

反相高效液相色谱负峰测定法研究以及酮类的测定

王 培¹ 郭治安^{*1} 陈海旭¹ 王丽琴²

(西北大学 合成与天然功能分子化学教育部重点实验室¹,
文化遗产研究与保护技术教育部重点实验室², 西安 710069)

摘 要 研究了反相液相色谱中负峰现象及产生的原理,应用计量置换作用原理解释了样品在色谱柱中的计量置换保留行为;应用负峰法测试了甲基脂肪酮各组分的含量。本研究采用 Agilent C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 V(甲醇) : V(水, 含 0.01 mmol/L 磺基水杨酸) = 60 : 40, 紫外检测器 (λ_{sig} = 310 nm, λ_{ref} = 275 nm)。本方法简便,线性相关系数 *r* 均大于 0.9993; 甲基酮的定量下限为 0.041 μg; 相对标准偏差为 0.52% ~ 0.80%。

关键词 反相高效液相色谱; 负峰法; 计量置换; 甲基酮

1 引 言

反相液相色谱中负峰测定法是一种间接光度检测方法,广泛应用于离子色谱和毛细管电泳中,检测对象基本是离子型化合物^[1~5],对于其作用机理也有相关解释^[3~5]。而由于缺乏合理的理论解释,间接光度反相液相色谱未得到很好的应用。色谱计量置换机理^[6]即一个溶质分子被吸附剂吸附的同时,必伴随着一定计量数目的溶剂分子离开溶质分子与吸附剂的界面而返回到溶液中。这个理论很好地解释了间接光度反相液相色谱测定中出现的负峰现象。若应用紫外检测器,样品分子是无紫外吸收或弱紫外吸收的分子,流动相含有紫外吸收分子,则在色谱分离过程中样品分子与固定相上吸附的紫外吸收分子发生置换使其返回到流动相中,相应谱带的紫外吸收分子浓度降低,检测器检测出负峰(即弱吸收峰)信号。因此,负峰法使紫外检测器可应用于无紫外吸收或弱紫外吸收的物质的分析测定。醛酮分子在紫外区有很微弱的吸收,用紫外检测器一般很难直接测定。通常,醛酮的测定需利用氧化还原反应在其还原端接上有紫外吸收的基团,例如 2,4-二硝基苯肼衍生测定法^[7,8]。若能借鉴色谱中的计量置换机理,采用间接光度技术直接测定醛酮,则可消除衍生化操作带来的麻烦和误差。文献[9]应用负峰测定法测定乙酸酯,文献[5]报道了间接光度色谱法,但用计量置换机理解释反相液相色谱溶质溶剂作用关系,及负峰法测定酮类物质尚未见报道。

本实验在流动相中加入吸光物质作为本底试剂,用负峰法测定甲基脂肪酮类化合物,系统研究了色谱分析条件。本实验用计量置换作用原理解释了反相液相色谱测定中出现的负峰现象。研究表明,在液相色谱分析时紫外检测器也可用于无紫外吸收物质的测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HP 1100 液相色谱仪 (美国惠普公司),配 DAD 二极管阵列检测器、HP Chem station 化学工作站、Agilent C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

甲醇 (色谱纯, Fisher Scientific 公司); 丙酮 (天津市富于精细化工有限公司); 丁酮 (天津化学试剂六厂); 甲基异丙基甲酮 (上海试剂一厂); 甲基异丁基甲酮、对苯二酚 (西安化学试剂厂); 水杨酸 (新中化学厂); 磺基水杨酸 (广州化学试剂厂); *N,N*-二甲基乙酰胺 (成都市联合化工试剂研究所), 上述试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

2009-10-27 收稿; 2010-01-15 接受

本文系西北大学文化遗产研究与保护技术教育部重点实验室开放课题基金 (No. KB09033) 资助

* E-mail: guozhianzhao@126.com

2 2 实验方法

用含确定量本底试剂的流动相平衡仪器至基线平直,在选定色谱条件下,对样品进行分析。

3 结果与讨论

3 1 流动相的选择

实验中采用二元流动相,向流动相中加入适量的本底试剂,在流动相中甲醇与本底试剂水溶液的体积比分别为 70 30, 60 40, 50 50, 40 60和 30 70,对甲基酮系列样品混合溶液进行测定。实验表明,当 $V(\text{甲醇})/V(\text{本底试剂水溶液})=60/40$ 时,各组分能达到很好地分离,而且分析时间短。因此本实验采用 $V(\text{甲醇})/V(\text{本底试剂水溶液})=60/40$ 为流动相进行样品测定。

3 2 本底试剂的选择

基于本底试剂的化学性质和极性,本实验考察了对苯二酚、水杨酸、磺基水杨酸、*N,N*-二甲基甲酰胺作为本底试剂时,甲基酮的检出限和仪器平衡时间。磺基水杨酸的极性较强,平衡时间短,而且检出限低,结果如表 1 所示。本实验最终以磺基水杨酸为本底试剂。

表 1 本底试剂与平衡时间和最低检测量的关系

本底试剂 Background reagent	平衡时间 Balance time (min)	最低检测量 Minimum detectable quantity (10^{-7} g)			
		丙酮 Acetone	丁酮 Butanone	甲基异丙基甲酮 Methyl isopropyl ketone	甲基异丁基甲酮 Methyl isobutyl ketone
对苯二酚 <i>p</i> -Dihydroxybenzene	60	0.80	1.11	1.07	1.76
水杨酸 Salicylic acid	70	0.84	0.84	1.05	1.39
磺基水杨酸 Sulfosalicylic acid	50	0.79	0.83	0.98	1.38
<i>N,N</i> -二甲基乙酰胺 <i>N,N</i> -Dimethylacetamide	40	0.84	1.03	0.97	1.51

流动相 (Mobile phase): 甲醇 (Methanol) 水 (Water) (含 0.05 mmol/L 本底试剂 (Background reagent)) (60/40, V/V); 测定物质 (Sample): 甲基酮 (Methyl ketones)。

3 3 负峰产生机理及检测波长的选择

实验向流动相中加入磺基水杨酸作为强紫外吸收的本底试剂,用这种流动相平衡仪器至基线平直。因为待分析样品甲基脂肪酮是弱紫外吸收物质,所以当样品进样后,甲基酮分子把原来吸附在固定相上的部分流动相分子 (包括甲醇、水和加入的本底试剂分子) 置换出来,使得固定相上对应甲基酮分子谱带的磺基水杨酸浓度低于其它分子谱带。由于此方法检测的吸光度为磺基水杨酸浓度变化的净吸光度,因此流出色谱柱经过检测器时测得比基线小的吸光度,紫外检测器检测出负峰信号。

本实验以甲基酮的吸收波长 275 nm 作为参比波长,改变检测波长对样品进行测定。实验发现,基线噪音和信噪比随检测波长而变化,噪音小,信噪比大,检测灵敏度高。如图 1 和图 2 所示,检测波长高于 260 nm 噪音较小且无明显变化;310 nm 时信噪比最大。实验选择的本底试剂为磺基水杨酸,经测定其最大吸收波长为 296 nm,而样品的最大吸收波长在 275 nm 附近。如果选择检测波长为 296 nm,样品信号峰最大,但噪音略大,则信噪比较小。由于实验测定的是本底试剂吸光度的减少值,磺基水杨酸最大吸收波长 296 nm 靠近样品的最大吸收波长,而 310 nm 距其相对较远,所以检测波长为 310 nm 时,Δ*A* 较 296 nm 时略大,信噪比也较大。因此实验选择 310 nm 为检测波长。此时噪音小,信噪比大,灵敏度高。

3 4 本底试剂浓度的选择

将本底物质加入流动相中,会使得基线噪音增大,所以选择本底试剂的浓度应尽可能低;但如果其

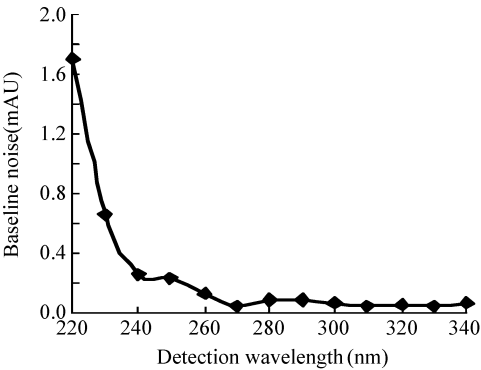


图 1 噪音与检测波长的关系
Fig 1 Dependence of baseline noise on detection wavelength

浓度太低,将降低检测的灵敏度。本实验分别配制本底试剂浓度 0.005,0.01,0.02和 0.05 mmol/L 的流动相,平衡仪器至基线平直,进行实验。由图 3所示,基线噪音随本底物质浓度变化较大,且当本底物质浓度为 0.01 mmol/L时,噪音最小,最小检测量最低。所以,确定流动相中所加的磺基水杨酸的浓度为 0.01 mmol/L。

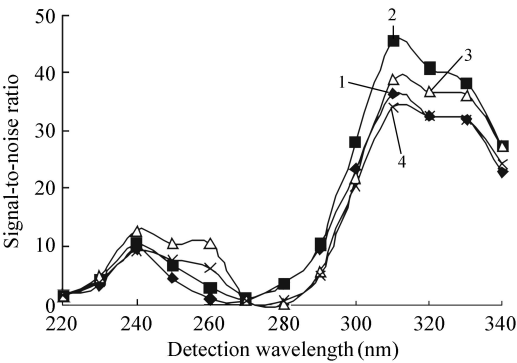


图 2 信噪比与检测波长的关系

Fig 2 Dependence of signal-to-noise ratio on detection wavelength

1. 丙酮 (Acetone); 2. 丁酮 (Butanone); 3. 甲基异丙基甲酮 (Methyl isopropyl ketone); 4. 甲基异丁基甲酮 (Methyl isobutyl ketone)。

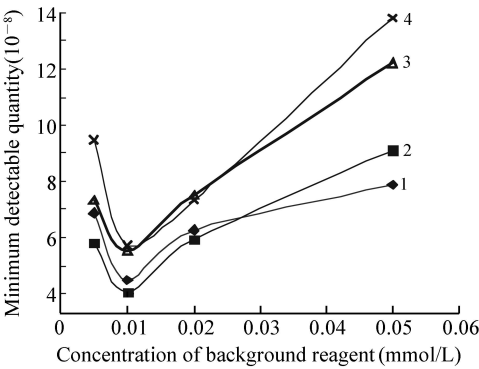


图 3 检出限与本底试剂浓度的关系

Fig 3 Dependence of detection limit on concentration of background reagent

1. 丙酮 (Acetone); 2. 丁酮 (Butanone); 3. 甲基异丙基甲酮 (Methyl isopropyl ketone); 4. 甲基异丁基甲酮 (Methyl isobutyl ketone)。

3.5 甲基酮系列分离

准确量取丙酮、丁酮、甲基异丙基甲酮和甲基异丁基甲酮各 100 μ L 于 10 mL 容量瓶中,用本底试剂浓度为 0.01 mmol/L 的流动相作为溶剂加至刻度,摇匀。取 10 μ L 此甲基酮混合溶液进样进行色谱分离 (图 4),分离结果良好,以上各物质的分离度均大于 1.5,峰形良好。

3.6 线性关系、精密度和检出限

峰面积和进样量成正比,是色谱定量分析的依据。本方法是根据色谱过程样品组分对本底试剂的置换作用建立的,测定的是负峰,为考察负峰面积与进样量间的关系,在本文选定的色谱条件下,取上述甲基酮溶液分别进样 2, 4, 6, 8 和 10 μ L。将所测得的峰面积与对应酮的绝对量进行线性回归,丙酮、丁酮、甲基异丙基甲酮、甲基异丁基甲酮的峰面积 A 与其绝对进样量 x 的工作曲线分别为: $A = 226.19x - 123.62$, $A = 230.24x - 98.855$, $A = 218.65x - 110.01$, $A = 179.63x - 45.128$,线性相关系数 r 分别为 0.9993, 0.9995, 0.9997, 0.9996。因此,此方法可以准确进行定量分析。

准确吸取 10 μ L 上述甲基酮溶液进行平行测定,结果见表 2。采用逐步稀释测定信噪比为 3:1 时,甲基酮的定量下限为 0.041 μ g。

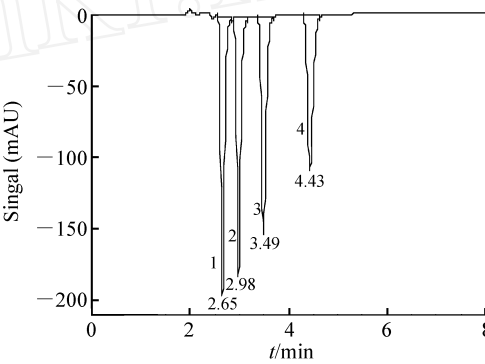


图 4 混合样品的色谱图

Fig 4 Chromatogram of sample mixture

流动相 (Mobile phase): 甲醇-水 (含 0.01 mmol/L 磺基水杨酸 (Sulfosalicylic acid) (60:40, V/V), $\lambda_{\text{sig}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ref}} = 275 \text{ nm}$; 流速 (Flow rate) = 0.8 mL/min; $T = 35^\circ\text{C}$ 。1. 丙酮 (Acetone); 2. 丁酮 (Butanone); 3. 甲基异丙基甲酮 (Methyl isopropyl ketone); 4. 甲基异丁基甲酮 (Methyl isobutyl ketone)。

表 2 混合样品测定结果

Table 2 Analytical results of sample mixture

甲基酮 Methyl ketone	峰面积平均值 Peak area mean	相对标准偏差 RSD (% , n = 5)
丙酮 Acetone	1014	0.52
丁酮 Butanone	1058	0.60
甲基异丙基甲酮 Methyl isopropyl ketone	984	0.73
甲基异丁基甲酮 Methyl isobutyl ketone	850	0.80

4 结 论

色谱负峰测定法反映了物质在色谱分离过程中存在一定的计量置换作用,从实验上支持了计量置换理论;从研究所采用的技术可见,用 HPLC 紫外检测器可用于测定无紫外吸收的物质,扩大了紫外检测器的应用范围;分析中直接检测的是加入的本底试剂的吸光度减少值,因此,只要能确定待测物质与加入物质的计量关系,即可在没用标准样品的情况下定量分析样品。

References

- 1 YUAN Cheng(袁成), WANG Jing-Xiang(王景祥), LIANG Zhu(梁竹), XIN Nai-Jun(辛乃军). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **1998**, 16(5): 445 ~ 447
- 2 HU Yu-Ling(胡玉玲), DA Shi-Lu(达世禄), FENG Yu-Qi(冯钰琦), ZHANG Qing-He(张庆合). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **1999**, 17(3): 271 ~ 274
- 3 Collet J, Gareil P. *Journal of Chromatogr A*, **1995**, 716(1-2): 115 ~ 122
- 4 Steiner F, Beck W, Engelhardt H. *J. Chromatogr A*, **1996**, 738(1): 11 ~ 23
- 5 Xiong X, Li S F Y. *J. Chromatogr A*, **1998**, 822(1): 125 ~ 136
- 6 Geng X D, Regnier, Fred E. *Chinese Journal of Chemistry*, **2003**, 21(2): 181 ~ 188
- 7 WEI Xiao-Bing(魏晓兵), FAN Guo-Liang(范国樑), SONG Wei(宋威), SONG Chong-Lin(宋崇林), ZHOU Wei-Yi(周维义), ZHANG Zhong-Rong(张仲荣). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2005**, 33(6): 781 ~ 784
- 8 ZHAO Yong-Gang(赵永刚), HU Guang-Jiu(胡冠九), NING Zhan-Wu(宁占武), ZHANG Xiang-Zhi(张祥志), ZHANG Yong(章勇), ZHOU Chun-Hong(周春宏). *The Administration and Technique of Environment*(环境监测管理与技术), **2008**, 20(3): 38 ~ 40
- 9 GUO Zhi-An(郭治安), ZHAO Jing-Chan(赵景婵), YAN Wei-Zhou(闫维洲), SONG Jun-Feng(宋俊峰). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2004**, 32(3): 356 ~ 359

Negative Peaks Ultraviolet Detection in Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography and Its Application to Determination of Ketones

WANG Pei¹, GUO Zhi-An^{*1}, CHEN Hai-Xu¹, WANG Li-Qin²

(Ministry of Education Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecular Chemistry¹,

Ministry of Education Key Laboratory of Culture Heritage Research and Conservation², Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract The phenomenon of negative peaks ultraviolet detection (UV) was reported and the principle was explained. In liquid chromatography, solute molecules in the mobile phase undergo many successive adsorptions and desorptions. It was proved that there was a relationship called stoichiometric displacement. The stoichiometric displacement retention behavior of samples in the column was explained using the theory. Based on the theory, the content of each component in the mixed ketones was detected. From the study, UV detector can be used to detect the sample without UV absorbance. As the result of the study, liquid chromatography separation was performed on Agilent C₁₈ column with methanol-water (60/40, V/V) and sulfosalicylic acid concentration of 0.01 mmol/L as mobile phase and with UV detection ($\lambda_{\text{sig}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ref}} = 275 \text{ nm}$). The method was simple and the correlation coefficients were above 0.9993. The limit of quantitative detection was 0.041 μg for methyl ketones and their relative standard deviations were between 0.5% and 0.8%.

Keywords Reversed phase high performance liquid chromatography; Negative peak; Stoichiometric displacement; Methyl ketones

(Received 27 October 2009; accepted 15 January 2010)