

УДК 543

ГРАДИЕНТНОЕ ВЭЖХ РАЗДЕЛЕНИЕ АЛКИЛФОСФОНОВЫХ КИСЛОТ НА ПОРИСТОМ ГРАФИТИРОВАННОМ СОРБЕНТЕ HYPERCARB С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДНОГО РАСТВОРА МУРАВЬИНОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Е.Н. Гончарова, И.П. Семенова, М.А. Статкус*, Г.И. Цизин

*(кафедра аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова;
e-mail: mstatkus@gmail.com)*

Предложен способ градиентного ВЭЖХ-разделения алкилфосфоновых кислот на пористом графитированном углеродном сорбенте Hypercarb с использованием водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы. Аналиты детектировали с помощью квадрупольного масс-спектрометра. Для увеличения удерживания аналитов хроматографическую колонку перед инъекцией раствора образца промыли водой. Этот прием позволяет увеличить коэффициенты удерживания алкилфосфоновых кислот в 3–4 раза по сравнению с описанными в литературе аналогами.

Ключевые слова: жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, пористый графитированный углеродный сорбент Hypercarb, алкилфосфоновые кислоты.

Нервно-паралитические отравляющие вещества (зарин GB, зоман GD, ви-газ VX) относятся к наиболее опасным видам химического оружия. Эти фосфорорганические соединения чрезвычайно токсичны и, попадая в организм человека, поражают нервную систему [1]. Согласно Конвенции о запрещении химического оружия 1993 г., производство, накопление и применение этих веществ запрещены. Важный аспект Конвенции – развитие методов определения фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) и продуктов их распада в образцах, взятых с мест производства или хранения, а также из окружающей среды (в случае их применения). Большинство ФОВ летучи, относительно неполярны и при попадании в окружающую среду подвергаются достаточно быстрому гидролизу до соответствующих О-алкилалкилфосфоновых кислот, а затем более медленно гидролизу до алкилфосфоновых кислот. Продукты разложения ФОВ относительно устойчивы и значительно менее токсичны, чем исходные вещества; присутствие этих продуктов трансформации свидетельствует о наличии контакта анализируемого объекта с ФОВ [2].

Конечный продукт гидролиза зарина, зомана и VX – метилфосфоновая кислота; она и ее гомологи (этил- и пропилфосфоновые кислоты) входят в «Список 2» химических соединений,

контролируемых в соответствии с Конвенцией о запрещении химического оружия.

Определение конечных продуктов гидролиза фосфорорганических отравляющих веществ – непростая задача. Из-за низкого поглощения в УФ-области и отсутствия способности к флуоресценции селективное детектирование этих веществ можно проводить только с помощью метода масс-спектрометрии [3]. Известны работы, в которых для косвенного УФ-детектирования алкилфосфоновых кислот переводили в бензил-производные [4], однако это усложняет процедуру анализа и не позволяет надежно идентифицировать отдельные аналиты.

Для определения алкилфосфоновых кислот широко используют газовую хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), но по причине нелетучести аналитов требуется трудоемкая и длительная дериватизация [5–7]. Поскольку алкилфосфоновые кислоты обладают кислотными свойствами ($pK_a = 2,5$), их можно определять с помощью анионообменной хроматографии. Но естественное содержание анионов в анализируемых объектах существенно превышает возможную концентрацию алкилфосфоновых кислот, что затрудняет ионнохроматографическое разделение и определение. Эти трудности приводят к тому, что все чаще для определения алкилфосфоновых кислот

применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию в обращенно-фазовом режиме с использованием масс-спектрометрического детектирования (ВЭЖХ-МС). В этом случае в водных образцах определение можно проводить напрямую (без дериватизации), сводя к минимуму возможные потери аналитов перед анализом. Использование тандемной масс-спектрометрии позволяет достигать весьма низких пределов обнаружения (10 нг/мл для метилфосфоновой кислоты [8]), не прибегая к трудоемким и длительным методам пробоподготовки.

Алкилфосфоновые кислоты – очень гидрофильные вещества, поэтому их разделение в режиме обращенно-фазовой хроматографии затруднительно по причине их малого удерживания. Для решения проблемы удерживания гидрофильных аналитов в литературе предложено использовать пористый графитированный углеродный сорбент Нуресcarb [9]. В качестве элюента для разделения метил-, этил- и пропилалкилфосфоновых кислот (а также бутилфосфоновой и О-алкилалкилфосфоновых кислот) использовали водный раствор муравьиной и других карбоновых кислот. Удалось достигнуть разделения всех аналитов, однако для метил-, этил- и пропилфосфоновых кислот коэффициенты удерживания достаточно низкие (около 0,8–2,6).

Мы предлагаем решить проблему недостаточного удерживания метил-, этил- и пропилфосфоновых кислот за счет использования

градиента концентрации муравьиной кислоты в подвижной фазе.

Настоящая работа посвящена разработке прямого метода определения метил-, этил- и пропилфосфоновых кислот в водных растворах с использованием углеродного сорбента Нуресcarb, основанного на ВЭЖХ-МС-разделении и определении.

Экспериментальная часть

Реагенты и сорбенты. Для приготовления растворов и элюентов использовали деионизованную воду, которую получали на установке «Millipore Simplicity» («Millipore», США), удельное сопротивление воды составляло 18,2 МОм·см. Для приготовления элюентов использовали раствор муравьиной кислоты в воде (50 мас.%), степень чистоты «for HPLC» («Sigma-Aldrich», США).

Использовали растворы метилфосфоновой (MPA), этилфосфоновой (EtPA) и *n*-пропилфосфоновой (*n*-PrPA) кислот в ацетонитриле с концентрацией 0,1 мг/мл. Все растворы хранили в стеклянной посуде с притертыми пробками. Исходные растворы хранили в темноте при +4 °С.

Аппаратура. Для определения использовали жидкостной хромато-масс-спектрометр производства «Shimadzu» (Япония), состоящий из следующих модулей:

квадрупольный масс-спектрометр «LCMS-20202 с ионизацией аналитов электрораспылением (ESI);

Т а б л и ц а 1

Параметры МС-детектора и интерфейса

Параметр	Значение
Время накопления сигнала на выбранной массе (SIM event time)	0,2 с
Напряжение на детекторе (Detector voltage)	1,1 кВ
Напряжение на интерфейсе (Interface voltage)	–4,5 кВ
Напряжение на линии десольватации (DL voltage)	0 В
Температура интерфейса (Interface temperature)	350 °С
Температура линии десольватации (DL temperature)	250 °С
Поток газа-распылителя (Nebulizing gas flow)	1,5 л/мин
Температура блока нагревателя (Heat Block)	400 °С
Поток газа-осушителя (Drying gas flow)	15 л/мин
Режим ионизации (Ionisation mode)	ESI

два ВЭЖХ-насоса LC-20;
автосамплер «SIL-20АС».

ВЭЖХ-разделение осуществляли на колонке с пористым графитированным углеродным сорбентом Нурегcarb 30×2,1 мм («Thermo Scientific», США), диаметр частиц 5 мкм.

Условия хроматографического разделения.

В качестве элюента использовали деионизованную воду с добавкой муравьиной кислоты (от 0,01 до 0,5 об.%). Скорость потока составляла 0,2 мл/мин, температура колонки 40 °С.

Таблица 3

Градиент для разделения алкилфосфоновых кислот

Время элюирования, мин	Состав элюента
20–0 (до инъекции)	деионизованная вода
инъекция образца	
0–10	0,1%-й раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде

Таблица 2

Параметры регистрации ионов аналитов

Аналит	<i>m/z</i>	Регистрируемый ион
МРА	95	[M-H] ⁻
EtPA	109	[M-H] ⁻
<i>n</i> -PrPA	123	[M-H] ⁻

В работе для детектирования алкилфосфоновых кислот использовали параметры МС-детектора и интерфейса, указанные в табл. 1. Эти параметры не оптимизировали, используя рекомендованные производителем оборудования значения.

Параметры регистрации ионов аналитов представлены в табл. 2. Величины *m/z* и режим

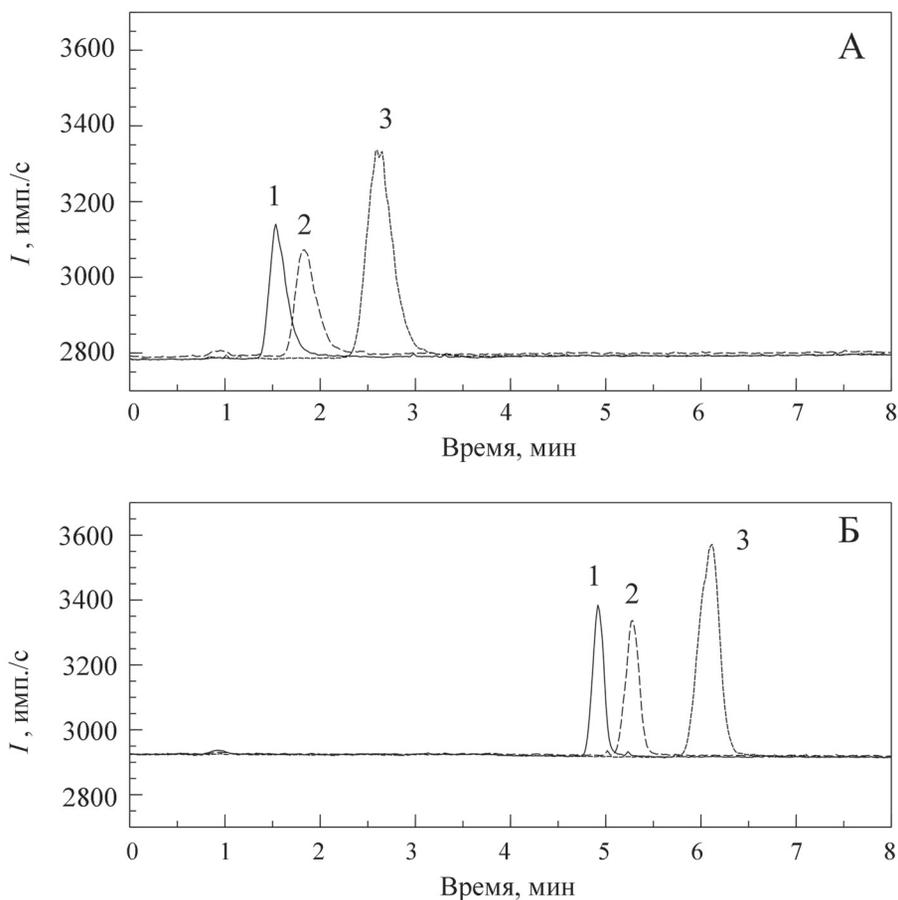


Рис. 1. Хроматограммы разделения алкилфосфоновых кислот: А – изократический режим, элюент – 0,1%-й раствор НСООН в воде; Б – градиентное элюирование согласно программе, представленной в табл. 3. Условия определения: колонка Нурегcarb 30×2,1; температура колонки: 40 °С; МС-детектирование (1 – метилфосфоновая кислота, 2 – этилфосфоновая кислота, 3 – пропилфосфоновая кислота)

Таблица 4

Ширина на полувысоте и разрешение пиков аналитов

Условия определения	$\omega_{1/2}$, мин			R_s	
	МРА	EtPA	<i>n</i> -PrPA	МРА–EtPA	EtPA– <i>n</i> -PrPA
Градиентное элюирование	0,158	0,194	0,291	0,94	1,52
Изократический режим	0,219	0,247	0,318	0,51	1,12

регистрации ионов выбирали, исходя из строения определяемых веществ. Детектирование проводили в режиме SIM-регистрации отрицательных ионов.

Результаты и обсуждение

Алкилфосфоновые кислоты (АРА) представляют собой очень полярные соединения и слабо удерживаются на большинстве коммерчески доступных фаз в режиме обращено-фазовой ВЭЖХ, что затрудняет их определение. Известно, что на сорбенте Нурегсарб удерживание полярных соединений существенно выше, чем на октадецилсиликагеле. В нескольких работах [9, 10] предложено использовать Нурегсарб в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ для разделения алкилфосфоновых и алкилметилфосфоновых кислот (АМРА). В качестве подвижной фазы использовали растворы муравьиной и других карбоновых кислот в воде. При увеличении концентрации карбоновых кислот в элюенте удерживание АРА и АМРА уменьшается, что свидетельствует о вытеснительном «квази-ионообменном» механизме элюирования аналитов. В работе [10] предложено использовать в качестве элюента 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде. При этом коэффициент удерживания МРА достаточно мал и составляет 0,8. Авторы попробовали провести разделение АРА с помощью воды без добавок карбоновых кислот, однако в этом случае коэффициент удерживания самого слабоудерживаемого компонента смеси (МРА) превысил значение 30, что делает разделение практически невозможным. Мы предположили, что проведение элюирования с использованием градиента концентрации муравьиной кислоты в воде позволит решить проблему слабого удерживания аналитов. Для проверки этого предположения была предложена градиентная программа, представленная в табл. 3. Первая часть градиента (20 мин до ввода образца, так называемая «промывка») необходима для установления равновесия

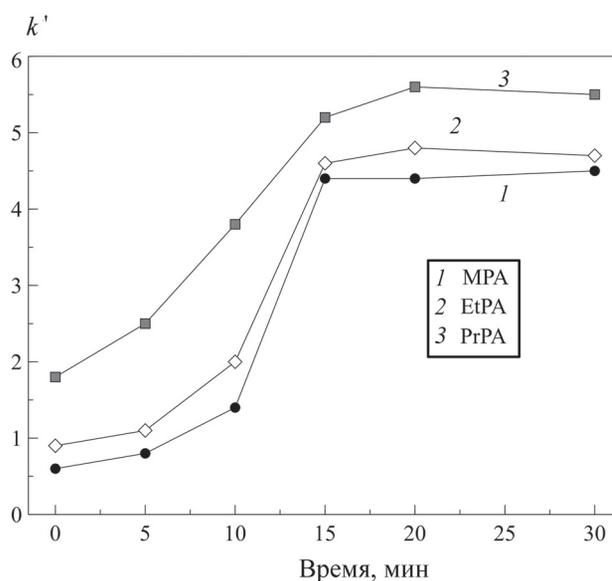


Рис. 2. Зависимость коэффициентов емкости аналитов от времени предварительной промывки колонки деионизованной водой

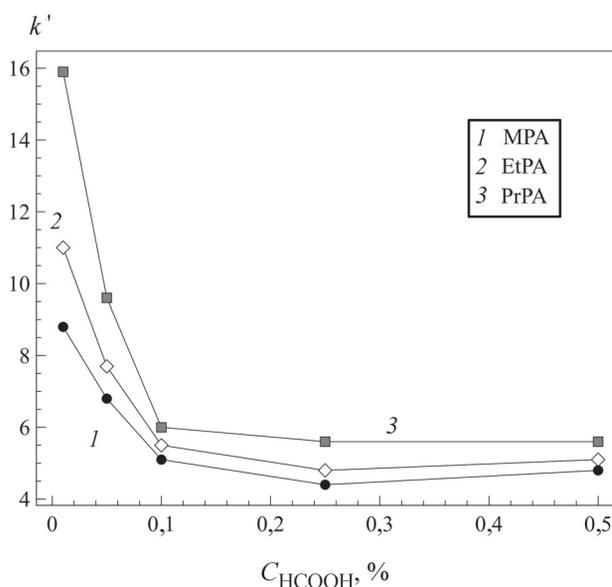


Рис. 3. Зависимость коэффициентов емкости аналитов от концентрации муравьиной кислоты в элюенте

Т а б л и ц а 5

Метрологические характеристики определения АРА

Аналит	Градиентное разделение			Изократическое разделение		
	уравнение градуировочной зависимости	R^2	$C_{\text{мин}}$, мкг/мл	уравнение градуировочной зависимости	R^2	$C_{\text{мин}}$, мкг/мл
МРА	$y = 2841x + 853$	0,996	0,47	$y = 2834x + 1179$	0,965	1,34
EtРА	$y = 3147x + 687$	0,995	0,53	$y = 3216x + 978$	0,968	1,28
<i>n</i> -PrРА	$y = 6949x + 2162$	0,994	0,59	$y = 7424x + 1962$	0,979	1,04

хроматографической колонки с водным элюентом, не содержащим муравьиной кислоты, при этом из колонки удаляется муравьиная кислота, оставшаяся после предыдущего разделения. Затем происходит ввод образца и одновременное повышение концентрации муравьиной кислоты до 0,1%.

Данный градиент позволяет увеличить время удерживания АРА, улучшить их разделение и форму пиков (уменьшить ширину пиков) по сравнению с изократическим элюированием 0,1%-м раствором муравьиной кислоты в деионизованной воде (рис. 1). Значения ширины пиков на полувысоте и разрешение пиков аналитов приведены в табл. 4.

Для выбора оптимальных условий проведения разделения мы изучили зависимость коэффициентов емкости аналитов от времени промывки колонки водой (рис. 2) при проведении элюирования 0,25%-й муравьиной кислотой в воде.

Увеличение времени промывки до 20 мин приводит к увеличению удерживания аналитов и коэффициентов емкости; дальнейшее увеличение времени промывки не приводит к существенному изменению коэффициентов емкости. Поэтому для дальнейшей работы в качестве оптимальной выбрана продолжительность промывки 20 мин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-23-00012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Munro B., Talmage S. // Environmental Health Perspectives 1999. Vol. 107. N 12. P. 933.
- Owens J., Koester C. // J. Agric. Food Chem. 2009. Vol. 57. N 17. P. 8227.
- Desoubries C. et al. // J. Chromatogr. B. 2012. Vol. 900. P. 48.
- Mazumder A., Gupta H. // J. Chromatogr. A. 2009. Vol. 1216. P. 5228.
- Riches, Morton I., Read R.W., Black R.M. // J. Chromatogr. B. 2005. Vol. 816. P. 251.
- Sega G., Tomkins B., Wayne H. // J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 790. P. 143.
- Kataoka M. // J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 891. P. 295.
- Zhou T., Lucy Ch. // J. Chromatogr. A. 2008. Vol. 1213. P. 8.
- Байгильдиев Т.М., Родин И.А., Ставрианиди А.Н., Браун А.В., Ахмерова Д.И., Штигун О.А., Рыбальченко И.В. Экспрессное определение низких содержаний метилфосфоновой кислоты методом ВЭЖХ-МС/МС // Заводская лаборатория 2016. Т. 82. С. 5.

10. Mercier J.P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A. // J. Chromatogr. A. 1999. Vol. 849. P. 197.
11. Røen B. // Analytica Chimica Acta. 2013. Vol. 761. P. 109.

Поступила в редакцию 20.04.17

GRADIENT HPLC SEPARATION OF ALKYLPHOSPHONIC ACIDS ON POROUS GRAPHITIC CARBON SORBENT HYPERCARB WITH WATER SOLUTION OF FORMIC ACID AS A MOBILE PHASE

E.N. Goncharova, I.P. Semenova, M.A. Statkus*, G.I. Tsysin

(Analytical chemistry division M.V. Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department; e-mail: mstatkus@gmail.com)

An approach to gradient HPLC separation of alkylphosphonic acids on porous graphitic carbon sorbent Hypercarb with water solution of formic acid as a mobile phase was proposed. Analytes were detected by quadrupole mass-spectrometer. HPLC column was washed with water before the injection of analytes, this procedure resulted in 3–4 fold increase of the retention times of alkylphosphonic acids compared to literature data.

Key words: liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry, porous graphitic carbon Hypercarb, alkylphosphonic acids.

Сведения об авторах: Гончарова Елизавета Николаевна – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (goncharovae.n@mail.ru); Семенова Ирина Павловна – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (semenova150794@gmail.com); Статкус Михаил Александрович – ст. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (mstatkus@gmail.com); Цизин Григорий Ильич – глав. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (tsisin@analyt.chem.msu.ru).