



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12239

Особенности удерживания азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-МС

Оксана Игоревна Гриневич[✉],

Анастасия Юрьевна Шолохова, Дмитрий Дмитриевич Матюшин

Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия,

oksigrinevich@gmail.com[✉]

Аннотация. Ароматические пяти- и шестичленные азотсодержащие гетероциклические соединения являются биологически активными веществами и находят широкое применение в биохимии и медицине. Кроме того, подобные соединения известны в качестве экотоксикантов, образующихся в ходе окислительных процессов в промышленных сточных водах. Для определения азотсодержащих гетероциклов в различных сложных смесях широко используется высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, в которой октадецилсиликагель является основным сорбентом для хроматографического разделения. Однако, октадецилсиликагель не всегда позволяет достичь удовлетворительного разделения в случае присутствия сильнополярных изомерных молекул, и необходимо использование более селективных хроматографических подходов. Одним из таких является гидрофильная хроматография, которая позволяет разделять полярные соединения.

Целью работы является сравнительная характеристика удерживания ряда пяти- и шестичленных азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием. Дополнительно осуществлялось спектрофотометрическое детектирование при длине волны 210 нм. Для достижения цели работы использовались сорбенты на основе октадецил- и непривитого силикагеля. Масс-спектрометрическое детектирование высокого разрешения осуществлялось в режиме электрораспылительной ионизации. Объектом исследования стали 19 азотсодержащих гетероциклических соединений. Использовались водно-ацетонитрильные подвижные фазы с добавлением водных растворов муравьиной кислоты и диэтиламина в качестве кислотно-основных модификаторов. Раствор формиата аммония применялся в качестве модификатора в режиме гидрофильной хроматографии. В режиме обращенно-фазовой хроматографии показано, что введение 0.1% водного раствора муравьиной кислоты улучшает ионизацию и интенсивность сигнала масс-спектрометра, однако не всегда позволяет добиться удовлетворительного разделения изомеров при элюировании с поверхности октадецилсиликагеля. Введение 0.01% раствора диэтиламина не дает выраженного улучшения в разделении по сравнению с подвижной фазой без модификаторов. Использование непривитого силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии позволяет разделять изомерные пятичленные гетероциклы с получением узких симметричных пиков, но не приводит к селективному разделению изомерных диазинов.

Таким образом, в работе изучено удерживание 19 азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной жидкостной хроматографии при ионизации электрораспылением. Установлено, что метод гидрофильной хроматографии на непривитом силикагеле позволяет удовлетворительно разделять изомерные пятичленные гетероциклические соединения разных классов. Для разделения шестичленных гетероциклов удовлетворительное разделение достигается при элюировании с поверхности октадецилсиликагеля водно-ацетонитрильной подвижной фазой без модификаторов.

Ключевые слова: азотсодержащие гетероциклические соединения, высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, гидрофильная хроматография

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-73-10053), предоставленного Институту физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук, <https://rscf.ru/project/22-73-10053/>

Для цитирования: Гриневич О.И., Шолохова А.Ю., Матюшин Д.Д. Особенности удерживания азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-



Original article

The retention features of nitrogen-containing heterocyclic compounds in reversed-phase and hydrophilic HPLC-MS modes

Oksana I. Grinevich[✉], Anastasia Yu. Sholokhova, Dmitriy D. Matyushin

Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, oksigrinevich@gmail.com[✉]

Abstract. Aromatic five- and six-membered nitrogen-containing heterocyclic compounds are biologically active substances and are widely used in biochemistry and medicine. In addition, such compounds are known as ecotoxicants formed during oxidation processes in industrial wastewater. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry is widely used to determine nitrogen-containing heterocycles in various complex mixtures. Octadecyl silica gel is the main sorbent for chromatographic separation. However, octadecyl silica gel does not always enable satisfactory separation in the presence of highly polar isomeric molecules, and more selective chromatographic approaches are required. One of these is hydrophilic chromatography, which facilitates the separation of polar compounds.

The aim of the study was to comparatively characterize the retention of a number of five- and six-membered nitrogen-containing heterocyclic compounds during reversed-phase and hydrophilic liquid chromatography with mass spectrometric detection. In addition, spectrophotometric detection at a wavelength of 210 nm was carried out. In the study, we used sorbents based on octadecyl silica gel and unmodified silica gel. High-resolution mass spectrometry was used in the electrospray ionization mode. We studied 19 nitrogen-containing heterocyclic compounds. We used aqueous acetonitrile mobile phases with added aqueous solutions of formic acid and diethylamine as acid-base modifiers. An ammonium formate solution was used as a modifier during hydrophilic chromatography. Reversed-phase chromatography showed that the introduction of 0.1% aqueous formic acid solution increased the ionization and the mass spectrometer signal intensity, but did not always result in a satisfactory separation of isomers upon elution from the octadecyl silica gel surface. The introduction of 0.01% diethylamine solution provided no significant improvement in the separation compared to the mobile phase without modifiers. The use of unmodified silica gel in hydrophilic chromatography mode allowed us to separate isomeric five-membered heterocycles, which was demonstrated by narrow symmetric peaks, but did not result in selective separation of isomeric diazines.

Thus, we studied the retention of 19 nitrogen-containing heterocyclic compounds using reversed-phase and hydrophilic liquid chromatography with electrospray ionisation. It was determined that hydrophilic chromatography on unmodified silica gel could be used for satisfactory separation of isomeric five-membered heterocyclic compounds of different classes. For six-membered heterocycles, satisfactory separation was achieved by elution from the surface of octadecyl silica gel using aqueous acetonitrile mobile phase without modifiers.

Keywords: nitrogen-containing heterocyclic compounds, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, reversed-phase high-performance liquid chromatography, hydrophilic chromatography

Acknowledgements: The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No. 22-73-10053) to the Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, <https://rscf.ru/project/22-73-10053/>

For citation: Grinevich O.I., Sholokhova A. Yu., Matyushin D.D. The retention features of nitrogen-containing heterocyclic compounds in reversed-phase and hydrophilic HPLC-MS modes. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(3): 373-385. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12239>

Введение

Азотсодержащие гетероциклические соединения образуют ряд классов органических соединений, которые объединяет наличие атомов азота в структуре ароматического или алициклического

ядра. Подобные соединения широко распространены в природе и большинство из них имеют выраженную биологическую активность. Наибольшее практическое применение в настоящее время имеют ароматические пяти- и шестичленные гетероциклы, имеющие в своем составе по



одному или несколько атомов азота. Многочисленные производные подобных структур являются лекарственными препаратами, ингибиторами коррозии и компонентами органического синтеза [1]. С другой стороны, различные азотсодержащие гетероциклы могут образовываться в результате сложных окислительных трансформаций в объектах окружающей среды по причине загрязнения отходами нефтяной [2] и ракетной [3-5] промышленности. В связи с этим, актуальна разработка современных методик идентификации и разделения смесей, содержащих азотистые гетероциклы. Повсеместно растущая популярность высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) привела к тому, что на сегодняшний день ВЭЖХ-МС является ведущим методом для решения данной задачи [6-10].

На текущий момент подавляющее большинство анализов проводится с использованием стандартных колонок, заполненных октадецилсиликагелем (ОДС) [11,12]. Однако, в случае изомеров положения заместителей или различного расположения атомов азота в гетероциклическом ядре, идентификация затруднена, если не достигнуто эффективное хроматографическое разделение. В связи с этим, актуальными остаются исследования, посвященные нахождению закономерностей между структурой сорбирующегося вещества и природой сорбента. Богатое электронами гетероциклическое ядро проявляет донорно-акцепторные свойства [13], что позволяет взаимодействовать с поверхностью неподвижных фаз за счет как дисперсионных, так и специфических взаимодействий [14-16].

В последние годы, наравне с классической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ) активно развивается хроматография гидрофильных взаимодействий или гидрофильная хроматография, широко известная как HILIC (Hydrophilic

interaction liquid chromatography). В отличие от ОФ ВЭЖХ, HILIC использует гидрофильные сорбенты, обычно представляющие собой силикагель, немодифицированный или содержащий химически связанные с поверхностью полярные группы, в то время как смеси с высокой долей органического растворителя применяются в качестве подвижной фазы [17]. HILIC считается «промежуточным» методом между обращенно- и нормально-фазовой ВЭЖХ, однако все еще ведутся исследования по установлению механизма удерживания в гидрофильной хроматографии. Основным считается перераспределение между насыщенной органическим растворителем подвижной фазой и насыщенной адсорбированной водой неподвижной фазой, однако свой вклад также могут вносить электростатические взаимодействия и водородные связи [18,19]. Благодаря такому смешанному механизму HILIC позволяет разделять полярные соединения, в том числе молекулы малого размера, которые слабо или вообще не удерживаются в обращенно-фазовой ВЭЖХ [17,20,21]. В том числе, это касается азотсодержащих гетероциклических соединений, таких как 1,2,4-триазолы [22].

В связи с этим, целью настоящей работы стала сравнительная характеристика удерживания ряда пяти- и шестичленных азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой ВЭЖХ и HILIC в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием.

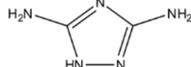
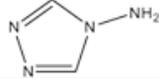
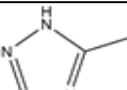
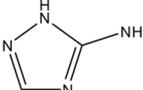
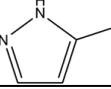
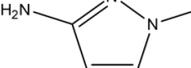
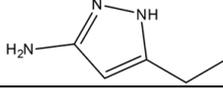
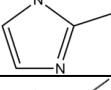
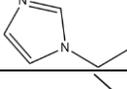
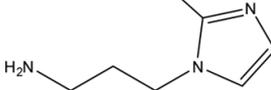
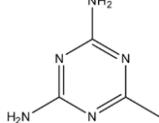
Экспериментальная часть

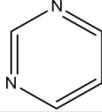
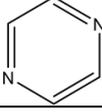
Для изучения удерживания в настоящей работе были использованы химические стандарты девятнадцати азотсодержащих гетероциклических соединений (Sigma Aldrich, США). Структурные формулы соединений приведены в таблице 1.

Для приготовления подвижной фазы

Таблица 1. Исследуемые азотсодержащие гетероциклические соединения

Table 1. Nitrogen-containing heterocyclic compounds studied

№	Название	Структурная формула	Молекулярная масса, Да
1	2	3	4
1	1H-1,2,4-триазол		69.03
2	1H-1,2,4-триазол-3,5-диамин		99.05
3	4-амино-4H-1,2,4-триазол		84.04
4	3-метил-1H-1,2,4-триазол		83.05
5	1H-1,2,3-триазол		69.03
6	3-амино-1H-1,2,4-триазол		84.04
7	1H-пиразол		68.03
8	3-метил-1H-пиразол		82.05
9	1-метил-3-амино-1H-пиразол		97.06
10	5-этил-1H-пиразол-3-амин		111.08
11	1H-имидазол		68.03
12	2-метил-1H-имидазол		82.05
13	1,2-диметил-1H-имидазол		96.07
14	1-этил-1H-имидазол		96.07
15	3-(2-метилимидазол-1-ил)пропан-1-амин		139.11
16	6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамин		125.07
17	пиридазин		80.04

1	2	3	4
18	пиримидин		80.04
19	пиразин		80.04

использовалась деионизованная вода, полученная с помощью системы водочистки АКВАЛАБ AL PLUS (Россия), и ацетонитрил категории чистоты «для ВЭЖХ-МС» (PanReac AppliChem, Германия). В качестве добавок в подвижную фазу использовались муравьиная кислота (НСООН), диэтиламин ($C_2H_5NHC_2H_5$, ДЭА) и формиат аммония (NH_4CO_2).

Эксперимент выполнен с применением хроматографической системы Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), оснащенной кватернарным насосом, дегазатором, автосэмплером, ячейкой термостатирования колонки и спектрофотометрическим многоволновым детектором. Удерживание в режиме ОФ ВЭЖХ осуществлялось на колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (Agilent Technologies, США), заполненной ОДС (100 мм × 4.6 мм, размер частиц 2.7 мкм). Удерживание в режиме гидрофильной хроматографии проводилось на колонке InfinityLab Poroshell 120 Hilic (Agilent Technologies, США), заполненной силикагелем (100 мм × 4.6 мм, размер частиц 2.7 мкм). Для ОФ ВЭЖХ использовались следующие подвижные фазы: вода/ацетонитрил, 0.1% водный раствор НСООН/0.1% раствор НСООН в ацетонитриле, 0.01% водный раствор ДЭА/0.01% раствор ДЭА в ацетонитриле. Подвижная фаза для гидрофильной хроматографии: 5 мМ водный раствор формиата аммония/ацетонитрил.

Использовались градиентные режимы элюирования:

1. Режим ОФ ВЭЖХ: повышение содержания ацетонитрила от 5 до 100% в

интервале 0-20 мин. Расход подвижной фазы 0.25 см³/мин.

2. Режим гидрофильной хроматографии: понижение содержания ацетонитрила от 90 до 5% в интервале 0-30 мин. Расход подвижной фазы 0.4 см³/мин.

Определение времени выхода несорбируемого вещества t_M проводилось следующим образом:

1. Режим ОФ ВЭЖХ: по удерживанию нитрита натрия (при элюировании подвижными фазами вода/ацетонитрил и 0.01% водный раствор ДЭА/0.01% раствор ДЭА в ацетонитриле) и по системному пику масс-детектора (при элюировании подвижной фазой 0.1% водный раствор НСООН/0.1% раствор НСООН в ацетонитриле).

2. Режим гидрофильной хроматографии: по удерживанию ацетона.

Все эксперименты проводились при постоянной температуре колонки 25°C и объеме ввода пробы 1 мкл. Спектрофотометрическое детектирование сорбатов проводилось при длине волны 210 нм.

Масс-спектрометрическое детектирование проводилось с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра высокого разрешения Bruker Maxis Impact QTOF (Bruker Daltonics, Германия). Ионизация выполнялась в режиме электрораспыления, в качестве газа-распылителя и осушителя использовался азот. Применялся режим регистрации положительных ионов с диапазоном сканирования масс $m/z = 50-500$; температура источника ионизации составляла 250°C; расход газа-осушителя – 7 дм³/мин; давление газа-распылителя – 1.4 бар; подаваемое напряжение – 4500 В.

Внешняя калибровка масс-детектора проводилась путем введения формиата натрия через устройство прямого ввода. Статистическое отклонение определения массы не превышало 0.03 ppm.

Для управления хромато-масс-спектрометрической системой и обработки полученных данных применялось программное обеспечение Compass NuStar software (Bruker Daltonics, Германия).

Обсуждение результатов

По результатам хроматографического эксперимента были рассчитаны факторы удерживания k гетероциклических соединений по формуле [23]:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

Значения для всех изученных систем приведены в таблице 2. Согласно полученным значениям, можно сделать вывод, что большинство соединений имеют слабое удерживание во всех рассматриваемых системах ($k \leq 1$), особенно это касается триазолов, которые крайне гидрофильны и подвержены раннему элюированию. Тем не менее, режим гидрофильной хроматографии демонстрирует более эффективное разделение по сравнению с сорбцией на ОДС, особенно для имидазолов и соединений, содержащих аминогруппы в качестве заместителей. Для последних усиление удерживания на гидрофильном сорбенте является следствием увеличения полярности молекул, а также реализации водородных связей аминогрупп с силанольными группами на поверхности сорбента. Что касается различия удерживания изомерных имидазолов и пиразолов, то, как было показано авторами ранее [24], в ядре имидазола оба атома азота являются акцепторами электронов, в отличие от пиразола, в котором электронная плотность более делокализована. Соответственно, имидазолы будут удерживаться дольше за счет более выраженных диполь-дипольных взаимодействий. Для изомерных диазинов пиридазин демонстрирует несколько более

выраженное удерживание на силикагеле по сравнению с пиримидином и пиразином, что также связано с меньшей флуктуацией заряда в ядре и более выраженным диполем, ориентированным в сторону соседних атомов азота [25].

Было проведено сравнение селективности привитого и непривитого силикагелей по отношению к некоторым парам сорбатов путем расчета коэффициента селективности по формуле [23]:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Полученные значения коэффициентов селективности приведены в таблице 3. Согласно полученным результатам, для отдельных пар изомерных гетероциклов гидрофильный силикагель демонстрирует большую селективность, а именно для изомеров положения атома азота в ароматическом ядре. Наиболее выражен эффект для структур с пятичленным гетероароматическим ядром, в то время как для диазинов природа сорбента гораздо менее значима. В то же время, для изомеров положения заместителей наблюдается обратная зависимость, и выбор стандартной обращенно-фазовой хроматографии будет давать удовлетворительные результаты.

Отмечено, что элюирование с непривитого силикагеля происходит преимущественно без размытия фронта хроматографического пика (рис. 1).

Помимо гидрофильной хроматографии, удерживание азотсодержащих гетероциклов было изучено в классическом обращенно-фазовом режиме при введении в систему кислотно-основных модификаторов. Необходимость введения модификаторов была обусловлена проявлением асимметрии и уширения пиков пятичленных гетероциклов при элюировании чистыми растворителями.

Диэтиламин, выступая в качестве основного модификатора подвижной фазы, вносит дополнительные ион-парные взаимодействия в гидрофобный механизм

Таблица 2. Факторы удерживания изученных азотсодержащих гетероциклов
Table 2. Retention factors of the studied nitrogen-containing heterocycles

№	Название	режим ОФ ВЭЖХ (ОДС)			Режим гидрофильной хроматографии (HILIC)
		k(ДЭА) $t_M = 4$ мин	k(HCOOH) $t_M = 3.6$	k(H ₂ O) $t_M = 4$	k (NH ₄ HCO ₂) $t_M = 3.2$
1	1Н-1,2,4-триазол	0.05	0.25	0.2	0.44
2	1Н-1,2,4-триазол-3,5-диамин	0.075	0.17	0.1	1.38
3	4-амино-4Н-1,2,4-триазол	0.1	0.17	0.1	1.13
4	3-метил-1Н-1,2,4-триазол	0.15	0.25	0.45	0.63
5	1Н-1,2,3-триазол	0.075	0.64	0.5	0.06
6	3-амино-1Н-1,2,4-триазол	0.05	0.17	0.175	0.75
7	1Н-пиразол	1.5	1.00	1.525	0.06
8	3-метил-1Н-пиразол	2.175	1.00	2.15	0.09
9	1-метил-3-амино-1Н-пиразол	0.9	0.31	0.9	0.41
10	5-этил-1Н-пиразол-3-амин	1.975	1.17	1.95	0.34
11	1Н-имидазол	0.5	0.14	0.125	1.31
12	2-метил-1Н-имидазол	0.75	0.22	0.15	3.16
13	1,2-диметил-1Н-имидазол	1.825	0.25	0.15	3.88
14	1-этил-1Н-имидазол	2.125	0.33	1.675	1.25
15	3-(2-метилимидазол-1-ил)пропан-1-амин	1.725	0.06	0.15	2.34
16	6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамин	0.625	0.22	0.625	1.22
17	пиридазин	0.675	0.61	0.625	0.47
18	пиримидин	0.825	0.97	0.825	0.34
19	пиразин	0.825	1.06	1.025	0.22

удерживания. Это незначительно снижает удерживание триазолов, являющихся слабыми основаниями, среди которых для 1Н-1,2,3-триазола влияние модификатора наиболее выражено. Удерживание имидазолов, наоборот, возрастает, сильнее всего – у 1,2-диметил-1Н-имидазола. Для шестичленных гетероциклов присутствие ДЭА не оказывает значительного влияния. Важно отметить, что использованный сорбент эндкемп-

ирован, соответственно, отсутствуют остаточные силанольные группы, которые ДЭА мог бы блокировать. Для рассматриваемых систем введение ДЭА не оказывает положительного влияния, а напротив, еще более ухудшает форму хроматографического пика (рис. 2).

Исходя из рис. 2 можно заметить, что присутствие ДЭА также приводит к появлению системного пика, вызванного собственным элюированием ДЭА и иониза

Таблица 3. Сравнительная характеристика коэффициентов селективности α для некоторых систем

Table 3. Comparative characterization of selectivity coefficients α for some systems

№	Разделяемые сорбаты	α (H ₂ O, ОДС)	α (HCOOH, ОДС)	α (NH ₄ HCO ₂ , HILIC)
1	1H-1,2,4-триазол/1H-1,2,3-триазол	2.5	2.6	7.3
2	4-амино-4H-1,2,4-триазол/3-амино-1H-1,2,4-триазол	1.8	1	1.5
3	3-метил-1H-1,2,4-триазол/1H-1,2,3-триазол	1.1	2.6	10.5
4	1H-пиразол/1H-имидазол	12.2	7	21.8
5	3-метил-1H-пиразол/2-метил-1H-имидазол	14.3	4.5	35.1
6	1H-имидазол/2-метил-1H-имидазол	1.2	1.6	2.4
7	1,2-диметил-1H-имидазол/1-этил-1H-имидазол	11.2	1.32	3.1
8	6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамин/пиридазин	1	2.8	2.6
9	пиридазин/пиримидин	1.3	1.6	1.4
10	пиридазин/пиразин	1.6	1.7	2.1
11	пиримидин/пиразин	1.2	1	1.5

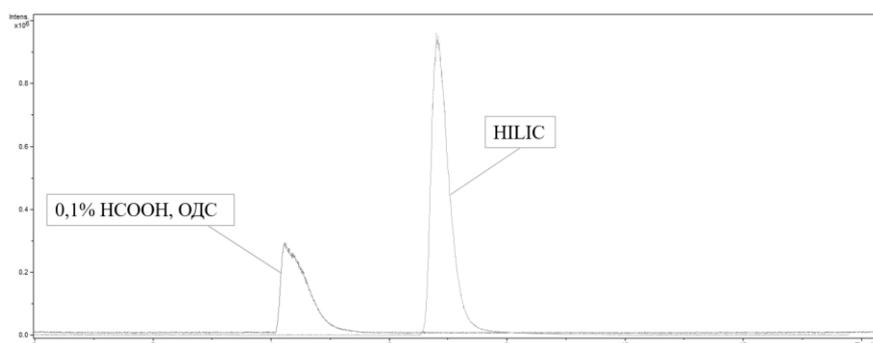


Рис. 1. Хроматограммы при МС-детектировании 4-амино-1H-1,2,4-триазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.1% HCOOH, и в режиме HILIC.

Хроматограммы записаны при $m/z = 85.05 \pm 0.05$ протонированного иона.

The MS chromatograms of 4-amino-1H-1,2,4-triazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.1% of HCOOH as well as in HILIC mode. The chromatograms were recorded at $m/z = 85.05 \pm 0.05$ of the protonated ions.

цией при 65-66% содержании ацетонитрила. Кроме того, ДЭА имеет тенденцию подавлять ионизацию пятичленных гетероциклов в режиме электрораспыления и

регистрации положительных ионов (рис. 3) вплоть до полного исчезновения сигнала анализируемого вещества (рис. 4), что

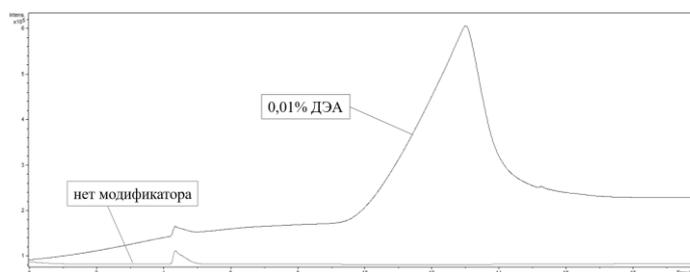


Рис. 2. Хроматограммы при спектрофотометрическом детектировании 4-амино-4Н-1,2,4-триазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.01% ДЭА, и при его отсутствии. Длина волны 210 нм.

Fig. 2. The spectrophotometric detection chromatograms of 4-amino-4H-1,2,4-triazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.01% of diethylamine solution and in its absence. The wavelength was 210 nm.

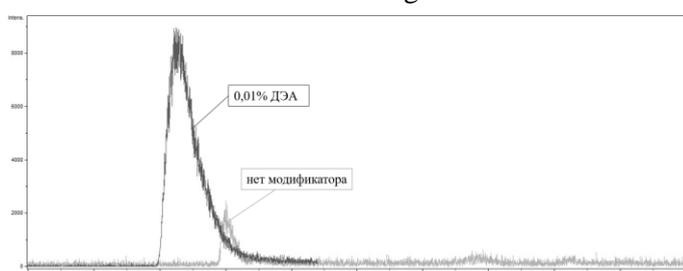


Рис. 3. Хроматограммы при МС-детектировании 1Н-имидазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.01% ДЭА, и при его отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 69.04 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 3. The MS chromatograms of 1H-imidazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.01% of diethylamine solution and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 69.04 \pm 0.05$ of the protonated ions.

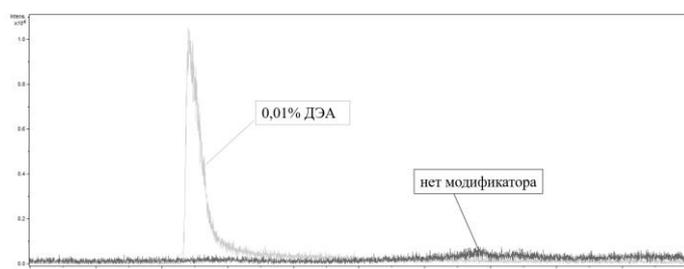


Рис. 4. Хроматограммы при МС-детектировании 1Н-1,2,4-триазола, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.01% ДЭА, и при его отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 70.04 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 4. The MS chromatograms of 1H-1,2,4-triazole eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.01% of diethylamine solution and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 70.04 \pm 0.05$ of the protonated ions.

может наблюдаться для молекул с молекулярной массой меньше, чем у ДЭА (73.14 Да). Подобный эффект ранее упоминался в литературе [26].

С другой стороны, введение 0.1% раствора муравьиной кислоты в подвижную фазу значительно повышает интенсивность ионизации (рис. 5) и улучшает форму хроматографического пика (рис. 6).

Имеются литературные данные, сообщающие о достижении оптимальных параметров удерживания для разделения шестичленных азотсодержащих гетероциклических гербицидов при использовании подвижной фазы с добавкой 0.1% HCOOH [27]. Действительно, если вновь обратиться к таблице 3, то можно видеть

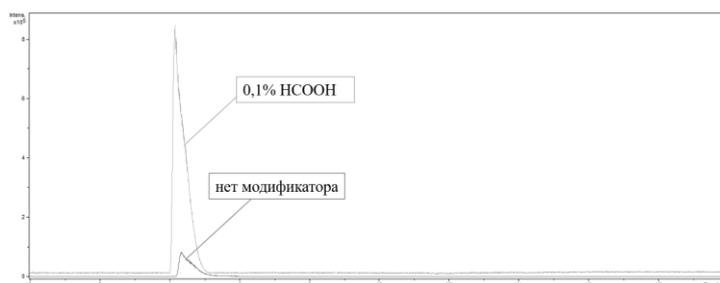


Рис. 5. Хроматограммы при МС-детектировании 1H-1,2,4-триазол-3,5-диамина, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.1% HCOOH, и при ее отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 100.06 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 5. The MS chromatograms of 1H-1,2,4-triazole-3,5-diamine eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.1% of HCOOH and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 100.06 \pm 0.05$ of the protonated ions.

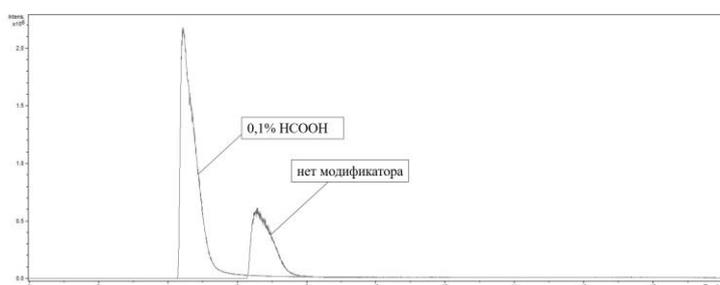


Рис. 6. Хроматограммы при МС-детектировании 6-метил-1,3,5-триазин-2,4-диамина, элюируемого с ОДС подвижной фазой, содержащей 0.1% HCOOH, и при ее отсутствии. Хроматограммы записаны при $m/z = 126.07 \pm 0.05$ протонированного иона.

Fig. 6. The MS chromatograms of 6-methyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine eluted from octadecyl silica gel using the mobile phase containing 0.1% of HCOOH and in its absence. The chromatograms were recorded at $m/z = 126.07 \pm 0.05$ of the protonated ions.

повышение селективности хроматографического разделения для неизомерных азинов. В остальных случаях введение муравьиной кислоты в подвижную фазу, как правило, ухудшает разделение изомерных гетероциклов. Соответственно, выбор в пользу муравьиной кислоты можно сделать, если основной целью является не повышение селективности разделения, а усиление интенсивность и улучшение формы получаемого хроматографического сигнала.

Таким образом, согласно полученным результатам, разделение пятичленных гетероциклов достигается при элюировании в режиме гидрофильной хроматографии, при этом удерживание на ОДС позволяет разделять изомерные диазины без использования модификаторов подвижной фазы.

Заключение

Изучено удерживание девятнадцати азотсодержащих гетероциклических соединений в режимах обращенно-фазовой и гидрофильной ВЭЖХ-МС в режиме ионизации электрораспылением. Показано, что введение 0.1% водного раствора муравьиной кислоты в качестве кислотного модификатора улучшает ионизацию и интенсивность сигнала масс-спектрометра, однако не всегда позволяет добиться удовлетворительного разделения при элюировании с поверхности ОДС. Введение 0.01% раствора диэтиламина, наоборот, не дает выраженного улучшения в разделении по сравнению с подвижной фазой без модификаторов. Использование непривитого силикагеля в режиме гидрофильной хроматографии позволяет



разделять изомерные пятичленные гетероциклы с получением узких симметричных пиков, однако не имеет преимущества перед ОДС при разделении диазинов.

Список литературы/References

1. Arora P., Arora V., Lamba H.S., Wadhwa D., Importance of Heterocyclic Chemistry, a Review, *IJPSR*, 2012; 3: 2947-2954.
2. Liao P., Yuan S., Xie W., Zhang W., Tong M., Wang K., Adsorption of nitrogen-heterocyclic compounds on bamboo charcoal, Kinetics, thermodynamics, and microwave regeneration, *J Colloid Interface Sci*, 2013; 390: 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.09.037>
3. Milyushkin A.L., Birin K.P., Matyushin D.D., Semeikin A.V., Iartsev S.D., Karnaeva A.E., Uleanov A.V., Buryak A.K., Isomeric derivatives of triazoles as new toxic decomposition products of 1,1-dimethylhydrazine, *Chemosphere*, 2019; 217: 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.155>
4. Sholokhova A.Y., Grinevich O.I., Matyushin D.D., Buryak A.K., Machine learning-assisted non-target analysis of a highly complex mixture of possible toxic unsymmetrical dimethylhydrazine transformation products with chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere*, 2022; 307: 135764. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135764>
5. Ul'yanovskii N.V., Kosyakov D.S., Popov M.S., Shavrina I.S., Ivakhnov A.D., Kenessov B., Lebedev A.T., Rapid quantification and screening of nitrogen-containing rocket fuel transformation products by vortex assisted liquid-liquid microextraction and gas chromatography – high-resolution Orbitrap mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 2021; 171: 106821. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106821>
6. Fay L.B., Ali S., Gross G.A., Determination of heterocyclic aromatic

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

amines in food products, Automation of the sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1997; 376: 29-35. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00022-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00022-5)

7. Frei R.W., Beall K., Cassidy R.M., Determination of Aromatic Nitrogen Heterocycles in Air Samples by High-Speed Liquid Chromatography, *Mikrochim Acta*, 1974; 62: 859-869. <https://doi.org/10.1007/BF01218306>

8. Saito K., Kobayashi K., Ohmiya S., Otomasu H., Murakoshi I., Analysis of lupine alkaloids in plants by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1989; 462: 333-340. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91359-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91359-1)

9. Sawaya A.C.F., Abreu I.N., Andrezza N.L., Eberlin M.N., Mazzafera P., HPLC-ESI-MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*, *Molecules*, 2008; 13: 1518-1529. <https://doi.org/10.3390/molecules13071518>

10. Yogo K., Takemura C., Saito Y., Jinno K., An abnormal temperature dependence of alkylypyrazines' retention in reversed-phase liquid chromatography, *Analytical Sciences*, 2011; 27: 1257-1260. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.1257>

11. Feng Y., Xu Y., Li W., Chen S., Su Z., Xi L., Li G., Improved enrichment and analysis of heterocyclic aromatic amines in thermally processed foods by magnetic solid phase extraction combined with HPLC-MS/MS, *Food Control*, 2022; 137: 108929. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108929>

12. Švábenský R., Oravec M., Šimek Z., Determination of polycyclic aromatic nitrogen heterocycles in soil using liquid



- chromatography/tandem mass spectrometry, *Int J Environ Anal Chem*, 2009; 89: 167-181. <https://doi.org/10.1080/03067310802499423>
13. Kerru N., Gummidi L., Maddila S., Gangu K.K., Jonnalagadda, S.B., A Review on Recent Advances in Nitrogen-Containing Molecules and Their Biological Applications, *Molecules*, 2020; 25: 1909. <https://doi.org/10.3390/molecules25081909>
14. Polyakova Y.L., Row K.H., Retention of some five-membered heterocyclic compounds on a porous graphitized carbon, Hypercarb™, *Chromatographia*, 2007; 65: 59-63. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0119-0>
15. Karaseva I.N., Karasev M.O., Nechaeva O.N., Kurbatova S.V. Vliyanie prirody sorbenta na uderzhivanie proizvodnyh 1,2,4-triazola i 1,2,4-triazina v usloviyah obrashchenno-fazovoj vysokoeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii. *ZHurnal fizicheskoy himii*. 2019; 93: 128-136. <https://doi.org/10.1134/s0044453719010138> (In Russ.)
16. Karaseva I.N., Karasev M.O., Kurbatova S.V. Influence of the topology of molecules on the sorption of derivatives of 1,2,4-triazole and 1,2,4-triazine by nonpolar sorbents under conditions of liquid chromatography. *Sorbtsionnye I Khromatograficheskie Protsessy*, 2018; 18(6): 893-905. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/618> (In Russ.)
17. Jandera P., Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography, a review, *Anal Chim Acta*, 2011; 692: 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>
18. Nguyen H.P., Schug K.A., The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations, Fundamentals and applications, *J Sep Sci*, 2008; 31: 1465-1480. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700630>
19. Greco G., Letzel T., Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations, *J Chromatogr Sci*, 2013; 51: 684-693. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>
20. Guo Y., Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Analyst*, 2015; 140: 6452-6466. <https://doi.org/10.1039/C5AN00670H>
21. Buszewski, B., Noga, S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique, *Anal Bioanal Chem*, 2012; 402: 231-247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
22. Chen Q., Zielinski D., Nowak S.A., Fast and sensitive method for the determination of trace 1,2,4-triazole and 4-amino-1,2,4-triazole by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in antifungal drug substance, *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2018; 41: 770-779. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1485040>
23. Majer V.R. Prakticheskaya vysokoeffektivnaya zhidkostnaya hromatografiya. Moskva, Tekhnosfera, 2019. 408 p. (In Russ.)
24. Grinevich O.I., Buryak A.K., Theoretical Study of the Adsorption of Some Azoles on the Graphene Surface. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 2024; 98(1): 205-210. <https://doi.org/10.1134/S0036024424010096>
25. Grinevich O.I., Volkov V.V., Buryak A.K., Diazines on graphene, adsorption, structural variances and electronic states, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2022; 24: 29712-29720. <https://doi.org/10.1039/d2cp05096j>
26. Peng L., Jayapalan S., Chankvetadze B., Farkas T., Reversed-phase chiral HPLC and LC/MS analysis with tris(chloromethylphenylcarbamate) derivatives of cellulose and amylose as chiral stationary phases, *J Chromatogr A*, 2010; 1217: 6942-6955. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.075>
27. Amelin, V.G. Bol'shakov, D.S. Andoralov, A.M. Skrining i opredelenie pesticidov razlichnyh klassov v prirodnoj



vode bez probopodgotovki metodom ul'tra
VEZHKN-kvadrupol'-vremyaoproletnoj
mass-spektrometrii vysokogo razresheniya.

ZHurnal analiticheskoy himii. 2018; 73(3):
214-223. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

О.И. Гриневич – аспирант, м.н.с. лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

O.I. Grinevich – Ph.D. student, researcher, laboratory of physicochemical principles of chromatography and chromatography – mass spectrometry; Institute of Physical chemistry and electrochemistry, Moscow, Russian Federation, email: oksigri-nevich@gmail.com, ORCID: 0000-0002-8242-5461

А.Ю. Шолохова – с.н.с. лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

A.Yu. Sholokhova – researcher, laboratory of physicochemical principles of chromatography and chromatography – mass spectrometry; Institute of Physical chemistry and electrochemistry, Moscow, Russian Federation, email: shonastya@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-4192-1677

Д.Д. Матюшин – н.с. лаборатории физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН, Москва, Россия

D.D. Matyushin – researcher, laboratory of physicochemical principles of chromatography and chromatography – mass spectrometry; Institute of Physical chemistry and electrochemistry, Moscow, Russian Federation, email: dm.matiushin@mail.ru, ORCID: 0000-0003-0978-7666

Статья поступила в редакцию 27.01.2024; одобрена после рецензирования 15.04.2024; принята к публикации 17.04.2024.

The article was submitted 27.01.2024; approved after reviewing 15.04.2024; accepted for publication 17.04.2024.