации 10 нг/мл и

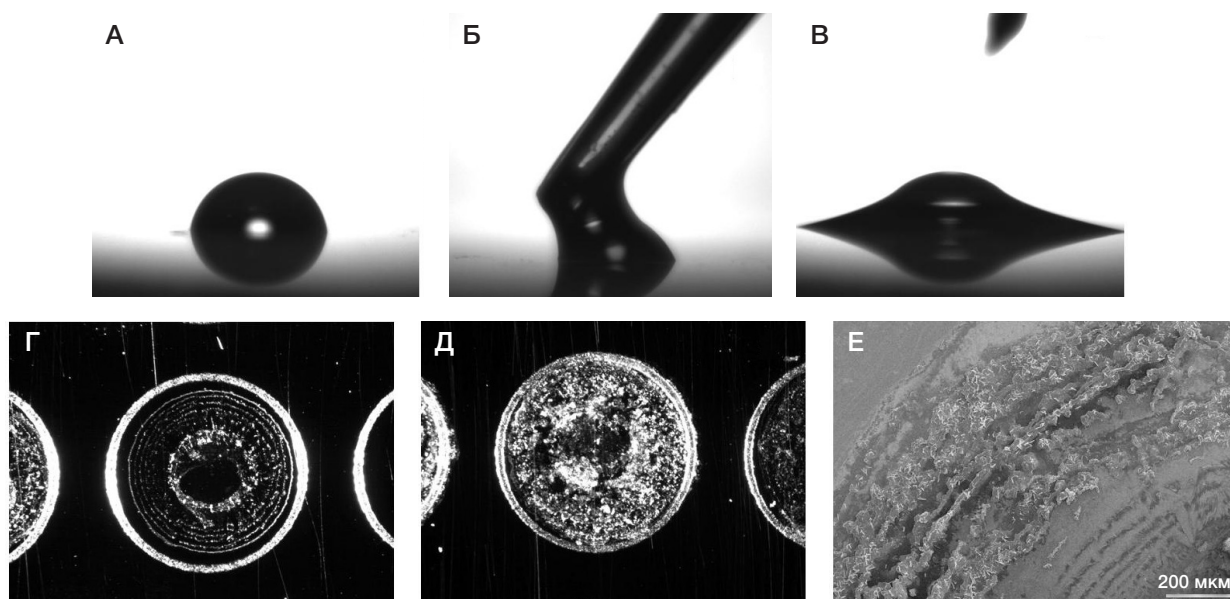


Рис. 1. А. Капля водной субфазы. Б. Нанесение раствора стеариновой кислоты в н-гексане. В. Распределение органической фазы по подложке. Г, Д. Изображение ячеек МАЛДИ-мишени после нанесения одного и шести слоев FLA (стереомикроскоп SMZ 1500 с цифровой камерой DS-2MBWc (Nikon; Япония). Е. СЭМ-изображение шести слоев FLA, сформированных на МАЛДИ-мишени (сканирующий электронный микроскоп S-3400N; Hitachi, Japan).

GE (О-изопропил этилфосфонофторид), CAS № 1189-87-3) до конечной концентрации 20 нг/мл.

БХЭ выделяли из образцов иммунопреципитацией с помощью иммуномагнитных микросфер Dynabeads Antibody Coupling Kit (143.11D; Invitrogen, США) с привитыми антителами против БХЭ (Pierce BChE monoclonal mouse antibody HAN 0020102; Thermo, США). Иммуномагнитные микросферы получали согласно протоколу производителя набора Dynabeads Antibody Coupling Kit. Выделение БХЭ из плазмы осуществляли согласно описанному ранее методу [21].

Для проведения ферментативного гидролиза БХЭ был использован трипсин (Sigma-Aldrich; США). 100 мкл элюата, содержащего БХЭ, трижды промывали водой с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultra-0.5, 30K (UFC5030BK; Merck Millipore, США). Далее объем образца доводили до 100 мкл 25 мМ водным раствором бикарбоната аммония, затем добавили 5 мкл трипсина (0,1 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение 4 ч, затем добавляли еще 5 мкл раствора трипсина (0,1 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение 16 ч.

Металл-аффинную хроматографию (МАХ) на сорбенте, содержащем FLA, проводили непосредственно на МАЛДИ-мишени с нанесенными монослоями.

Сорбцию образцов триптического гидролизата БХЭ, модифицированной ФОС, проводили в 2,5%-м водном растворе аммиака в течение 20 мин. Сорбент промывали дважды 5 мкл 2,5%-го водного раствора аммиака и 8 мкл воды для удаления несвязавшейся фракции. Для улучшения десорбции фосфонилированных пептидов добавляли 3 мкл 30%-го ацетонитрила с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), затем на мишень добавляли 2 мкл матрицы СНСА (5 мг/мл в 70%-м водном ацетонитриле). После МАХ монослои FLA удерживали сорбированные фосфонилированные пептиды белков крови.

Для получения МАЛДИ-масс-спектров образцов 7-го квалификационного биомедицинского теста ОЗХО использовали масс-спектрометр ион-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, оснащенный лазером SmartBeam-II (355 нм) Solarix XR 7T (Bruker Daltonics; ФРГ). Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме детектирования положительно заряженных ионов

в диапазоне m/z 1000–3200. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения Data Analysis 5.0 (Bruker Daltonics; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Функционализация поверхности МАЛДИ-мишени

Для работы была выбрана полированная МАЛДИ-мишень, имеющая такую гидрофобную поверхность, чтобы нанесенная на нее водная капля фиксировалась, сохраняя свою геометрическую форму (рис. 1А). Функционализацию поверхности мишени проводили по методике, опубликованной ранее [20]. Объем растворов был выбран таким образом, чтобы при нанесении раствора стеариновой кислоты в н-гексане на водную каплю (рис. 1Б) не происходило растекания гексана за границы ячейки, и слои формировались строго в ее пределах (рис. 1В–Е). Было показано, что после последовательного формирования шести монослоев материал перестает удерживаться на ячейке, количество монослоев больше шести приводит к меньшей адгезии пленок стеарата лантана к МАЛДИ мишени. МАЛДИ-МС анализ пленок, сформированных на мишени, показал, что основным структурным звеном сорбента является ион дистеарата лантана, о чем свидетельствует сигнал с m/z 705,46. Физико-химические параметры пленок стеарата лантана были охарактеризованы ранее [20]. Поверхность МАЛДИ мишени функционализировали за счет формирования в ячейках сорбента на основе мультимолекулярных структур FLA, состоящих из шести коллапсированных монослоев.

Оценка сорбционных свойств FLA

При разработке подхода для проведения металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени» было показано, что на пятне сорбента, состоящего из шести коллапсированных монослоев FLA, надежно удерживаются капли основных растворов для МАХ в следующих объемах: 2,5%-й водный аммиак — 7–8 мкл; вода — 10–12 мкл; 30%-й водный ацетонитрил — 3–5 мкл. Модельным объектом был

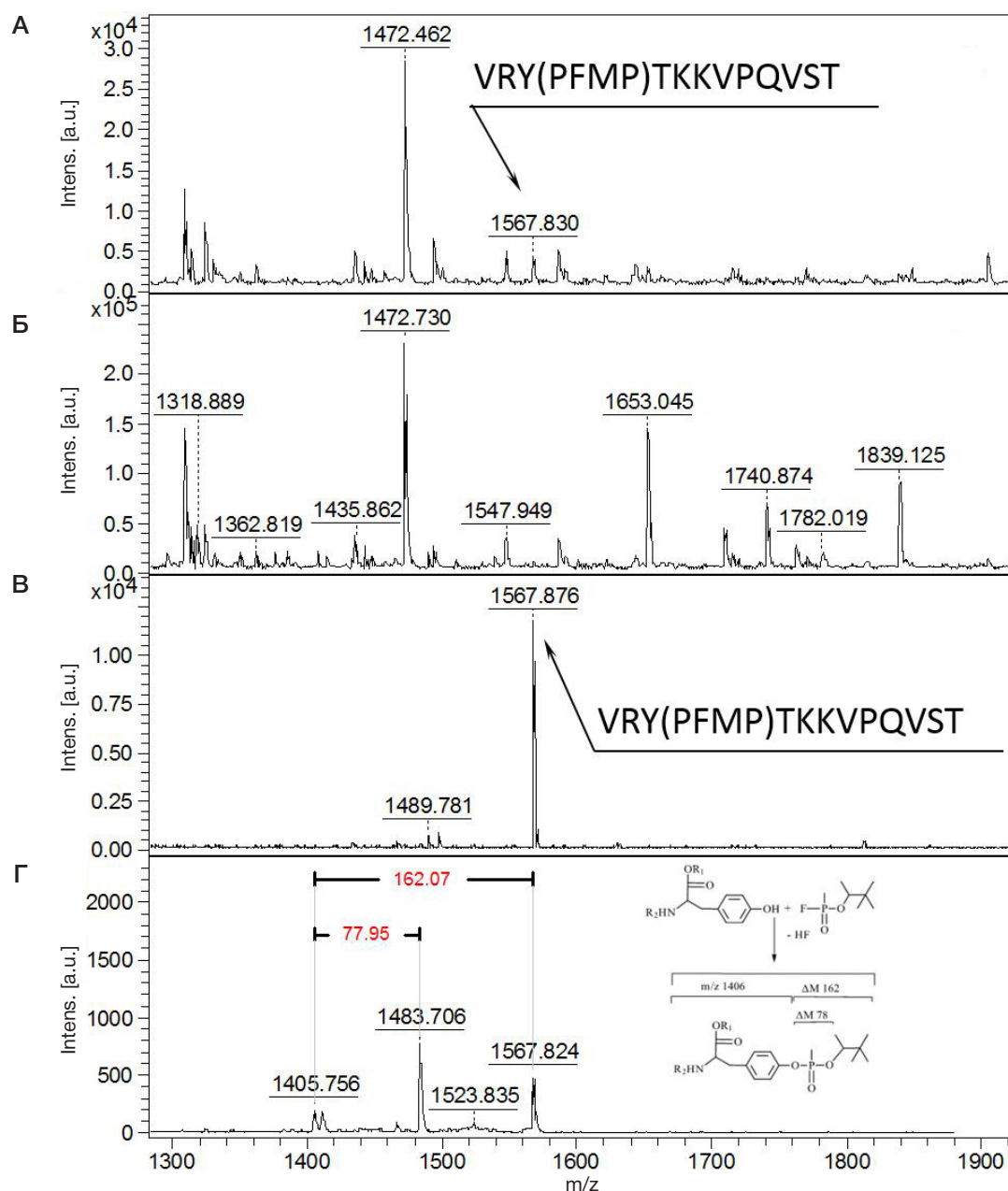


Рис. 2. Масс-спектр пептического гидролизата СА человека, модифицированного PFMP, при соотношении модифицированной формы к немодифицированной, равном 1 : 10. **А.** Масс-спектр исходного образца. **Б.** Масс-спектр несвязавшейся фракции. **В.** Масс-спектр, полученный с пятна сорбента после МАХ. **Г.** Идентификация модификации PFMP по нейтральной потере

выбран пептический гидролизат плазмы крови, в которой сывороточный альбумин (СА) модифицирован PFMP на 90% по тирозину-411. Далее все эксперименты, включающие стадию МАХ, проводили в соответствии со следующей методикой. На сорбент наносили каплю 2,5%-го водного аммиака для уравнивания фазы, выдерживали 5 мин, после чего удаляли и наносили повторно. Затем в каплю добавляли 1 мкл образца, выдерживали 20 мин для прохождения сорбции. Несвязавшуюся фракцию переносили на соседнюю ячейку для дальнейшего МАЛДИ-МС анализа. FLa последовательно промывали 2,5%-м водным раствором аммиака, водой и 0,1%-м водным раствором ТФУ. Сорбент высушивали, для десорбции наносили 3 мкл 30%-го водного раствора ацетонитрила и 2 мкл раствора матрицы СНСА с концентрацией 5 мг/мл и проводили МАЛДИ-МС-анализ.

Для исследования сорбционной способности FLa пептический гидролизат плазмы крови человека,

содержащей модифицированный на 90% сывороточный альбумин, с начальной концентрацией СА 1 мг/мл, разбавляли дистиллированной водой до получения следующих концентраций: 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 и 0,1 мг/мл. МАХ-МАЛДИ-МС-анализ показал, что после МАХ сигнал со значением m/z 1567,87, соответствующий аддукту VRY(PFMP)TKKVPQVST, в масс-спектре несвязавшейся фракции не детектируется после нанесения на сорбент 1 мкл раствора с концентрацией белка 0,5 мг/мл. В масс-спектрах, полученных со всех пятен сорбентов, сигнал с m/z 1567,87 регистрировали с высокой интенсивностью, а результаты фрагментного анализа подтвердили его принадлежность аддукту VRY(PFMP)TKKVPQVST. Исходя из степени модификации белка, соответствующей 90%, и при полном прохождении гидролиза (о чем свидетельствует отсутствие сигнала LVRY(PFMP)TKKVPQVST (продукт неполного гидролиза) с m/z 1680,89 во всех масс-спектрах), можно сделать

Таблица 1. Результаты исследования селективности метода при разбавлении СА, модифицированного PFMP, плазмой крови человека

Молярное соотношение VRY(PFMP)TKKVPQVST/ VRYTKKVPQVST	Объем нанесенного на сорбент образца, мкл	Соотношение сигнал / шум
1 : 10	1	51
1 : 100	1	35
1 : 1000	5	13
	1	5
1 : 10 000	5	3
	1	–

вывод, что шесть слоев FLA способны удерживать 0,012 мкг аддукта VRY(PFMP)TKKVPQVST.

Для оценки специфичности и селективности подхода пептические гидролизаты модифицированного и немодифицированного СА смешивали таким образом, чтобы соотношения VRY(PFMP)TKKVPQVST/ VRYTKKVPQVST составляли 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 и 1 : 10000. На сформированные и подготовленные пятна FLA наносили образец с начальной концентрацией СА 1 мг/мл в соответствии с данными, представленными в табл. 1. Результаты МАХ-МАЛДИ-МС-анализа (табл. 1; рис. 2) свидетельствуют о высокой эффективности предложенного подхода металл-аффинной экстракции аддуктов СА с PFMP в формате «лаборатория на мишени». Детектировать сигнал, соответствующий аддукту, не удалось только при нанесении 1 мкл смеси при соотношении VRY(PFMP)TKKVPQVST/VRYTKKVPQVST, равном 1 : 10 000. Уже при нанесении 5 мкл этого раствора наблюдается сигнал со значением m/z 1567,87 с соотношением сигнал/шум (S/N) как 2–3 (при различных повторях). В случае анализа 1 мкл смеси 1 : 1000 соотношение S/N составляло 5–6. При более высоких концентрациях аддукт воспроизводимо надежно детектируется.

На следующем этапе работы была исследована возможность экстракции аддуктов БХЭ с PFMP методом МАХ на FLA с последующим их МАЛДИ-МС-анализом. Триптический пептид БХЭ, модифицированный ФОС, более удобный аналит при МАЛДИ-МС-анализе, чем пептический нонапептид активного центра БХЭ, широко используемый в ВЭЖХ-МС/МС-анализе. Триптический пептид, содержащий серин-198 активного центра, состоит из 29 аминокислотных остатков: SVTLFGES*AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (m/z 2928,521). Однако, в отличие от аддуктов СА с ФОС, аддукты БХЭ подвержены деалкилированию (старению) [22, 23], и при МС-анализе чаще всего детектируют аддукт БХЭ с остатком метилфосфоновой кислоты (MPA). Эксперимент проводили с использованием предварительно выделенной из плазмы крови человека БХЭ, которую инкубировали с PFMP до достижения полного ингибирования фермента. Триптический гидролизат модифицированного белка БХЭ с концентрацией 1 мг/мл в объеме 1 мкл был нанесен на FLA с последующим МАХ-МАЛДИ-МС-анализом. По результатам МАЛДИ-МС-анализа (рис. 3) можно сделать вывод, что FLA, сформированные на мишени, проявляют специфичность по отношению к аддуктам БХЭ как с PFMP, так и с MPA. В масс-спектре присутствуют сигналы с m/z 3006,51, соответствующего аддукту SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, и с m/z 3090,61, соответствующего аддукту SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR. При разбавлении гидролизата модифицированной БХЭ гидролизатом немодифицированной специфичность и селективность МАХ-МАЛДИ-МС-анализа заметно ниже, по сравнению с

анализом аддуктов сывороточного альбумина человека с PFMP, тем не менее, при соотношении модифицированной формы к немодифицированной в соотношении 1 : 100 сигналы аддуктов БХЭ с PFMP и MPA надежно детектируются с $S/N \geq 6$.

Определение аддуктов в образцах плазмы крови человека, инкубированной с PFMP

В качестве образцов использовали плазму крови человека, инкубированную с PFMP с концентрацией 1 и 10 нг/мл, при этом степень ингибирования БХЭ составила < 5 и 40%, соответственно. Поиск аддукта СА с PFMP проводили в пептическом гидролизате суммарного белка плазмы крови, концентрация СА после осаждения белков и перерастворения в дистиллированной воде составляла 1 мг/мл. В случае БХЭ было важно выделить БХЭ в максимально чистом виде, для этого использовали высокоспецифичный метод иммунопреципитации из 250 мкл плазмы крови. Для МАХ-МАЛДИ-МС был использован раствор с концентрацией БХЭ 1 мг/мл. Результаты МАХ-МАЛДИ-МС-анализа представлены на рис. 4 и в табл. 2. При анализе пептического гидролизата суммарного белка плазмы крови с использованием разработанного подхода сигнал аддукта VRY(PFMP)TKKVPQVST был обнаружен в масс-спектрах обоих образцов. Однако если образец, инкубированный с PFMP в концентрации 10 нг/мл, был нанесен на сорбент в объеме 1 мкл и соотношение S/N сигнала VRY(PFMP)TKKVPQVST составило 5, то во втором случае (с конечной концентрацией PFMP, равной 1 нг/мл) потребовалось обогащение, и на сорбент было нанесено 5 мкл образца. Соотношение S/N при этом составило 4. При этом в обоих образцах плазмы крови был идентифицирован аддукт БХЭ, выделенный с помощью иммунопреципитации, с деалкилированным остатком PFMP SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR с хорошим S/N без дополнительной оптимизации методики.

Определение аддуктов ФОС с БХЭ в образцах плазмы крови человека

Определение аддуктов ФОС с БХЭ с помощью предлагаемого подхода проводили при выполнении 7-го квалификационного теста ОЗХО. БХЭ предварительно выделяли из 250 мкл плазмы крови с добавками ФОС. БХЭ после иммунопреципитации элюировали с сорбента 0,6%-й муравьиной кислотой, переводили элюат в бикарбонатный буфер и гидролизовали трипсином. После МАХ-МАЛДИ-МС-анализа в области m/z 2880–3100 детектируются нативный пептид и модифицированные пептиды с m/z 3034,5397 (VX) и с m/z 3062,5650 (GE) (рис. 5). Молекулярной массе остатка GE соответствуют и другие ФОС, например VR и CVX. Для точного определения агента в этом случае целесообразно использовать

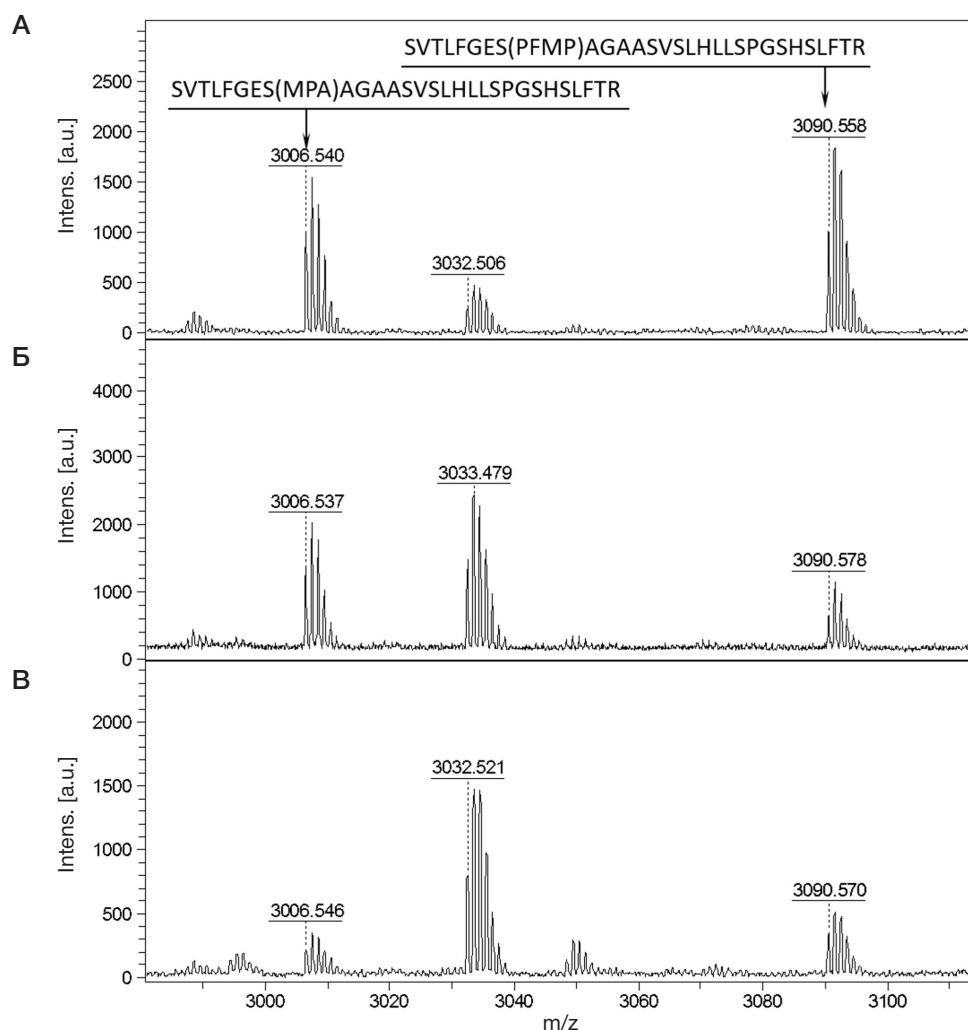


Рис. 3. Результаты MAX(FLa)-МАЛДИ-МС-анализа триптического гидролизата БХЭ (1 мг/мл), модифицированной PFMP при соотношении модифицированной формы к немодифицированной 100 : 0 (А); 1 : 10) (Б); 1 : 100 (В)

метод реактивации агента из белковых аддуктов и идентификации с помощью газовой хроматографии — масс-спектрометрии. Использование масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье позволило определить точную массу присоединенного остатка и существенно сузить перечень возможных ФОС.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предлагаемый подход позволяет проводить обзорный скрининговый анализ пептидов СА и БХЭ, модифицированных ФОС, в реальных образцах плазмы крови с подозрением на отравление этим классом соединений. Отравление высокотоксичными ФОС сопровождается концентрацией агента в плазме крови, достигающей 100 нг/мл. Идентификация массы присоединенного остатка с использованием МС высокого разрешения позволяет сделать обоснованные предположения об исходном соединении.

Несмотря на то что аддукты СА с фосфорорганическими соединениями в ряде работ определяются как маркеры интоксикации, позволяющие не только установить ее факт, но и идентифицировать ФОС по присоединившемуся остатку [24–27], большая часть исследователей основным белковым маркером рассматривают аддукт БХЭ, присоединяющей остаток ФОС по серину-198 [28]. Это связано с тем, что концентрации БХЭ и СА в плазме человека значительно различаются — 5 и 40 000 мкг/мл

соответственно. Даже в случае полного ингибирования БХЭ степень модификации СА будет крайне низкой. Но при этом, в отличие от БХЭ, аддукты СА с ФОС не подвергаются деалкилированию, что в большинстве случаев позволяет по ΔM между модифицированным и нативным пептидами, либо идентифицировать ФОС, либо подобрать брутто-формулу, что значительно облегчает дальнейшую идентификацию другими методами. Соответственно, стадия обогащения образца аддуктами СА с ФОС становится необходимой. СА является основным компонентом плазмы крови, поэтому для определения аддуктов сывороточного альбумина, можно использовать ферментативные гидролизаты плазмы крови, без дополнительной стадии выделения белка. Действительно, метод MAX на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной FLA, позволяет специфично и селективно экстрагировать аддукты СА с PFMP даже из пептического гидролизата суммарного белка плазмы крови, при том что концентрация СА составляет 40% и остальные белковые компоненты усиливают эффект подавления целевых сигналов. Стоит отметить, что в проведенном исследовании для инкубации плазмы с ФОС были выбраны концентрации PFMP, не приводящие к летальному исходу при попадании ФОС в организм. В случае концентрации PFMP, равной 1 нг/мл, ингибирование БХЭ составило < 5%, что зачастую даже не вызывает клинических проявлений. Однако предложенный подход в формате «лаборатория

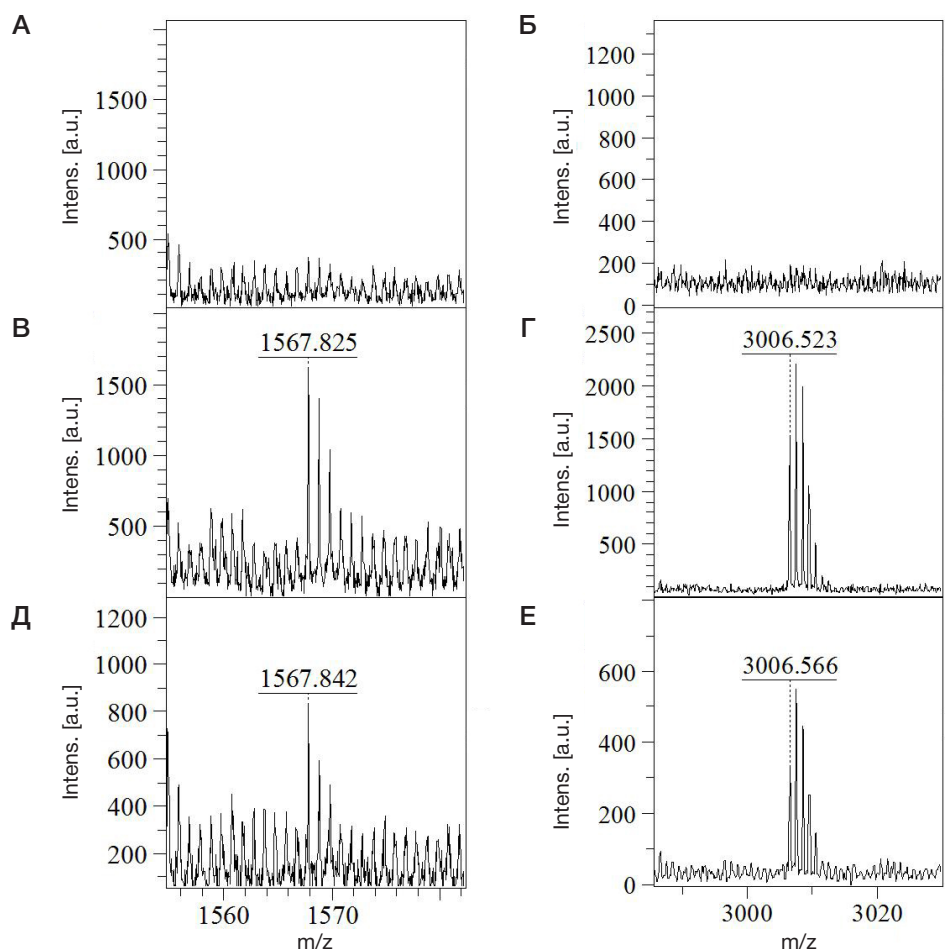


Рис. 4. Результаты MAX(FLa)-МАЛДИ-МС-анализа образцов плазмы крови, инкубированной с PFMP. Представлены масс-спектры контрольных образцов (А, Б); аддуктов VRY(PFMP)TKKVPQVST и SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, концентрация PFMP — 10 нг/мл (В, Г); аддуктов VRY(PFMP)TKKVPQVST и SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR, концентрация PFMP — 1 нг/мл (Д, Е)

на мишени» не только позволил выявить ингибирование БХЭ по наличию деалкилированного аддукта, но и дал информацию для идентификации PFMP по $\Delta M = 162$. По сравнению с экстракцией в спиновых колонках в разы снижаются затраты на реактивы, сокращается время эксперимента и заметно повышается чувствительность анализа, что имеет существенное значение при работе с крайне ограниченными количествами биоматериала.

Последовательное выделение фермента БХЭ из плазмы крови и дальнейшая MAX на FLa триптического гидролизата фермента позволяют детектировать потенциальные

ковалентные аддукты ФОС с серином активного центра БХЭ методом МАЛДИ-МС в диапазоне m/z 3000–3100. Информация о массе присоединенного ингибитора позволяет существенно снизить число возможных веществ, вызвавших отравление. Возможные структурные изомеры, имеющие одинаковый молекулярный вес, могут быть идентифицированы в режиме целевого химического анализа методом газовой хроматографии в сочетании с МС после реактивации из белковых аддуктов или анализом тирозиновых аддуктов белков плазмы крови, не обладающих свойствами спонтанного деалкилирования.

Таблица 2. Чувствительность MAX-МАЛДИ-МС-анализа пептических пептидов СА и триптических пептидов БХЭ, модифицированных PMPF

№	Пептид (m/z)	Соотношение PFMP / плазма, нг/мл	Объем нанесенного на сорбент образца, мкл	Соотношение сигнал / шум
СА				
1	VRY(PFMP)TKKVPQVST (1567,89)	10 : 1	1	5
2	VRY(PFMP)TKKVPQVST (1567,89)	1 : 1	5	4
БХЭ				
3	SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3006,54)	10 : 1	1	34
4	SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3090,56)	10 : 1	1	–
5	SVTLFGES(MPA)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3006,54)	1 : 1	1	14
6	SVTLFGES(PFMP)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR (3090,56)	1 : 1	1	–

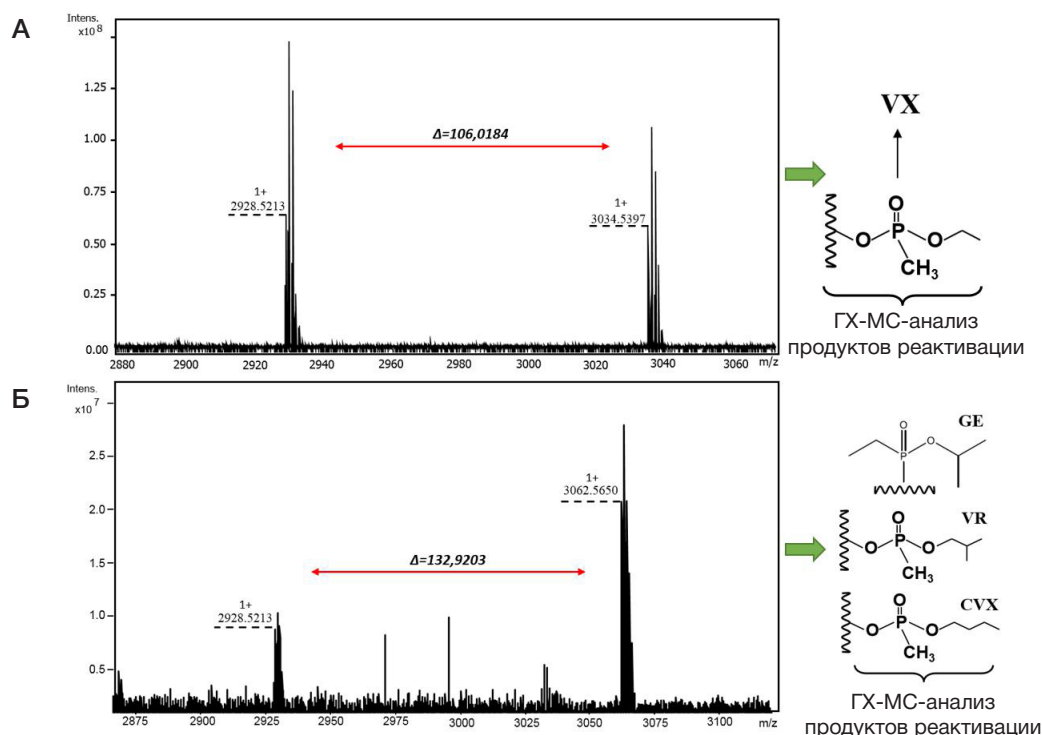


Рис. 5. Результаты МАХ-МАЛДИ-МС-анализа образцов 7-го профессионального теста ОЗХО по анализу биомедицинских проб. **А.** МАЛДИ-масс-спектр триптического гидролизата ВХЭ, модифицированной ВХ, сигнал с m/z 3034,5397 — SVTLFGES(Vx)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR. **Б.** МАЛДИ-масс-спектр триптического гидролизата ВХЭ, модифицированной GE, сигнал с m/z 3062,5650 — SVTLFGES(GE)AGAASVSLHLLSPGSHSLFTR

ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России является аккредитованной лабораторией ОЗХО, и разработанный подход позволяет проводить быстрый скрининг потенциально возможных токсикантов фосфорорганической природы в плазме крови при расследовании отравлений этим классом соединений.

ВЫВОДЫ

Разработана методика специфичной и селективной экстракции аддуктов белков крови с ФОС на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной мультимолекулярными структурами на основе стеарата

лантана, методом МАХ в формате «лаборатория на мишени». Показано, что сорбент способен удерживать как полноразмерные, так и деалкилированные аддукты белков крови с 2-(фторметилфосфорил)окси-3,3-диметилбутаном (PFMP). С помощью предложенной методики были экстрагированы и идентифицированы пептиды СА и ВХЭ, модифицированные остатком PFMP и МРА, после инкубации плазмы крови человека с ФОС в концентрации 1 и 10 нг/мл, что позволяет использовать этот подход для идентификации ФОС при реальных случаях интоксикации. Разработанная методика была использована при выполнении 7-го квалификационного теста ОЗХО.

Литература

- Mangas J, Estevez E, Vilanova TC, França C. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*. 2017; 376: 30–43.
- Конвенция о химическом оружии. Доступно по ссылке: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_ru.pdf.
- Schaller J, Gerber S, Kämpfer U, Lejon S, Trachsel Ch. Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function. John Wiley & Sons, Ltd., 2008; 538 p.
- Van der Schans MJ, Fidler A, van Oeveren D, Hulst AG, Noort D. Verification of exposure to cholinesterase inhibitors: generic detection of OPCW Schedule 1 nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase. *J Anal Toxicol*. 2008; 32: 125–9. DOI: 10.1093/jat/32.1.125.
- Dubrovskii Ya, Murashko E, Chuprina O, Beltyukov P, Radilov A, Solovyev N, et al. Mass spectrometry based proteomic approach for the screening of butyrylcholinesterase adduct formation with organophosphates. *Talanta*. 2019; 197: 374–82. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.059.
- Read RW, Riches JR, Stevens JA, Stubbs SJ, Black RM. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy. *Arch Toxicol*. 2010; 84: 25–36. DOI: 10.1007/s00204-009-0473-4.
- Liu C, Huang G, Xia Ha, Liu S, Liu J, Yu H, et al. Yuan. Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adducts and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procainamide-gel separation method combined with UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr*. 2016; 1036–7: 57–65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.044.
- Fu F, Guo Y, Lu X, Zhao P, Zou S, Wang H, et al. Forensic analysis of soman exposure using characteristic fragment ions from protein adducts. *Human & Experimental Toxicology*, 2021; 9603271211001111. DOI: 10.1177/09603271211001111.
- Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. Mass spectrometry, review of the basics: ionization, *Applied spectroscopy reviews*. 2015; 50: 158–75. DOI: 10.1080/05704928.2014.954046.
- Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical

- proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2018; 15: 683–96. DOI: 10.1080/14789450.2018.1505510.
11. Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai Sh, Yazaki Y, Suzuki T. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58: 883–96. DOI: 10.1515/cclm-2019-0868.
 12. Urban PL, Amantonico A, Zenobi R. Lab-on-a-plate: extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets. *Mass Spectrometry Reviews*. 2011; 30: 435–78. DOI: 10.1002/mas.20288.
 13. Ch-J Chen, Ch-Ch Lai, M-Ch Tseng, Yu-Ch Liu, Sh-Yi Line, Fuu-J Tsai. Simple fabrication of hydrophobic surface target for increased sensitivity and homogeneity in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptides, phosphopeptides, carbohydrates and proteins. *Analytica Chimica Acta*. 2013; 783: 31–38. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.029.
 14. Huang H, Sun L, He H, Xia T. A new silicon dioxide-coated MALDI-TOF sample plate for peptide analysis. *BioMed Research International*. 2020; 8597217: 1–6. DOI: 10.1155/2020/8597217.
 15. Gladilovich V, Greifenhagen U, Sukhodolov N, Selyutin A, Singer D, Thieme D, et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron (III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics. *J Chromatogr A*. 2016; 1443: 181–90. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044.
 16. Рожкова ЕА, Краснов ИА, Суходолов НГ, Иванов НС, Янкович АИ, Подольская ЕП, и др. Исследование поверхностных свойств наноструктур (пленок Лэнгмюра-Блоджетт), содержащих ионы железа, и определение их состава с привлечением методов масс-спектрометрии. *Научное приборостроение*. 2008; 18: 54–60.
 17. Miyauchi S, Arisawa S, Yamada T, Yamamoto H, Yamamoto R. Adhesion of fatty acid in Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*. 1989; 178: 347–50. DOI: 10.1016/0040-6090(89)90320-9.
 18. Shreyner E, Alexandrova M, Sukhodolov N, Selyutin A, Podolskaya E. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography. *Mendelev Commun*. 2017; 27: 304–6. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030.
 19. Silyavka ES, Selyutin AA, Sukhodolov NG, Shilovskikh VV, Oleneva PA, Mitrofanov AA, et al. Collapsed monomolecular thin films as surface nanomodification techniques for bioorganic MALDI analysis. *AIP Conf Proc*. 2019; 2064: 030015-1–030015-5. DOI: 10.1063/1.5087677.
 20. Gladchuk AS, Silyavka ES, Shilovskikh VV, Bocharov VN, Zorin IM, Tomilin NV, et al. Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment. *Thin Solid Films*. 2022; 756: 139374. DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374.
 21. Корягина Н. Л., Савельева Е. И., Каракашев Г. В., Бабаков В. Н., Дубровский Я. А., и др. Определение конъюгированных с белками метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови. *Журнал аналитической химии*. 2016; 71 (8): 883–93.
 22. Masson P, Nachon F, Lockridge O. Structural approach to the aging of phosphylated cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 187: 157–62. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.03.027.
 23. Jiang W, Murashko EA, Dubrovskii YA, Podolskaya EP, Babakov VN, Mikler J, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. *Anal Biochem*. 2013; 439: 132–41. DOI: 10.1016/j.ab.2013.04.018.
 24. Marsillach J, Costa LG, Furlong CE. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2013; 307: 46–54. DOI: 10.1016/j.tox.2012.12.007.
 25. Peebles ES, Schopfer LM, Duysen EG, Spaulding R, Voelker T, Thompson CM, et al. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*. 2005; 83: 303–12. DOI: 10.1093/toxsci/kfi023.
 26. Bao Y, Liu Q, Chen J, Lin Y, Wu B, Xie J. Quantification of nerve agent adducts with albumin in rat plasma using liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J of Chromatography A*. 2012; 1229: 164–71. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.01.032.
 27. John H, van der Schans MJ, Koller M, H. Spruit ET, Worek F, Thiermann H, et al. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic toxicology*. 2017; 36: 61–71. DOI: 10.1007/s11419-017-0376-7.
 28. Schopfer LM, Lockridge O. Analytical approaches for monitoring exposure to organophosphorus and carbamate agents through analysis of protein adducts. *Drug testing and analysis*. 2012; 4: 246–61. DOI: 10.1002/dta.1325.

References

1. Mangas J, Estevez E, Vilanova TC, França C. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*. 2017; 376: 30–43.
2. Конвенція о хімічному озброєнні. Доступно по ссылке: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/CWC/CWC_ru.pdf.
3. Schaller J, Gerber S, Kämpfer U, Lejon S, Trachsel Ch. Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function. John Wiley & Sons, Ltd., 2008; 538 p.
4. Van der Schans MJ, Fidler A, van Oeveren D, Hulst AG, Noort D. Verification of exposure to cholinesterase inhibitors: generic detection of OPCW Schedule 1 nerve agent adducts to human butyrylcholinesterase. *J Anal Toxicol*. 2008; 32: 125–9. DOI: 10.1093/jat/32.1.125.
5. Dubrovskii Ya, Murashko E, Chuprina O, Beltyukov P, Radilov A, Solov'yev N, et al. Mass spectrometry based proteomic approach for the screening of butyrylcholinesterase adduct formation with organophosphates. *Talanta*. 2019; 197: 374–82. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.059.
6. Read RW, Riches JR, Stevens JA, Stubbs SJ, Black RM. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy. *Arch Toxicol*. 2010; 84: 25–36. DOI: 10.1007/s00204-009-0473-4.
7. Liu C, Huang G, Xia Ha, Liu S, Liu J, Yu H, et al. Yuan. Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adducts and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procainamide-gel separation method combined with UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr*. 2016; 1036-7: 57–65. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.044.
8. Fu F, Guo Y, Lu X, Zhao P, Zou S, Wang H, et al. Forensic analysis of soman exposure using characteristic fragment ions from protein adducts. *Human & Experimental Toxicology*, 2021; 9603271211001111. DOI: 10.1177/09603271211001111.
9. Awad H, Khamis MM, El-Anead A. Mass spectrometry, review of the basics: ionization, Applied spectroscopy reviews. 2015; 50: 158–75. DOI: 10.1080/05704928.2014.954046.
10. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2018; 15: 683–96. DOI: 10.1080/14789450.2018.1505510.
11. Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai Sh, Yazaki Y, Suzuki T. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58: 883–96. DOI: 10.1515/cclm-2019-0868.
12. Urban PL, Amantonico A, Zenobi R. Lab-on-a-plate: extending the functionality of MALDI-MS and LDI-MS targets. *Mass Spectrometry Reviews*. 2011; 30: 435–78. DOI: 10.1002/mas.20288.
13. Ch-J Chen, Ch-Ch Lai, M-Ch Tseng, Yu-Ch Liu, Sh-Yi Line, Fuu-J Tsai. Simple fabrication of hydrophobic surface target for increased sensitivity and homogeneity in matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of peptides, phosphopeptides, carbohydrates and proteins. *Analytica Chimica Acta*. 2013; 783: 31–38. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.029.
14. Huang H, Sun L, He H, Xia T. A new silicon dioxide-coated MALDI-TOF sample plate for peptide analysis. *BioMed Research International*. 2020; 8597217: 1–6. DOI: 10.1155/2020/8597217.
 15. Gladilovich V, Greifenhagen U, Sukhodolov N, Selyutin A, Singer D, Thieme D, et al. Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron (III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics. *J Chromatogr A*. 2016; 1443: 181–90. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.03.044.
 16. Rozhkova EA, Krasnov IA, Sukhodolov NG, Ivanov NS, Yanklovich AI, Podolskaya EP, et al. Surface behavior of nanostructures (Langmuir-Blodgett Films), Containing Fe(III) ions and their composition determination mass-spectrometry methods. *Nauchnoe Priborostr*. 2008; 18: 54–60.
 17. Miyauchi S, Arisawa S, Yamada T, Yamamoto H, Yamamoto R. Adhesion of fatty acid in Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*. 1989; 178: 347–50. DOI: 10.1016/0040-6090(89)90320-9.
 18. Shreyner E, Alexandrova M, Sukhodolov N, Selyutin A, Podolskaya E. Extraction of the insecticide dieldrin from water and biological samples by metal affinity chromatography, *Mendeleev Commun*. 2017; 27: 304–6. DOI: 10.1016/j.mencom.2017.05.030.
 19. Silyavka ES, Selyutin AA, Sukhodolov NG, Shilovskikh VV, Oleneva PA, Mitrofanov AA, et al. Collapsed monomolecular thin films as surface nanomodification techniques for bioorganic MALDI analysis. *AIP Conf Proc*. 2019; 2064: 030015-1–030015-5. DOI: 10.1063/1.5087677.
 20. Gladchuk AS, Silyavka ES, Shilovskikh VV, Bocharov VN, Zorin IM, Tomilin NV, et al. Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment. *Thin Solid Films*. 2022; 756: 139374. DOI: 10.1016/j.tsf.2022.139374.
 21. Koryagina NL, Saveleva EI, Karakashev GV, Babakov VN, Dubrovskii YaA, et al. Determination of protein adducts of organophosphorus nerve agents in blood plasma. *J Anal Chem*. 2016; 71: 849–59. DOI: 10.1134/S1061934816080086.
 22. Masson P, Nachon F, Lockridge O. Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*. 2010; 187: 157–62. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.03.027.
 23. Jiang W, Murashko EA, Dubrovskii YA, Podolskaya EP, Babakov VN, Mikler J, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of titanium oxide-enriched peptides for detection of aged organophosphorus adducts on human butyrylcholinesterase. *Anal Biochem*. 2013; 439: 132–41. DOI: 10.1016/j.ab.2013.04.018.
 24. Marsillach J, Costa LG, Furlong CE. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2013; 307: 46–54. DOI: 10.1016/j.tox.2012.12.007.
 25. Peeples ES, Schopfer LM, Duysen EG, Spaulding R, Voelker T, Thompson CM, et al. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*. 2005; 83: 303–12. DOI: 10.1093/toxsci/kfi023.
 26. Bao Y, Liu Q, Chen J, Lin Y, Wu B, Xie J. Quantification of nerve agent adducts with albumin in rat plasma using liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry. *J of Chromatography A*. 2012; 1229: 164–71. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.01.032.
 27. John H, van der Schans MJ, Koller M, H. Spruit ET, Worek F, Thiermann H, et al. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic toxicology*. 2017; 36: 61–71. DOI: 10.1007/s11419-017-0376-7.
 28. Schopfer LM, Lockridge O. Analytical approaches for monitoring exposure to organophosphorus and carbamate agents through analysis of protein adducts. *Drug testing and analysis*. 2012; 4: 246–61. DOI: 10.1002/dta.1325.