

## 混合固定相电色谱中溶质的输运特征

张维冰, 张丽华, 张凌怡, 张玉奎

(中国科学院大连化学物理研究所 国家色谱研究分析中心, 辽宁 大连 116011)

**摘要** :以离子交换和反相固定相构成的混合固定相电色谱中,溶质迁移在受到疏水、离子交换作用的同时,对于带电溶质而言,还受到电泳迁移的影响。根据离子独立迁移原理,结合色谱过程中的多种相互作用,得到了描述溶质表观迁移速率与其各形态迁移速率、各种相互作用之间相互关系的理论表达式,讨论了混合模式电色谱中流动相的 pH 及其中的有机调节剂浓度、混合固定相配比等对电渗流的影响及不同形态溶质在柱内的输运特征。结果表明,在电色谱中采用混合固定相可以在较大的 pH 和有机调节剂浓度范围内得到较强且稳定的电渗流。pH 通过改变溶质的形态影响分离,有机调节剂对中性溶质的影响满足一般反相电色谱中的规律,竞争试剂对带电溶质分离的影响较大,它的加入可以有效地改善峰形,但是由于电泳作用的调节,其作用并不如一般离子交换色谱中对选择性的影响大。

**关键词** :毛细管电色谱;混合固定相;输运;溶质

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-871X(2002)04-0295-04

## Transfer of Solutes in Capillary Electrochromatography with Mixed-Mode Stationary Phase

ZHANG Wei-bing, ZHANG Li-hua, ZHANG Ling-yi, ZHANG Yu-kui  
(National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics,  
The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116011, China)

**Abstract** : In capillary electrochromatography with the mixed-mode stationary phase, while the transfer of solutes could be controlled by the contributions of chromatography (reversed-phase and ion exchange), the transfer of charged solutes could be influenced by electrophoresis transfer. According to the principle of ion independent transfer and several kinds of interaction between solute, mobile phase, and stationary phase, an theoretical expression was derived to describe the relationship among the apparent transfer velocity of solute, the transfer velocities in various forms and the diversified interactions. The studies focused on the influence of various parameters (e. g., pH, organic modifier content, stationary phase proportion) and the transfer characters of various solutes in the mixed-mode capillary electroosmotic chromatography (CEC). These results demonstrate that electroosmotic flow in the mixed stationary phase electrochromatography are kept high and steady within wide ranges of pH and organic modifier content. The separation was affected by the pH through the change of the solutes conformation. The influence of neutral solutes by organic modifier complies with the rule of conventional reversed-phase CEC. The separation of charged solutes was influenced evidently by the compete reagents which could improve the shape of the peak, but it was not so important as in the conventional ion exchange chromatography due to the adjustment by the function of electrophoresis.

**Key words** : capillary electroosmotic chromatography; mixed-mode stationary phase; transfer; solute

毛细管电色谱是近年来新发展起来的一种高效微分离技术,它结合了毛细管电泳的高效和高效液相色谱高选择性的特点<sup>[1-3]</sup>。目前,毛细管电色谱柱中采用的填料 95% 以上沿用反相高效液相色谱

中的烷基键合固定相<sup>[4]</sup>。由于烷基键合固定相具有疏水的表面,当流动相中有机调节剂浓度较高时,电渗流会过低。此外,流动相 pH 的变化也会对电渗流产生较大影响。Smith 等<sup>[4]</sup>系统研究了多种电

收稿日期 2002-03-31

作者简介 张维冰,男,1964 年生,教授。

通讯联系人 张玉奎,研究员,博士生导师,电话/传真 (0411)3693427, E-mail: ykzhang1@online.ln.cn.

基金项目 国家重大基础研究基金项目(973)001CB510202。

色谱柱中电渗流的特征, Luddtke 等<sup>[5]</sup>也研究了反相和强阳离子交换混合固定相的特征。

在电色谱中采用离子交换与反相填料的混合固定相可以在较大的流动相组成范围内得到较强且稳定的电渗流, 从而避免了单纯采用反相固定相的缺陷<sup>[6~11]</sup>。Huang 等<sup>[12]</sup>利用反相和离子交换填料的混合模式分离小分子肽的混合物, 与一般的 ODS 填料反相电色谱相比, 通过调节流动相 pH 能够有效改善分离选择性。Hilder 等<sup>[13]</sup>采用混合模式电色谱, 通过流动相组成的改变, 调整离子交换固定相产生的离子交换作用与电泳作用, 结合竞争阴离子的种类和浓度控制两者的贡献, 使分离选择性改变。Adam 等<sup>[14]</sup>采用电色谱的方法研究奶油中的活性组分和防腐剂时, 分离柱采用强阳离子与反相混合填料。Tang 等<sup>[15]</sup>也合成了具有离子交换和反相特征的整体柱, 在该柱上流动相中的有机调节剂对电渗流的影响不很明显, 在 pH 2~9 内可获得稳定的电渗流。

在反相与离子交换混合模式电色谱过程中, 溶质的运输不仅与电渗流有关, 也与不同形态溶质的电泳速度、溶质与反相和离子交换固定相的作用有关。本文基于电泳过程中的离子独立迁移原理, 通过对柱分离过程中各种相互作用的系统考察, 说明溶质在混合模式电色谱中的运输规律。

## 1 理论部分

在反相和离子交换混合模式电色谱过程中, 不同形态的溶质与固定相的作用机制也不同。一般来讲, 可解离溶质在混合填料电色谱中存在溶质的解离平衡和不同形态溶质与固定相的作用平衡。

### 1.1 溶质的解离平衡

对于可解离溶质, 在流动相中可以以多种形态存在, 在特定的 pH 值范围内, 一般可以只考虑溶质两种形态之间的转换平衡。以一元弱酸 HA 为例, 转换平衡可以写成:



其中:  $k_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$ , 为解离平衡常数; HA 为溶质的酸性形态,  $\text{A}^-$  为其对应的碱性形态。在流动相中, 中性形态溶质以电渗流速度  $u_{\text{eo}}$  迁移, 带电形态的溶质以电渗流和电泳流的合速度  $u_{\text{eo}} + u_{\text{ep}}$  迁移。

### 1.2 不同形态的溶质与固定相的作用平衡

由于离子交换作用源于固定相表面上的强酸性或强碱性基团的解离, 而反相固定相表面的键合非极性基团的稳定性较高, 因此在流动相中盐的种类和离子强度保持不变的情况下, 可以认为两种固定

相在研究范围内稳定。与带电形态的溶质相比, 中性形态的溶质, 尤其是极性较弱的溶质与离子交换固定相的作用相对较小, 一般可以不予考虑。带电形态的溶质与反相色谱固定相的相互作用也较小, 同样可以忽略。这样, 只需探讨中性形态的溶质与反相色谱固定相的作用和带电形态的溶质与离子交换固定相之间的作用, 即:



其中:  $k_1 = \frac{[\text{HAS}_1]}{[\text{HA}][\text{S}_1]}$ ,  $k_2 = \frac{[\text{AS}_2]}{[\text{A}^-][\text{S}_2]}$ , 分别为对应的作用平衡常数;  $\text{S}_1$ ,  $\text{S}_2$  分别代表反相和离子交换固定相。

根据电泳过程中的离子独立迁移原理, 溶质在毛细管电色谱中的表观迁移速率为其各种形态迁移速率  $u$  的摩尔分数加权平均, 因此

$$u = \frac{k_a[\text{H}^+]u_{\text{eo}} + (u_{\text{eo}} + u_{\text{ep}})}{1 + k_a[\text{H}^+] + k_2[\text{S}_2] + k_a k_1[\text{S}_1][\text{H}^+]} \quad (4)$$

其中  $[\text{S}_1]$ ,  $[\text{S}_2]$  为反相和离子交换固定相表面的活性位点分数。

式(4)反映了在混合固定相情况下溶质迁移速率与固定相种类、溶质性质、流动相性质、混合填料的配比以及操作条件之间的关系。

## 2 实验部分

在选用的作为溶质的化合物中除苯甲酸、乙苯和喹啉为化学纯试剂外, 其余均为分析纯或色谱纯试剂。流动相由二次去离子水配制, TriS(上海第一试剂厂)、磷酸、磷酸二氢钠和三乙基胺(沈阳化学试剂厂)均为分析纯; 乙腈(色谱纯, 山东禹王试剂厂)。流动相在使用前超声 20 min, 实验中每次更换流动相后均先将电色谱柱预平衡 30 min。

实验在 Beckman P/ACE 5510 型电泳仪(美国 Beckman 公司)上进行, 于 254 nm 波长处检测。填充毛细管电色谱柱为自制, 毛细管电色谱柱中填充的固定相为 5  $\mu\text{m}$  粒径的 Spherisorb ODS 和 5  $\mu\text{m}$  粒径的 SCX(购自英国 Phase Separation 公司)的填料; 所用毛细管的内、外径分别为 75  $\mu\text{m}$  和 365  $\mu\text{m}$ , 总柱长为 27 cm, 填充部分长度为 20 cm(河北永年光导纤维厂)。数据采集系统(WDL 95 色谱工作站, 国家色谱研究分析中心)。

## 3 结果和讨论

### 3.1 混合固定相电色谱中电渗流的变化

SCX 为最常用的强阳离子交换固定相, 其表面

磷酸基的解离使其具有较强的亲水能力;ODS 是最常用的具有强疏水表面性质的反相色谱固定相。采用 SCX 与 ODS 混合固定相具有一定的代表性,图 1 给出了不同固定相配比情况下的电渗流变化。

混合填料的电渗流采用硫脲测定,全部装填 SCX 填料的电渗流采用水测定。可以看出,电渗流随 SCX 配比的增加有小的下降趋势,但当 SCX 的配比不是很小时,电渗流基本不变。采用硫脲测定混合填料的电渗流时,由于硫脲的强极性可能与 SCX 表面发生作用,影响到电渗流的测定精度,但并不影响图 1 中电渗流总的变化趋势。Huang 等<sup>[12]</sup>的研究也表明,混合固定相在较大的流动相有机调节剂浓度变化范围和较大的 pH 变化范围内保持较大且稳定的电渗流。

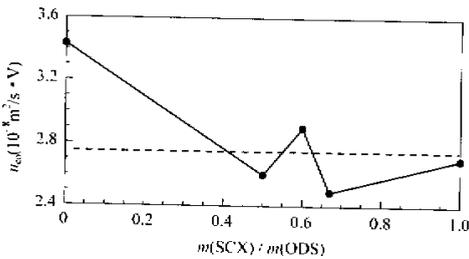


图 1 不同 SCX/ODS 配比下的电渗流变化  
Fig.1 Relationship between electroosmotic flow (EOF) and  $m(\text{SCX})/m(\text{ODS})$   
The dash line shows the average value.

在理想情况下,硫脲在 ODS 柱中完全不与固定相作用。而水在 SCX 柱中也完全不与固定相作用,但在相反的体系中,两者可以与固定相产生极强的相互作用。混合填料情况下电渗流的强弱应介于两种极端情况下的电渗流强弱之间。根据容量因子的物理意义,这一结果应与稀溶液的依数性规律非常相似。

在完全理想的状态下,尤其在两种填料单独使用时死时间相差较小的情况下,混合填料电色谱的死时间可以表示为两者关于固定相配比的加权平均。一般来讲,混合模式的电渗流与理想结果将有所偏离,可能得到正偏离或负偏离的结果。

### 3.2 中性溶质在混合固定相上的输运

对于非解离的中性化合物在混合模式电色谱柱上的分离,式(4)可以简化为:

$$u = \frac{u_{eo}}{1 + k_1[S_1]} \quad (5)$$

显然,如果不考虑电渗流的变化,SCX 填料的加入只相当于反相色谱中相比的改变。根据容量因子的定义,式(5)可以进一步改写为:

$$k' = k_1[S_1] \quad (6)$$

其中  $k'$  为溶质的容量因子,  $k_1$  相当于填料全部为反相固定相时的  $k'$ ,即在一般反相色谱中的容量因子,可采用通常的容量因子表达式计算。图 2 给出了在 SCX/ODS 混合柱上根据死时间和溶质保留时间的实测值,按通常的容量因子表达式计算得到的甲苯的容量因子随 SCX/ODS 配比的变化情况。

由图 2 可见,在 SCX/ODS 混合柱中,中性形态溶质的迁移所满足的规律与一般反相色谱中的规律基本相同,保留值与混合固定相的配比成正比例变化,在很大范围内式(6)能够被很好地满足。

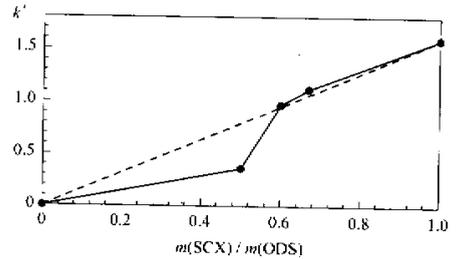


图 2 甲苯容量因子随 SCX/ODS 配比的变化  
Fig.2 Relationship between  $k'$  of toluene and mass ratio of SCX and ODS

### 3.3 离子形态的溶质在混合固定相上的迁移

一般的方法建立应避免在可解离溶质的  $pK_a \pm 0.5$  的范围内调节 pH,否则所建立方法的稳定性将不能得到保证。因此,在所建立的方法中一种溶质通常只以一种主要形态存在于流动相中。

对只以带电形态存在的溶质,式(4)可简化为:

$$u = \frac{u_{eo} + u_{ep}}{1 + k_1[S_2]} \quad (7)$$

带电形态溶质的迁移综合了电泳和离子交换色谱的特征。Klampfl 等<sup>[9]</sup>通过在流动相中加入离子竞争试剂调节电泳机理和离子交换机理在分离过程中的作用,使样品达到更好的分离效果。为了说明带电形态的溶质在混合填料电色谱中的迁移行为,图 3 给出了喹啉在混合固定相、pH 2.63 的流动相体系中的电色谱谱图。

在 pH 2.63 的流动相体系中喹啉带正电荷,与电渗流迁移方向相同,应较作为电渗流标记物的硫脲流出更快,但由于其与 SCX 固定相的作用,使表观迁移速率变慢。图 3 中峰 2 为喹啉。由于在这种实验条件下喹啉带正电荷,可以与 SCX 产生离子交换作用,因而又引起峰拖尾。当流动相中加入三乙基胺后,由于其对固定相表面的掩蔽作用,可以减弱溶质与混合固定相的离子交换作用,使峰形得到改善。当竞争试剂与溶质的作用比其与固定相的作用强时,溶质以与毛细管区带电泳(CZE)中相类似的机理输运,迁移速率主要由电泳流决定,表观迁移速

率加快。结合式(6)和图2,也可以得到喹啉在该体系中的离子交换平衡常数。

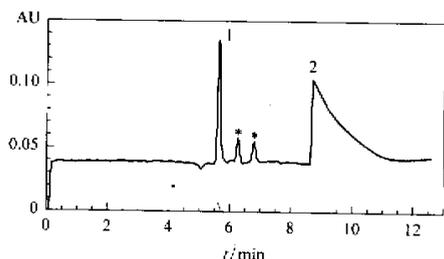


图3 喹啉在 pH 2.63 流动相体系中的迁移

Fig.3 Separation of quinoline in the mobile phase (pH 2.63)

Conditions: mixed stationary phase, 5  $\mu\text{m}$ ,  $m(\text{SCX})/m(\text{ODS})=1/2.5$ ; packed column length, 20 cm; total column length, 27 cm; mobile phase: ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (70:30, V/V) containing 2 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ , pH 2.63; injection, 1 kV  $\times$  1 s.

1. thiourea; 2. quinoline; \*. impurity.

### 3.4 复杂样品在混合固定相上的分离

对于同时含有酸性、碱性和中性化合物的复杂样品,由于混合固定相具有较好的选择性调节作用,因此在其上可以得到更好的分离效果。Klampfl 等<sup>[9]</sup>在混合固定相电色谱柱上实现了中性、酸性和碱性化合物的同时分离。我们在实验中采用 SCX/ODS 混合填充柱,在等度洗脱方式下也实现了酸性、碱性和中性化合物的同时快速分离(见图4)。

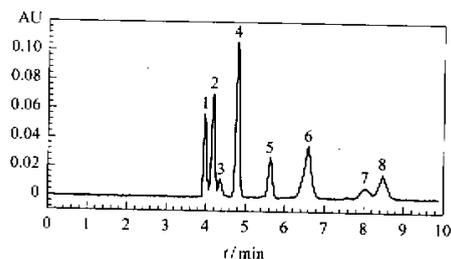


图4 SCX/ODS 混合填充柱同时快速分离酸性、碱性和中性化合物

Fig.4 Separation of acid, basic and neutral compounds on the mixed stationary phase of SCX and ODS in the same run

Conditions: mobile phase, ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (75:25, V/V) containing 2 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ , pH 2.63; the others are the same as in Fig.3.

1. thiourea; 2. benzoic acid; 3. *o*-toluic acid; 4. benzaldehyde; 5. *p*-nitrotoluene; 6. *o*-phthalic acid; 7. pyridine; 8. quinoline.

在 pH 2.63 的条件下,吡啶和喹啉均带正电,而其他化合物皆为中性,8 种组分在 9 min 内得到很好分离。

流动相中有机调节剂、pH、竞争试剂浓度的变化,可以同时影响到不同形态溶质的迁移行为。为了使所建立的方法具有足够的稳定性,选定的 pH 应避免在所有组分的  $\text{pK}_a$  附近。通常选择较强的酸性 (pH < 3) 或较强的碱性 (pH > 8) 范围,这样一般

的酸性或碱性组分将以中性形态存在。此外,当组分所带电荷导致其与电渗流迁移方向相反时,也可能使分析时间过长,甚至不出峰。实际上通过 pH 的控制,同时含有酸性、中性和碱性组分的样品分离可以简化为只有带一种电荷形态的组分及中性组分在柱中的分离。带电形态的组分迁移受电泳过程和离子交换过程两种机理影响,而中性形态的溶质的迁移过程满足一般的反相电色谱分离机理。

流动相中的有机调节剂对分离选择性的影响主要取决于对中性组分在两相间分配过程的影响。由于离子交换固定相提供了较强的电渗流,且有机调节剂对电渗流的影响不明显,因此有机调节剂对带电形态组分的迁移影响不大。竞争试剂对中性组分的迁移过程几乎无影响,而对带电形态的溶质分离的影响较大,因此有机调节剂的加入可以有效地改善带电形态溶质的峰形。但是由于电泳过程的调节,其作用不如在一般离子交换色谱中对选择性的影响大。

对于强极性化合物的分离,SCX 也起到一定的作用,此时应在考虑反相色谱机理的同时考虑 SCX 的离子交换作用。磺酸基的存在增大了固定相表面的亲水能力,因此可以通过降低流动相中有机改性剂含量的方法来实现强极性化合物的分离。

### 参考文献:

- [1] ZOU Han-fa, LIU Zhen, YIE Ming-liang, *et al.* Theory and Practice of Capillary Electrochromatography. Beijing: Science Press, 2001. 46  
邹汉法,刘震,叶明亮,等. 毛细管电色谱理论与实践. 北京:科学出版社,2001. 46
- [2] Lammerhofer M, Svec F, Frechet J M J, *et al.* TrAC, Trends Anal Chem, 2000, 19(11): 676
- [3] Dabek Z E, Aranda R R, Keppel J K. Electrophoresis, 2001, 22(19): 4262
- [4] Smith N, Evans M B. J Chromatogr A, 1999, 832, 41
- [5] Ludtke T S, Unger K K. Chromatographia, 1999, 49: 49
- [6] Klampfl C W, Buchberger W, Haddad P R. J Chromatogr A, 2001, 911: 277
- [7] Klampfl C W, Haddad P R. J Chromatogr A, 2000, 884: 277
- [8] Scherer B, Steiner F. J Chromatogr A, 2001, 924: 197
- [9] Klampfl C W, Hilder E F, Haddad P R. J Chromatogr A, 2000, 888: 267
- [10] Walhagen K, Unger K K, Hearn M T W. Anal Chem, 2001, 73(20): 4924
- [11] Zhang L, Zhang Y, Shi W, *et al.* J High Resol Chromatogr, 1999, 22(12): 666
- [12] Huang P, Jin X, Chen Y, *et al.* Anal Chem, 1999, 71(9): 1786
- [13] Hilder E F, Macka M, Haddad P R. Anal Commun, 1999, 36(8): 299
- [14] Adam T, Kramer M. Chromatographia, 1999, 49: 35
- [15] Tang Q, Lee M L. J Chromatogr A, 2000, 887: 265