

Особенности характеристики триалкилтиофосфатов индексами удерживания в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией

**И.Г. Зенкевич, ¹Т.И. Пушкарева, ²Г.В. Каракашев*

¹Санкт-Петербургский государственный университет,
Российская Федерация, 198504, С-Петербург, Университетский просп., 26

²Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»
Федерального медико-биологического агентства (ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России),
Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский район,
г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. № 93.

*Адрес для переписки: Зенкевич Игорь Георгиевич, E-mail: izenkevich@yandex.ru

Поступила в редакцию 22 июля 2019 г., после исправления – 27 августа 2019 г.

Хроматомасс-спектрометрическая характеристика 12 гомологов ряда триалкилтиофосфатов в режиме ВЭЖХ-МС включала определение их индексов удерживания (**RI**) и регистрацию масс-спектров с ионизацией электрораспылением при детектировании положительно заряженных ионов. Подтверждена корреляция RI(ВЭЖХ) триалкилтиофосфатов и RI(ГЖХ) их структурных аналогов – триалкилфосфатов. Установлено, что зависимость RI(ВЭЖХ) от молекулярных масс гомологов с высокой точностью может быть аппроксимирована уравнением линейной регрессии, $RI = aM + b$. Аномалии этой зависимости обусловлены тем, что в ГЖХ разветвления углеродного скелета молекул гомологов существенно влияют на характеристики удерживания, а в ВЭЖХ проявляются в незначительной степени. Впервые рассмотрены возможности использования гомологических инкрементов индексов удерживания, $i_{RI} = RI - xDRI(CH_2)$, где $x = \text{int}(M/14)$, int – функция, обозначающая целую часть частного от деления молекулярного массового числа на 14, эквивалентная записи $M = 14x + y$, y_M – номер гомологической группы соединения, $y_M \equiv M(\text{mod}14)$, $DRI(CH_2)$ – инкремент индекса удерживания для гомологической разности CH_2 (в ГЖХ равен 100). Показано, что в ВЭЖХ этот инкремент может принимать другие значения; например в ряду триалкилтиофосфатов более информативна величина $DRI(CH_2) = 74$. Применение концепции i_{RI} наиболее эффективно для выявления соединений, масс-спектры которых незначительно отличаются от масс-спектров целевых аналитов. В случае триалкилтиофосфатов это продукты частичного гидролиза таких эфиров – диалкилтиофосфаты $(RO)_2P(S)-OH$, которые не могут быть проанализированы методом ГЖХ из-за наличия активного атома водорода в молекулах.

Ключевые слова: Триалкилтиофосфаты, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, индексы удерживания, гомологические инкременты индексов удерживания, обнаружение диалкилтиофосфатов в реакционных смесях.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 3, pp. 425-433

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.3.012

Features of trialkyl thiophosphates characterization by the retention indices in HPLC combined with the mass spectrometric data

**Igor G. Zenkevich, ¹Tatiana I. Pushkareva, ²Georgy V. Karakashev*

¹St. Petersburg State University, Universitetskii prosp., 26, St. Petersburg, 198504, Russian Federation

²Research Institute of hygiene, occupational pathology, and human ecology, Federal Medico-Biological Agency,
p/o Kuzmolovsky, Vsevolozhsky District, Leningrad reg., 188663, Russian Federation

*Corresponding author: Igor G. Zenkevich, E-mail: izenkevich@yandex.ru

HPLC-MS characterization of 12 homologues of trialkyl thiophosphate series was conducted including the determination of their retention indices (RI) and the registration of the mass spectra with the electrospray ionization in the positive mode. The correlation of RI(HPLC) and RI(GC) values for trialkyl phosphates was confirmed. It was revealed that the dependence of RI(HPLC) vs. molecular masses of homologues with the high precision could be approximated by the linear regression $RI = aM + b$. The anomalies of this dependence were caused by the features of two analytical methods: the branches of the carbon skeleton of analytes' molecules strongly influence the GC retention parameters, while in HPLC such influence is much less. The possibilities of the application of so-called homologous increments of retention indices, $i_{RI} = RI - xDRI(CH_2)$, where $x = \text{int}(M/14)$, "int" is the integer part of the quotient from the division of the molecular mass number by 14, that is equivalent to $M = 14x + y$, y_M – the number of homologous group of analyte, $y_M \equiv M(\text{mod}14)$, $DRI(CH_2)$ – the retention index increment of homologous difference CH_2 (in GC it is equal to 100) were considered. It was demonstrated that in HPLC this increment may not be equal to 100; for instance, for trialkyl thiophosphates the more informative value was $DRI(CH_2) = 74$. The application of the i_{RI} concept seems to be most useful for revealing the compounds which mass spectra are like those of the target analytes. In the case of trialkyl thiophosphates these are the products of their partial hydrolysis – dialkyl thiophosphates $(RO)_2PS-OH$. These acidic esters could not be analyzed using the GC techniques due to the presence of active hydrogen atoms in their molecules.

Keywords: Trialkyl thiophosphates, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, electrospray ionization, retention indices, homologous increments of retention indices, revealing dialkyl thiophosphates in reaction mixtures.

ВВЕДЕНИЕ

Детальный анализ содержания подробных массивов справочной информации для хромато-масс-спектрометрической идентификации органических соединений (в том числе, базы данных NIST [1]) позволяет выявлять недостаточно подробно охарактеризованные в настоящее время объекты (как гомологические ряды, так и конкретные соединения) в качестве обоснования необходимости их первоочередного рассмотрения. К числу таких соединений относятся многие эфиры неорганических кислот [2-5]. Наиболее информативным дополнением к масс-спектрам ионизации электронами (ЭИ) считают газохроматографические индексы удерживания (RI) [1]. Аналогичное представление параметров удерживания в форме индексов известно и в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), но его используют существенно реже [6-9].

Вместе с тем, необходимость привлечения определяемых одновременно с регистрацией масс-спектров хроматографических параметров для сочетания ВЭЖХ-МС представляется даже более актуальной, чем для сочетания ГХ-МС. Это обусловлено меньшей структурной информативностью масс-спектров с ионизацией электрораспылением по сравнению со стандартными масс-спектрами ЭУ, особенно с учетом того факта, что объем баз данных для tandemной масс-спектрометрии (МС-МС) [1] существенно уступает объему баз масс-спектров ИЭ [1]. Дублирование ГХ-МС анализа одних и тех же образцов в варианте ВЭЖХ-МС может оказаться источником ценной информации. Так, например, ВЭЖХ-МС анализ нескольких содержащих триалкилфосфиты и диалкилфосфонаты реакционных смесей позволил выявить окисление этих соединений растворенным кислородом атмосферного воздуха с образованием три- и диалкилфосфатов, соот-

ветственно [10]. В реакционной смеси 1-гептанола с PCl_3 обнаружено два продукта, соответствующих по массе диэфиру $C_{14}H_{31}O_3P$, но существенно различающихся по параметрам удерживания. Гидрофобный продукт представляет собой дигептилфосфонат $(C_7H_{15}O)_2PH=O$, тогда как гидрофильный изомер может соответствовать «классическому» дигептилфосфиту $(C_7H_{15}O)_2P-OH$.

Настоящая работа посвящена характеристике O,O,O-триалкилтиофосфатов $(RO)_3PS$ аналитическими параметрами в условиях ВЭЖХ-МС анализа. Для соединений этого ряда ранее были известны только масс-спектры ИЭ всего трех гомологов (триметил-, триэтил- и триизопропил) [1]; единственное известное значение RI трибутилтиофосфата на стандартной неполярной неподвижной фазе (1680 ± 2) определено в работе [5].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исходные реагенты: в работе использовали тиофосфорилхлорид $PSCl_3$ (Aldrich, CAS № 3982-91-0, содержание основного вещества 98 %) и препараты алифатических спиртов (квалификации «ч» или «для хроматографии»): этанола, 1-пропанола, 2-пропанола, 1-бутанола и 1-гексанола. В качестве растворителя – хлороформ квалификации «ч» без дополнительной очистки. Из-за присутствия следов этанола в хлороформе все реакционные смеси кроме триалкилтиофосфатов $(RO)_3PS$ содержат алкилдиэтилтиофосфаты $(RO)(C_2H_5O)_2PS$ и диалкилэтилтиофосфаты $(RO)_2(C_2H_5O)PS$ [5].

Условия взаимодействия спиртов с $PSCl_3$ были аналогичными использованным в работе [5]: к 100-400 мкл спирта (1.7 – 2.3 ммоль) в 1 мл хлороформа прибавляли 100 мкл (1.1 ммоль) тиофосфорилхлорида. Реакционные смеси выдерживали в течение 1-3 час. Для последующего анализа методов ОФ

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием реакционные смеси разбавляли ацетонитрилом в 1000 раз.

Условия анализа методом ОФ ВЭЖХ: Анализ проводили на хроматографе Thermo Scientific Accela с масс-спектрометрическим детектором, колонкой Acquity UPLC HSS T3 длиной 100 мм, внутренним диаметром 2.1 мм и диаметром частиц сорбента 1.8 мкм, и предколонкой, заполненной таким же сорбентом. Расход элюента 300 мкл/мин, объем проб 5 мкл, температура термостата колонки 30 °С. Фаза А: вода / ацетонитрил / муравьиная кислота (99 / 1 / 0.1 об.); фаза В: вода / ацетонитрил / муравьиная кислота (10 / 90 / 0.1 об.). Градиент: время, мин (содержание фазы В, %): 0 (40), 20 (100). 22(100), 22.5 (40), 26 (40). Мертвое время хроматографической системы (0.9 минут) оценили по водному раствору тиомочевины. Для определения индексов удерживания в образцы добавляли смесь реперных *n*-алкилфенилкетонов: ацетофенона (время удерживания 3.3 минуты, RI = 800), пропиофенона (5.3 мин., RI = 900) и бутирофенона (7.6 минут, RI = 1000).

Условия масс-спектрометрического детектирования. Определение масс ионов в масс-спектрах компонентов смесей использовали масс-спектрометр LTQ Orbitrap Velos с электрораспылительной ионизацией. Газ-осушитель – азот, температура 300 °С, напряжение на капилляре 3.5 кВ. Детектирование положительно заряженных ионов проводили в режиме сканирования по полному ионному току (режим SCAN) в диапазоне m/z от 50 до 1000 в течение всего анализа, построение хроматограмм проводили по суммарному ионному току в диапазоне m/z 100–600, хроматограммы в режиме SIM для m/z иона $[P(OH)_3SH]^+$ записывали по m/z 115 в диапазоне 114.959 – 114.961 Да.

Обработка результатов. Линейно-логарифмические индексы удерживания компонентов реакционных смесей вычисляли с использованием программы QBasic. Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с использованием ПО Excel (Microsoft 2010) и ORIGIN (версии 4.1 и 8.2). Молекулярные формулы всех зарегистрированных в масс-спектрах ионов подтверждены данными масс-спектрометрии высокого разрешения (не менее четырех значащих цифр после запятой).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности состава реакционных смесей алифатических спиртов с тиофосфорилхлоридом. Результаты идентификации компонентов реакционных смесей алканолов с $PSCl_3$ непосредственно после их приготовления (в течение нескольких часов) обсуждаются в работе [5]. Во всех таких смесях не были обнаружены триалкилтиофосфаты $(RO)_3PS$, а основными их компонентами оказались соответствующие алкилдихлортиофосфаты $(RO)PSCl_2$ и диалкилхлортиофосфаты $(RO)_2PSCl$. Однако в результате их хранения до ВЭЖХ-МС анализа

(не менее месяца) указанные промежуточные продукты полностью прореагировали со спиртами. В режиме регистрации положительных ионов во всех образцах обнаружены только алкилтиофосфаты. Единственный хлорсодержащий продукт гидролиза $(C_2H_5O)PO(OH)Cl$ выявлен лишь в реакционной смеси с этанолом.

Аналитические параметры основных компонентов реакционных смесей алифатических спиртов с тиофосфорилхлоридом приведены в табл. 1 и включают времена удерживания (t_R , мин), индексы удерживания (RI), массовые числа ионов $[M + H]^+$ и осколочных ионов, соответствующих наиболее интенсивным сигналам спектров, а также результаты идентификации. Точность оценки наибольших значений RI (набраны курсивом) дигексилэтил- и тригексилтиофосфатов невелика; ее повышение требует существенного расширения количества реперных *n*-алкилфенилкетонов.

На рис. 1 в качестве примера представлена хроматограмма реакционной смеси 1-бутанола с $PSCl_3$ а) по суммарному ионному току в интервале $m/z = 100-600$, б) по массе иона $[P(OH)_3SH]^+$ ($m/z = 115$) в диапазоне 114.959 – 114.961 Да, на которой присутствуют сигналы с временами удерживания 2.9, 6.4 (минорный), 10.6 и 14.3 мин. Отнесение пиков приведено в табл. 1. Первый из них принадлежит не триалкилтиофосфату, а дибутиловому эфиру тиофосфорной кислоты $(C_4H_9O)_2PS(OH)$; еще два аналогичных диалкиловых эфира обнаружены в реакционной смеси 1-гексанола с $PSCl_3$ (этилгексил- и дигексил-). Кроме того, в трех из пяти

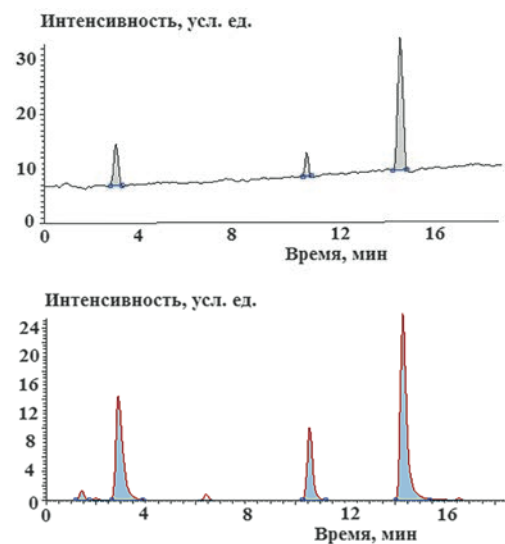


Рис. 1. Хроматограмма реакционной смеси 1-бутанола с $PSCl_3$: а) по суммарному ионному току в интервале $m/z = 100-600$, б) по массе иона $[P(OH)_3SH]^+$ ($m/z = 115$) в диапазоне 114.959 – 114.961 Да. Отнесение пиков приведено в табл. 1.

Fig. 1. Chromatogram of 1-butanol with $PSCl_3$ reaction mixture: а) using TIC (Total Ion Current) within m/z range 100–600, б) using mass of ion $[P(OH)_3SH]^+$ ($m/z = 115$) within range 114.959 – 114.961 Da. For attribution of peaks see Table 1.

Таблица 1

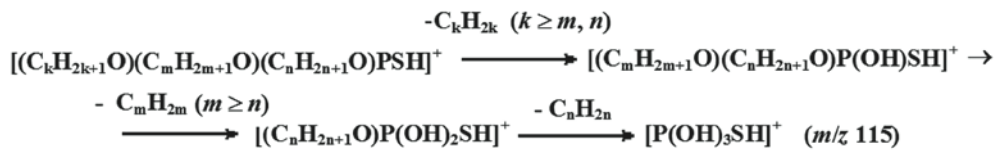
Аналитические параметры (ВЭЖХ-МС, регистрация положительных ионов) основных компонентов реакционных смесей алифатических спиртов с тиофосфорилхлоридом

Table 1

Analytical parameters (HPLC-MS, positive mode) of the aliphatic alcohols principal constituents with thiophosphoryl chloride reaction mixtures

Алканол в реакционной смеси с PSCl ₃	<i>t</i> _R , мин	RI	<i>m/z</i> ионов [M + H] ⁺	<i>m/z</i> осколочных ионов	Результат идентификации (M)
C ₂ H ₅ OH	0.87	-	145* / 147 (3 : 1)	-	(C ₂ H ₅ O)PO(OH)Cl (144)
	3.24	794 ± 2	199	171 = 199 – 28 143 = 171 – 28 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O) ₃ PS (198)
1-C ₃ H ₇ OH	4.45**	860 ± 2	213	171 = 213 – 42 143 = 171 – 28 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O) ₂ (C ₃ H ₇ O)PS (212)
	6.34	946 ± 2	227	185 = 227 – 42 143 = 185 – 42 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O)(C ₃ H ₇ O) ₂ PS (226)
	8.47	1038 ± 3	241	199 = 241 – 42 157 = 199 – 42 115 = 157 – 42	(C ₃ H ₇ O) ₃ PS (240)
изо-C ₃ H ₇ OH	0.92	-	-	115, 99	-
	1.10	485	-	143, 115, 99	-
	1.47	614	115	-	H ₃ PO ₃ S (114)
	4.07**	842 ± 2	213	171 = 213 – 42 143 = 171 – 28 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O) ₂ (изо-C ₃ H ₇ O)PS (212)
	5.50	909 ± 2	227	185 = 227 – 42 143 = 185 – 42 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O)(изо-C ₃ H ₇ O) ₂ PS (226)
	7.50	996 ± 2	241	199 = 241 – 42 157 = 199 – 42 115 = 157 – 42	(изо-C ₃ H ₇ O) ₃ PS (240)
1-C ₄ H ₉ OH	1.43**	-	115	-	H ₃ PO ₃ S (114)
	2.91	776 ± 2	227	171 = 227 – 56 115 = 171 – 56	(C ₄ H ₉ O) ₂ PS(OH) (226)
	6.43**	950 ± 2	227	171 = 227 – 56 143 = 171 – 28 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O) ₂ (C ₄ H ₉ O)PS (226)
	10.60	1121 ± 3	255	199 = 255 – 56 143 = 199 – 56 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O)(C ₄ H ₉ O) ₂ PS (254)
	14.31	1263 ± 5	283	227 = 283 – 56 171 = 227 – 56 115 = 171 – 56	(C ₄ H ₉ O) ₃ PS (282)
1-C ₆ H ₁₃ OH	1.52**	-	115	-	H ₃ PO ₃ S (114)
	3.05	785 ± 2	227	143 = 227 – 84 115 = 143 – 28	(C ₆ H ₁₃ O)(C ₂ H ₅ O)PS(OH) (226)
	10.56	1119 ± 4	283	199 = 283 – 84 115 = 199 – 84	(C ₆ H ₁₃ O) ₂ PS(OH) (282)
	18.06	1402***	311	227 = 311 – 84 143 = 227 – 84 115 = 143 – 28	(C ₂ H ₅ O)(C ₆ H ₁₃ O) ₂ PS (310)
	22.33**		353	145	-
	24.09	1620	367	283 = 367 – 84 199 = 283 – 84 114 = 199 – 84	(C ₆ H ₁₃ O) ₃ PS (366)

Примечания: * – жирным шрифтом здесь и далее набраны значения *m/z* наиболее интенсивных сигналов масс-спектров; ** – минорные компоненты реакционных смесей; *** – курсивом набраны величины, превышающие значение RI последнего из используемых реперных компонентов (бутирофенон, RI = 1000) более чем на 300 ед. индекса, что снижает их точность.



Схема

реакционных смесей обнаружен один и тот же гидрофильный компонент с временем удерживания в диапазоне 1.47 ± 0.05 минуты, в масс-спектре которого регистрируется единственный сигнал с $m/z = 115$. Этим компонентом, наиболее вероятно, является тиофосфорная кислота $\text{H}_3\text{PO}_3\text{S}$ – продукт гидролиза тиофосфорилхлорида.

Фрагментация протонированных ионов $[\text{M}+\text{H}]^+$, образующихся в условиях ионизации электрораспылением, включает последовательное отщепление трех олефиновых фрагментов по мере уменьшения в них числа атомов углерода так, как это представлено на схеме.

Процесс заканчивается образованием не содержащих углерода ионов $[\text{P(OH)}_3\text{SH}]^+$ с $m/z = 115$. Сигналы аналогичных по механизму образования ионов характеристичны в масс-спектрах большинства производных фосфорных кислот в условиях ИЭ [5]. На рис. 2 приведен типичный масс-спектр трибутилтиофосфата, в котором практически нет сигналов ионов, отличающихся от указанных на схеме.



Рис. 2. Масс-спектр (ES) трибутилтиофосфата ($M = 282$, $t_R = 14.31$ мин). Отнесение пиков: $m/z = 283$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 227 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 171 $[\text{M}+\text{H}-2\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 115 $[\text{M}+\text{H}-3\text{C}_4\text{H}_9]^+$ ° $[\text{P(OH)}_3\text{SH}]^+$. Сигналы с $m/z = 305$ и 322 принадлежат ионам $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и $[\text{M}+\text{K}]^+$, соответственно.

Fig. 2. Mass spectrum (ES) of tributyl thiophosphate ($M = 282$, $t_R = 14.31$ min). Attribution of peaks: $m/z = 283$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 227 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 171 $[\text{M}+\text{H}-2\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 115 $[\text{M}+\text{H}-3\text{C}_4\text{H}_9]^+$ ° $[\text{P(OH)}_3\text{SH}]^+$. Signals with $m/z = 305$ and 322 belong to ions $[\text{M}+\text{Na}]^+$ and $[\text{M}+\text{K}]^+$ respectively.

Особенности взаимной корреляция индексов удерживания в ГЖХ и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Несмотря на то, что механизмы удерживания аналитов в газо-жидкостной хроматографии и обращенно-фазовой ВЭЖХ различны [11], закономерности вариаций таких интерполяционных характеристик удерживания как индексы удерживания в гомологических рядах во многом аналогичны. По этой причине представляется целесообразным рассмотреть такую «нестандартную» задачу как взаимная корреляция величин $\text{RI}(\text{ГЖХ})$ и $\text{RI}(\text{ВЭЖХ})$ для одних и тех же соединений. Важнейшая практическая цель такой корреляции – пересчет справочных значений индексов удерживания для того варианта хроматографического разделения, для которого они более подробны (чаще всего это ГЖХ), в тот, который хуже охарактеризован (что чаще встречается для ВЭЖХ). Поскольку и в одном, и в другом методах разности индексов удерживания гомологов пропорциональны свободным энергиям взаимодействия гомологической разности CH_2 либо с сорбентом (ВЭЖХ), либо с неподвижной фазой (ГЖХ), то *a priori* можно предполагать линейную корреляцию $\text{RI}(\text{ВЭЖХ})$ и $\text{RI}(\text{ГЖХ})$:

$$\text{RI}(\text{ВЭЖХ}) = a\text{RI}(\text{ГЖХ}) + b. \quad (1)$$

Однако возможности проверки этого соотношения ограничены количеством доступных справочных данных, причем чаще лимитированы данные в ВЭЖХ. В данной же работе достаточно надежно определены $\text{RI}(\text{ВЭЖХ})$ десяти триалкилтиофосфатов (если не принимать во внимание два максимальных значения в табл. 1, соответствующих наиболее «удаленной» экстраполяции), но известно только единственное значение $\text{RI}(\text{ГЖХ})$ для трибутилтиофосфата (1680 ± 2) [5]. Таким образом, непосредственное применение уравнения (1) для триалкилтиофосфатов пока еще затруднительно по причине, для преодоления которой его и предполагается использовать. С целью более эффективного применения соотношения (1) можно модифицировать его химическую «область определения», а именно вместо $\text{RI}(\text{ГЖХ})$ для триалкилтиофосфатов $(\text{RO})_3\text{PS}$ использовать данные для их подробнее охарактеризованных структурных аналогов, например, триалкилфосфатов $(\text{RO})_3\text{PO}$. При таких посылках уравнение (1) можно записать в модифицированном виде:

$$\text{RI}(\text{ВЭЖХ}, \text{ряд } 1) = a'\text{RI}(\text{ГЖХ}, \text{ряд } 2) + b', \quad (2)$$

где гомологи ряда (2) взаимно-однозначно соответствуют их структурным аналогам ряда (1).

Даже в этом случае для вычисления параметров интересующей нас линейной регрессии (1) доступны данные для всего четырех пар соединений: триэтил-, трипропил-, триизопропил- и трибутилтио- и -фосфатов, соответственно. График соответствующей уравнению (1) линейной зависимости приведен на рис. 3; параметры этого уравнения указаны в подписи к рисунку.

Для трех гомологов, содержащих нормальные алкильные фрагменты, линейная зависимость характеризуется высоким коэффициентом корреляции ($R = 0.9998$), однако положение точки, соответствующей триизопропилтиофосфату и триизопропилфосфату, аномально. Причиной этой аномалии как раз и являются различные механизмы удерживания. В ГЖХ появление разветвлений углеродного скелета в алкильных заместителях уменьшает как температуры кипения анализов, так и симбатные им индексы удерживания. Напротив, в ОФ ВЭЖХ последовательности элюирования гомологов определяются характеристиками их гидрофобности, на которую число разветвлений углеродного скелета алкильных фрагментов молекул влияет в весьма незначительной степени. В соответствии с этим, положение точки для триизопропиловых эфиров относительно точки для трипропиловых эфиров по оси абсцисс (ГЖХ) меньше на 190 ед. инд., но по оси ординат (ВЭЖХ) – всего на 40. Таким образом, именно эта особенность препятствует объединению данных для любых гомологов единими регрессионными соотношениями.

С другой стороны, если разветвления углеродного скелета слабо влияют на параметры удерживания в ОФ ВЭЖХ (в отличие от ГЖХ), то это дает возможность использовать линейное регрессионное уравнение,

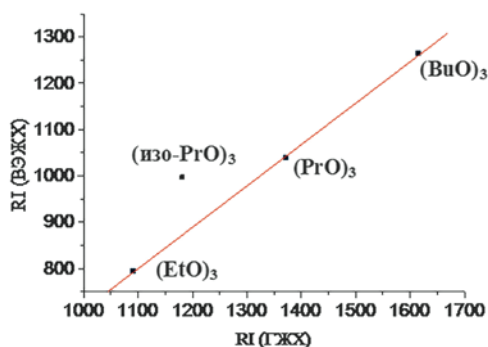


Рис. 3. Линейная зависимость индексов удерживания триалкилтиофосфатов в обращенно-фазовой ВЭЖХ от индексов удерживания триалкилфосфатов в ГЖХ. Параметры уравнения линейной регрессии: $a = 0.893 \pm 0.015$, $b = -182 \pm 21$, $R = 0.9998$, $S_0 = 5.7$. Точка, соответствующая триизопропиловым эфирам, выпадает из этой зависимости.

Fig. 3. Linear dependence of trialkyl thiophosphate retention indices in the reversed phase HPLC vs. trialkyl phosphates GC retention indices. The parameters of linear regression were as follows: $a = 0.893 \pm 0.015$, $b = -182 \pm 21$, $R = 0.9998$, $S_0 = 5.7$. The point for triisopropyl esters did not correspond to this dependence.

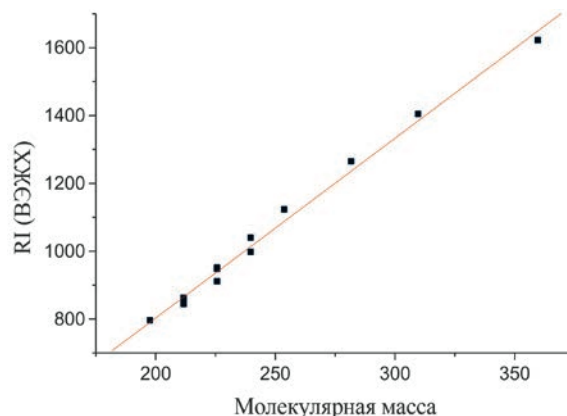


Рис. 4. Линейная зависимость индексов удерживания RI(ВЭЖХ) триалкилтиофосфатов от их молекулярных масс. Параметры уравнения линейной регрессии $RI = aM + b$: $a = 5.30 \pm 0.15$, $b = -257 \pm 38$, $R = 0.996$, $S_0 = 24$.

Fig. 4. Linear dependence of RI(HPLC) retention indices of trialkyl thiophosphates vs. their molecular masses. Parameters of linear regression $RI = aM + b$: $a = 5.30 \pm 0.15$, $b = -257 \pm 38$, $R = 0.996$, $S_0 = 24$.

связывающее молекулярные массы гомологов с их индексами удерживания вне зависимости от структуры их молекул:

$$RI = aM + b \quad (3)$$

На рис. 4 представлен иллюстрирующий соотношение (3) график, а в подписи к нему приведены параметры соответствующей линейной регрессии. Значение дисперсии S_0 в первом приближении характеризует точность аппроксимации величин RI (в данном случае 24). Это соотношение позволяет проверить, насколько ненадежны набранные курсивом в табл. 1 максимальные значения RI. Для дигексилэтилтиофосфата ($M = 310$) получаем $RI = 5.30 \cdot 310 - 257 \approx 1386$, что принципиально отличается от определенной величины 1402. Однако для тригексилтиофосфата ($M = 366$) $RI = 5.30 \cdot 366 - 257 \approx 1683$, что существенно превышает экспериментальное значение 1620. С учетом такой проверки мы далее используем первое из этих двух значений, тогда как второе исключено.

Особенности гомологических инкрементов хроматографических индексов удерживания в ВЭЖХ-МС. Одновременная регистрация масс-спектров и определение хроматографических индексов удерживания позволяет характеризовать анализы объединенными хроматомасс-спектрометрическими параметрами, в частности, гомологическими инкрементами индексов удерживания i_{RI} :

$$i_{RI} = RI - xDRI(CH_2), \quad (4)$$

где $x = \text{int}(M/14)$, int – функция, обозначающая целую часть частного от деления молекулярного массового числа на 14, эквивалентная записи $M = 14x + y$, y_M – номер гомологической группы соединения, $y_M \equiv M(\text{mod}14)$, $DRI(CH_2)$ – инкремент индексов

Таблица 2

Гомологические инкременты индексов удерживания триалкилтиофосфатов в обращенно-фазовой ВЭЖХ

Table 2

Homologous increments of trialkyl phosphates retention indices in HPLC reversed phase

Набор (RO) в (RO) ₃ PS	M	RI	Гомологические инкременты i_{RI} [при DRI(CH ₂) = 100]	Гомологические инкременты i_{RI} [при DRI(CH ₂) = 74]
(C ₂ H ₅ O) ₃	198	794	-603	-242
(C ₂ H ₅ O) ₂ (C ₃ H ₇ O)	212	860	-640	-250
(C ₂ H ₅ O)(C ₃ H ₇ O) ₂	226	946	-654	-238
(C ₃ H ₇ O) ₃	240	1038	-662	-220
(C ₂ H ₅ O) ₂ (изо-C ₃ H ₇ O)	212	842	-658	-268
(C ₂ H ₅ O)(изо-C ₃ H ₇ O) ₂	226	909	-691	-275
(изо-C ₃ H ₇ O) ₃	240	996	-704	-262
(C ₂ H ₅ O) ₂ (C ₄ H ₉ O)	226	950	-650	-234
(C ₂ H ₅ O)(C ₄ H ₉ O) ₂	254	1121	-679	-211
(C ₄ H ₉ O) ₃	282	1263	-737	-217
(C ₂ H ₅ O)(C ₆ H ₁₃ O) ₂	310	1402	-	-226
(C ₆ H ₁₃ O) ₃	366	-*	-	-
Общее среднее значение i_{RI} :			-668 ± 37	-240 ± 21
То же без учета гомологов с разветвлениями углеродного скелета алкильных фрагментов:			-	-230 ± 13
То же для гомологов, содержащих разветвленные углеродные фрагменты			-	-268 ± 7

Примечание: * – определенное экстраполяцией ненадежное значение не учитывали.

удерживания для гомологической разности CH₂, который в ГЖХ принимают равным 100.

В настоящей работе значениями RI(ВЭЖХ) впервые охарактеризована серия гомологов ряда триалкилтиофосфатов, что позволяет обсудить особенности применения концепции i_{RI} в этом варианте хроматографического разделения.

Одно из важных практических приложений этой концепции – возможность оценки молекулярных масс соединений, не дающих в масс-спектрах ИЭ надежно регистрируемых сигналов молекулярных ионов [3-5], – для варианта ВЭЖХ-МС не слишком актуально, так как вероятность обнаружения сигналов протонированных ионов [M + H]⁺ в условиях электрораспылительной ионизации достаточно высока. Актуальность другого применения – дифференциации гомологов с нормальными и разветвленными углеводородными заместителями – также невелика из-за отмеченной выше особенности метода ВЭЖХ, а именно слабой зависимости гидрофобности аналитов от числа разветвлений углеродного скелета молекул. В табл. 2 суммированы все значения RI(ВЭЖХ) триалкилтиофосфатов и вычисленные на их основании по соотношению (4) при DRI(CH₂) = 100 значения i_{RI} . Поскольку значениями i_{RI} можно характеризовать как отдельные соединения, так и соответствующие гомологические ряды, то усреднение данных для всех гомологов дает величину -668 ± 37. При этом никаких особых аномалий для гомологов, содержащих разветвленные (изопропильные) заместители, не наблюдается.

Если обратить внимание на зависимость RI(ВЭЖХ) от молекулярных масс гомологов (3), то коэффициент “а” этой зависимости соответствует вариациям RI на единицу молекулярной массы (1 Да). Следовательно, в расчете на массу гомологической разности CH₂ вариации RI в ряду триалкилтиофосфатов в среднем составляют 5.30·14 = 74.2 ≈ 74 ед. инд., что существенно меньше 100. Это может означать, что общее соотношение для гомологических инкрементов индексов удерживания в ВЭЖХ вида (4) сохраняет свое значение, но значение инкремента DRI(CH₂) может быть не равно 100. Этот вопрос достаточно сложен для того, чтобы на него можно было ответить в рамках данной публикации, поскольку если значения DRI(CH₂) неодинаковы для разных рядов, практическая ценность соотношения (4) снижается. В табл. 2 дополнительно включены значения i_{RI} , вычисленные при DRI(CH₂) = 74, но какие-либо обобщения на применимость такой модификации соотношения (4) к другим рядам сделать пока еще (без существенного расширения числа охарактеризованных рядов) нельзя.

Значения i_{RI} , вычисленные при условии DRI(CH₂) = 74, заметно различаются для соединений, содержащих и не содержащих разветвленные углеводородные заместители, несмотря на то, что в ВЭЖХ влияние этого фактора несравнимо меньше, чем в ГЖХ. Так, для эфиров, содержащих только *n*-алкильные заместители, среднее значение $\langle i_{RI} \rangle$ равно -230 ± 13, а при наличии одной или двух изопропильных групп -268 ± 7.

Главным же преимуществом использования концепции i_{RI} представляется возможность выявления соединений с масс-спектрами, трудно отличимыми от масс-спектров целевых аналитов. Для эфиров многоосновных органических и неорганических кислот наибольшую «опасность» представляют кислые эфиры, соответствующие замещению не всех активных атомов водорода алкильными заместителями. Из данных табл. 1 следует, что таких кислых эфиров в реакционных смесях было обнаружено три: дибутил- ($M = 226$, $RI = 776$), гексилэтил- ($M = 226$, $RI = 785$) и дигексилтиофосфаты ($M = 292$, $RI = 1119$). Вычисленные по этим данным значения i_{RI} [при условии $DRI(CH_2) = 74$] составляют -408, -399 и -361, соответственно. Их средняя величина (-389 ± 24) статистически значимо отличается от средней для триалкилтиофосфатов (-230 ± 13), что подтверждает возможность надежной дифференциации таких эфиров по данным ВЭЖХ-МС анализа. Важно заметить, что прямой газохроматографический анализ подобных диалкиловых эфиров монотиофосфорной кислоты невозможен (так же, как и диалкилфосфатов [2]) из-за наличия активного атома водорода в их молекулах, вследствие чего они требуют дериватизации [12, 13].

ВЫВОДЫ

Таким образом, на примере серии гомологов ряда триалкилтиофосфатов показано, что их характеристика объединенными хроматомасс-спектрометрическими параметрами целесообразна не только в ГХ-МС, но и в варианте ВЭЖХ-МС анализа. По значениям гомологических инкрементов индексов удерживания $i_{RI} = RI - xDRI(CH_2)$ можно различать триалкилтиофосфаты и продукты их частичного гидролиза – диалкилтиофосфаты.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в соответствии с темой и при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-03-00151а). Авторы выражают благодарность руководству ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА за предоставленную возможность использования аналитического оборудования.

ACKNOWLEDGEMENTS

Current work was fulfilled in accordance with the content and under the financial support of RFBR grant № 18-03-00151a. The authors are grateful to the authorities of The Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology, and Human Ecology (St. Petersburg, Russia) for the permission of using the analytical equipment.

ЛИТЕРАТУРА

1. The NIST 17 Mass Spectral Library (NIST17/2017/EPA/NIH). Software/Data Version (NIST17); NIST Standard Reference Database, Number 69, June 2017. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899: <http://webbook.nist.gov> (дата обращения: июль 2019 г.).

- Zenkevich I.G., Nosova V.E. Ограничения газохроматографического анализа соединений с активными атомами водорода. Диалкилфосфаты // Аналитика и контроль. 2016. Т. 20, № 4. С. 307-313.
- Zenkevich I.G., Nosova V.E. Хромато-масс-спектрометрическая характеристика диалкилфосфитов // Журн. аналит. химии. 2018. Т. 73, № 12. С. 906-921.
- Zenkevich I.G., Nosova V.E. Особенности обнаружения триалкилфосфитов в составе реакционных смесей и их хроматомасс-спектрометрическая характеристика // Масс-спектрометрия. 2018. Т. 15, № 2. С. 119-131.
- Zenkevich I.G., Nosova V.E. Газохроматографические индексы удерживания в хроматомасс-спектрометрической идентификации алкилдиалорфосфатов, диалкилхлорфосфатов и их тиоаналогов // Масс-спектрометрия. 2019. Т. 16, № 1. С. 58-72.
- Smith R.M. Alkyl aryl ketones as a retention index scale in liquid chromatography // J. Chromatogr. 1982. V. 236, P. 313-320.
- Smith R.M. Retention and Selectivity in Liquid Chromatography. Ser. J. Chromatogr. Library. Amsterdam: Elsevier, 1965. 462 p.
- Bogusz N., Aderjan P. Improved standardization in reversed phase high performance liquid chromatography using 1-nitroalkanes as a retention index scale // J. Chromatogr. 1988. V. 435, P. 43-53.
- Retention indices as the most reproducible retention parameters in reversed phase HPLC. Calculation for hydrophilic phenolic compounds using reference n-alkyl phenyl ketones / I.G. Zenkevich [et al.] // J. Liquid Chrom. & Related Technol. 2005. V. 28, P. 2141-2162.
- Zenkevich I.G., Пушкарева Т.И., Носова В.Э. ВЭЖХ-МС разделение и детектирование диалкилфосфонатов и триалкилфосфитов в реакционных смесях 1-алканолов с трихлоридом фосфора // Аналитика и контроль. 2018. Т. 22, № 3. С. 259-266.
- Аналитическая химия / Под ред. Л.Н. Москвина. М.: Академия, 2008-2010. В 3-х тт.
- Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS-MS with isotopic internal standards / R. Bravo et al.] // J. Anal. Toxicol. 2002. V. 26, № 4. P. 245-252.
- De Alwis G.K.H., Needham L.I., Barr D.B. Determination of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine by automated solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography – mass spectrometry // J. Anal. Toxicol. 2008, vol. 32, pp. 721-727.

REFERENCES

- The NIST 17 Mass Spectral Library (NIST17/2017/EPA/NIH). Software/Data Version (NIST17); NIST Standard Reference Database, Number 69, June 2017. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899: <http://webbook.nist.gov> (Accessed: July 2019 г.).
- Zenkevich I.G., Nosova V.E. [Restrictions of GC analysis of compounds with active hydrogen atoms. Dialkyl phosphates]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2016, vol. 20, no. 4, pp. 307-313 (In Russian). doi: 10.15826/analitika.2016.20.4.007.
- Zenkevich I.G., Nosova V.E. Characterization of dialkyl phosphites by gas chromatography – mass spectrometry. *J. Analyt. Chem. (Russ.)*. 2018, vol. 73, no. 12. pp. 1162-1176. doi: 10.1134/S1061934818090150.
- Zenkevich I.G., Nosova V.E. [Features of the trialkyl phosphites revealing in reaction mixtures and their GC-MS characterization]. *Mass spectrometria* [Mass spectrometry].

- 2018, vol. 15, no. 2, pp. 119-131. (In Russian)./ doi: 10.25703/MS.2018.15.27.
5. Zenkevich I.G., Nosova V.E. [Gas chromatographic retention indices in GC-MS identification of alkyl dichlorophosphates, dialkyl; chlorophosphates, and their thioanalogues]. *Mass spectrometria* [Mass spectrometry]. 2019, vol. 16, no. 1, pp. 58-72. (In Russian). (In Russian). doi: 10.25703/MS.2019.16.18.
6. Smith R.M. Alkyl aryl ketones as a retention index scale in liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1982, vol. 236, pp. 313-320. doi: 10.1016/S0021-9673(00)84880-3.
7. Smith R.M. Retention and Selectivity in Liquid Chromatography. Ser. J. Chromatogr. Library. Vol. 57. Amsterdam: Elsevier, 1995. 462 p.
8. Bogusz N., Aderjan P. Improved standardization in reversed phase high performance liquid chromatography using 1-nitroalkanes as a retention index scale. *J. Chromatogr.*, 1988, vol. 435, pp. 43-53. doi: 10.1016/S0021-9673(01)82161-0.
9. Zenkevich I.G., Kochetova M.V., Larionov O.G., Revina A.A., Kosman V.M. Retention indices as the most reproducible retention parameters in reversed phase HPLC. Calculation for hydrophylic phenolic compounds using reference n-alkyl phenyl ketones. *J. Liquid Chrom. & Related Technol.*, 2005, vol. 28, pp. 2141-2162. doi: 10.108/JLC-200064000.
10. Zenkevich I.G., Pushkareva T.I., Nosova V.E. [HPLC-MS separation and detection of dialkyl phosphonates and trialkyl phosphites in reaction mixtures of 1-alkanols with phosphorus trichloride]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control]. 2018, vol. 22, no. 3, pp. 259-266. (In Russian). doi: 10.15826/analitika.2018.22.3.014.
11. *Analiticheskaia khimia* [Analytical Chemistry]. Ed. L.N. Moskvina. Moscow: Academia Press, 2008-2010. Vols. 1-3. (In Russian).
12. Bravo R., Driskell W.J., Whitehead R.D., Needham L.L., Barr D.B. Quantitation of dialkyl phosphate metabolites of organophosphate pesticides in human urine using GC-MS-MS with isotopic internal standards. *J. Anal. Toxicol.*, 2002, vol. 26, no. 4, pp. 245-252.
13. De Alwis G.K.H., Needham L.L., Barr D.B. Determination of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine by automated solid-phase extraction, derivatization, and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, vol. 32, pp. 721-727.