

Анализ вещества

УДК 54.061;54.064;543.31

ЭКСПРЕССНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИЗКИХ СОДЕРЖАНИЙ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

© Т. М. Байгильдиев¹, И. А. Родин¹, А. Н. Ставрианиди^{1,2}, А. В. Браун^{1,2},
Д. И. Ахмерова¹, О. А. Шпигун¹, И. В. Рыбальченко²

Статья поступила 6 ноября 2015 г.

Разработан экспрессный подход к определению метилфосфоновой кислоты (МФК) — конечного продукта гидролиза нервнопаралитических отравляющих веществ в водных объектах — методом жидкостной хроматографии — tandemной масс-спектрометрии. Выбраны оптимальные условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования. Разработанный способ характеризуется хорошей чувствительностью, точностью, селективностью определения, отсутствием мешающего влияния компонентов основы пробы при анализе природных вод. Способ был опробован при определении МФК в различных реальных водных объектах методом «введено — найдено». При прямом ВЭЖХ-МС/МС определении предел обнаружения МФК в водных объектах составил 10 нг/мл.

Ключевые слова: продукты трансформации нервнопаралитических отравляющих веществ; метилфосфоновая кислота; ВЭЖХ-МС/МС; анализ воды.

Главными положениями Конвенции о запрещении химического оружия [1], принятой 29 апреля 1997 г. 130 странами, являются запрет на производство и применение химического оружия, а также уничтожение всех его запасов. Однако до сих пор некоторые боевые отравляющие вещества (БОВ) применяются при локальных вооруженных конфликтах и в террористических атаках.

Боевые отравляющие вещества нервнопаралитического действия, такие как VX, зарин, зоман и др., быстро гидролизуются с образованием соответствующих алкилметилфосфоновых кислот (АМФК), которые в свою очередь медленно гидролизуются с образованием метилфосфоновой кислоты. МФК является наиболее стабильным продуктом гидролиза нервнопаралитических отравляющих веществ: период ее полураспада в реакции с радикалами ОН в воде составляет 18 лет [2]. МФК обладает устойчивостью к биоразложению, гидролизу и фотолизу. Соединения, содержащие С–Р связь, не подвергаются расщеплению в процессе обмена веществ у млекопитающих и растений. Микроорганизмы [3] и некоторые бактериальные клетки [4, 5] расщепляют С–Р связь, но только в том случае, если МФК является единственным источником фосфора в окружающей среде.

Метилфосфоновая кислота не подвергается как гидролизу из-за отсутствия гидролизующих функциональных групп, так и фотолизу из-за отсутствия поглощения УФ-излучения окружающей среды (>290 нм) [6].

Обнаружение чрезвычайно стабильной МФК позволяет судить о факте применения химического оружия по прошествии длительного времени. Важнейшей задачей является мониторинг объектов окружающей среды, которые могут быть заражены БОВ в процессе хранения, транспортировки и утилизации запасов химического оружия. Поэтому перспективной является разработка способа определения МФК в объектах окружающей среды.

В работах [7–9] авторы применяли метод капиллярного электрофореза для определения МФК и АМФК в воде, характеризующийся быстротой разделения и высоким разрешением, однако полученные пределы обнаружения превышают 1 мкг/мл.

Газовая хроматография [10–15] в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием является одним из наиболее популярных методов анализа продуктов деструкции нервнопаралитических отравляющих веществ. Однако низкие пределы обнаружения могут быть достигнуты не только при помощи масс-спектрометрического детектора. Например, в работе [11] детектирование проводили при помощи пламенно-фотометрического детектора. Предел обнаружения МФК составил 8,5 нг/мл. Несмотря на довольно низкие пределы обнаружения существенным

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; e-mail: timurbaychem@gmail.com

² Костромской государственный технологический университет, г. Кострома, Россия.

недостатком ГХ является необходимость дериватизации, так как АМФК не обладают летучестью. Дериватизация увеличивает время анализа и может приводить к возникновению дополнительной погрешности определения.

Авторы работ [16, 17] использовали ионную хроматографию для определения МФК и других АМФК. В работе [17] удалось достичь низкого предела обнаружения МФК в стандартных образцах — 40 нг/мл. Но ограничением метода является значительное влияние неорганических анионов, присутствующих в реальных образцах. Снижения предела обнаружения и повышения селективности можно добиться применением масс-спектрометрического детектора.

Жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием является конкурирующим с газовой хроматографией по популярности методом определения продуктов гидролиза компонентов химического оружия [18 – 21]. Определение МФК методом ЖХ-МС характеризуется экспрессностью и довольно низкими пределами обнаружения (50 нг/мл).

Данная работа посвящена разработке способа прямого ВЭЖХ-МС/МС определения МФК, характеризующегося быстротой, надежностью и низкими пределами обнаружения.

Растворы и реагенты. В работе использовали следующие соединения: метилфосфоновую кислоту (Sigma-Aldrich, США), ацетонитрил (HPLC grade, Panreac), ацетат аммония (Roth, Германия), муравьиную кислоту (98 %, Panreac, Испания), уксусную кислоту (98 %, Panreac, Испания). Деионизированную воду получали с помощью системы водоподготовки Milli-Q (Millipore, США) из дистиллированной воды.

Подвижные фазы и рабочие растворы готовили растворением необходимых навесок в деионизированной воде с последующей дегазацией в ультразвуковой ванне в день проведения анализа.

На начальном этапе работы по точной навеске сухого вещества был приготовлен концентрированный (1 мг/мл) раствор МФК в ацетонитриле. Полученный раствор хранили в герметичных стеклянных

виалах с тefлоновой крышкой при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рабочие растворы МФК готовили из концентрированных растворов путем разбавления в день проведения эксперимента.

Оборудование. Работу выполняли с применением ВЭЖХ-МС/МС-системы Agilent 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, США), состоящей из тройного квадрупольного масс-селективного детектора, оснащенного двумя источниками ионизации (источником химической ионизации при атмосферном давлении и источником электрораспылительной ионизации), ВЭЖХ насоса, позволяющего работать в режиме градиента высокого давления (до 1200 бар), спектрофотометрического детектора, системного контроллера, дегазатора подвижной фазы, термостата колонок и автосемплера.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Acclaim RSLC ($150 \times 2,1$ мм), диаметр зерна сорбента — 2,2 мкм (Dionex, США) в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы использовали 0,5 %-ный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (Б) в соотношении 95:5. Скорость подачи подвижной фазы — 0,4 мл/мин. Время анализа составило 2,5 мин. Регистрацию хроматограмм проводили с помощью персонального компьютера и программных пакетов Agilent MassHunter Workstation (Agilent Technologies, США).

Для измерения pH использовали иономер Sartorius PB-11 (Германия). Массу точных навесок определяли с помощью весов Explorer PRO (OHAUS corp., USA).

Оптимизация параметров детектирования. Спектры прямого ввода получали при помощи переходника нулевого объема, используя растворы МФК с концентрацией 1 мкг/мл. Для выбора оптимальных условий детектирования в ручном режиме варьировали значения входного напряжения и энергии соударений. Масс-спектры были получены при значениях температуры газа-распылителя — $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, газа периферийного слоя — $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, скоростях потока газа-распылителя — 10 л/мин, газа периферийного слоя — 11 л/мин и напряжении 4500 В.

Пробоподготовка. Образцы природных вод центрифугировали для осаждения нерастворимых примесей, помещали в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов, пропускали через шприцевой фильтр Chromafil Xtra с размером пор 0,45 мкм и вводили 20 мкл пробы в хроматограф.

Анализ образцов природных вод. В работе исследовали образцы природных вод, характеристики которых представлены в табл. 1. Для проверки правильности разработанного подхода к исследуемому образцу добавляли определенное количество стандартного раствора МФК (100 нг/мл).

С использованием системы прямого ввода в масс-спектрометр для МФК были получены спектры ионов-предшественников и фрагментных ионов. После обработки этих спектров выбрали характери-

Таблица 1. Химический состав образцов вод

Параметр	Природная вода	Вода из скважины	Водопр-водная вода
Цветность в градусах	9	0	1,5
Мутность, ЕМФ, мг/л	2	0,6	0,4
Водородный показатель (pH)	7,00	7,25	7,05
Общая жесткость, мг-экв/л	4,6	4,9	6,18
Хлориды, мг/л	3,1	15,1	1,39
Сульфаты, мг/л	7,2	23,0	9,24
Марганец, мг/л	0,009	0,054	0,028
Фториды, мг/л	1,3	0,07	0,49
Железо общ., мг/л	0,08	0,06	0,18
Медь, мкг/л	40	29,8	1,22
Нитраты, мг/л	3,1	4,5	15

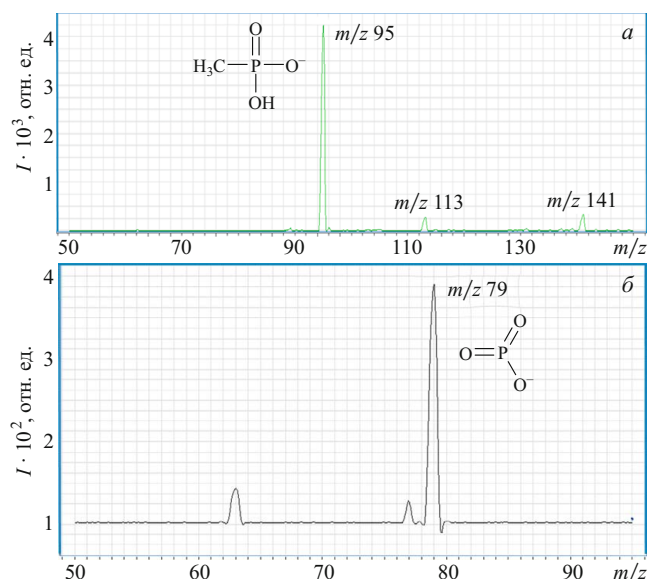


Рис. 1. Масс-спектры прямого ввода стандартного образца МФК (а) и дочерних ионов депротонированной молекулы МФК $[M - H]^-$ с m/z 95 (б)

стические ионы, по которым проводили масс-спектрометрическое детектирование. На рис. 1 представлен масс-спектр, полученный в режиме сканирования, и спектр фрагментных ионов, полученных из депротонированной молекулы МФК.

Из рис. 1 видно, что в масс-спектре МФК присутствует интенсивный сигнал с m/z 95, соответствующий депротонированной молекуле МФК, а также два сигнала с m/z 113 и 141, соответствующих аддуктам депротонированной молекулы МФК с молекулой воды и муравьиной кислоты. В спектре ионов-продуктов преобладает сигнал с m/z 79, которому соответствует молекула, образующаяся в ячейке соударений при потере метильной группы. Исходя из полученных масс-спектров для определения выбрали ионный переход с m/z 95 → 79, а для качественного подтверждения — переход m/z 95 → 63.

Оптимизация состава подвижной фазы. Для выбора наиболее подходящего состава подвижной фазы в качестве первого компонента использовали водные растворы муравьиной кислоты (0,5 %), ацетата аммония (5 ммоль/л) и их смеси с уксусной кислотой и гидроксидом аммония. В качестве второго компонента подвижной фазы использовали ацетонитрил. Получали зависимость интенсивности сигнала депротонированной молекулы (m/z 95) от pH подвижной фазы (рис. 2).

Из рис. 2 можно сделать вывод, что интенсивность сигнала иона депротонированной молекулы МФК максимальна при значении pH 2,4, соответствующем pH 0,5 %-ного раствора муравьиной кислоты в воде. Таким образом, наиболее подходящей подвижной фазой является смесь 0,5 %-ного водного

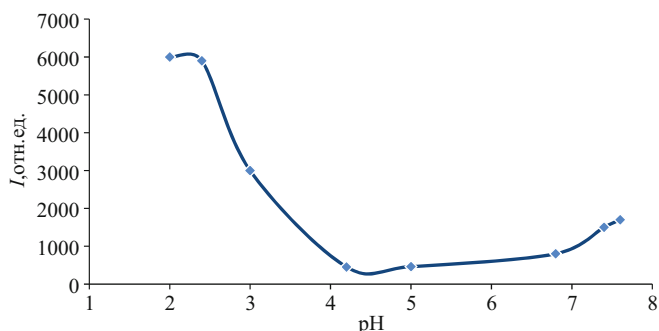


Рис. 2. Зависимость интенсивности сигнала иона $[M - H]^-$ с соотношением m/z 95 от pH подвижной фазы

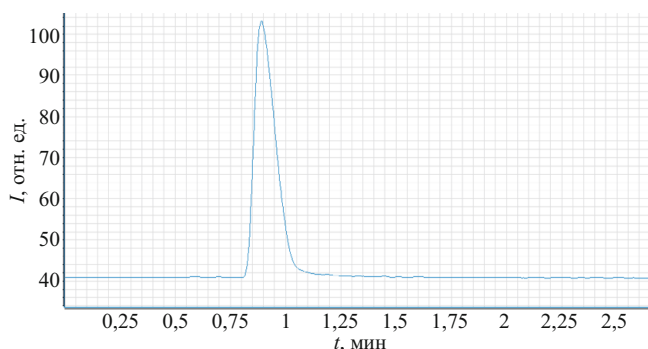


Рис. 3. Хроматограмма по ионному переходу 95 → 79 природной воды с добавкой 100 нг/мл раствора МФК

раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила в объемном отношении 95:5.

Оптимизация масс-спектрометрических параметров. На следующей стадии работы оптимизировали параметры масс-спектрометрического детектирования, такие как потенциал на входе в масс-анализатор (Fragmentor) и энергия соударений (CE). Указанные параметры варьировали с целью получения максимальной интенсивности сигнала ионов с m/z 95, 79 и 63 и, следовательно, максимальной чувствительности определения. Выяснено, что наибольшая интенсивность сигнала ионов с m/z 95, 79 и 63 наблюдается для потенциала на входе в масс-анализатор 50 В, а оптимальное значение энергии соударений составляет 20 В для m/z 79 и 25 В для m/z 63.

Оптимизировали параметры масс-спектрометра. Изменение скорости потока газа-распылителя от 8 до 10 л/мин и температуры газа-распылителя от 200 до 350 °С привело к десятикратному увеличению сиг-

Таблица 2. Результаты определения МФК методом «введено — найдено» ($n = 3$; $P = 0,95$)

Проба воды	Введено в смеси, нг/мл	Найдено, нг/мл
Природная вода	100	98 ± 5
Вода из скважины	100	96 ± 7
Водопроводная вода	100	105 ± 9

нала, соответствующего ионному переходу $95 \rightarrow 79$ и $95 \rightarrow 63$.

Апробация разработанного подхода. Разработанный подход применяли при анализе природных вод (см. табл. 1). Правильность разработанного подхода определяли методом «введено – найдено» (табл. 2). На рис. 3 представлена хроматограмма образца природных вод с добавкой 100 нг/мл МФК, полученная при оптимальных условиях разделения и детектирования.

Характеристики прямого ВЭЖХ-МС/МС определения МФК приведены ниже:

Линейный динамический диапазон, нг/мл. 30 – 1000
Уравнение градуировочной зависимости $y = 570x$
 R^2 0,99
Наименьшая определяемая концентрация, нг/мл 30
Предел обнаружения, нг/мл. 10

Таким образом, благодаря высокой чувствительности масс-спектрометрического оборудования удалось достигнуть столь низких пределов обнаружения МФК (10 нг/мл) в таких объектах, как природные воды. Разработанный подход характеризуется экспрессностью, простотой и надежностью, что позволяет проводить быстрый скрининг природных вод в случае их возможного заражения отравляющими веществами.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and their Destruction, Technical Secretariat of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, 1997. URL: <http://www.opcw.nl>.
- Mill T., Gould C. W. Free-radical oxidation of organic phosphonic acid salts in water using hydrogen peroxide, oxygen, and ultraviolet light / Environ. Sci. Technol. 1979. Vol. 13. P. 205 – 208.
- Daughton C. G., Cook A. M., Alexander M. Phosphate and soil binding: factors limiting bacterial degradation of ionic phosphorus-containing pesticide metabolites / Appl. Environ. Microbiol. 1979. Vol. 37. N 3. P. 605 – 609.
- Schowanek D., Verstraete W. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples / Appl. Environ. Microbiol. 1990. Vol. 56. N 4. P. 895 – 903.
- Osamura N., Murata K., Kimura A. Cytosolic C – P Bond Cleavage Activity in Bacterial Cells Isolated from Soil / J. Ferment. Bioeng. 1991. Vol. 71. N 2. P. 128 – 130.
- Lyman W. J., Reehl W. F., Rosenblatt D. H. Handbook of Chemical Property Estimation Methods. — Washington, DC: American Chemical Society, 1990. — 54 p.
- Mercier J.-P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A. Capillary electrophoresis analysis of chemical warfare agent breakdown products I. Counterelectroosmotic separation of alkylphosphonic acids and their monoester derivatives / J. Chromatogr. A. 1996. Vol. 741. P. 279 – 285.
- Mercier J.-P., Morin Ph., Dreux M., Tambute A. Capillary electrophoresis separation of alkylphosphonic acid monoesters with indirect ultraviolet detection / J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 779. P. 245 – 252.
- Oehrlé S. A., Bossle P. C. Analysis of nerve agent degradation products using capillary ion electrophoresis / J. Chromatogr. A. 1995. Vol. 692. P. 247 – 252.
- Rohrbaugh D. K., Sarver E. W. Detection of alkyl methylphosphonic acids in complex matrices by gas chromatography-tandem mass spectrometry / J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 809. P. 141 – 150.
- Sega G. A., Tomkins B. A., Griest W. H. Analysis of methylphosphonic acid, ethyl methylphosphonic acid and isopropyl methylphosphonic acid at low microgram per liter levels in groundwater / J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 790. P. 143 – 152.
- Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H. Determination of the main hydrolysis product of O-ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate, ethyl methylphosphonic acid, in human serum / J. Chromatogr. B. 1997. Vol. 689. P. 327 – 333.
- Tornes J. Aa., Johnsen B. A. Gas chromatographic determination of methylphosphonic acids by methylation with trimethylphenylammonium hydroxide / J. Chromatogr. A. 1989. Vol. 467. P. 129 – 138.
- Pardasani D., Palit M., Gupta A., Kanauija P., Sekhar K., Dubey D. Microemulsion mediated in situ derivatization-extraction and gas chromatography-mass spectrometric analysis of alkylphosphonic acids / J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1108. P. 166 – 175.
- Saradhi V., Prabhakar S., Redy T. J., Vairamani M. Ion-pair solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of acidic hydrolysis products of chemical warfare agents from aqueous samples / J. Chromatogr. A. 2006. Vol. 1129. P. 9 – 13.
- Pianetti G. A., Moreira de Campos L. M. Application of ion chromatography with indirect spectrophotometric detection to the sensitive determination of alkylphosphonic acids and fosfomycin / Anal. Chim. Acta. 1993. Vol. 284. P. 291 – 299.
- Katagi M., Nishikawa M., Tatsuno M., Tsuchihashi H. Determination of the main hydrolysis products of organophosphorus nerve agents, methylphosphonic acids, in human serum by indirect photometric detection ion chromatography / J. Chromatogr. B. 1997. Vol. 698. P. 81 – 88.
- Creasy W. R. Postcolumn Derivatization Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Detection of Chemical-Weapons-Related Compounds / J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999. Vol. 10. P. 440 – 447.
- Black R. M., Read R. W. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry, and tandem mass spectrometry, to the analysis and identification of degradation products of chemical warfare agents / J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 759. P. 79 – 92.
- Black R. M., Read R. W. Analysis of degradation products of organophosphorus chemical warfare agents and related compounds by liquid chromatography-mass spectrometry using electrospray and atmospheric pressure chemical ionization / J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 794. P. 233 – 244.
- Hayes T. L., Kenny D. V., Hernon-Kenny L. Feasibility of direct analysis of saliva and urine for phosphonic acids and thiodiglycol-related species associated with exposure to chemical warfare agents using LC-MS/MS / J. Med. Chem. Def. 2004. Vol. 2. N 1. P. 121 – 127.