

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ГИДРОФИЛЬНЫХ  
ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ПОРИСТОМ  
ГРАФИТИРОВАННОМ УГЛЕРОДНОМ СОРБЕНТЕ HUPERCARB  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДНОГО РАСТВОРА МУРАВЬИНОЙ  
КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ****Кирилл Сергеевич Гутенев, Михаил Александрович Статкус,  
Григорий Ильич Цизин**

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии

**Автор, ответственный за переписку:** Григорий Ильич Цизин,  
tsisin@analyt.chem.msu.ru

**Аннотация.** Изучена возможность элюирования гидрофильных фосфорорганических веществ с использованием градиента концентрации муравьиной кислоты в водной подвижной фазе на пористом графитированном углеродном сорбенте Hupercarb. Аналиты детектировали с помощью моноквадрупольного масс-спектрометра. Удерживание аналитов изучали, варьируя состав подвижной фазы перед инъекцией раствора образца. Показано, что влияние ступенчатого градиентного элюирования на удерживание аналитов в первую очередь обусловлено состоянием поверхности сорбента, а не элюирующей способностью фаз. Наиболее вероятным является вытеснительный «квазионообменный» механизм удерживания аналитов.

**Ключевые слова:** жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, пористый графитированный углеродный сорбент Hupercarb, алкилфосфоновые кислоты, фосфорорганические пестициды

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-5-388-396

**Финансирование.** Статья выполнена в рамках работ по теме госзадания № АААА-А21-121011990021-7 «Создание функциональных материалов, высокоэффективных способов и средств химического анализа для мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, перехода к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, персонализированной медицине, технологиям здоровьесбережения, создания безопасных и качественных продуктов питания, лекарственных препаратов».

**Для цитирования:** Гутенев К.С., Статкус М.А., Цизин Г.И. Хроматографическое разделение гидрофильных фосфорорганических веществ на пористом графитированном углеродном сорбенте Hupercarb с использованием водного раствора муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 5. С. 388–396.

ORIGINAL ARTICLE

**CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF HYDROPHILIC ORGANOPHOSPHATES ON A POROUS GRAPHITIZED CARBON SORBENT HYPERCARB USING AN AQUEOUS SOLUTION OF FORMIC ACID AS A MOBILE PHASE**

**Kirill S. Gutenev, Michail A. Statkus, Grigory I. Tsizin**

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry

**Corresponding author:** Grigory I. Tsizin, [tsizin@analyt.chem.msu.ru](mailto:tsizin@analyt.chem.msu.ru)

**Abstract.** The possibility of elution of hydrophilic organophosphorus substances using the concentration gradient of formic acid in an aqueous mobile phase on a porous graphitized carbon sorbent Hypercarb has been studied. The analytes were detected using a mono quadrupole mass spectrometer. To study the retention of analytes, the composition of the mobile phase was varied before injection of the sample solution. It is shown that the effect of stepwise gradient elution on the retention of analytes is primarily due to the state of the sorbent surface, rather than the elution ability of the phases, and that the displacing “quasi-ion exchange” mechanism of retention of analytes is the most likely.

**Keywords:** liquid chromatography, mass spectrometry, porous graphitized carbon sorbent Hypercarb, alkylphosphonic acids, organophosphate pesticides

**Financial Support.** The article was carried out as part of the work on the topic of state task No. ААААА21-121011990021-7 “Creation of functional materials, highly effective methods and means of chemical analysis for monitoring and forecasting the state of the environment, transition to highly productive and environmentally friendly agro- and aquatic farming, personalized medicine, health-saving technologies, creation of safe and high-quality food, medicinal drugs”.

**For citation:** Gutenev K.S., Statkus M.A., Tsizin G.I. Chromatographic Separation of Hydrophilic Organophosphates on a Porous Graphitized Carbon Sorbent Hypercarb Using an Aqueous Solution of Formic Acid as a Mobile Phase // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 5. S. 388–396.

Гидрофильные фосфорорганические соединения представляют собой обширную группу веществ, многие из которых встречаются в повседневной жизни. Фосфорорганические гербициды и инсектициды, такие как глифосат (Gly) и глюфосинат (Glu), ацефат (ACE) и ометоат (Ome), могут проявлять себя как канцерогены, а метамидофос (Meth) и монокротофос (Mon) токсичны и запрещены во многих странах. К гидрофильным фосфорорганическим соединениям относятся также продукты трансформации нервно-паралитических отравляющих веществ (ОВ) – алкилфосфоновые (АФК) и О-алкилалкилфосфоновые кислоты (О-ААФК). Метилфосфоновая кислота (МРА) и ее гомологи этил- (ЕРА) и пропилфосфоновые (РРА) кислоты, а также этил- (EtMPA), изопропил- (iPrMPA) и изобутилметилфосфоновые (iBuMPA) кисло-

ты служат маркерами применения химического оружия. Из-за высокой опасности и токсичности указанных выше пестицидов и ОВ, продуктами разложения которых являются АФК и О-ААФК, необходима разработка простых, эффективных и надежных методов их определения в объектах окружающей среды, пищевых продуктах, биомедицинских и других объектах.

Часто встречающийся метод определения указанных аналитов – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которую применяют в обращенно-фазовом (ОФ), ионном и НІІС вариантах [1–3]. Следует отметить, что эти вещества имеют низкое поглощение в УФ и видимой области, они также не способны к флуоресценции, поэтому их селективное определение можно осуществлять исключительно с использованием масс-спектрометра.

Несмотря на то, что при определении этим методом не требуется дериватизации аналитов, большие проблемы возникают из-за их высокой полярности – эти вещества слабо удерживаются на большинстве коммерчески доступных фаз. Кроме того, в ионной хроматографии определение с МС-детектированием возможно только после трудоемкой процедуры по уменьшению влияния сопутствующих ионов. Для определения указанных аналитов также часто применяют метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ–МС) [4]. Однако из-за низкой летучести АФК, О-ААФК и некоторых пестицидов перед ГХ-анализом необходимо провести трудоемкую и длительную стадию дериватизации.

Известно, что сорбент Нуперсарб удерживает полярные соединения значительно лучше, чем силикагель С18 в ОФ ВЭЖХ, поэтому в предыдущих работах нашей группы [5–8] предложено использовать Нуперсарб в качестве неподвижной фазы для ВЭЖХ разделения/определения гидрофильных органических соединений. Представленный в работах [5, 7, 8] способ увеличения времени удерживания гидрофильных фосфорорганических аналитов с применением промывки колонки Нуперсарб водой до инъекции образца использовали и в настоящей работе, при этом расширен круг определяемых веществ и проведено более детальное изучение механизма удерживания гидрофильных фосфорорганических соединений на пористом графитированном углеродном сорбенте Нуперсарб с помощью указанного способа промывки колонки водой. Использование этого приема в будущем может быть крайне полезным и позволит добиться лучшего разделения сложных смесей гидрофильных аналитов.

### Экспериментальная часть

**Реагенты.** Для приготовления растворов и элюентов использовали деионизованную воду (18,2 МОм·см), полученную на установке «Millipore Simplicity» («Millipore», США), а также раствор муравьиной кислоты в воде (50 мас.%) чистоты «fog HPLC» («Sigma-Aldrich», США).

Использовали исходные растворы МРА, ЕРА, РРА, EtMPA, iPrMPA, iBuMPA, Gly, Glu, Ace, Meth, Ome и Mon с концентрацией 1 мг/мл. Структуры и характеристики аналитов приведены в табл. 1. Все вещества были произведены фирмой «Sigma-Aldrich» (США). Рабочие растворы смеси аналитов с концентрацией 70 мкг/мл готовили путем по-

следовательного разбавления исходных растворов. Исходные и рабочие растворы хранили в темноте при +4 °С.

**Аппаратура.** Использовали жидкостной хромато-масс-спектрометр фирмы «Shimadzu», состоящий из следующих модулей: квадрупольный масс-спектрометр «LCMS-2020» с ионизацией аналитов электрораспылением (ESI), два ВЭЖХ-насоса «LC-20AD», дегазатор «DGU-20A», контроллер «СВМ-20А», автосамплер «SIL-20АС» и термостат «СТО-20АС». Для детектирования аналитов использовали параметры МС-детектора и интерфейса «Shimadzu LCMS-2020», рекомендованные производителем оборудования: время регистрации интенсивности на заданном  $m/z$  (SIM event time) 0,2 с, напряжение на детекторе (detector voltage) 1,55 кВ; напряжение на интерфейсе (interface voltage) 4,5 кВ; напряжение линии десольватации (DL voltage) 0 В; 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. Аналиты определяли в режиме регистрации отрицательных положительных ионов. Параметры  $m/z$  регистрации ионов аналитов для масс-спектрометра представлены в табл. 1. Хроматографические параметры рассчитывали в программе LabSolutions. Для ВЭЖХ-разделения использовали колонку с сорбентом Нуперсарб («Thermo Scientific», США) (3,2×2,1 мм, 5 мкм). Водородный показатель измеряли на рН-метре «Эконикс Эксперт рН».

**Условия хроматографического определения.** В качестве элюента (фаза В) использовали 0,1%-й водный раствор муравьиной кислоты, а в качестве промывочного раствора (фаза А) – деионизованную воду, а также воду, насыщенную  $\text{CO}_2$ , и 0,5 мМ водный раствор  $\text{NH}_3$ , насыщенный  $\text{CO}_2$ . Скорость потока элюента 0,2 мл/мин, температура колонки 30 °С.

### Результаты и обсуждение

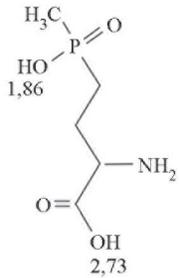
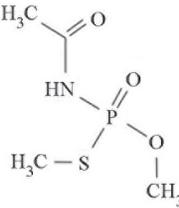
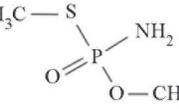
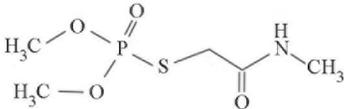
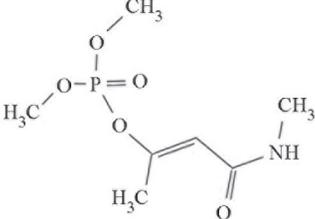
Предложенный ранее в нашей группе прием предварительного уравнивания колонки водой с последующим ступенчатым градиентом концентрации муравьиной кислоты при разделении аналитов на пористом графитированном углеродном сорбенте позволяет добиться улучшения формы пиков аналитов: уменьшения ширины пиков и, соответственно, увеличения высоты пиков. Основываясь на предыдущих

Т а б л и ц а 1

**Структуры аналитов, их параметры липофильности ( $\text{Log } P$ ) и выбранные для масс-спектрометрической регистрации ионов аналитов величины  $m/z$**

Аналит	Структура с обозначением $pK_a$ функциональных групп	$m/z$	$\text{Log } P$
MPA		-95	-1,6
EPA		-109	-1,2
PPA		-123	-0,7
EtMPA		-123	-0,8
iPrMPA		-137	-0,3
iBuMPA		-151	0,1
Gly		-168	-4,6

Окончание табл. 1

Аналит	Структура с обозначением $pK_a$ функциональных групп	m/z	Log P
Glu		-180	-5,0
Ace		+184	-0,8
Meth		+143	-0,9
Ome		+214	-0,9
Mon		+224	-0,2

результатах [8], где ступенчатый градиент показал лучшее разделение карбоновых кислот по сравнению с изократическим режимом и линейным градиентом, выбраны два режима элюирования: изократический режим (для сравнения) и режим ступенчатого градиента. В изократическом режиме элюирующей фазой была 100%-я фаза В. В свою очередь, ступенчатый градиент состоял из двух участков: до инъекции аналитов пропускали 100% фазы А, после инъекции – 100% фазы В, где момент времени с инъекцией образца и одновременной сменой подвижной фазы принимали за 0-ю минуту. Пример условий изократического и ступенчатого градиентных хроматографических разделений с

промывкой колонки до инъекции ( $t_w$ ) в течение 5 мин описан в табл. 2. Установлено, что в случае ступенчатого градиента важную роль играет продолжительность промывки фазой А колонки до инъекции. По нашему мнению, при промывке колонки до инъекции чистой водой (фаза А) аналитов в течение менее 5 мин на поверхности сорбента остается некоторое количество формиат-ионов и удерживание аналитов близко к изократическому режиму, в котором промывку не проводили вовсе. Поэтому минимально необходимое время уравнивания колонки до инъекции образца составило 5 мин (рис. 1). Дальнейшее увеличение длительности этой стадии мало влияло на время удерживания аналитов.

Т а б л и ц а 2

**Условия изократического и ступенчатого градиентного хроматографического разделения с промывкой колонки до инъекции**

Стадия	Промывка колонки, 5-я – 0-я минута	Инъекция образца, 0-я минута	Окончание анализа, 25-я минута
Изократический режим	100% фазы В	100% фазы В	100% фазы В
Ступенчатый градиент	100% фазы А	100% фазы В	100% фазы В

Т а б л и ц а 3

**Разрешение некоторых пар карбоновых кислот в зависимости от выбранного режима элюирования**

Пара анализов	Разрешение (Rs)			
	состав промывочного раствора			
	без промывки	H <sub>2</sub> O*	насыщенный CO <sub>2</sub> *	насыщенный CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> водный*
МРА/ЕРА	0,82	1,09	0,54	0,43
РРА/ЕtМРА	1,32	1,24	0,84	1,00
Gly/Glu	0,50	0,34	0,33	0,32

\*Длительность промывки составляла 6 мин.

Для модельной смеси анализов при элюировании в изократическом режиме 0,1%-й муравьиной кислотой не удалось добиться полного разделения следующих пар веществ: МРА/ЕРА и Асе/Gly/Glu. Более того, оказалось, что ступенчатый градиент муравьиной кислоты при промывке чистой водой до инъекции оказывает влияние на удерживание фосфоновых кислот, глифосата и глюфосината в одинаковой мере.

Из-за этого время удерживания анализов изменяется в большую сторону с улучшением разделения пары МРА/ЕРА по сравнению с изократическим режимом (табл. 3). При этом на примере фосфорорганических пестицидов было показано, что градиентное элюирование муравьиной кислотой в значительной мере влияет на характер удерживания анализов кислотной природы, которые в нейтральной среде находятся в форме анионов,

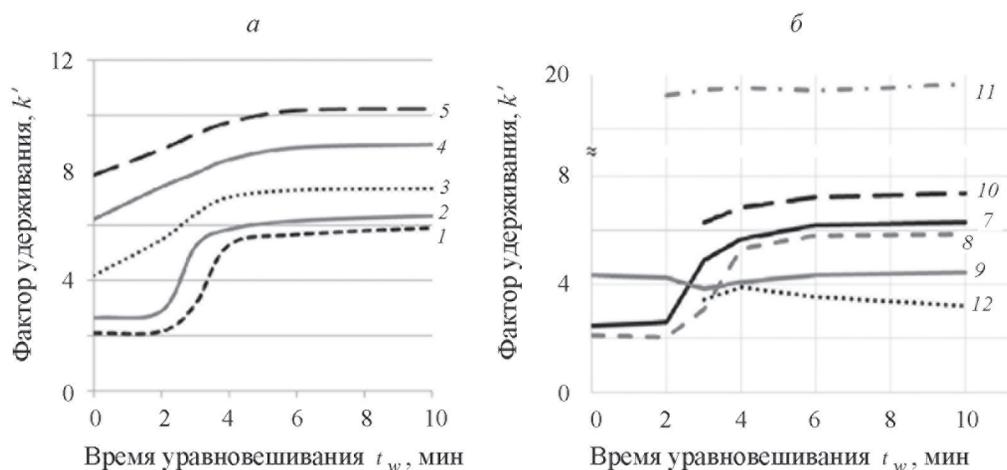


Рис. 1 Зависимость фактора удерживания анализов ( $k'$ ) от длительности уравнивания колонки ( $t_w$ ) водой. Разделяли кислоты: *a* – МРА (1), ЕРА (2), РРА (3), ЕtМРА (4), iPrМРА (5); *б* – пестициды: Gly (7), Glu (8), Асе (9), Meth (10), Оме (11), Mon (12).  $C_{\text{аналит.}} = 70$  мкг/мл, инжестировали 3 мкл раствора

что можно объяснить слабыми анионообменными свойствами сорбента Nupercarb. В свою очередь, у фосфорсодержащих гидрофильных аналитов (ацефата, метамидофоса, омеоата и монокротофоса) отсутствуют гидроксильные группы (табл. 1), и в условиях наших экспериментов они находятся в виде катионов из-за содержащихся аминогрупп в составе молекул. На значение их времени удерживания градиент муравьиной кислоты оказал незначительное влияние и время удерживания для этих пестицидов не зависело ни от длительности промывки, ни от состава промывочной фазы А. Это может свидетельствовать о том, что указанные катионы не удерживаются на поверхности сорбента за счет ионных сил, а их разделение происходит по ОФ-механизму. При этом хроматографические пики метамидофоса и монокротофоса имели крайне низкую интенсивность относительно остальных аналитов, наблюдали значительное искажение симметрии как в изократическом режиме, так и ступенчатом градиенте, поэтому они не приведены на рис. 2.

Предполагается, что особенности удерживания аналитов кислотной природы на сорбенте Nupercarb в этих условиях можно объяснить гипотетическим вытеснительным «квазианообменным» механизмом элюирования аналитов и влиянием состава подвижной фазы на состояние поверхности сорбента. Так, по нашему мнению, при использовании растворов муравьиной кислоты в качестве подвижной фазы формиат-ионы частично остаются на поверхности сорбента из-за его слабых анионообменных свойств. В процессе промывки водой происходит вымывание формиат-ионов с поверхности Nupercarb, а элюирующая способность чистой воды оказывается значительно хуже, что приводит к увеличению удерживания аналитов кислотной природы. Поэтому для изучения влияния состава промывочной подвижной фазы на значение времени выхода гидрофильных фосфорорганических веществ были выбраны анионы (гидрокарбонат- и гидроксид-ион), способные заместить формиат ионы на поверхности сорбента. Гидрокарбонат-ионы получали растворением в воде углекислого газа. Эксперименты включали следующие подвижные фазы для промывки колонки:  $\text{H}_2\text{O}$  (рН 6,2),  $\text{H}_2\text{O}$ , насыщенная  $\text{CO}_2$  (рН 3,9),  $\text{H}_2\text{O}$ , насыщенная  $\text{CO}_2$  с последующим добавлением водного раствора  $\text{NH}_3$  (рН 8,3). Следует отметить, что в ступенчатом гра-

диентном режиме все аналиты с кислотными группами изначально находятся в ионной форме за счет того, что значение рН фазы А близко к нейтральному. По мере увеличения концентрации муравьиной кислоты и уменьшения рН подвижной фазы до 2,7 происходит переход аналитов в молекулярную форму, а глифосата и глюфосината – в цвиттер-ионную форму. Поэтому при применении ступенчатого градиента механизм удерживания аналитов на начальном этапе разделения в основном ионный, а по мере перехода аналитов в молекулярную форму происходит переход к ОФ-механизму. Из-за этого влияние ступенчатого градиента на удерживание аналитов осуществляется в разной степени, за счет чего происходит улучшение разрешения исследуемых веществ. Кроме того, при использовании ступенчатого градиента ширина большинства пиков уменьшалась, увеличивалась их интенсивность, что также влияло на разрешение хроматографических пиков.

Для промывочных фаз «вода без добавок» и «вода, насыщенная  $\text{CO}_2$ », наблюдали схожие закономерности в изменении времени удерживания для кислотных аналитов. Типичные зависимости факторов удерживания этих аналитов от времени промывки колонки до инъекции представлены на рис. 3. В случае промывки колонки водой, насыщенной  $\text{CO}_2$  (рН 3,9), подавляющая часть добавки находится в молекулярной форме ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) и слабо взаимодействует с положительно заряженной поверхностью сорбента. Поэтому в этих двух вариантах промывок муравьиная кислота, оставшаяся с предыдущего эксперимента, вымывается с колонки и при последующем разделении органических кислот аналиты сильнее удерживаются на поверхности. Добавление в промывочную подвижную фазу модификатора в виде гидрокарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) при рН 8,3 приводило к тому, что время удерживания аналитов не изменялось по сравнению с изократическим режимом. Вероятно, в случае промывки раствором с гидрокарбонатом в щелочной среде происходит замещение остатков формиата с поверхности сорбента на гидрокарбонат, а промывочная фаза имеет схожую элюирующую силу с 0,1%-й муравьиной кислотой, за счет чего значения времени удерживания аналитов остаются практически одинаковыми.

Таким образом, показано, что сорбция гидрофильных фосфорорганических веществ с кислотными группами вероятнее всего происходит по вытеснительному «квази-анообменному механизму».

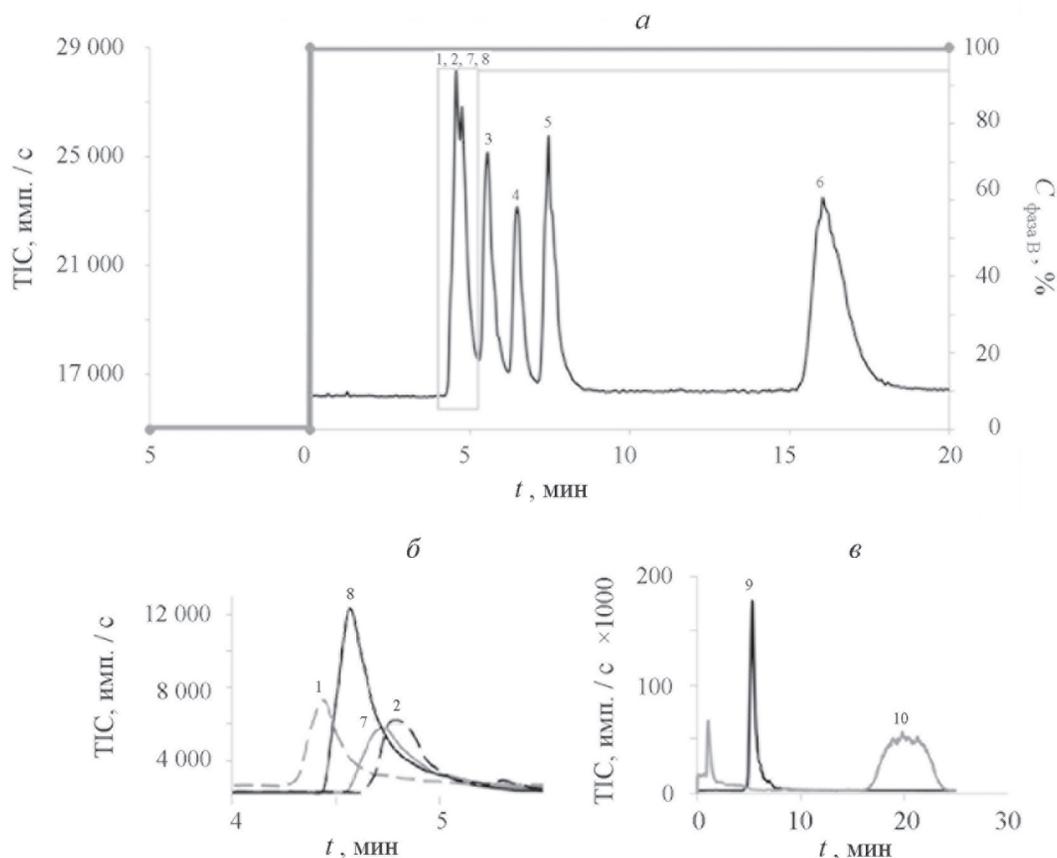


Рис. 2. Хроматограмма, полученная при разделении карбоновых кислот на колонке с пористым графитированным углеродом. Разделяли кислоты: МРА (1), ЕРА (2), РРА (3), EtMPA (4), iPrMPA (5) и iBuMPA (6); пестициды: Gly (7), Glu (8), Ace (9), Ome (10); а – хроматограмма по полному ионному току анализов 1–8; б – наложение хроматограмм анализов 1, 2, 7, 8; в – наложение хроматограмм анализов 9, 10.  $C_{\text{аналит.}} = 70$  мкг/мл, инжестировали 3 мкл раствора

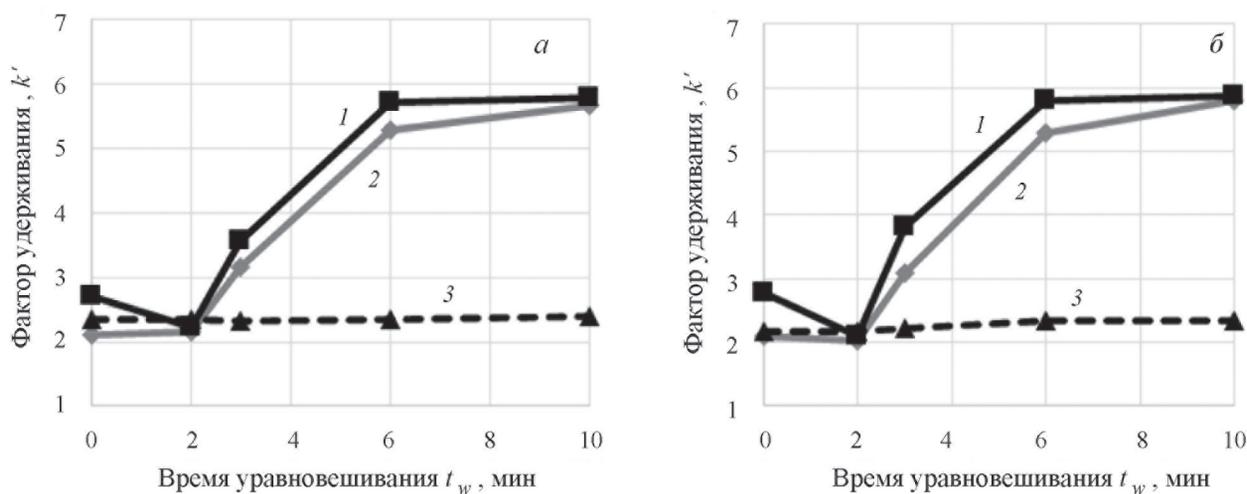


Рис. 3 Зависимости фактора удерживания МРА (а) и Glu (б) от длительности «уравнивания» колонки водой без добавок (1), водой, насыщенной  $\text{CO}_2$  (2), водой, насыщенной  $\text{CO}_2$  и 5 мМ  $\text{NH}_3$  водный раствор (3)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Desoubries C., Chapuis-Hugon F., Bossee A., Pichon V. // *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. Vol. 900. asani D., Kumar R., Srivastava R.K.,
2. Gupta A.K., Dubey D.K. // *J. Chromatogr. A.* 2007. Vol. 1161. P. 198.
3. Hamelin E.I., Schulze N.D., Shaner R.L. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. Vol. 406. P. 5195.
4. Riches J., Morton I., Read R.W., Black R.M. // *J. Chromatogr. B.* 2005. Vol. 816. P. 251.
5. Гончарова Е.Н., Статкус М.А., Цизин Г.И., Золотов Ю.А. // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 4. С. 291 [Goncharova E.N., Statkus M.A., Tsizin G.I., Zolotov Yu.A. // *J. Anal. Chem.* 2020. Vol. 75. № 4. P. 423] (DOI: 10.1134/S1061934820040036).
6. Goncharova E.N., Statkus M.A., Nesterenko P.N., Tsysin G.I., Zolotov Yu.A. // *J. Chromatogr. A.* 2021. Vol. 1653. P. 462420 (DOI: 10.1016/j.chroma.2021.462420).
7. Гончарова Е.Н., Семенова И.П., Статкус М.А., Цизин Г.И. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 2: Химия.* 2017. Т. 58. № 6. С. 275 [Goncharova E.N., Semenova I.P., Statkus M.A., Tsysin G.I. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2017. Vol. 72. № 6. P. 255] (DOI: 10.3103/S0027131417060050).
8. Гутенев К.С., Статкус М.А., Цизин Г.И. // *Журн. аналит. химии.* 2022. Т. 77. № 10. С. 923.

**Информация об авторах**

Кирилл Сергеевич Гутенев – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (g-5676@yandex.ru);

Михаил Александрович Статкус – вед. науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (mstatkus@gmail.com);

Григорий Ильич Цизин – ст. науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (tsisin@analyt.chem.msu.ru).

**Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических стандартов**

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 08.09.2023

Одобрена после рецензирования 10.10.2023

Принята к публикации 21.02.2024