

反相离子对色谱中有机溶剂浓度和离子对试剂浓度对保留值的影响

邹汉法* 张玉奎 洪名放 卢佩章

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心 大连 116011)

摘要 我们测定了氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在反相离子对色谱中不同乙腈/水、甲醇/水配比和离子对试剂浓度下的保留值,并把两种冲洗剂下的保留值和关系式 $\ln k' = a + Cc_b$ 中的参数 a , C 作线性关联,得到很好的相关性;这表明有机溶剂乙腈和甲醇对选择性并无显著的影响,但乙腈有更大的冲洗强度.证明关系式 $\ln k' = A + B \ln c_p + Cc_b$ 能较好地描述有机溶剂和离子对试剂浓度对保留值的影响,但当离子对试剂浓度较高时该关系式不成立.同时提出了有机溶剂浓度和离子对试剂浓度“等效效应”的概念.

关键词 离子对色谱, 有机溶剂, 离子对试剂, 保留值

反相离子对色谱法由于保持了反相色谱法操作简便、分离柱效高所固有的优点,而且能同时分离离子和中性分子的混合物;因此在药物、生化、染料及其中间体的分离检测等领域获得广泛的应用^[1~3].在反相离子对色谱中,溶质的保留值主要通过调节有机溶剂、离子对试剂、无机盐浓度和性质以及 pH 值和柱温获得满意的分离.至今,已提出许多离子对色谱的保留机理用于解释实验观察到的现象.这些模型可分成计量和非计量模型两大类,计量模型包括离子对模型^[4,5]、动态离子交换模型^[6,7]、复合动态离子交换模型^[8];而非计量模型主要包括离子作用模型^[9,10]、Gouy-Chapman 双电层静电作用模型^[11,12]、统计热力学模型^[13,14]和热力学模型^[15,16].随着离子对色谱机理研究的深入,我们已提出静电和分子作用力对离子对色谱的保留机理起主导作用,并用离子对色谱的保留值预测离子性有机化合物的正辛醇/水分配系数^[17,18].本文的工作主要考察甲醇和乙腈对保留值影响的差别;离子对试剂浓度和有机溶剂浓度对保留值的影响,并提出有机溶剂浓度与离子对试剂浓度“等效效应”的概念.

1 实验

1.1 仪器和试剂

美国 Waters-510 输液泵.西德 Biotronic 公司的多波长紫外检测器,检测波长 254nm.色谱柱为 150×4.6mm I. D. 不锈钢柱填充 10 μ m Spherisorb-C₁₈ 担体.冲洗剂为不同配比的乙腈/水和不同浓度的离子对试剂,内含 NaH₂PO₄ 10mmol·dm⁻³,冲洗剂的 pH 值恒定为 6.98 (由美国 Orion 公司 pH 测试仪测定).冲洗剂流速为 1.20mL/min;所用水为二次蒸

馏水、乙腈、甲醇；离子对试剂四丁基碘化铵、NaOH 和 HCl 均为分析纯。选用的样品为大连理工大学染料教研室合成的氨基苯磺酸和氨基萘磺酸。标样由固体样品溶于蒸馏水制成。全部实验测定数据由 NEC-APCIV 微机处理。

2 结果和讨论

表 1 列出 15 种氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在不同离子对试剂和有机溶剂浓度下实测的 k' 值。已知其它条件恒定，有机溶剂浓度对保留值的影响可由下式表达^[13~15]：

$$\ln k' = a + Cc_b \quad (1)$$

将表 1 中离子对试剂浓度为 $0.004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时的 k' 值按式 (1) 回归，结果见表 2。在离子对试剂浓度 $0.004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时不同甲醇/水配比下实测的 k' 值求得的参数 a ， C 也列于表 2 中。比较甲醇和乙腈作为有机溶剂时的参数 a ， C 值可看到，在乙腈作为有机溶剂时的参数 a 值比甲醇作为有机溶剂时的参数 a 值小，参数 C 值也有类似结果。这表明乙腈对保留值的影响较甲醇的影响更大，即乙腈具有更大的疏水性。

表 1 不同乙腈 (c_b) 和离子对试剂 (c_p) 浓度下实测的 k' 值

溶 质	k'								
	c_b								
	0.30 c_p 0.004	0.25 0.004	0.20 0.004	0.15 0.004	0.10 0.004	0.20 0.001	0.20 0.002	0.20 0.008	0.20 0.016
2-氨基苯磺酸	0.368	0.647	1.03	2.27	5.01	0.492	0.748	1.426	1.514
3-氨基苯磺酸	0.161	0.263	0.453	0.868	1.79	0.181	0.328	0.639	0.637
4-氨基苯磺酸	0.067	0.169	0.295	0.535	0.931	0.069	0.208	0.385	0.409
2-甲基-5-氨基苯磺酸	0.222	0.439	0.706	1.47	3.36	0.311	0.522	0.907	0.943
2-甲氧基-6-氨基苯磺酸	0.386	0.692	1.13	2.56	5.95	0.577	0.888	1.51	1.62
2-甲氧基-5-氨基苯磺酸	0.067	0.164	0.254	0.510	0.954	0.153	0.198	0.343	0.367
2-氯-5-氨基苯磺酸	0.308	0.528	0.826	1.84	3.93	0.384	0.621	1.12	1.24
5-氨基萘磺酸	0.375	0.732	1.17	2.58	5.68	0.570	0.869	1.57	1.73
6-氨基萘磺酸	0.488	1.03	1.72	4.30	13.13	0.914	1.41	2.41	2.63
2-氨基-1,4-苯二磺酸	0.162	0.515	0.881	1.93	4.18	0.160	0.514	1.43	2.30
4,6-二氨基-1,3-苯二磺酸	0.137	0.443	0.716	1.50	3.10	0.157	0.381	1.09	1.18
3-氨基-1,5-萘二磺酸	0.278	0.683	1.36	3.36	10.04	0.290	0.757	2.12	2.51
3-氨基-2,7-萘二磺酸	0.350	0.907	1.77	4.47	15.85	0.409	1.03	2.99	3.29
7-氨基-1,4,5-萘三磺酸	0.415	1.29	2.97	10.14	37.01	0.424	1.52	6.30	7.08
7-氨基-1,4,6-萘三磺酸	0.448	1.36	3.00	10.62	40.03	0.457	1.60	6.60	7.40

表 2 恒定离子对试剂浓度 ($c_p = 0.004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) 时实测 k' 值 [按式 (1) 回归结果]

溶 质	甲醇 / 水			乙腈 / 水		
	a	C	r	a	C	r
2-氨基苯磺酸	4.166	-11.17	0.9984	2.834	-12.95	0.9983
3-氨基苯磺酸	3.084	-11.17	0.9982	1.721	-12.02	0.9981
4-氨基苯磺酸	2.359	-10.65	0.9987	1.302	-12.83	0.9924
2-甲基-5-氨基苯磺酸	3.562	-10.53	0.9992	2.454	-13.28	0.9976
2-甲氧基-6-氨基苯磺酸	4.257	-11.18	0.9973	3.044	-13.56	0.9973
2-甲氧基-5-氨基苯磺酸	2.192	-9.721	0.9974	1.286	-12.89	0.9955
2-氯-5-氨基苯磺酸	3.633	-10.83	0.9957	2.551	-12.67	0.9971
5-氨基萘磺酸	4.154	-11.72	0.9962	3.009	-13.39	0.9985

(续表 2)

溶 质	甲醇 / 水			乙腈 / 水		
	<i>a</i>	<i>C</i>	<i>r</i>	<i>a</i>	<i>C</i>	<i>r</i>
6-氨基苯磺酸	5.267	-12.95	0.9956	4.007	-16.03	0.9941
2-氨基-1,4-苯二磺酸	4.678	-14.31	0.9996	3.039	-15.64	0.9939
4,6-二氨基-1,3-苯二磺酸	4.192	-13.26	0.9998	2.679	-14.92	0.9913
3-氨基-1,5-萘二磺酸	5.564	-14.98	0.9977	3.955	-17.54	0.9980
3-氨基-2,7-萘二磺酸	6.139	-16.08	0.9988	4.439	-18.44	0.9954
7-氨基-1,4,5-萘三磺酸	8.019	-19.86	0.9992	5.735	-22.08	0.9991
7-氨基-1,4,6-萘三磺酸	8.267	-20.15	0.9974	5.791	-22.09	0.9987

为了评价乙腈 / 水冲洗剂和甲醇 / 水冲洗剂系统对分离选择性的影响, 并研究不同冲洗剂系统下溶质保留值数据相互转换的可能性, 我们做了以下的工作: (1) 把 15 种氨基苯磺酸和氨基萘磺酸在乙腈 / 水系统下的保留值与在甲醇 / 水下的保留值相关联, 所得结果见图 1; (2) 把乙腈 / 水为冲洗剂时的 a , C 值与甲醇 / 水为冲洗剂时的 a , C 值线性回归, 所得结果见图 2 和图 3. 由图 1~3 的结果可以得出以下的结论: (1) 乙腈 / 水为冲洗剂时的保留值和参数 a , C 与甲醇 / 水为冲洗剂时的保留值和参数 a , C 有很好的线性关系; (2) 这些良好的线性关系表明, 有机溶剂乙腈在反相离子对色谱中与有机溶剂甲醇相似, 即对于被分离物质的分离选择性并无明显差异, 但它们的保留值却有较大的差别. 产生这些良好的线性关系的原因可归结为: (1) 被分离物质的主体结构相同, 只是取代基和取代位置不同, 即物质的基本构型对保留过程的贡献相似; (2) 在所研究的有机溶剂浓度下, 溶质分子作用力本身对保留值的贡献很小, 主要由与离子对试剂的静电作用力所致, 冲洗剂中有机溶剂的改变对溶剂与离子对试剂的相互作用并无选择性改变, 即不同有机溶剂对溶质保留过程的贡献具有基本平行关系.

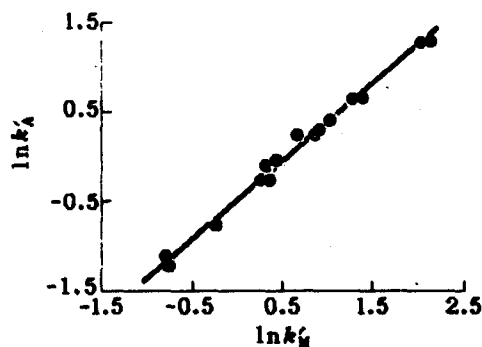


图 1 在离子对试剂浓度 $0.004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时实测的 k'_A 值与 k'_M 值间的线性回归结果
 $\ln k'_A = -0.474 + 0.859 \ln k'_M$, $r = 0.9958$, $n = 15$
 实测 k'_A 时, 乙腈 / 水 = 0.20 / 0.80;
 实测 k'_M 时, 醇 / 水 = 0.30 / 0.70.

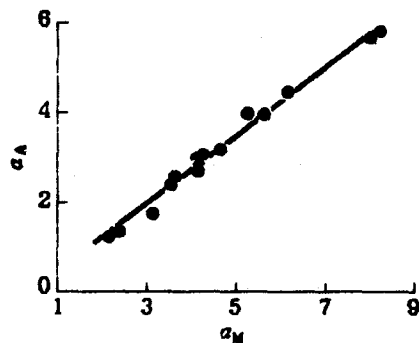


图 2 在乙腈 / 水为冲洗剂时的参数 a_A 与甲醇 / 水为冲洗剂时的参数 a_M 间的线性关系
 $a_A = -0.375 + 0.769 a_M$, $r = 0.9925$, $n = 15$

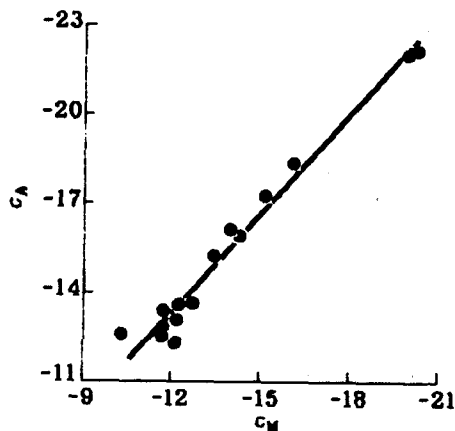


图 3 在乙腈 / 水为冲洗剂时的参数 c_A 与甲醇 / 水为冲洗剂时的参数 c_M 间的线性关系
 $c_A = -2.264 + 0.989 c_M$, $r = 0.9816$, $n = 15$

研究表明, 恒定其它操作条件, 在适当的离子对试剂浓度范围内, 离子对试剂浓度 c_p 对保留值的影响可由下式表达^[19]:

$$\ln k' = A' + B \ln c_p \quad (2)$$

若把式 (1)、(2) 结合起来, 辅以适当条件, 有机溶剂和离子对试剂浓度对保留值的影响由下式表达:

$$\ln k' = A + B \ln c_p + C c_b \quad (3)$$

将表 1 中的保留值按式 (3) 作多元回归, 所得结果见表 3. 分析表 3 中的数据, 溶质的保留值随有机溶剂浓度的升高而下降, 但随离子对试剂浓度的升高而升高. 当离子对试剂浓度达到或超过一定值时, 对保留值的影响不很明显, 离子对试剂浓度为 $0.016 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时, 实测的保留值与 $0.008 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时测定的保留值差别不大. 如把高浓度点时的保留值纳入式 (3) 的回归中, 将引起回归系数 r 的降低, 同时对参数 A 和 C 也有较大的影响. 因此关系式 (3) 只有在离子对试剂浓度较低时才能成立, 否则必须考虑离子对试剂相互作用项的影响.

表 3 由表 1 中的实测 k' 值按式 (3) 回归结果

溶 质	9 个实验点回归结果				8 个实验点回归结果			
	A	B	C	r	A	B	C	r
2-氨基苯磺酸	4.951	0.441	-12.95	0.9774	5.814	0.557	-12.95	0.9894
3-氨基苯磺酸	4.137	0.459	-12.02	0.9762	5.126	0.627	-12.02	0.9931
4-氨基苯磺酸	4.504	0.602	-12.81	0.9612	5.693	0.804	-12.83	0.9795
2-甲基-5-氨基苯磺酸	4.523	0.400	-13.28	0.9754	5.476	0.561	-13.28	0.9895
2-甲氧基-6-氨基苯磺酸	4.973	0.374	-13.56	0.9789	5.778	0.511	-13.56	0.9888
2-甲氧基-5-氨基苯磺酸	3.058	0.332	-12.89	0.9935	3.441	0.397	-12.89	0.9960
2-氯-5-氨基苯磺酸	4.737	0.423	-12.67	0.9749	5.594	0.567	-12.67	0.9868
5-氨基萘磺酸	5.118	0.405	-13.39	0.9826	5.885	0.535	-13.39	0.9916
6-氨基萘磺酸	5.979	0.382	-16.03	0.9798	6.777	0.517	-16.03	0.9870
2-氨基-1,4-苯二磺酸	7.982	0.916	-15.65	0.9835	8.799	1.054	-15.65	0.9875
4,6-二氨基-1,3-苯二磺酸	6.580	0.735	-14.92	0.9714	7.933	0.964	-14.92	0.9890
3-氨基-1,5-萘二磺酸	8.024	0.771	-17.54	0.9750	9.440	1.011	-17.54	0.9900
3-氨基-2,7-萘二磺酸	8.427	0.756	-18.44	0.9747	9.902	1.005	-18.44	0.9901
7-氨基-1,4,5-萘三磺酸	11.16	1.017	-22.08	0.9766	12.99	1.334	-22.08	0.9929
7-氨基-1,4,6-萘三磺酸	11.12	1.008	-22.08	0.9762	12.97	1.322	-22.08	0.9923

8 个和 9 个实验点分别去掉 $c_b = 0.20$ (v/v), $c_p = 0.016 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 时 k' 值和纳入这一值时的回归结果.

考虑有机溶剂和离子对试剂浓度的综合影响, 可以预见, 对每一溶质都存在离子对试剂浓度对保留值的正贡献与有机溶剂浓度负贡献相等的所谓“等效效应”值. 假定在 c_{p1} 和 c_{b1} 时的 $\ln k'$ 值与在 c_{p2} 和 c_{b2} 时 $\ln k'$ 值相等, 则有

$$B(\ln c_{p2} - \ln c_{p1}) = C(c_{b1} - c_{b2}) \quad (4)$$

式 (4) 经整理后得:

$$-\frac{(c_{b2} - c_{b1})}{\ln c_{p2} - \ln c_{p1}} = B/C = R \quad (5)$$

式 (5) 表明每增加 e 倍的离子对试剂浓度, 相当于降低 B/C 体积分数的有机溶剂; 因此可把 B/C 定义为“等效效应”值. 将式 (5) 代入式 (3)

$$\ln k'_2 = \ln k'_1 + C[R \ln(c_{p1}/c_{p2}) + c_{b2} - c_{b1}] \quad (6)$$

表 4 列出了每一溶质的“等效效应” R 值, 以及在 $c_p = 0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和乙腈浓度 0.20 (v/v) 时实测的 k'_e 值和由式 (3) 预测的 k'_{e1} 值以及基于 $c_{p1} = 0.008 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 和 $c_{b1} = 0.20$ (v/v) 时的保留值由式 (6) 预测的 k'_{e2} 值. 在计算 R 值和预测 k' 值时, 我们选用了由 8 个实验点回归所得的参数 A 、 B 和 C 值. 表 3 中的数据表明, 每增加 e 倍的离子对试剂浓度, 相当于降低 0.031~0.067 体积分数乙腈. 而从预测的精度来看, 由式 (6) 预测的 k'_{e2} 与实测值的偏差更小, 精度更高. 这主要归结为: (a) 关系式 (3) 多元回归所得相关系数只有 0.98~0.99, 由此可导致预测其它冲洗剂组成下保留值误差的增大; (b) 在应用式 (5) 预测 k' 值时, 引入某一组成下的实测 k' 值, 也即应用式 (6) 预测的保留值是相对值, 这样有利于消除系统误差对保留值预测精度的影响, 有利于提高保留值的预测精度.

表 4 反相离子对色谱中“等效效应” R 值和由式 (3)、(6) 预测的 k'_{e1} 、 k'_{e2} 值、实测的 k'_e 值比较

溶 质	R	k'_e	k'_{e1}	k'_{e2}
2-氨基苯磺酸	0.0430	1.25	1.50	1.26
3-氨基苯磺酸	0.0521	0.561	0.607	0.526
4-氨基苯磺酸	0.0627	0.330	0.348	0.285
2-甲基-5-氨基苯磺酸	0.0422	0.802	0.988	0.802
2-甲氧基-6-氨基苯磺酸	0.0377	1.37	1.67	1.39
2-甲氧基-5-氨基苯磺酸	0.0308	0.305	0.343	0.337
2-氯-5-氨基苯磺酸	0.0448	0.971	1.20	0.974
5-氨基萘磺酸	0.0400	1.38	1.68	1.42
6-氨基萘磺酸	0.0323	2.13	2.85	2.32
2-氨基-1,4-苯二磺酸	0.0673	1.09	1.18	0.942
4,6-二氨基-1,3-苯二磺酸	0.0646	0.824	0.927	0.753
3-氨基-1,5-萘二磺酸	0.0576	1.62	2.01	1.49
3-氨基-2,7-萘二磺酸	0.0545	2.24	2.81	2.15
7-氨基-1,4,5-萘三磺酸	0.0604	4.18	5.21	3.89
7-氨基-1,4,6-萘三磺酸	0.0599	4.36	5.45	4.11

$$c_b = 0.18(v/v); c_p = 0.004 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

参考文献

- 1 达世禄, 分析化学, 1989, 17, 372.
- 2 Fransson, B., *J. Chromatogr.*, 1986, 361, 161.
- 3 Barber, W. E.; Carr, P. W., *J. Chromatogr.*, 1984, 301, 25.
- 4 Horvath, C.; Melander, W.; Molnar, I., *Anal. Chem.*, 1977, 49, 142.
- 5 Horvath, C.; Melander, W.; Molnar, I., *J. Chromatogr.*, 1976, 125, 129.
- 6 Knox, J. H.; Hartwick, R. A., *J. Chromatogr.*, 1981, 204, 3.
- 7 Deedler, R. S.; Van der Berg, J. H. M., *J. Chromatogr.*, 1981, 218, 327.
- 8 Melander, W.; Horvath, C., "Ion-Pair Chromatography—Theory and Biological and Pharmaceutical Application", ed. by Hearn, M. T. W., Marcel Dekker, NY, 1985, p.27.
- 9 Bidlingmeyer, B. A., *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, 18, 525.
- 10 Bidlingmeyer, B. A.; Deming, S. N.; Price, Jr. W. P.; Sachok, B.; Petrusek, M., *J. Chromatogr.*, 1979, 186, 419.
- 11 Stahlberg, J., *J. Chromatogr.*, 1986, 356, 231.
- 12 Stahlberg, J., *Chromatographia*, 1987, 24, 820.
- 13 Lu, P.; Zou, H.; Zhang, Y., *Mikrochimica Acta*, 1990, 3, 35.
- 14 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章, 科学通报, 1991, 6, 433.
- 15 Zou, H.; Zhang, Y.; Lu, P., *J. Chromatogr.*, 1991, 545, 59.
- 16 Zou, H.; Zhang, Y.; Hong, M.; Lu, P., *Chromatographia*, 1991, 31, 329; 528.

- 17 张玉奎, 邹汉法, 洪名放, 卢佩章, 分析化学, **1992**, 20, 1042.
18 Zou, H.; Zhang, Y.; Hong, M.; Lu, P., *J. Chromatogr.*, **1993**, 644, 269.
19 洪名放, 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章, 化学学报, **1993**, 4, 357.

Comparison of Aromatic Sulphonic Acids in Reversed-phase Ion-pair Liquid Chromatography with Different Organic Modifier and Ion-pair Reagent Concentration

Zou, Han-Fa* Zhang, Yu-Kui Hong, Ming-Fang Lu, Pei-Zhang

(National Chromatographic Research and Analysis Center, Dalian Institute of Chemical Physics,
The Chinese Academy of Sciences, Dalian, 116011)

Abstract The capacity factors of 15 aromatic sulphonic acids in reversed-phase ion-pair liquid chromatography (RP-IPC) with acetonitrile / water and methanol / water containing ion-pair reagent tetrabutylammonium iodide were measured, the linear regression between the $\ln k'$ values and methanol, acetonitrile concentrations according to equation $\ln k' = a + Cc_b$ was carried out, good linear relationships of the $\ln k'$ values, the parameters a and C with acetonitrile as organic modifier vs. those with methanol as organic modifier were obtained, which mean that there is no significant difference in acetonitrile and methanol affecting the selectivity, the acetonitrile has a stronger eluent strength than methanol. The combined effect of organic modifier and ion-pair reagent concentration on retention values can be expressed by the equation $\ln k' = A + B \ln c_p + Cc_b$ in a suitable range of ion-pair reagent concentration. A critical value the positive effect of ion-pair reagent concentration on retention is equal to the negative effect of organic modifier concentration on retention has been obtained.