

PŮVODNÍ ČLÁNEK / ORIGINAL ARTICLE

OPCW BIOMEDICAL PROFICIENCY TEST V LABORATOŘI ANALYTICKÉ CHEMIE KATEDRY TOXIKOLOGIE A VOJENSKÉ FARMACIE

OPCW BIOMEDICAL PROFICIENCY TEST IN THE LABORATORY OF ANALYTICAL CHEMISTRY AT THE DEPARTMENT OF TOXICOLOGY AND MILITARY PHARMACY

David Herman¹✉, Alžběta Dlabková¹, Nela Váňová^{1,2}, Lukáš Prchal^{1,3}, Marie Vajrychová^{1,3}, Rafael Doležal^{1,3}, Petr Bzonek¹, Daniel Jun¹

¹ Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 02, Hradec Králové, Česká republika

² Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

³ Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Česká republika

Přijato 24. dubna 2020.

Akceptováno 7. května 2020.

Zveřejněno 4. září 2020.

Souhrn

S ohledem na události posledních let není riziko vojenského či teroristického zneužití vysoce toxických látek včetně zakázaných bojových otravných látek zanedbatelné. Katedra toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany tudíž zavedla analytické metody a postupy úprav biologických vzorků (plasma, moč) pro stanovení identifikačních znaků (biomarkerů) vystavení nervově paralytickým látkám (sarinu, cyklosarinu, somanu, tabunu a V-látkám) a yperitu, čímž přináší do Armády České republiky schopnost potvrdit jejich zneužití vůči živé síle. Metody popsané v článku jsou založeny na průkazu metabolitů (O-alkyl methylfosfonových kyselin pro nervově paralytické látky a thiodiglykolu pro yperit) a produktů jejich reakcí s přítomnými biomolekulami (tyrosinových aduktů nervově paralytických látek a peptidových aduktů sirného yperitu) pomocí kapalinové a plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. Funkčnost těchto metod je ověřována a diskutována v rámci testu odborné způsobilosti pro biomedicínskou analýzu s mezinárodní účastí, který každoročně pořádá Organizace pro zákaz chemických zbraní. Katedra se těchto testů účastní od roku 2016, kdy se konal první ročník.

Klíčová slova: chemické bojové látky; yperit; OPCW; BioPT; biomarkery

✉ Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra toxikologie a vojenské farmacie, Třebešská 1575, 500 02, Hradec Králové, Česká republika

📧 david.herman@unob.cz

☎ +420 973 255 193

📠 +420 973 253 100

Summary

Taking into account the events of recent years, a risk of exposure to high toxic substances including chemical weapons is not negligible. Therefore the Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence introduced analytical and biological samples (plasma, urine) preparation methods for determination of biomarkers of exposure to nerve agent (sarin, cyclosarin, soman, tabun, VX and VR agent) and sulphur mustard. Evidence of chemical weapon use is based on detection of their metabolites (Alkyl methylphosphonic acids as metabolites of the organophosphorus nerve agents, thiodiglycol as a metabolite of sulphur mustard) and products of their reactions with biomolecules (tyrosine adducts of organophosphorus nerve agents, sulphur mustard-albumin adducts). Gas chromatography tandem mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry are used for determination of biomarkers. Functionality of described methods is validated and discussed participating in Biomedical proficiency test, which is organized by The Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons every year.

Key words: chemical warfare agent; sulphur mustard; OPCW; BioPT; biomarkers

Úvod

Laboratoř analytické chemie Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (KTVF FVZ UO) se poslední 4 roky účastní testů odborné způsobilosti pro biomedicínskou analýzu (*Biomedical Proficiency Test*, BioPT), jejichž cílem je prokázat schopnost laboratoře správně určit vzorky, které jsou pozitivní na použití zakázaných látek z Úmluvy o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a jejich zničení (dále jen Úmluva) a identifikovat použitou toxickou látku. Tyto testy jsou každoročně pořádány Organizací pro zákaz chemických zbraní (*The Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*, OPCW), jež vznikla na základě Úmluvy, a účastní se jich několik desítek laboratoří z členských států OPCW (29 laboratoří z 23 států v roce 2019). Podmínkou pro úspěšné splnění BioPT je spolehlivý a správný průkaz použití zakázané látky v definovaných vzorcích. Za jednoznačné potvrzení těchto sloučenin v předkládaném vzorku se považuje stanovení alespoň dvou odlišných identifikačních znaků (biomarkerů) expozice nebo jednoho znaku s využitím dvou různých analytických metod (1). Protože se převážně jedná o vysoce reaktivní sloučeniny, v organismu většinou nejsou přítomny v původním stavu. Proto se jako biomarkery využívají jejich metabolity nebo produkty jejich reakcí s biomolekulami (proteiny, DNA, erytrocyty, aj.) exponovaného organismu. V plasmě se nejčastěji jedná o adukty na přítomné proteiny, zatímco v moči se vyskytují jejich hydrofilní metabolity (2–4).

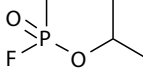
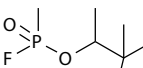
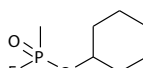
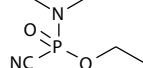
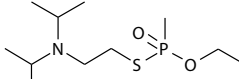
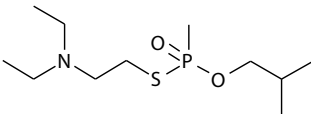
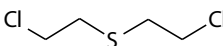
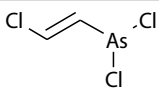
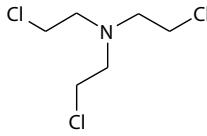
OPCW zajišťuje plnění ustanovení obsažených v Úmluvě, včetně mezinárodní kontroly jejího dodržování. Zároveň poskytuje odborné konzultace a zprostředkovává spolupráci mezi smluvními státy. Hlavním cílem Úmluvy je zamezit jakémukoliv použití chemických zbraní a likvidace současných světových zásob těchto látek (5). K tomuto cíli se zavázalo všech 193 států (pokrývá 98 % světové populace), které tuto Úmluvu dosud ratifikovaly (6,7). Přehled zakázaných sloučenin je uveden v příloze Úmluvy na Seznamech 1–3. Kde každý seznam je rozdělen na část A (toxické látky) a část B (prekurzory). Chemikálie s nejvyšší toxicitou, které byly použity nebo vyvíjeny jen jako chemické zbraně jsou uvedeny na Seznamu 1.A, viz tabulka 1. Doposud byly BioPT zaměřeny především na nervově paralytické látky (NPL) a yperity z důvodu vysokého rizika jejich zneužití.

Ačkoliv Úmluva v dubnu 2020 slaví už 23. výročí, události posledních let (2017 – látka VX na letišti v Kuala Lumpur (8), 2017 – sarin v Sýrii (9), 2018 – incident v Salisbury a Amesbury (10)) ukazují, že likvidace živé síly prostřednictvím vysoce toxických látek je stále používaným nástrojem k prosazení zájmu států nebo různých uskupení. S rostoucím počtem případů podezření na užití bojových otravných látek (BOL), narůstá také celkové množství vzorků, které musí inspektori OPCW odebírat z míst domnělého použití chemických zbraní. Zpracování vysokého počtu těchto vzorků naráží na kapacitu vlastních laboratoří OPCW, a proto byl zřízen institut tzv. určených laboratoří. Tyto laboratoře jsou základem ověřovacího režimu OPCW a její schopnosti vyšetřovat obvinění z používání chemických zbraní.

Jedná se o laboratoře v členských státech OPCW, které musí pro oblast biomedicínské analýzy splňovat několik podmínek:

- 1) zavedený systém jakosti v souladu s normami (ISO / IEC 17025: 2005 nebo rovnocenný),
- 2) platná akreditace akreditačním orgánem mezinárodně uznávaným pro analýzu chemických látek - ochranné prostředky a příbuzné sloučeniny v různých typech vzorků,
- 3) účast na BioPT nejméně jednou za kalendářní rok, kde musí získat dvakrát známku „A“ nebo jednou „A“ a jednou „B“ z posledních dvou po sobě jdoucích účastí (11,12).

Tabulka 1. Seznam 1. A Úmluvy – toxické látky (5)

Seznam Úmluvy	obecný název sloučeniny	příklady
1.A.1	O-alkyl($\leq C_{10}$ včetně O-cykloalkyl)-alkyl (methyl, ethyl, n-propyl nebo i-propyl)fosfonofluoridáty	 Sarin (GB)  Soman (GD)  Cyklosarin (GF)
1.A.2	O-alkyl($\leq C_{10}$ včetně O-cykloalkyl)-N,N-dialkyl (methyl, ethyl, n-propyl nebo i-propyl)fosforamidokyanidáty	 Tabun (GA)
1.A.3	O-alkyl(H nebo $\leq C_{10}$ včetně O-cykloalkyl)-S-[2-N,N-dialkyl (methyl, ethyl, n-propyl nebo i-propyl)aminoethyl]-alkyl (methyl, ethyl, n-propyl nebo i-propyl)fosfonothioáty a odpovídající alkylované nebo protonované soli	 Látka VX  Látka VR
1.A.4	Sírné yperity	 Yperit (HD)
1.A.5	Lewisity	 Lewisit 1
1.A.6	Dusíkaté yperity	 HN1
1.A.7	Saxitoxin	
1.A.8	Ricin	

BioPT navazuje na již dlouhodobě prováděné testy odborné způsobilosti (*Proficiency Test*, PT) zabývající se průkazem zakázaných chemikálií v environmentálních vzorcích. OPCW pomocí BioPT ověřuje způsobilost laboratoří v biomedicínské analýze. Získává tak určené laboratoře i v této oblasti, a to ji poskytuje schopnost zpracování velkého množství nejen environmentálních vzorků odebraných z prostředí, ale i vzorků od lidí či zvířat. Z výsledků analýz více druhů vzorků je dosaženo vyšší důvěryhodnosti z nich odvozených závěrů o zneužití zakázaných látek. Z důvodů použití závěrů analýz jako důkazů pro případné soudní jednání, je nutné splnit přísná pravidla provádění analýz, nakládání se vzorky a prezentace výsledků v závěrečné zprávě. Tato pravidla se na základě nových poznatků a zkušeností z jednotlivých testů neustále vyvíjejí. Průkaz zakázané látky ve vzorku je založen na srovnávacích analýzách neznámých vzorků se vzorky referenčních standardů. U jednotlivých analytů je posuzován retenční čas, poměr kvalitativních iontů nebo ploch pod pikem, které by měly být ve shodě s hodnotami z referenční analýzy.

V současné době má statut určené laboratoře v oblasti biomedicínské analýzy 17 laboratoří z 12 států (12). I když je Česká republika 48. státem (7), který Úmluvu ratifikoval, nemá na svém území žádnou takovou laboratoř. Statut určené laboratoře mají ve střední a východní Evropě pouze dvě laboratoře v Ruské federaci.

Hlavním cílem tohoto sdělení je prezentovat metodiky pro průkaz expozice BOL na živou sílu založené na stanovení biomarkerů pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS) a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS), které jsou zavedené v analytické laboratoři KTVF FVZ UO, a naše dosud dosažené výsledky při jejich použití v rámci řešení BioPT.

Materiál a metodika

Chemikálie

Aceton, acetonitril, methanol, kyselina mravenčí, octan amonný (vše čistota pro LC-MS), pentafluorobenzyl bromid, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid, diisopropylamin, hydrogenuhličitan amonný ((NH₄)HCO₃), enzymy pronáza a proteináza K byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Voda pro LC-MS byla připravena zařízením na bázi reverzní osmózy Aqua Osmotic typ 06 (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika). Nervově paralytické látky byly syntetizovány ve Vojenském výzkumném ústavu v Brně o čistotě 90–95 % (stanovena GC-MS analýzou). Smíř yperit byl získán z vojenské laboratoře v Zemianských Kostoľanech (Slovensko) o čistotě 95 % (stanovena GC-MS analýzou).

Biomarkery v moči

Stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin – biomarkery expozice NPL

Příprava vzorků

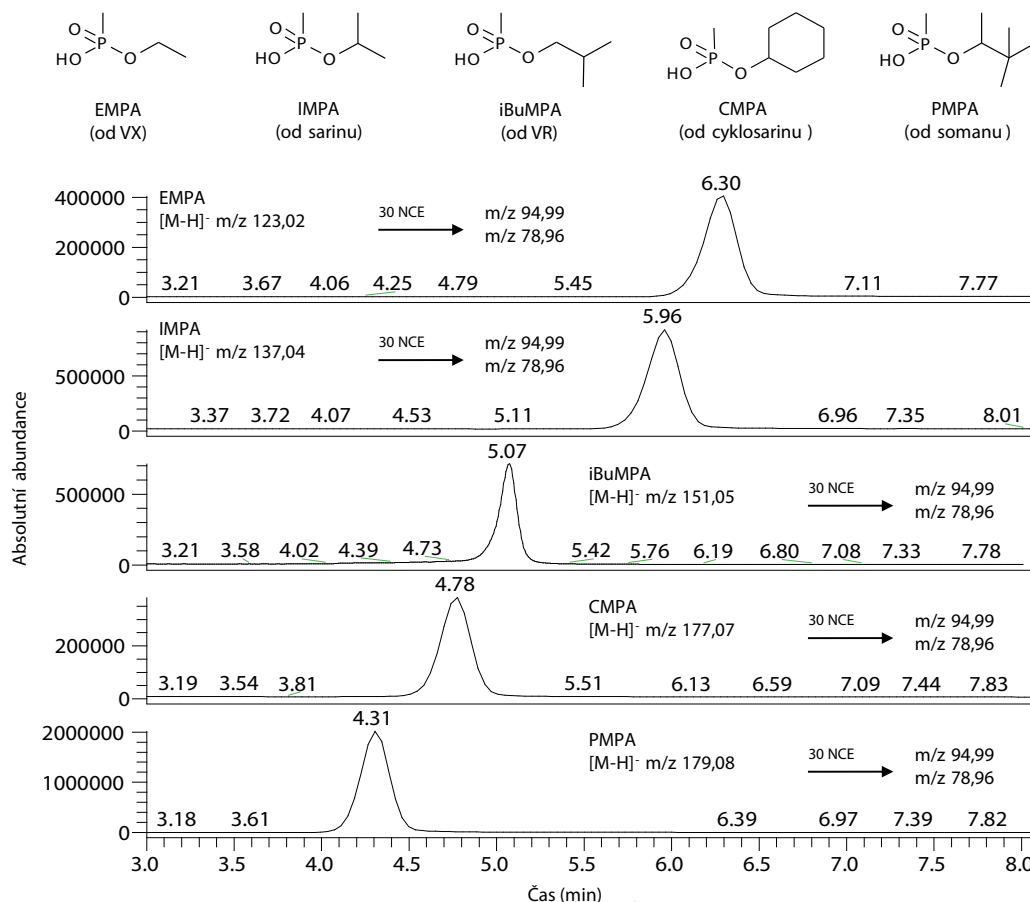
Postup přípravy vzorků vznikl kombinací a úpravou metod dle Riches a kol. (13) a Swaim a kol. (14). Po přidání 2500 µl acetonitrilu ke 250 µl moči byla směs nanášena na SPE kolonku Strata Si-1 (200 mg, 3 ml), která byla kondicionována 3 ml 75% acetonitrilu a 3 ml 100% acetonitrilu. Po propláchnutí kolonky 1 ml acetonitrilu a 1 ml 90% acetonitrilu byl analyt eluován 2 × 1 ml 75% acetonitrilu. Eluáty se po spojení odpařily pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Následně byl odparek rekonstituován v 250 µl čistého acetonitrilu a volné methylfosfonové kyseliny (MPA) byly stanoveny metodou LC-MS. Pro GC-MS analýzu bylo nutné MPA nejprve derivatizovat. Pro derivatizaci se odparek smísil s 200 µl acetonu, 20 µl diisopropylaminu a 20 µl pentafluorobenzyl bromidu. Takto připravený vzorek byl zahříván v suché lázni (70 °C, 4 h) a odpařen do sucha pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Pro stanovení pomocí GC-MS metody byl odparek rozpuštěn v 50 µl 100% acetonitrilu.

LC-MS metoda

Separace analytů byla provedena na LC-MS sestavě Thermo Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Thermo Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Pro analýzu byla použita chromatografická kolona Kinetex HILIC (2,6 µm; 150 mm × 2,1 mm) s předkolonou SecurityGuard ULTRA HILIC

(Phenomenex, Torrance, CA, USA). Stanovení probíhalo za použití isokratické eluce a průtoku $500 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok octanu amonného o koncentraci $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a acetonitril v poměru 14:86 (v/v). Analýza probíhala při teplotě kolony 40°C po dobu 5 min. Pro stanovení bylo použito $10 \mu\text{l}$ připraveného vzorku.

Hmotnostně spektrometrická detekce probíhala v negativním módu a při následujícím nastavení elektrospreje: vložené napětí $3,0 \text{ kV}$; teplota kapiláry 275°C ; průtok sušícího plynu 15 arbitrárních jednotek a průtok zmlžujícího plynu 5 arbitrárních jednotek. Měření probíhalo v módu sledování vybraných reakcí, kde hodnoty m/z prekurzorových a produktových iontů a kolizní energie (*normalized collision energy*, NCE) byly získány analýzou standardů. Struktura biomarkerů a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody jsou zobrazeny na obrázku 1.

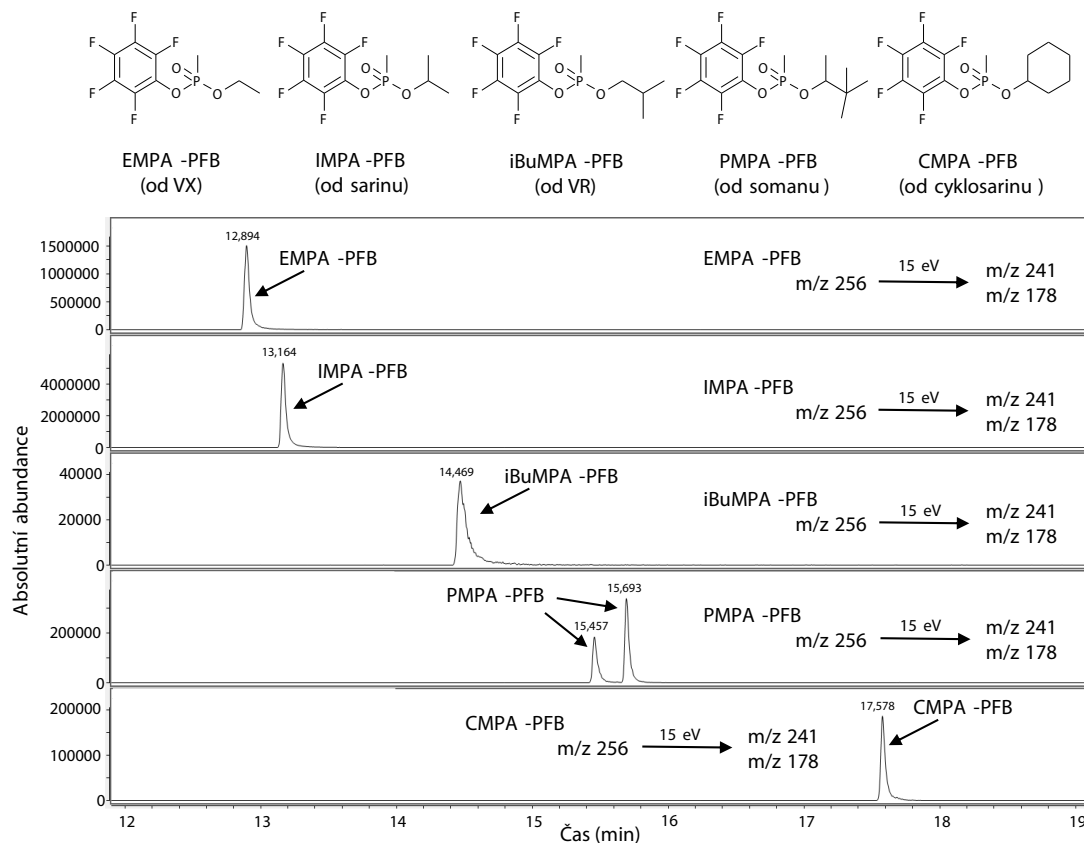


Obrázek 1. Struktura O-alkyl methylfosfonových kyselin a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody při LC-MS analýze

GC-MS metoda

Analýza derivatizovaných MPA probíhala na sestavě Agilent 7000D GC/QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) osazené kolonou HP-5ms Ultra Inert (30 m; $0,25 \text{ mm}$; $0,25 \mu\text{m}$, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Teplota inletu byla 250°C . Objem nástriku byl $1 \mu\text{l}$ a proběhl v módu splitless (bez dělení objemu nástriku). Teplotní program vyhřívání pece začínal na 60°C . Tato teplota byla držena 2 min a poté lineárně zvyšována rychlostí $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na teplotu 250°C . Pak následovalo zvýšení teploty rychlostí $30^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na 280°C , a tato teplota byla konstantní po dobu 5 min. Průtok nosného plynu helia činil $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, přičemž analýza trvala 27 min. Měření probíhalo v módu sledování vybraných reakcí, kde hodnoty m/z prekurzorových a produktových iontů a NCE byly získány analýzou standardů. Struktura derivátů a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody jsou zobrazeny na obrázku 2.

Obě metody byly zavedeny pro stanovení O-ethyl methylfosfonové kyseliny (EMPA), O-isopropyl methylfosfonové kyseliny (IMPA), O-isobutyl methylfosfonové kyseliny (iBuMPA), O-cyklohexyl methylfosfonové kyseliny (CMPA) a O-pinakolyl methylfosfonové kyseliny (PMPA).



Obrázek 2. Struktura derivátů O-alkyl methylfosfonových kyselin a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody při GC-MS analýze.

Stanovení thiodiglykolu – biomarker expozice yperitu

Příprava vzorků LC-MS

Vzorek moči byl naředěn vodou v poměru 1:1 a poté analyzován pomocí LC-MS metody.

LC-MS metoda

Stanovení thiodiglykolu bylo provedeno na LC-MS sestavě Thermo Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Thermo Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Pro separaci byla použita chromatografická kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5 μ m; 150 mm \times 2,1 mm) s předkolonou XDB-C18 (5 μ m; 2,1 mm \times 12,5 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Stanovení probíhalo za použití gradientové eluce a průtoku 250 μ l.min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 5 mmol.l⁻¹ v 1% methanolu ve vodě a roztoku mravenčanu amonného o koncentraci 5 mmol.l⁻¹ v 95% methanolu ve vodě. Průběh gradientu je zobrazen v tabulce 2. Separace probíhala při teplotě kolony 40 °C po dobu 13 min. Na stanovení bylo použito 10 μ l připraveného vzorku.

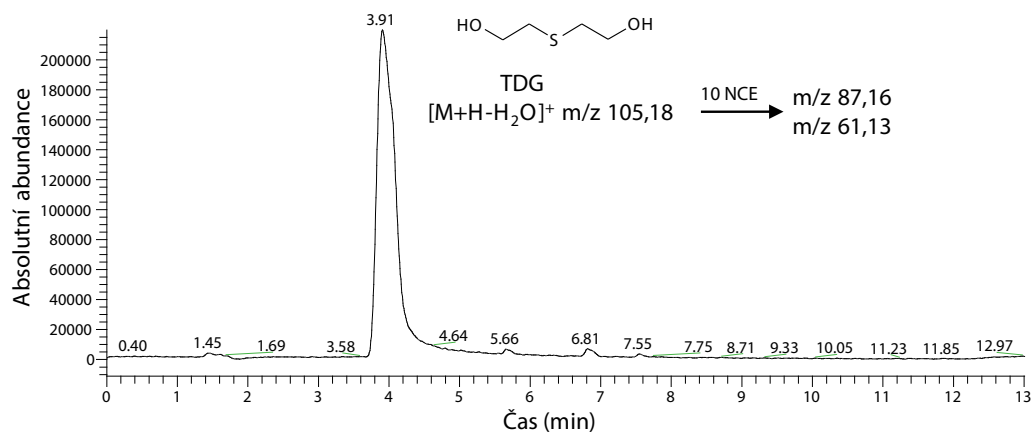
Hmotnostně spektrometrická detekce probíhala v pozitivním módu při následujícím nastavení elektrospreje: vložené napětí 3,5 kV; teplota kapiláry 275 °C; průtok sušícího plynu 15 arbitrárních jednotek a průtok zmlžujícího

plynu 5 arbitrárních jednotek. Měření probíhalo v módu sledování vybrané reakce, kde hodnoty m/z prekurzorového a produktových iontů a NCE byly získány analýzou standardu. Struktura thiodiglykolu a vzorový extrahovaný chromatogram pro sledovaný přechod je zobrazen na obrázku 3.

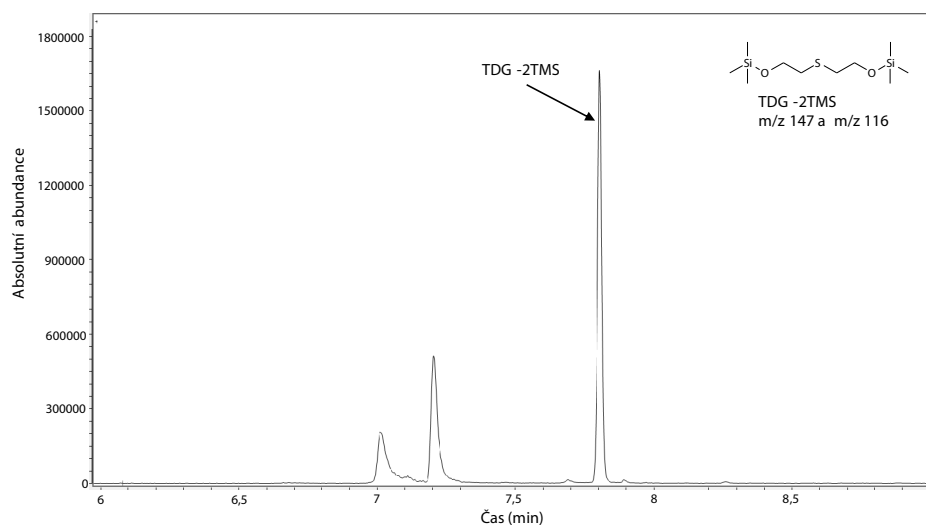
Tabulka 2. Průběh gradientu při LC-MS stanovení thiodiglykolu.

čas (min)	5 mmol.l ⁻¹ AF v MeOH/H ₂ O (1/99, v/v) (%)	5 mmol.l ⁻¹ AF v MeOH/H ₂ O (95/5, v/v) (%)
0	100	0
1	100	0
9	20	80
10	20	80
10,1	100	0
13	100	0

AF – mravenčan amonný, MeOH – methanol, H₂O – voda



Obrázek 3. Struktura thiodiglykolu a vzorový extrahovaný chromatogram ze stanovení LC-MS.



Obrázek 4. Struktura trimethylsilyl derivátu thiodiglykolu a vzorový extrahovaný chromatogram ze stanovení GC-MS

Příprava vzorků GC-MS

Vzorek moči o objemu 1 ml byl odpařen do sucha pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Residua byla rozpuštěna v 300 µl 100% acetonitrilu. Pro následnou derivatizaci se přidalo 10 µl N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu a směs se zahřívala při 50 °C po dobu 50 min. Poté byl vzorek analyzován pomocí GC-MS metody.

GC-MS metoda

Stanovení thiodiglykolu probíhalo na sestavě Agilent 7000D GC/QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) osazené kolonou HP-5ms Ultra Inert (30 m; 0,25 mm; 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Teplota inletu byla 250 °C. Nástřik o objemu 1 µl proběhl v módu splitless (bez dělení objemu nástřiku). Teplotní program vyhřívání pece začínal na 55 °C. Tato teplota byla držena 1 min a poté byla lineárně zvyšována rychlostí 20 °C.min⁻¹ na teplotu 280 °C. Ta byla konstantní po dobu 1,75 min. Průtok nosného plynu helia byl 1 ml.min⁻¹ a analýza trvala 14 min. Detekce analytu probíhala v módu sledování vybraných iontů, kde hodnota *m/z* vybraného iontu byla získána analýzou standardu. Struktura derivátu a vzorový extrahovaný chromatogram jsou zobrazeny na obrázku 4.

Biomarkery v plasmě

Stanovení tyrosinových aduktů NPL – biomarkery expozice NPL

Příprava vzorků

Postup přípravy vzorků pro stanovení tyrosinových aduktů NPL vznikl modifikací metod dle Crow a kol. (15) a Vanninen (16). Plasmatické proteiny byly precipitovány přidáním 1500 µl acetonu k 500 µl plasmy za vzniku pelety po odstředění (5000 × g, 5 min, 20 °C). Suchá peleta byla rozpuštěna v 1400 µl roztoku (NH₄)HCO₃ (c = 50 mmol.l⁻¹) a po přidání 500 µl roztoku pronázy (c = 15 mg.ml⁻¹, v (NH₄)HCO₃ o koncentraci 50 mmol.l⁻¹) probíhalo enzymatické štěpení při 37 °C po dobu 14 h. Získané peptidy byly přečištěny na reverzní fázi Strata C18-E (100 mg, 3 ml), která byla kondicionována 3 ml acetonitrilu a 3 ml vody. Po propláchnutí 3 ml vody byl analyt eluován 3 ml acetonitrilu. Po odpaření pod proudem dusíku při teplotě 50 °C byl vzorek pro LC-MS stanovení rekonstituován v 500 µl 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě.

LC-MS metoda

Analýza vzorků probíhala na LC-MS sestavě Thermo Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Thermo Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Na separaci analytů byla použita chromatografická kolona Kinetex C18 (1,7 µm; 50 mm × 2,1 mm) s předkolonou SecurityGuard ULTRA C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Stanovení probíhalo při gradientové eluci a průtoku mobilní fáze 300 µl.min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě a 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Průběh gradientu je uveden v tabulce 3. Separace probíhala při teplotě kolony 30 °C po dobu 15 min. Na stanovení bylo použito 10 µl připraveného vzorku.

Hmotnostně spektrometrická detekce probíhala v pozitivním módu při následujícím nastavení elektrospreje: vložené napětí 3,5 kV; teplota kapiláry 275 °C; průtok sušícího plynu 20 arbitrárních jednotek a průtok zmlžujícího plynu 10 arbitrárních jednotek. Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných reakcí, kde hodnoty *m/z* prekurzorových a produktových iontů a NCE byly získány analýzou standardů. Struktura aduktů a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody jsou zobrazeny na obrázku 5. Metoda byla zavedena pro adukty tyrosinu od látky VX, sarinu, tabunu, látky VR, cyklosarinu a somanu.

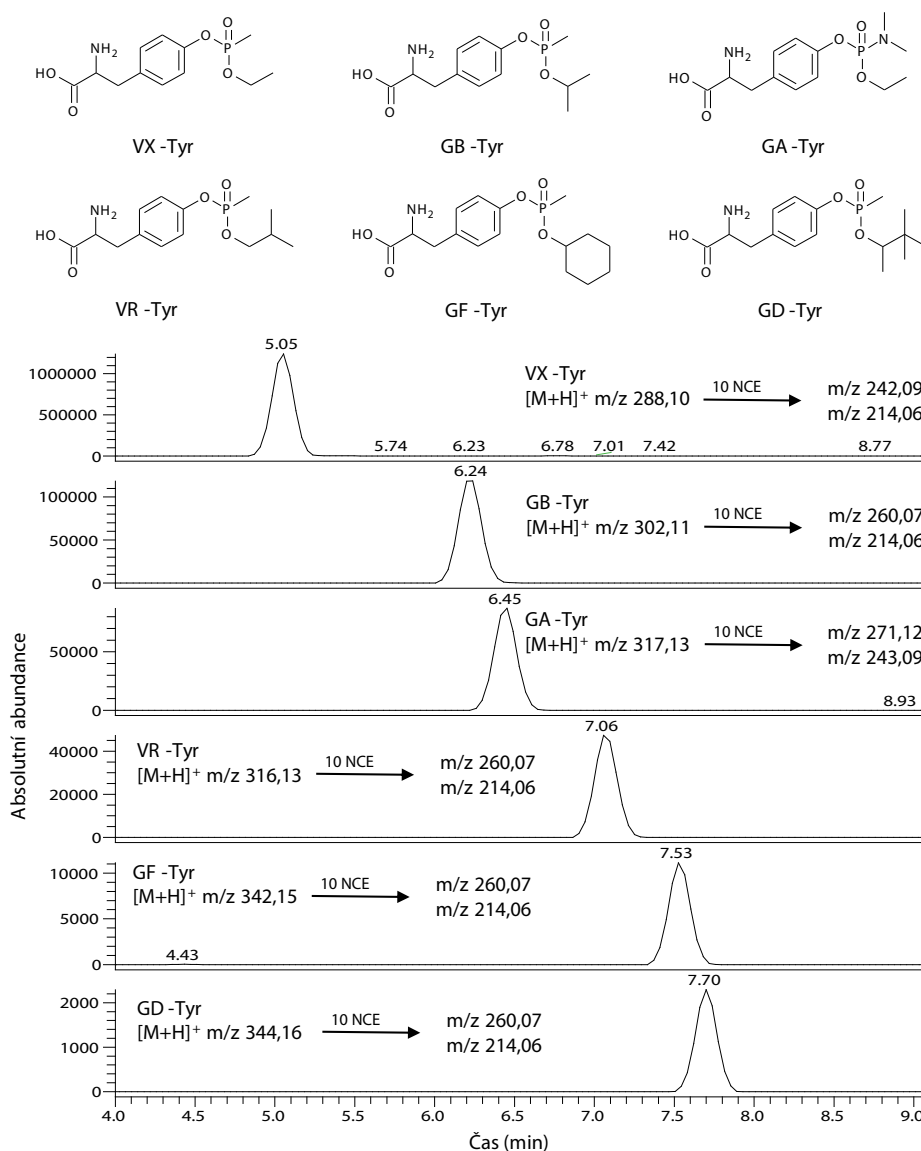
Stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin – biomarkery expozice NPL

Příprava vzorků

Do 2000 µl plasmy se přidalo 50 µl roztoku reaktivátoru acetylcholinesterázy HI-6 (c = 10 mg.ml⁻¹) a směs byla zahřívána v suché lázni (37 °C, 20 min). Plasmatické proteiny byly odstraněny precipitací přidáním 20 ml acetonitrilu.

Tabulka 3. Průběh gradientu při LC-MS stanovení tyrosinových aduktů NPL.

čas (min)	0,1% FA v H ₂ O (%)	0,1% FA v ACN (%)
0	95	5
1,5	95	5
3	80	20
4	80	20
6	0	100
8	0	100
9	95	5
15	95	5

FA – kyselina mravenčí, ACN – acetonitril, H₂O – voda

Obrázek 5. Struktura aduktů BOL na tyrosin a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody při LC-MS analýze.

Po odstředění (20 °C, 5 min, 5000 × g) byl supernatant nanesen na SPE kolonku Strata Si-1 (200 mg, 3 ml), která byla kondicionována 3 ml 75% acetonitrilu a 3 ml 100% acetonitrilu. Po propláchnutí kolonky 1 ml acetonitrilu a 1 ml 90% acetonitrilu byl analyt eluován 2 × 1 ml 75% acetonitrilem. Eluáty byly po spojení odpařeny pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Odparek byl rekonstituován ve 100 µl 100% acetonitrilu. Poté byl vzorek analyzován LC-MS metodou, viz biomarkery v moči.

Metoda byla zavedena pro stanovení EMPA jako biomarkeru použití látky VX, IMPA od sarinu, iBuMPA od látky VR, CMPA od cyklosarinu a PMPA od somanu.

Stanovení aduktů sirného yperitu – biomarkery expozice yperitu

Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny modifikovanou metodou dle Pantazides a kol. (17). Plasmatické proteiny byly precipitovány přidáním 300 µl acetonu do 50 µl plasmy. Po odstředění (20 °C, 5 min, 5000 × g) byl supernatant odstraněn a proteinová peleta sušena volně na vzduchu po dobu 10 min. K proteinové peletě bylo přidáno 50 µl roztoku 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě, 400 µl roztoku (NH₄)HCO₃ (c = 50 mmol.l⁻¹) a pro stanovení tripeptidového aduktu [S-HETE]-Cys-Pro-Phe 100 µl roztoku proteinázy K (c = 10 mg.ml⁻¹, v (NH₄)HCO₃ o koncentraci 50 mmol.l⁻¹) nebo pro stanovení dipeptidového aduktu [S-HETE]-Cys-Pro 100 µl pronázy (c = 10 mg.ml⁻¹, v (NH₄)HCO₃ o koncentraci 50 mmol.l⁻¹). Štěpení probíhalo za stálého míchání při 50 °C po dobu 90 min. Po enzymatickém štěpení byla směs nanesená na SPE kolonku Oasis HLB (30 mg, 1 ml), která byla kondicionována 1 ml methanolu a 1 ml vody. Po propláchnutí 1 ml 20% methanolu ve vodě byl analyt eluován 0,5 ml čistého acetonitrilu. Po odpaření pod proudem dusíku při teplotě 50 °C se odparek rekonstituoval v 50 µl 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě. Poté byl vzorek analyzován LC-MS metodou.

LC-MS metoda

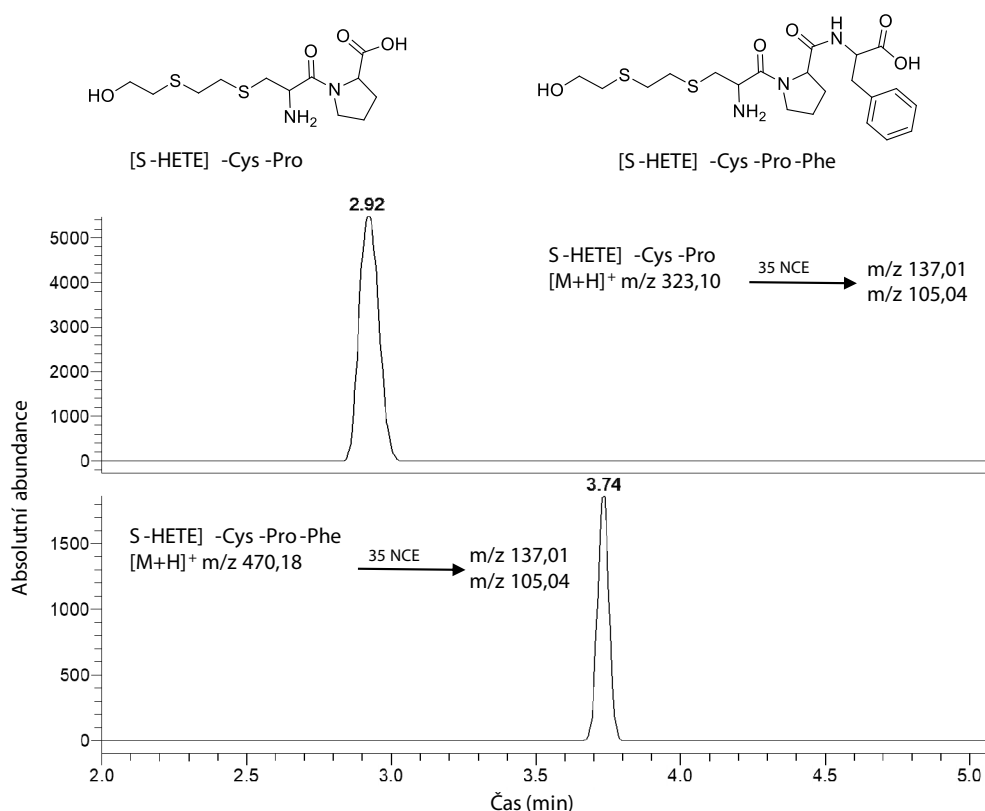
Analýza vzorků probíhala na LC-MS sestavě Thermo Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Thermo Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Na separaci analytů byla použita chromatografická kolona Kinetex C18 (2,6 µm; 150 mm × 2,1 mm) s předkolonou SecurityGuard ULTRA C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Stanovení probíhalo za použití gradientové eluce a průtoku 350 µl.min⁻¹. Mobilní fáze byla složena z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě a 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Průběh gradientu je uveden v tabulce 4. Separace probíhala při teplotě kolony 50 °C po dobu 11,5 min. Pro stanovení bylo využito 25 µl připraveného vzorku.

Tabulka 4. Průběh gradientu při LC-MS stanovení aduktů sirného yperitu.

čas (min)	0,1% FA v H ₂ O (%)	0,1% FA v ACN (%)
0	98	2
0,5	98	2
6,5	0	100
8,5	0	100
8,6	98	2
11,5	98	2

FA – kyselina mravenčí, ACN – acetonitril, H₂O – voda

Hmotnostně spektrometrická detekce probíhala v pozitivním módu při následujícím nastavení elektrospreje: vložené napětí 3,5 kV; teplota kapiláry 275 °C; průtok sušícího plynu 20 arbitrárních jednotek a průtok zmlžujícího plynu 10 arbitrárních jednotek. Analyty byly měřeny v módu sledování vybraných reakcí, kde hodnoty *m/z* prekurzorových a produktových iontů a NCE byly získány analýzou standardů. Struktura aduktů a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody jsou zobrazeny na obrázku 6.



Obrázek 6. Struktura aduktů yperitu a vzorové extrahované chromatogramy pro sledované přechody při LC-MS analýze.

Výsledky a diskuze

Hmotní spektrometrie spojená s kapalinovou a plynovou chromatografií patří k efektivním a vysoce citlivým analytickým metodám. Z tohoto důvodu byly využity v rámci BioPT. Zasláné vzorky bylo nutné zanalyzovat a vyhotovit závěrečnou zprávu do 14 dnů od jejich obdržení. Výsledné hodnocení se odvíjí od počtu správně identifikovaných vzorků, viz tabulka 5.

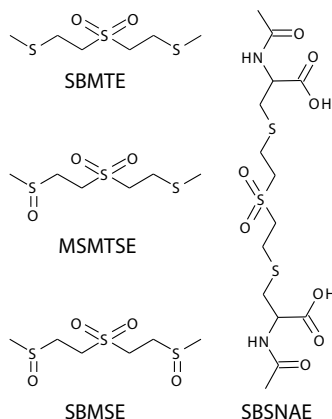
Tabulka 5. Podmínky výsledného hodnocení laboratoří (1).

podmínky	hodnocení
Všechny vzorky jsou správně identifikované	A
Správně identifikované jsou kromě jednoho všechny vzorky	B
Správně identifikovaná je alespoň polovina vzorků	C
Správně identifikována je méně než polovina vzorků	D
Reportování falešně pozitivního vzorku, falšování výsledků nebo neodevzdání závěrečné zprávy do konce časového limitu 14 dnů	F

1. ročník BioPT (2016)

Tento ročník byl zaměřen na sirný yperit (skupina 1.A.4 Seznamu 1 Úmluvy, viz tabulka 1) a jeho metabolity. V obdržení vzorcích pro první BioPT byly 3 vzorky plasmy a 3 vzorky moči, každý o objemu přibližně 5 ml. Jeden vzorek plasmy byl vyhodnocen jako slepý vzorek a ve zbylých dvou byly stanoveny tripeptid [S-HETE]-Cys-Pro-Phe i dipeptid [S-HETE]-Cys-Pro pomocí metody na stanovení aduktů sirného yperitu (viz Stanovení

aduktů sirného yperitu), čímž bylo u těchto vzorků prokázáno použití yperitu. V jednom vzorku moči byl stanoven thiodiglykol ovšem jen pomocí metody LC-MS. Metoda pro GC-MS nebyla v době konání prvního ročníku BioPT ještě zavedena. Stanovení látky pouze jednou metodou je pro účely BioPT nedostatečné, proto nebyl vzorek započítán jako správně určený. Pro další metabolity, vznikající působením β -lyázy (1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethan] – SBMTE, 1-methylsulfinyl-2-[2-(methylthio)ethylsulfonyl]ethan – MSMTESE, 1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethan] – SBMSE, 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethan] – SBSNAE, jejich struktura je zobrazena na obrázku 7), které se vyskytují v moči (18), nebyl na KTVF FVZ UO zavedený postup pro stanovení kvůli absenci referenčních standardů. Z toho důvodu nebylo možné přítomnost těchto metabolitů potvrdit v obdržených vzorcích moči.



Obrázek 7. Struktura hydrofilních metabolitů yperitu vznikajících působením β -lyázy.

Standardy těchto metabolitů je možné připravit víceřadovou syntézou. Nejdříve je potřeba yperit oxidovat vařením s peroxidem vodíku. Následnou reakcí s methanthiolem vzniká SBMTE. To se poté oxiduje jodistanem sodným na MSMTESE nebo peroxidem vodíku za vzniku SBMSE (19). SBSNAE se dá připravit oxidací yperitu a následnou reakcí s triethylaminem a N-acetylcysteinem (20). Tyto metabolity se dají stanovit pomocí LC-MS (18,21) nebo GC-MS (22,23).

Přehled chemikálií a jejich koncentrace v jednotlivých vzorcích prvního ročníku BioPT jsou zobrazeny v tabulce 6. Získané hodnocení laboratoře analytické chemie KTVF FVZ UO za dva správně určené vzorky bylo „D“ (24).

Tabulka 6. Seznam vzorků a přidávaných chemikálií v prvním ročníku BioPT.

označení vzorku	matrice	přidaná chemikálie	koncentrace ng.ml ⁻¹	správná identifikace
U111/20	moč	Thiodiglykol (TDG)	100	pouze jednou metodou
U112/20	moč	1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethan] (SBMSE)	40	NE
U113/20	moč	1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethan] (SBMSE)	50	NE
P114/20	plasma	Bis(2-chloroethyl)sulfid (HD)	40	ANO
P115/20	plasma	-	-	-
P116/20	plasma	Bis(2-chloroethyl)sulfid (HD)	50	ANO

2. ročník BioPT (2017)

Tento ročník BioPT se věnoval NPL a jejich metabolitům. Celkový počet zaslaných vzorků byl 6 a opět se jednalo o 3 vzorky plasmy a 3 vzorky moči, každý o objemu přibližně 5 ml. Pro běžnější látky ze skupiny 1.A.1 ze Seznamu 1 Úmluvy (viz tabulka 1) a produkty jejich hydrolýzy byly již v laboratoři analytické chemie KTVF

FVZ UO zavedené analytické metody. A proto byly ve dvou vzorcích plasmy stanoveny tyrosinové adukty sarinu metodou LC-MS (viz Stanovení aduktů tyrosinu NPL) a IMPA jako produkt hydrolýzy sarinu metodou LC-MS (viz Stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin). Jeden vzorek plasmy byl vyhodnocen jako slepý vzorek. Ve všech třech vzorcích moči byla nalezena IMPA, která byla stanovena metodami LC-MS a po derivatizaci GC-MS na stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin. Chemikálie přidané do matric a jejich výsledná koncentrace je zobrazena v tabulce 7. Za správné určení všech vzorků tak laboratoř analytické chemie KTVF FVZ UO byla hodnocena nejvyšší možnou známkou „A“ (25).

Tabulka 7. Seznam vzorků a přidaných chemikálií v druhém ročníku BioPT.

označení vzorku	matrice	přidaná chemikálie	koncentrace ng.ml ⁻¹	správná identifikace
P211/21	plasma	-	-	-
P212/21	plasma	O-isopropylmethylfluorofosfonát (GB)	100	ANO
P213/21	plasma	O-isopropylmethylfluorofosfonát (GB)	50	ANO
U214/21	moč	O-isopropyl methylfosfonová kyselina (IMPA)	15	ANO
U215/21	moč	O-isopropyl methylfosfonová kyselina (IMPA)	50	ANO
U216/21	moč	O-isopropyl methylfosfonová kyselina (IMPA)	30	ANO

3. ročník BioPT (2018)

V tomto ročníku BioPT bylo zasláno 6 vzorků plasmy a opět se týkal identifikací vzorků po použití NPL, tentokrát látkou ze skupiny 1.A.2 ze Seznamu 1 Úmluvy (viz tabulka 1). Pro tuto skupinu látek v době konání testu ještě nebyly v naší laboratoři zavedeny analytické metody na jejich stanovení, proto ve vzorcích nebylo možné potvrdit přítomnost tabunu.

V současné době je již zavedena LC-MS metoda na stanovení aduktu tabunu na tyrosin (viz Stanovení aduktů tyrosinu). Druhá metoda týkající se prokázání tabunu v plasmě by mohla být založena na fluoridové reaktivaci a stanovení fluorovaného derivátu tabunu pomocí GC-MS analýzy (26,27). Tuto metodu lze použít i pro ostatní NPL. Další možností prokázání tabunu a jiných organofosfátů je rozštěpit izolovanou butyrylcholinesterázu pepsinem a následně stanovit nonapeptid s navázaným organofosfátem (28,29).

Koncentrace tabunu ve vzorcích třetího ročníku BioPT je uvedena v tabulce 8. Laboratoř byla hodnocena známkou „D“ z důvodů minutí všech analytů (30).

Tabulka 8. Seznam vzorků a přidaných chemikálií ve třetím ročníku BioPT.

označení vzorku	matrice	přidaná chemikálie	koncentrace ng.ml ⁻¹	správná identifikace
P301/06	plasma	-	-	-
P302/06	plasma	O-ethylamidokyanofosfát (GA)	10	NE
P303/06	plasma	O-ethylamidokyanofosfát (GA)	20	NE
P304/06	plasma	O-ethylamidokyanofosfát (GA)	40	NE
P305/06	plasma	O-ethylamidokyanofosfát (GA)	60	NE
P306/06	plasma	-	-	-

4. ročník BioPT (2019)

V tomto ročníku se dále rozvíjela problematika identifikace vzorků po použití NPL. Došlo k navýšení celkového počtu zaslaných vzorků na 7. Jednalo se o 4 vzorky plasmy a 3 vzorky moči. V jednom vzorku plasmy byla metodou

LC-MS pro stanovení aduktů tyrosinu určena přítomnost aduktu sarinu na tyrosin a pomocí metody LC-MS pro stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin byl odhalen produkt hydrolyzy sarinu IMPA. S použitím stejných metod byla ve dvou vzorcích plasmy odhalena přítomnost aduktu cyklosarinu na tyrosin a produktu hydrolyzy cyklosarinu CMPA. Jeden vzorek plasmy a jeden moči byly vyhodnoceny jako vzorky slepé. Metodami LC-MS a po derivatizaci GC-MS na stanovení O-alkyl methylfosfonových kyselin byla v jednom vzorku moči stanovena CMPA a v jednom IMPA. Ovšem u vzorku obsahujícím IMPA z důvodu neodpovídajících poměrů ploch pod píkem mezi standardem a vzorkem stanovených pomocí metody LC-MS pro O-alkyl methylfosfonové kyseliny nebyla analýza uznána a vzorek nebyl hodnocen jako správně určený. Proto bylo hodnocení získané za správnou identifikaci u čtyř vzorků „B“ (31). Seznam přidávaných chemikálií do matric a jejich koncentrace je zobrazena v tabulce 9.

Tabulka 9. Seznam vzorků a přidávaných chemikálií ve čtvrtém ročníku BioPT.

označení vzorku	matrice	přidaná chemikálie	koncentrace ng.ml ⁻¹	správná identifikace
P451/03	plasma	O-cyklohexylmethylfluorofosfonát (GF)	8	ANO
P452/03	plasma	O-isopropylmethylfluorofosfonát (GB)	20	ANO
P453/03	plasma	-	-	-
P454/03	plasma	O-cyklohexylmethylfluorofosfonát (GF)	5	ANO
U455/03	moč	O-isopropyl methylfosfonová kyselina (IMPA)	20	pouze jednou metodou
U456/03	moč	-	-	-
U457/03	moč	O-cyklohexyl methylfosfonová kyselina (CMPA)	5	ANO

Závěr

Analytická laboratoř KTVF FVZ UO byla úspěšná ve dvou ze čtyř ročníků BioPT, jichž se zúčastnila. Jako jedna z největších překážek při plnění zadání testů se ukázala absence referenčních standardů biomarkerů. Bez příslušných standardů nebylo možné ustavit podmínky pro separaci a MS analýzu daných analytů a zároveň nebylo možné prokázat látky ve vzorcích na základě porovnání se standardy. Přestože některé biomarkery lze jednoduše připravit reakcí příslušné BOL s matricí (adukty NPL na tyrosin, adukty yperitu na albumin, produkty hydrolyzy), umělé příprava produktů různých metabolických pochodů (produkty štěpení yperitu β-lyázou) je složitější (19,20). Navíc se standardy připravených reakcí BOL s matricí je možné prokázat pouze přítomnost daných biomarkerů, nikoli stanovit jejich absolutní množství. Postupné snižování koncentrací přidávaných látek do jednotlivých matric (viz tabulky 6–9) také klade vyšší nároky na vlastní přípravu vzorků pro instrumentální analýzu a na přístrojové vybavení v testovaných laboratořích. Do určité míry lze problém nízkých koncentrací řešit částečným odpařením přítomného rozpouštědla ze vzorku, ale při konečném objemu obdrženého vzorku a nutností udělat několik analýz, to nelze dělat do nekonečna. Dalším řešením by bylo vylepšení stávajícího instrumentálního vybavení v laboratoři analytické chemie KTVF FVZ UO.

Finanční podpora

Práce byla podpořena Dlouhodobým záměrem rozvoje a organizace – zdravotnická problematika ZHN (Fakulta vojenského zdravotnictví), projektem specifického výzkumu (SV/FVZ202002)

Funding

The work was supported by Long-term development plan (Faculty of Military Health Sciences), by Project No. SV/FVZ202002.

Prohlášení o střetu zájmu

Autoři deklarují, že v této práci nedošlo k žádnému střetu zájmu.

Declaration of conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Adherence to Ethical Standards

This article does not contain any studies involving animals performed by any of the authors. This article does not contain any studies involving human participants performed by any of the authors.

Literatura

1. Bennett A. Standard operating procedure for the organisation of OPCW Biomedical Proficiency tests. OPCW; 2020.
2. Black RM. An Overview of Biological Markers of Exposure to Chemical Warfare Agents. *Journal of Analytical Toxicology*. 2008 Jan 1;32(1):2–9.
3. Black RM. History and perspectives of bioanalytical methods for chemical warfare agent detection. *Journal of Chromatography B*. 2010 May 15;878(17):1207–15.
4. Black RM, Muir B. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. *Journal of Chromatography A*. 2003 Jun 6;1000(1):253–81.
5. Úmluva o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a jejich zničení [Internet]. Available from: https://www.sujb.cz/fileadmin/sujb/docs/zakaz-zbrani/Umluva_CW.pdf
6. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons [Internet]. OPCW. [cited 2020 Mar 25]. Available from: <https://www.opcw.org/node/2632>
7. Křížková J, Vitvarová T. 20 let úmluvy o zákazu chemických zbraní. *Chemické listy*. 2017 Apr 15;111(4):285–9.
8. OPCW Executive Council Condemns Chemical Weapons Use in Fatal Incident in Malaysia [Internet]. OPCW. [cited 2020 Jan 16]. Available from: <https://www.opcw.org/media-centre/news/2017/03/opcw-executive-council-condemns-chemical-weapons-use-fatal-incident>
9. OPCW Confirms Use of Sarin and Chlorine in Ltamenah, Syria, on 24 and 25 March 2017 [Internet]. OPCW. [cited 2020 Jan 16]. Available from: <https://www.opcw.org/media-centre/news/2018/06/opcw-confirms-use-sarin-and-chlorine-ltamenah-syria-24-and-25-march-2017>
10. Incident in Salisbury [Internet]. OPCW. [cited 2020 Jan 16]. Available from: <https://www.opcw.org/media-centre/featured-topics/incident-salisbury>
11. Designated Laboratories [Internet]. OPCW. [cited 2020 Jan 16]. Available from: <https://www.opcw.org/designated-laboratories>
12. Status of designate laboratories for the analysis of authentic biomedical samples [Internet]. Technical secretariat OPCW; 2019. Available from: <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2019/07/s-1779-2019%28e%29.pdf>
13. Riches J, Morton I, Read RW, Black RM. The trace analysis of alkyl alkylphosphonic acids in urine using gas chromatography–ion trap negative ion tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2005 Feb 25;816(1):251–8.
14. Swaim LL, Johnson RC, Zhou Y, Sandlin C, Barr JR. Quantification of Organophosphorus Nerve Agent Metabolites Using a Reduced-Volume, High-Throughput Sample Processing Format and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2008 Nov 1;32(9):774–7.
15. Crow BS, Pantazides BG, Quiñones-González J, Garton JW, Carter MD, Perez JW, et al. Simultaneous Measurement of Tabun, Sarin, Soman, Cyclosarin, VR, VX, and VM Adducts to Tyrosine in Blood Products by Isotope Dilution UHPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2014 Oct 21;86(20):10397–405.
16. Vanninen P. Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament. Helsinki: University of Helsinki; 2017.
17. Pantazides BG, Crow BS, Garton JW, Quiñones-González JA, Blake TA, Thomas JD, et al. Simplified Method for Quantifying Sulfur Mustard Adducts to Blood Proteins by Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography–Isotope Dilution Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 2015 Feb 16;28(2):256–61.
18. Liu C-C, Liu S-L, Xi H-L, Yu H-L, Zhou S-K, Huang G-L, et al. Simultaneous quantification of four metabolites of sulfur mustard in urine samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2017 Apr 7;1492:41–8.

19. Black RM, Brewster K, Harrison JM, Stansfield N. The Chemistry of 1,1'-Thiobis-(2-Chloroethane) (sulphur Mustard) Part I. Some Simple Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 1992 Oct 1;71(1–4):31–47.
20. Black RM, Brewster K, Clarke RJ, Harrison JM. The Chemistry of 1,1'-Thiobis(2-Chloroethane) (sulphur Mustard) Part II.1 the Synthesis of Some Conjugates with Cysteine, N-Acetylcysteine and N-Acetylcysteine Methyl Ester. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 1992 Oct 1;71(1–4):49–58.
21. Lee JY, Lee YH. Solid-Phase Extraction of Sulfur Mustard Metabolites Using an Activated Carbon Fiber Sorbent. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016 Jan 1;40(1):64–71.
22. Barr JR, Pierce CL, Smith JR, Capacio BR, Woolfitt AR, Solano MI, et al. Analysis of urinary metabolites of sulfur mustard in two individuals after accidental exposure. *Journal of Analytical Toxicology*. 2008 Feb;32(1):10–6.
23. Lin Y, Dong Y, Chen J, Li C-Z, Nie Z-Y, Guo L, et al. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of β -lyase metabolites of sulfur mustard adducts with glutathione in urine and its use in a rabbit cutaneous exposure model. *Journal of Chromatography B*. 2014 Jan 15;945–946:233–9.
24. Evaluation of the results of the first official OPCW biomedical proficiency test [Internet]. Technical secretariat OPCW; 2016. Available from: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2016/en/s-1401-2016_e_.pdf
25. Evaluation of the results of the second official OPCW biomedical proficiency test [Internet]. Technical secretariat OPCW; 2017. Available from: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/S_series/2017/en/s-1515-2017_e_.pdf
26. van der Meer JA, Trap HC, Noort D, van der Schans MJ. Comprehensive gas chromatography with Time of Flight MS and large volume introduction for the detection of fluoride-induced regenerated nerve agent in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 2010 May 15;878(17–18):1320–5.
27. Bai H-H, Guo L, Feng J-L, Cui-Ling F, Chen J, Xie J-W. Gas Chromatography-Mass Spectrometric Determination of Sarin Exposures in Human Serum by Fluoride Reactivation Method. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2008 Sep 1;36(9):1269–72.
28. Liu C-C, Huang G-L, Xi H-L, Liu S-L, Liu J-Q, Yu H-L, et al. Simultaneous quantification of soman and VX adducts to butyrylcholinesterase, their aged methylphosphonic acid adduct and butyrylcholinesterase in plasma using an off-column procainamide-gel separation method combined with UHPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2016 Nov 15;1036–1037:57–65.
29. Li X, Yuan L, Wang Q, Liang L, Huang G, Li X, et al. Solid-phase synthesis for novel nerve agent adducted nonapeptides as biomarkers. *Tetrahedron Letters*. 2017 Apr 12;58(15):1437–40.
30. Evaluation of the results of the third official OPCW biomedical proficiency test [Internet]. Technical secretariat OPCW; 2018. Available from: <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2018/08/s-1660-2018%28e%29.pdf>
31. Evaluation of the results of the fourth official OPCW biomedical proficiency test [Internet]. Technical secretariat OPCW; 2019. Available from: <https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2019/07/s-1776-2019%28e%29.pdf>