

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

УДК 543.51543.544.943.3

### ПРИМЕНЕНИЕ ТСХ/МАЛДИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ МОНО- И ДИЗАМЕЩЕННЫХ НИТРОБЕНЗОЙНЫХ КИСЛОТ

© 2022 г. И. В. Миненкова<sup>1, \*</sup>, И. С. Пыцкий<sup>1</sup>, А. К. Буряк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Ленинский проспект, 31, к. 4, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: irina.vl.minenkova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

В работе показана возможность совместного применения тонкослойной хроматографии и матрично-активированной десорбции/ионизации для анализа и разделения моно- и дизамещенных нитробензойных кислот. За счет возможности визуализации масс-спектрометрического метода были рассчитаны параметры хроматографического процесса. Согласно полученным данным, значения коэффициентов подвижности для *мета*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот отличаются примерно в два раза, а коэффициент разделения составляет 0.67. Выяснено, что для повышения чувствительности анализа толщину неподвижной фазы (силикагеля) заводской пластинки для тонкослойной хроматографии следует уменьшить. Поэтому перед началом анализа рекомендуется механически снимать небольшой слой силикагеля. При проведении масс-спектроскопического анализа силикагель выступает матрицей.

**Ключевые слова:** визуализация, масс-спектрометрия, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, нитробензойные кислоты, тонкослойная хроматография

**DOI:** 10.31857/S0044185622060122

#### ВВЕДЕНИЕ

Особое место в современной химии занимает изучение поверхности конструкционных материалов. При контакте с атмосферой поверхность многих материалов подвергается коррозии, что приводит к потере свойств материала. Для защиты металлических конструкционных материалов их поверхности обрабатывают различными ингибиторами коррозии. В ракетно-космической отрасли для таких целей нашли применение нитробензойные кислоты, их соли или смеси этих солей [1, 2]. Важной аналитической задачей является контроль концентрации компонентов используемого средства на обработанных поверхностях, а также обнаружение их следовых количеств для определения стадии обработки исследуемого образца. Наиболее часто нитробензойные кислоты (НБК) определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием [3], ионной хроматографией [4], спектроскопией ядерного магнитного резонанса [5].

Во многих экспериментах важно иметь возможность разделить смесь на ее химические компоненты, чтобы выделить одно соединение или оценить чистоту смеси. Необходимо учитывать,

что на поверхности сталей происходит восстановление НБК до соответствующих аминов. При этом на поверхности конструкционного материала содержание НБК резко снижается. Если стоит задача определить состав многокомпонентной смеси, находящейся на поверхности какого-либо конструкционного элемента, то в этом может помочь тонкослойная хроматография (ТСХ). При наличии реальной конструкционной детали или ее фрагмента необходимо произвести смывы с поверхности и затем проводить анализ полученного раствора. ТСХ является одним из самых простых и универсальных методов анализа, способных выполнить данную задачу благодаря ее низкой стоимости, простоты, высокой чувствительности [6–8].

Однако этому методу свойственен ряд недостатков. Так, например, в практике ТСХ идентификация разделенных компонентов обычно проводится с использованием различных оптических и химических методов. Применение дополнительных методов и проявочных реагентов может привести к разрушению исследуемого вещества, которое в последствии будет не пригодно для количественного анализа. Более эффективным подходом для идентификации компонентов, разде-

ленных с использованием ТСХ, является применение масс-спектрометрии с десорбционными методами ионизации, в частности, с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ) [9–11]. Применение масс-спектрометрии особенно важно при отсутствии аналитических стандартов для обычной идентификации путем сравнения значений коэффициентов подвижности  $R_f$  и разделения  $\alpha$ .

Также совместное применение ТСХ и МАЛДИ может помочь проведению количественного анализа идентифицированных соединений. Благодаря возможности осуществления визуализации масс-спектрометрического исследования идентификация бесцветных, неокрашенных компонентов смеси может быть проведена без реагентов-проявителей.

Таким образом, цель работы заключалась в установлении возможности проведения анализа моно- и дизамещенных нитробензойных кислот на поверхности конструкционных материалов при совместном использовании тонкослойной хроматографии и матрично-активированной адсорбции/десорбции.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования были выбраны растворы *meta*-нитробензойной кислоты (МНБК) (Sigma-Aldrich, США), 3,5-динитробензойной кислоты (ДНБК) (Sigma-Aldrich, США) и их смеси.

Для проведения исследований на реальной поверхности использовались образцы конструкционных материалов марки АМг6 (ГОСТ 4784–97), размер образцов  $2 \times 2$  см.

Тонкослойный хроматографический анализ проводили на пластинах ПТСХ-АФ-А-УФ (ТУ26-11-17-89, Sorbfil, Краснодар, Россия): алюминиевая подложка, нанесенный рабочий слой фракционированного силикагелиевого сорбента (5–17 мкм), толщина слоя  $90\text{--}120 \pm 5$  мкм, размер пластин  $10 \times 10$  см. Люминофор – 254 нм.

Для тонкослойной хроматографии были подготовлены пластинки размером  $2 \times 10$  см. На стартовую линию пластинки наносили 1 мкл анализируемого раствора. После пластинки погружались в эксикатор с толуолом (ч. д. а.). Для проведения ТСХ анализа в атмосфере насыщенных паров растворителя, эксикатор накрывали крышкой. Время анализа составляло 30–40 мин. После пластинку вынимали из эксикатора и высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрические исследования проводились с помощью масс-спектрометра Bruker

Daltonics Ultraflex II (Bruker, Германия), оснащенного азотным лазером ( $\lambda = 337$  нм) и время-пролетным масс-анализатором. Основные характеристики работы лазера: 50 выстрелов с частотой 20 Гц; энергия лазерного импульса – 90–100 мкДж. Работа масс-детектора осуществлялась в режиме рефлектрона. Эксперимент проводили в режимах регистрации как положительных, так и отрицательных ионов в диапазоне 20–1200 Да. Ниже дана только информативная часть масс-спектров. Основные характеристики режимов ионизации (положительной/отрицательной): напряжение на выталкивающем электроде – 25/20 кВ; ускоряющее напряжение – 20/17.5 кВ; напряжение на фокусирующей системе – 10.5/7.5 кВ; тормозящее напряжение на ионном зеркале – 26/21 кВ; отражающее напряжение на ионном зеркале – 14/11 кВ.

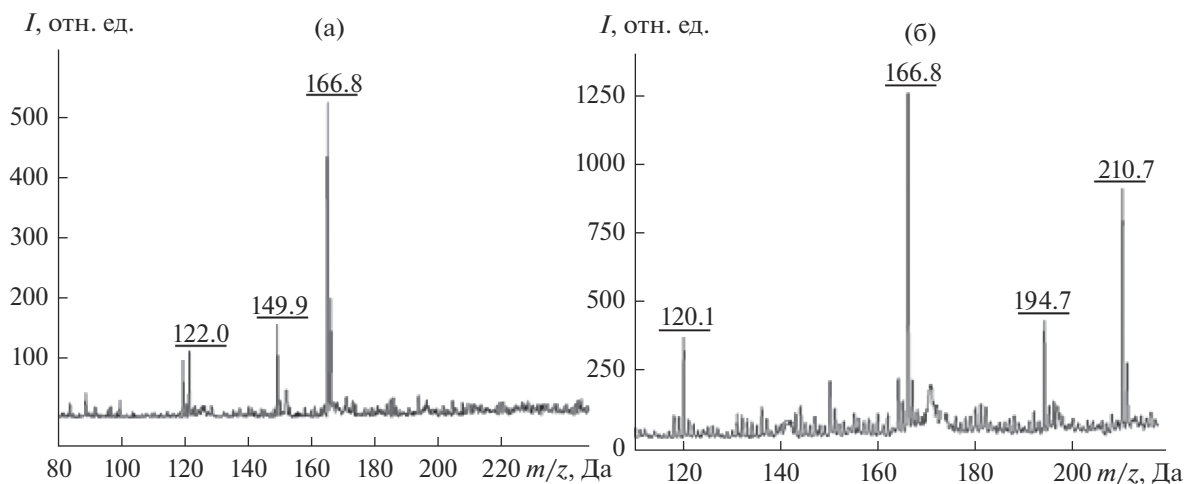
При осуществлении ТСХ/МАЛДИ анализируемую пластинку закрепляли непосредственно на поверхности стандартной плашки (Bruker, Германия) и загружали в масс-спектр.

Визуализацию масс-спектрометрических результатов осуществляли с помощью программы, разработанной в Лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии ИФХЭ РАН [12].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Масс-спектрометрическое изучение замещенных нитробензойных кислот в режиме регистрации положительных ионов не дало информативных масс-спектров, поэтому дальнейшие исследования проводили в режиме регистрации отрицательных ионов. Предварительные исследования НБК различных концентраций показали, что аналитическая концентрация должна быть не менее 1.6 нг/мкл. Установленная в работе минимальная концентрация смеси кислот для ТСХ/МАЛДИ получилась на порядок больше ожидаемой. Вероятно, это связано с тем, что большая часть анализируемого раствора проникает и адсорбируется в слое силикагеля пластинки. Так как метод МАЛДИ является чувствительным методом анализа, то минимальную аналитическую концентрацию возможно еще снизить и в случае реального анализа, после смыва с поверхности для увеличения концентрации определяемых компонентов, полученный раствор рекомендуется упарить.

Все представленные ниже результаты получены для минимально определяемой концентрации 1.6 нг/мкл. Рисунок 1 иллюстрирует масс-спектры *m*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот в режиме регистрации отрицательных ионов.



**Рис. 1.** Масс-спектры *m*-нитробензойной (а) и 3,5-динитробензойной (б) кислот в режиме регистрации отрицательных ионов.

Согласно полученным результатам, в масс-спектрах наблюдаются пики молекулярных анионов  $[M-H]^-$ , с  $m/z = 166$  Да и  $m/z = 211$  Да, для *m*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислоты соответственно. Образование молекулярных анионов в газовой фазе обусловлено наличием способности потери протона карбоксильной группы и возникновению стабильного иона за счет акцепторных групп в *meta*-положении у нитробензойных кислот. Кроме того, в масс-спектрах зафиксирован ряд других частиц анионного типа. Все идентифицированные частицы представлены в табл. 1.

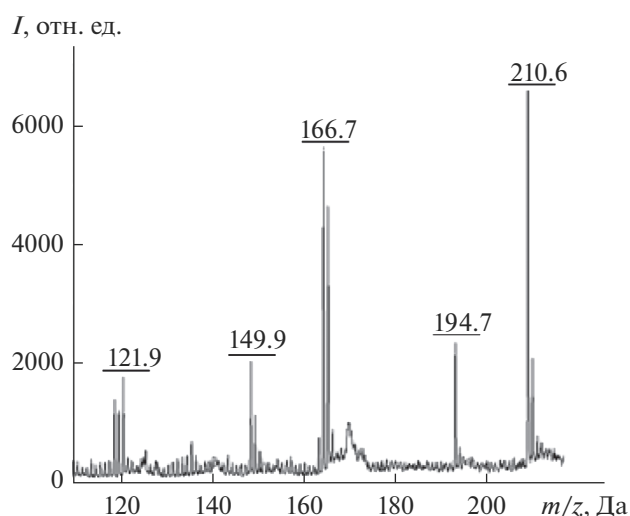
Похожие пики и, соответственно, схожие фрагменты встречаются для МНБК при ионизации электронами [13, 14]. Следует отметить, что наблюдаемые при электронной ионизации значения отличаются от наших на 1 Да.

Так как в большинстве случаев на практике используется смесь моно- и дизамещенных нитробензойных кислот, то было проведено масс-спектрометрическое исследование смеси МНБК и ДНБК (рис. 2).

Для идентификации НБК в смеси, необходимо произвести сравнение масс-спектров МНБК и ДНБК на наличие характерных пиков. ДНБК можно надежно установить по пикам с  $m/z = 211$  Да и  $m/z = 195$  Да, которые имеют отношение только к дизамещенной кислоте. Пик с  $m/z = 167$  Да не подходит для анализа ДНБК, т.к. при масс-спектрометрическом изучении смеси на него накладывается изотопный пик от монозамещенной НБК ( $[M-H]^-$ , 166 Да). Из-за того, что пики с  $m/z$  в диапазоне от 120 до 122 наблюдаются в масс-спектрах обеих кислот, они также не подходят для

идентификации. Таким образом, для идентификации в смеси ДНБК должны проявляться пики с  $m/z = 211$  и  $m/z = 195$  Да. В свою очередь для МНБК характерными пиками являются значения  $m/z = 166$  и  $m/z = 150$  Да. Поскольку пики, характерные для молекулярных ионов моно- ( $m/z = 166$  Да) и дизамещенной ( $m/z = 211$  Да) нитробензойной кислот, являются самыми интенсивными в масс-спектре, они были выбраны для идентификации кислот в смеси и определения параметров их разделения.

При переходе от инертной (идеальной) поверхности к реальной вид масс-спектра меняется (рис. 3).



**Рис. 2.** Масс-спектр смеси *m*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот в режиме регистрации отрицательных ионов.

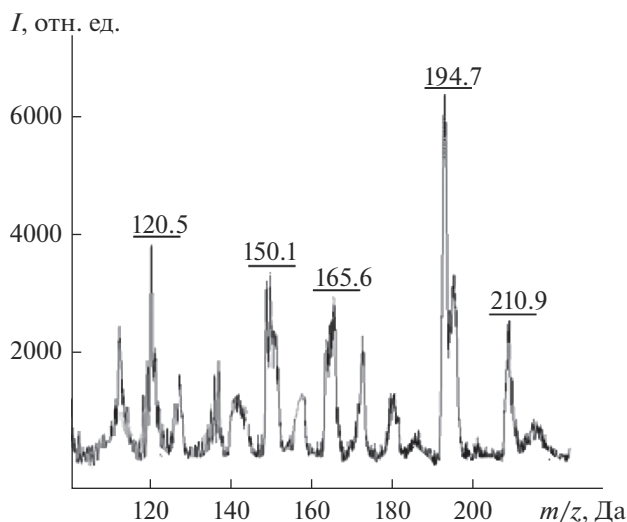
**Таблица 1.** Результаты масс-спектрометрического исследования растворов *мета*-нитробензойной кислоты и 3,5-динитробензойной кислоты

Измеренное $m/z$ , Да	Предполагаемый ион	Структурная формула	МНБК	ДНБК
120	$[M-H-NO_2] \cdot^-$ $[C_7H_4O_2] \cdot^-$		+	-
121	$[M-COOH-NO_2]^-$ $[C_6H_3NO_2] \cdot^-$		-	+
122	$[M-COOH]^-$ $[C_6H_4NO_2]^-$		+	-
150	$[M-OH]^-$ $[C_7H_4NO_3]^-$		+	-
166	$[M-H]^-$ $[C_7H_4NO_4]^-$		+	-
167	$[M-COOH]^-$ $[C_6H_3NO_4]^-$		-	+
195	$[M-OH]^-$ $[C_7H_3N_2O_5]^-$		-	+
211	$[M-H]^-$ $[C_7H_3N_2O_6]^-$		-	+

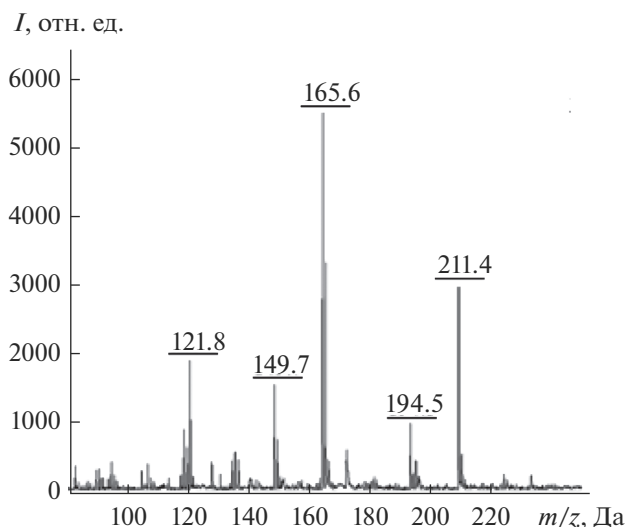
В масс-спектре, полученном с поверхности конструкционного материала, также проявились пики характерные для монозамещенной нитробензойной кислоты ( $m/z = 150$  и  $m/z = 166$  Да) и для дизамещенной нитробензойной кислоты ( $m/z = 195$  и  $m/z = 211$  Да). Однако в масс-спектре наблюдается уширение полос и уменьшение соотношения сигнал/шум. Ухудшение вида масс-спектра может быть обусловлено неидеальностью реальной поверхности, где сказывается влияние наличия на поверхности примесей (из сплава, за-

несенных при работе и т.д.), наличие отравлений и “мозаичность” поверхности.

Таким образом, масс-спектрометрический метод лазерной десорбции/ионизации позволяет проводить анализ смеси нитробензойных кислот непосредственно на поверхности конструкционного материала. Однако полученные масс-спектры из-за дефектов реальной поверхности могут быть недостаточно пригодны для идентификации соединений. Этим проблем можно избежать, совместив метод ЛДИ с ТСХ. Кроме того, что ТСХ



**Рис. 3.** Масс-спектр, полученный с поверхности конструкционного материала сплава АМг6, обработанного смесью *m*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот.



**Рис. 4.** Масс-спектр с поверхности ТСХ пластины, обработанной смесью *m*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот.

анализ является простым и экспрессным, этот метод позволяет проводить не только идентификацию соединений, но и разделение веществ из смеси для дальнейшего количественного анализа.

Исследуемые в работе растворы НБК являются бесцветными, поэтому для их анализа необходим какой-нибудь реагент-проявитель или УФ-лампа. Однако применение дополнительного реагента может помешать количественному анализу. Чтобы избежать этого можно воспользоваться методом МАЛДИ и его возможностью — визуализацией компонентов на изучаемой поверхности. Кроме того, можно избежать необходимости дополнительного использования матрицы, т.к. в данном случае неподвижная фаза — силикагель ТСХ пластинки — будет выполнять эту роль [11].

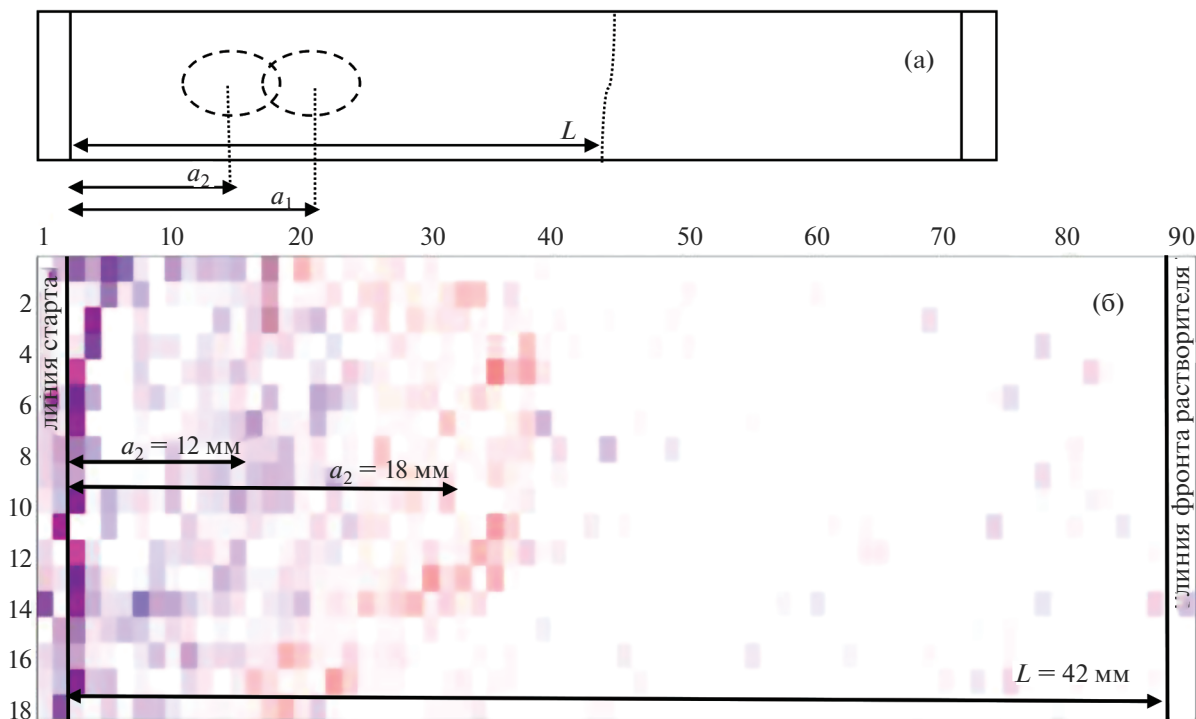
При проведении серии первичных исследований было установлено, что слой силикагеля на пластинке слишком толстый, и адсорбирующиеся вещества проникают слишком глубоко. В результате этого наблюдается снижение чувствительности. Технические характеристики лазера не позволили осуществить ионизацию частиц на такой “глубине” и получение информативного масс-спектра оказалось затруднительно. Для устранения этой проблемы было предпринято провести механическое уменьшение толщины слоя силикагеля примерно в два раза.

После проделанных манипуляций удалось получить результативный масс-спектр с поверхности ТСХ пластинки, обработанной смесью моно- и дизамещенной нитробензойной кислот (рис. 4).

В полученном масс-спектре, как и на рис. 2, присутствуют основные пики характерные для моно- и дизамещенной нитробензойной кислот. Следовательно, предложенный метод анализа смеси нитробензойных кислот при совместном использовании ТСХ и ЛДИ может быть пригоден для анализа реальных смесей.

Чтобы проследить за результатом разделения компонентов смеси МНБК и ДНБК, была осуществлена масс-спектрометрическая визуализация ТСХ пластинки. Визуализация результирующей пластинки, схематическое изображение которой дано на рис. 5а, проводилась на основе распределения молекулярных ионов моно- ( $m/z = 166$  Да) и дизамещенной ( $m/z = 211$  Да) нитробензойной кислот. Полученная двумерная диаграмма распределения  $[M-H]^-$  частиц представлена на рис. 5б.

Полученная двумерная диаграмма распределения наглядно демонстрирует области распределения и линии фронта МНБК (красная часть диаграммы) и ДНБК (фиолетовая часть диаграммы). По полученной диаграмме распределения были определены расстояния от стартовой линии до центра пятен объектов исследования: для МНБК оно составило 18 мм ( $a_1$ ), для ДНБК — 12 мм ( $a_2$ ). Основываясь на полученных значениях, были рассчитаны основные параметры для ТСХ анализа: коэффициент подвижности  $R_f$  и коэффициент разделения  $\alpha$  [8]. Для МНБК значение  $R_f$  составило 0.43, а для ДНБК — 0.29. Обе величины входят в интервал оптимальных значений  $0.3 < R_f < 0.7$  и разница между коэффициентами подвижности



**Рис. 5.** Схематичное изображение полученной ТСХ пластинки после разделения *m*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот (а). Двумерная диаграмма распределения ионов с  $m/z = 166$  Да (красные точки) и с  $m/z = 211$  Да (фиолетовые точки) по поверхности ТСХ пластики (б). Анализируемый участок  $45 \times 9$  мм, шаг 500 мкм.

$\Delta R_f > 0.1$ , что указывает на практическую возможность разделения МНБК и ДНБК в данных условиях. Коэффициент разделения, который характеризует селективность разделения, составил 0.67. Рассчитанное значение отлично от единицы, что также подтверждает возможность разделения МНБК и ДНБК методом тонкослойной хроматографии при выбранных условиях анализа.

Таким образом, совместное применение ТСХ и МАЛДИ позволяет не только провести идентификацию состава многокомпонентной смеси, но и выделить отдельные соединения для дальнейшего анализа. Кроме того, за счет возможности визуализации МАЛДИ можно определить параметры хроматографического процесса и подобрать оптимальные условия для разделения компонентов смеси.

## ВЫВОДЫ

В ходе проведенной работы на примере моно- и дизамещенных нитробензойных кислот были подобраны параметры проведения анализа антикоррозионных соединений с поверхности металлических конструкционных материалов на основе сочетания тонкослойной хроматографии и масс-спектрометрии.

Выяснено, что толщина неподвижной фазы заводской пластинки для тонкослойного хроматографического анализа слишком большая. Поэтому перед анализом необходимо снимать небольшой слой силикагеля. При проведении масс-спектроскопического анализа силикагель, являющийся для ТСХ неподвижной фазой, выступает матрицей.

Основываясь на построенных двухмерных диаграммах распределения моно- и дизамещенной нитробензойных кислот, были рассчитаны хроматографические параметры разделения смеси кислот. Согласно полученным величинам, значения коэффициентов подвижности для *мета*-нитробензойной и 3,5-динитробензойной кислот отличаются примерно в два раза, а коэффициент разделения составляет 0.67.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чирков А.М., Таранцов В.А., Глазунов М.П., Бебих Г.Ф. // Способ удаления продуктов коррозии с поверхности металла и состав для его осуществления. Патент RU 2059676 С1. 1996.

2. Буряк А.К., Сердюк Т.М., Ульянов А.В. // Коррозия: материалы, защита. 2008. № 4. С. 33.
3. МУК 4.1.0.447-96. Измерение концентраций 3-нитробензойной кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в воздухе рабочей зоны. 1996.
4. Мохов А.А., Богданов Э.В., Егорькова Г.Н. и др. // Способ количественного определения изомеров нитробензойной кислоты. Патент SU 1656447 А1. 1991.
5. Хидиров Ш.Ш., Магомедова З.М., Ахмедов М.А. и др. // Вест. Дагест. гос. ун-та. 2015. Т. 30. № 6. С. 198.
6. Santiago M., Strobel S. // Methods in enzymology. 2013. V. 533. P. 303.
7. Bele A., Khale A. // International journal of pharmaceutical sciences and research. 2011. V. 2. № 2. P. 256.
8. Ларионов О.Г. Руководство по современной тонкослойной хроматографии. Москва. 1994. 311 с.
9. Эснарса С.А., Борисов Р.С., Половков Н.Ю. и др. // Масс-спектрометрия. 2017. Т. 14. С. 203.
10. Esparza C., Borisov R.S., Varlamov A.V., Zaikin V.G. // J. Chromatogr. A. 2016. V. 1470. № 28. P. 118.
11. Борисов Р.С., Жилев Д.И., Эснарса С.А. и др. // Масс-спектрометрия. 2014. Т. 11. С. 220.
12. Iartsev S.D., Matyushin D.D., Pytskii I.S. et al. // Surface innovations. 2018. V. 6. № 4. P. 244.
13. NIST Mass Spectrometry Data Center // <https://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C121926&Mask=200#Mass-Spec>
14. Jaoui M., Lewandowski M., Offenber J.H. et al. // J. Mass Spectrom. 2018. V. 53. № 8. P. 680.