

反相液相色谱中离子抑制剂的有机调节剂作用

戚争春, 梅少博, 练鸿振*

生命分析化学教育部重点实验室, 南京大学化学化工学院, 南京大学现代分析中心, 南京 210093

* 通讯作者, E-mail: hzlian@nju.edu.cn

收稿日期: 2009-05-28; 接受日期: 2009-06-15

摘要 系统地研究了在反相液相色谱(RPLC)流动相中作为离子抑制剂的酸、碱及缓冲溶液对中性化合物保留行为的影响, 着重探讨了有机酸、有机碱离子抑制剂的有机调节剂作用, 定量地考察了甲醇和乙腈、甲醇和乙酸、甲醇和三乙胺、乙腈和乙酸、乙腈和三乙胺在十八烷基硅烷键合相上洗脱强度之间的关系, 为 RPLC 中有机调节剂的洗脱强度排序提供一种评判方法. 另外, 讨论了乙酸和三乙胺作为有机调节剂时不同的作用机理. 本实验结果对于 RPLC 分离方法的快速建立和准确优化都具有一定的借鉴意义.

关键词

反相液相色谱(RPLC)
离子抑制剂
乙酸
三乙胺(TEA)
缓冲溶液
有机调节剂

1 引言

用有机调节剂和水的混合溶液作流动相, 在解决反相液相色谱(RPLC)的很多分离问题时卓有成效. 对于弱解离化合物的分离和分析, 为了保证溶质在色谱中有足够的保留, 常在水溶液中加入含盐缓冲溶液作为离子抑制剂, 称为离子抑制反相液相色谱(IS-RPLC)^[1,2]. 这些缓冲溶液在色谱过程中能缓冲流动相的 pH, 以抑制溶质的离解, 还能覆盖色谱柱中固定相的活性中心(即活性硅羟基), 从而改善色谱峰形、提高分离度^[3,4]. 但另一方面, 金属盐和磷酸盐等非挥发性缓冲溶液, 极易污染离子源^[5], 与质谱仪不能兼容, 限制了缓冲溶液的使用. 在实际的 RPLC 工作中, 直接用酸或碱调节一定的 pH 值来抑制弱解离化合物的离解一直得到广泛的应用, 在样品保留行为与流动相性质(抑制剂种类、浓度和 pH)关系方面也有少量零星文献报道^[6], 但是对单纯用酸或碱作离子抑制剂的 IS-RPLC 模式尚没有非常系统的研究. 本小组^[7~10]已经系统研究了用酸或碱的水溶液代替缓冲溶液作为离子抑制剂时, 弱解离化合物的 RPLC 保

留行为与溶质的疏水性和离解性以及流动相 pH 之间的关系, 提出了描述这种关系的理论模型包括数学表达式, 并建立了以酸或碱为离子抑制剂时, 弱解离化合物的 RPLC 分离最佳条件选择和保留值预测的方案. 我们在实验中发现, 以高氯酸为离子抑制剂时, 弱解离酸性化合物的保留值只会随 pH 值的下降而单方向增加, 符合前人文献中所提出的反“S”型规律^[11~13]; 而以乙酸为抑制剂时, 这些溶质的保留值先随 pH 值的下降而增加, 尔后又减小, 与反“S”型规律不符^[7~9]. 这个现象初步被解释为: 乙酸不仅是离子抑制剂(离子部分的作用), 其未离解部分还具有有机调节剂的作用. 在高 pH 条件下, 乙酸在流动相中的含量很少, 且大部分离解为离子状态, 此时主要表现为离子抑制剂的作用; 而在低 pH 条件下, 由于乙酸的含量在流动相中大为增加, 中性分子状态的乙酸在流动相中占有相当比例, 这时乙酸则主要起到有机调节剂的作用; 而高氯酸是强酸性物质, 在流动相中完全离解, 不存在有机调节剂的作用. 在以碱为离子抑制剂进行弱解离碱性化合物保留行为的研究时

发现, 绝大多数化合物在以三乙胺(TEA)为离子抑制剂时的保留值均小于以氨水为离子抑制剂时的保留值, 推断这也与 TEA 具有一定的有机调节剂的功能有关^[10].

为了验证这个推测, 本小组在前期工作^[7]中用中性(不离解)的溶质做了比较实验, 发现乙酸的确能降低 RPLC 的保留. 但是由于样本数量较少, 我们只得到了乙酸具有有机调节剂的作用这一定性的结论^[7-9], 尚未进行更深一步的定量研究.

以酸、碱作为离子抑制剂时, 由于其具有有机调节剂作用, 会给预测带来一些误差, 尤其是流动相中有机调节剂浓度较低时^[7-10]. 一般认为, 缓冲溶液用作离子抑制剂时, 由于缓冲作用, 能保持流动相 pH 基本不变. 实际上, 由于缓冲溶液中用于调节 pH 值的有机酸碱同样具有有机调节剂的作用, 会导致保留值预测产生不可避免的误差.

本实验对酸碱离子抑制剂的有机调节剂作用展开了定量研究, 以间二硝基苯、1,3,5-三甲氧基苯、氯化苄、甲苯、对二氯苯和 1,2-二苯乙酮六种中性化合物为研究对象, 分别探讨了以甲醇-乙酸水溶液、甲醇-三乙胺水溶液和乙腈-乙酸水溶液、乙腈-三乙胺水溶液作为流动相时, 在加入不同体积分数的有机酸碱(对应不同的 pH)后, 各溶质保留行为的变化规律, 在十八烷基硅胶(ODS)固定相上, 建立了乙酸和三乙胺作为有机调节剂时与常见有机调节剂甲醇和乙腈相对应的定量关系. 同样地, 研究了以甲醇-乙酸铵-乙酸、甲醇-乙酸铵-氨水、乙腈-乙酸铵-乙酸、乙腈-乙酸铵-氨水为流动相时, 各溶质保留行为的变化规律, 在 ODS 固定相上建立了缓冲溶液中的乙酸作为有机调节剂时与甲醇和乙腈相对应的定量关系.

另一方面, Snyder^[14]提出了在液固色谱法中, 当某溶质在极性吸附剂硅胶色谱柱上进行分离时, 变更不同洗脱强度的溶剂作流动相时, 溶质的容量因子 k 也不同, 且提出了表征流动相溶剂强度参数的洗脱公式. 于世林^[15]则报道了在 Al_2O_3 吸附剂上的溶剂强度参数. 目前 ODS 色谱柱的应用非常广泛, 而对于在 ODS 柱上经常使用的溶剂强度参数的研究却少有报导. 本实验使用 ODS 色谱柱, 在不同洗脱条件下, 对酸碱离子抑制剂具有的有机调节剂作用展开了定量研究, 考察了甲醇、乙腈、乙酸、三乙胺的疏

水性和洗脱强度之间的关系, 为建立 RPLC 中有机调节剂的洗脱强度排序的方法提供一个新思路.

2 实验部分

2.1 实验仪器

LabTech LC 600 高效液相色谱仪(北京莱伯泰科仪器有限公司), 配有 Rheodyne 7725i 六通进样阀、HB-230A 恒温箱(江苏汉邦科技有限公司)、UV600 紫外-可见检测器和 LC workstation 2006 色谱工作站(北京莱伯泰科仪器有限公司).

实验选用 Phenomenex Gemini C_{18} 柱, 5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d.(广州菲罗门公司), Waters X-Terra C_{18} 柱, 5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d.(美国 Waters 公司)和 Kromasil C_{18} 柱, 5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d.(江苏汉邦科技有限公司). 其中, 两根不同批号的 Phenomenex Gemini C_{18} 柱(A、B)被采用, A 柱键合相的碳覆盖率和比表面积分别为 14.4%和 398 m^2/g , B 柱键合相的碳覆盖率和比表面积则分别为 13.8%和 376 m^2/g . 柱温均恒定在 30 $^{\circ}C$. 流动相流速为 1.0 mL/min, 进样体积为 10 μL , 检测波长为 254 nm.

2.2 药品和试剂

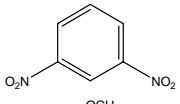
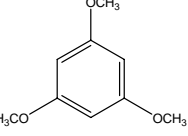
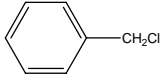
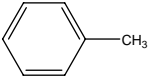
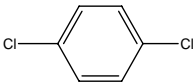
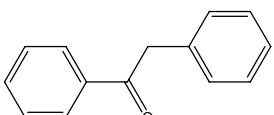
实验中流动相和稀释用水均为娃哈哈纯净水(中国杭州娃哈哈集团公司); 甲醇(色谱纯)购自江苏汉邦科技有限公司; 乙腈(色谱纯)购自德国 Merck 公司; 冰乙酸(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司; 三乙胺(色谱纯)购自美国 TEDIA 公司; 乙酸铵(分析纯)购自中国兴塔美兴化工厂; 氨水(25%~28%, 分析纯)购自南京化学试剂有限公司; 选用的 6 种中性化合物, 间二硝基苯、1,3,5-三甲氧基苯、氯化苄、甲苯、对二氯苯和 1,2-二苯乙酮(表 1)纯度均大于 99%, 用甲醇分别配制浓度为 1.0 mg/mL 的各溶质工作溶液, 储存于冰箱待用.

2.3 实验方法

2.3.1 流动相

pH 值用 SevenMulti 型 pH/电导率/离子综合测试仪(瑞士 Mettler-Toledo 公司)测定, 参比溶液为 pH 7.00 \pm 0.02、pH 9.21 \pm 0.02 和 pH 11.00 \pm 0.02 的缓冲溶液(瑞士 Mettler-Toledo 公司). 配制不同体积比的乙

表 1 6 种中性化合物

No.	Compounds	Structural formula
1	1,3-Dinitrobenzene	
2	1,3,5-Trimethoxybenzene	
3	1-Chloromethylbenzene	
4	Toluene	
5	1,4-Dichlorobenzene	
6	1,2-Diphenylethanone	

腈-水溶液, 乙腈在该溶液中的体积分数分别为 1%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 15%, 18%和 20%; 配制不同体积比的乙酸-水溶液, 乙酸在该溶液中的体积分数分别为 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 15%, 18%和 20%, 相应的 pH 分别为 2.71、2.52、2.38、2.28、2.24、2.16、2.10、2.04、1.94 和 1.90(25℃, 下同); 配制不同体积比的三乙胺-水溶液, 三乙胺在该溶液中的体积分数分别为 1%, 2%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%和 5%, 相应的 pH 分别为 12.36、12.66、12.69、12.82、12.86、12.94 和 12.96; 配制不同 pH 值的乙酸铵缓冲溶液, 固定乙酸铵的浓度为 100 mmol/L, 用乙酸调节该缓冲溶液的 pH 值分别为 6.01, 5.00, 4.01, 3.54, 3.22 和 3.00, 相应地加入乙酸的体积分数分别为 0.02%、0.22%、2.2%、6.0%、12%和 18.2%。

2.3.2 容量因子 k 的获得

由公式 $k = (t_R - t_0) / t_0$ 计算可得容量因子 k , 其中 t_R 是溶质的保留时间, t_0 是死时间, 本实验的死时间由 NaNO_3 的甲醇溶液测得, 所有的溶质保留时间是至少两次相近实验值的平均值。

分别以不同比例的甲醇-水或乙腈-水为流动相, 记录六种化合物在 Phenomenex Gemini C_{18} (A)和

Waters X-Terra C_{18} 柱上的保留值, 得到这六种化合物的容量因子与流动相中甲醇或乙腈体积分数之间的基准关系。

在 Phenomenex Gemini C_{18} (A)柱和 Waters X-Terra C_{18} 柱上, 采用甲醇-乙腈水溶液为流动相, 固定甲醇的体积分数分别为 0.60 和 0.55, 改变乙腈在水溶液中的浓度, 记录各溶质在不同乙腈浓度时的保留值, 考察甲醇和乙腈洗脱强度之间的关系。

固定甲醇的体积分数分别为 0.60 (Phenomenex Gemini C_{18} (A)柱)和 0.55 (Waters X-Terra C_{18} 柱), 采用甲醇-乙酸水溶液、甲醇-三乙胺水溶液为流动相, 分别改变乙酸和三乙胺在水溶液中的浓度, 记录各溶质相应的保留值, 考察甲醇和乙酸、甲醇和三乙胺洗脱强度之间的关系。

固定乙腈的体积分数分别为 0.50 (Phenomenex Gemini C_{18} (A)柱)和 0.45 (Waters X-Terra C_{18} 柱). 采用乙腈-乙酸水溶液、乙腈-三乙胺水溶液为流动相, 分别改变乙酸和三乙胺在水溶液中的浓度, 记录各溶质相应的保留值, 考察乙腈和乙酸、乙腈和三乙胺洗脱强度之间的关系。

在 Phenomenex Gemini C_{18} (B)柱上, 固定甲醇和乙腈的体积分数分别为 0.60 和 0.50, 在 Kromasil C_{18} 柱上; 固定甲醇和乙腈的体积分数分别为 0.65 和 0.50, 固定乙酸铵-乙酸的浓度为 100 mmol/L, 通过乙酸调节乙酸铵缓冲溶液的 pH 值, 得到各溶质相应的保留值, 考察在缓冲流动相中, 甲醇和乙酸、乙腈和乙酸洗脱强度之间的关系。

3 结果与讨论

在液相色谱中, Snyder - Soczewinski 公式表达了容量因子 k 与二元流动相中有机调节剂的体积百分比 Φ 的关系^[16]:

$$\log k = \log k_w - S\Phi, \quad (1)$$

其中, S 是 Φ 的回归系数, $\log k_w$ 是假定以纯水做流动相时溶质的保留值. 这个公式被卢佩章等^[17,18]进行了修正:

$$\log k = a + b \ln C_B + c C_B, \quad (2)$$

公式中的 a 、 c 和 C_B 分别相当于公式(1)中的 $\log k_w$ 、 $-S$ 和 Φ . 在 RPLC 中, $b \ln C_B$ 的贡献很小^[17-19], 可以忽略, 因而有:

$$\log k = a + cC_B, \quad (3)$$

其中, 参数 a 反映了 RPLC 中溶质与键合相的疏水作用; 参数 c 反映了溶质在流动相中的作用能^[18], 还被称为作用指数, 用于标志 RPLC 系统中洗脱剂的强度^[20], 对于特定的溶质-洗脱剂而言是一个常数.

3.1 直接以酸、碱作为离子抑制剂时酸碱离子抑制剂的有机调节剂作用

3.1.1 甲醇-水和乙腈-水中 $\log k$ 与 C_B 基准线性关系的考察

分别在甲醇-水和乙腈-水二元流动相条件下, 建立了 6 种中性化合物在 Phenomenex Gemini C₁₈ (A) 和 Waters X-Terra C₁₈ 柱上的 RPLC 容量因子对数值 $\log k$ 与有机调节剂(甲醇或乙腈)浓度 C_B 之间的线性关系, 得到各溶质分别在甲醇-水体系和乙腈-水体系中的 $\log k$ - C_B 基准关系. 由表 2 可以看出, $\log k$ - C_B 的线性关系回归结果均非常好 ($r > 0.999$). 以乙腈做有机调节剂时, 溶质的 $\log k$ - C_B 线性总体上略低于以甲醇做有机调节剂时溶质的 $\log k$ - C_B 线性, 这是因为甲醇在 ODS 固定相表面呈单分子层吸附状态, 其 $\log k$ 与 C_B 在 0~100% 甲醇浓度范围内呈良好的线性, 而乙腈以多分子层的状态吸附, 其 $\log k$ 与 C_B 在 0~100% 乙腈浓度范围内呈双曲线关系^[21], 但是, 由于本实验的乙腈浓度跨度很小, 而且位于线性最好的乙腈浓度段, 并不影响溶质的 $\log k$ - C_B 线性. 结果还显示, 在相同体

积分数的甲醇和乙腈的条件下, 溶质在甲醇-水体系下的保留值大于其在乙腈-水体系中的保留值, 也就是说甲醇在 RPLC 中的洗脱强度弱于乙腈. 一方面, 由于甲醇的表面张力和介电常数较大, 极性强于乙腈, 溶质在甲醇中与疏水性键合相的缔合作用较强; 另一方面, 甲醇和乙腈的正辛醇/水分配系数对数值 ($\log K_{ow}$) 分别是 -0.66 和 -0.34^[22], 甲醇疏水性小于乙腈. 从甲醇-水体系和乙腈-水体系的 $\log k$ - C_B 线性回归结果可以看出, 同一溶质在 Phenomenex Gemini C₁₈ (A) 柱和 Waters X-Terra C₁₈ 柱上的 a 值和 c 值基本接近, 但不完全吻合. 原因是, 虽然两根色谱柱填料都是 ODS 固定相, 但是不同品牌、不同型号的 ODS 固定相的碳含量和比表面积不同, 导致溶质的保留值有所差别.

3.1.2 甲醇和乙腈洗脱强度之间的关系

如果流动相中同时存在两种有机调节剂, 其中第一种有机调节剂的体积分数为 p_1 , 第二种有机调节剂的体积分数为 $C_{B(2)}$. 设根据中性化合物的 $\log k$ - C_B 基准关系得到的流动相中以第一种有机调节剂的有机调节剂的总体积分数为 $C_{B(1)}$, 则有:

$$C_{B(1)}' = p_1 + q_{1/2} C_{B(2)}, \quad (4)$$

其中, $q_{1/2}$ 为流动相中单位体积分数的第二种有机调节剂相当于第一种有机调节剂的体积分数.

已知在 RPLC 中, 乙腈的洗脱强度大于甲醇. 绘

表 2 6 种中性化合物分别在甲醇-水和乙腈-水体系中的 $\log k$ - C_B 基准关系 (r 表示回归系数, 下同)

Columns	No.	Methanol-water		Acetonitrile-water	
		Relation equation	r	Relation equation	r
Gemini C ₁₈ (A)	1	$\log k = 1.843 - 2.695 C_B$	0.9996	$\log k = 1.765 - 2.938 C_B$	0.9998
	2	$\log k = 2.417 - 3.218 C_B$	0.9999	$\log k = 1.906 - 2.966 C_B$	0.9996
	3	$\log k = 2.774 - 3.510 C_B$	1.0000	$\log k = 2.225 - 3.207 C_B$	0.9995
	4	$\log k = 2.792 - 3.347 C_B$	0.9999	$\log k = 2.161 - 2.956 C_B$	0.9995
	5	$\log k = 3.473 - 4.051 C_B$	0.9999	$\log k = 2.582 - 3.329 C_B$	0.9993
	6	$\log k = 3.749 - 4.442 C_B$	0.9999	$\log k = 3.192 - 4.169 C_B$	0.9989
X-Terra C ₁₈	1	$\log k = 1.625 - 2.489 C_B$	0.9998	$\log k = 1.717 - 3.128 C_B$	0.9984
	2	$\log k = 2.142 - 3.077 C_B$	0.9996	$\log k = 1.851 - 3.216 C_B$	0.9991
	3	$\log k = 2.452 - 3.323 C_B$	0.9998	$\log k = 2.189 - 3.494 C_B$	0.9992
	4	$\log k = 2.385 - 3.143 C_B$	0.9998	$\log k = 2.058 - 3.193 C_B$	0.9992
	5	$\log k = 3.115 - 3.869 C_B$	0.9997	$\log k = 2.584 - 3.722 C_B$	0.9993
	6	$\log k = 3.824 - 4.492 C_B$	0.9999	$\log k = 3.240 - 4.681 C_B$	0.9993

制在固定流动相中甲醇比例(p_{MeOH})时, 6 种中性化合物分别在两种色谱柱上的保留值与乙腈在流动相中体积分数(C_{ACN})之间的关系曲线. 结果表明, 随着乙腈体积分数的增大, 溶质的容量因子明显减小, 而且表 3 显示各化合物的 $\log k-C_{ACN}$ 回归方程均具有良好的线性($r > 0.99$). 在不同体积分数的乙腈(C_{ACN})加入流动相后, 各溶质有相应的 $\log k$ 值, 代入表 2 中对应溶质的 $\log k-C_B$ 基准关系, 可以得到流动相中以甲醇计的有机调节剂的总体积分数(C_{MeOH}'). 以 C_{MeOH}' 对 C_{ACN} 作图, 得到良好的线性关系(表 4). 对于 Phenomenex Gemini C₁₈ (A)和 Waters X-Terra C₁₈ 柱, p_{MeOH} 的回归结果(截距, 平均值 \pm 标准偏差)分别为 0.60 ± 0.00 和 0.54 ± 0.00 , 与流动相中所固定的甲醇体积分数吻合; $q_{MeOH/ACN}$ (斜率)则为单位体积分数乙腈相当于甲醇的体积分数. 在相同的色谱条件下, 对于所有的溶质而言, 乙腈与甲醇洗脱强度之间保持一个几乎恒定的 $q_{MeOH/ACN}$ 值, 而在两根不同的色谱柱上, 1% 的乙腈则分别相当于 $(1.08\%\pm 0.03\%)$ 和 $(1.20\%\pm 0.04\%)$ 的甲醇, 提示在较窄的有机调节剂比例范围内, $q_{MeOH/ACN}$ 仅与色谱柱有关, 而与溶质无关, 不同有机调节剂的洗脱强度之间存在简单的加权关

系. 同时, $q_{MeOH/ACN} > 1$, 也表明乙腈的洗脱强度大于甲醇.

3.1.3 乙酸的有机调节剂作用

绘制在固定流动相中甲醇比例(p_{MeOH})时, 6 种中性化合物在两种不同色谱柱上的保留值与加入乙酸的体积分数(C_{HAc})之间的关系曲线. 结果表明, 随着乙酸体积分数的增大, 溶质容量因子明显减小, 而且表 5 显示各化合物的 $\log k-C_{HAc}$ 回归方程均具有良好的线性($r > 0.998$), 这些都说明乙酸符合有机调节剂的特征. 根据表 2 提供的中性化合物的 $\log k-C_B$ 基准关系, 可以得到流动相中以甲醇计的有机调节剂的总体积分数(C_{MeOH}'). 以 C_{MeOH}' 对 C_{HAc} 作图, 得到良好的线性关系(表 6).

对于 Phenomenex Gemini C₁₈ (A)和 Waters X-Terra C₁₈ 柱, p_{MeOH} 的回归结果分别为 0.60 ± 0.00 和 0.55 ± 0.01 , 与流动相中所固定的甲醇体积分数完全吻合; $q_{MeOH/HAc}$ 则为单位体积分数的乙酸相当于甲醇的体积分数. 在相同的色谱条件下, 对于所有的溶质而言, 乙酸与甲醇洗脱强度之间保持一个几乎恒定的 $q_{MeOH/HAc}$ 值, 而在两根不同色谱柱上, 1% 的乙酸则

表 3 6 种中性化合物在两种色谱柱上的保留值与乙腈流动相中 $\log k-C_{ACN}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A), $C_{MeOH} = 0.60$		X-Terra C ₁₈ , $C_{MeOH} = 0.55$	
	Relation equation	r	Relation equation	r
1	$\log k = 0.240 - 2.824 C_{ACN}$	0.9993	$\log k = 0.284 - 3.017 C_{ACN}$	0.9988
2	$\log k = 0.486 - 3.406 C_{ACN}$	0.9996	$\log k = 0.468 - 3.707 C_{ACN}$	0.9981
3	$\log k = 0.667 - 3.827 C_{ACN}$	0.9997	$\log k = 0.642 - 3.937 C_{ACN}$	0.9987
4	$\log k = 0.784 - 3.765 C_{ACN}$	0.9997	$\log k = 0.670 - 3.772 C_{ACN}$	0.9988
5	$\log k = 1.038 - 4.281 C_{ACN}$	0.9998	$\log k = 1.002 - 4.387 C_{ACN}$	0.9988
6	$\log k = 1.319 - 5.388 C_{ACN}$	0.9998	$\log k = 1.344 - 5.708 C_{ACN}$	0.9986

表 4 6 种中性化合物在甲醇-水乙腈溶液中 C_{MeOH}' 和 C_{ACN} 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A)		X-Terra C ₁₈	
	Relation equation	r	Relation equation	r
1	$C_{MeOH}' = 0.595 + 1.048 C_{ACN}$	0.9993	$C_{MeOH}' = 0.539 + 1.212 C_{ACN}$	0.9988
2	$C_{MeOH}' = 0.600 + 1.058 C_{ACN}$	0.9996	$C_{MeOH}' = 0.544 + 1.205 C_{ACN}$	0.9981
3	$C_{MeOH}' = 0.600 + 1.090 C_{ACN}$	0.9997	$C_{MeOH}' = 0.547 + 1.185 C_{ACN}$	0.9987
4	$C_{MeOH}' = 0.600 + 1.125 C_{ACN}$	0.9997	$C_{MeOH}' = 0.545 + 1.200 C_{ACN}$	0.9988
5	$C_{MeOH}' = 0.601 + 1.057 C_{ACN}$	0.9998	$C_{MeOH}' = 0.546 + 1.134 C_{ACN}$	0.9988
6	$C_{MeOH}' = 0.603 + 1.077 C_{ACN}$	0.9998	$C_{MeOH}' = 0.535 + 1.271 C_{ACN}$	0.9986

表 5 6 种中性化合物 $\log k-C_{\text{HAc}}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A), C _{MeOH} = 0.60		X-Terra C ₁₈ , C _{MeOH} = 0.55	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$\log k = 0.230 - 3.610 C_{\text{HAc}}$	0.9988	$\log k = 0.243 - 3.449 C_{\text{HAc}}$	0.9994
2	$\log k = 0.478 - 3.876 C_{\text{HAc}}$	0.9986	$\log k = 0.434 - 3.824 C_{\text{HAc}}$	0.9991
3	$\log k = 0.665 - 4.001 C_{\text{HAc}}$	0.9988	$\log k = 0.614 - 3.834 C_{\text{HAc}}$	0.9995
4	$\log k = 0.781 - 3.794 C_{\text{HAc}}$	0.9989	$\log k = 0.647 - 3.616 C_{\text{HAc}}$	0.9995
5	$\log k = 1.038 - 4.547 C_{\text{HAc}}$	0.9989	$\log k = 0.977 - 4.431 C_{\text{HAc}}$	0.9994
6	$\log k = 1.324 - 5.842 C_{\text{HAc}}$	0.9993	$\log k = 1.323 - 5.852 C_{\text{HAc}}$	0.9992

表 6 6 种中性化合物 $C_{\text{MeOH}}'-C_{\text{HAc}}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A)		X-Terra C ₁₈	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$C_{\text{MeOH}}' = 0.599 + 1.340 C_{\text{HAc}}$	0.9988	$C_{\text{MeOH}}' = 0.555 + 1.386 C_{\text{HAc}}$	0.9994
2	$C_{\text{MeOH}}' = 0.602 + 1.205 C_{\text{HAc}}$	0.9986	$C_{\text{MeOH}}' = 0.555 + 1.243 C_{\text{HAc}}$	0.9991
3	$C_{\text{MeOH}}' = 0.600 + 1.140 C_{\text{HAc}}$	0.9988	$C_{\text{MeOH}}' = 0.553 + 1.154 C_{\text{HAc}}$	0.9995
4	$C_{\text{MeOH}}' = 0.600 + 1.133 C_{\text{HAc}}$	0.9989	$C_{\text{MeOH}}' = 0.553 + 1.151 C_{\text{HAc}}$	0.9995
5	$C_{\text{MeOH}}' = 0.601 + 1.122 C_{\text{HAc}}$	0.9989	$C_{\text{MeOH}}' = 0.552 + 1.145 C_{\text{HAc}}$	0.9994
6	$C_{\text{MeOH}}' = 0.602 + 1.168 C_{\text{HAc}}$	0.9993	$C_{\text{MeOH}}' = 0.540 + 1.303 C_{\text{HAc}}$	0.9992

分别相当于(1.18±0.08)%和(1.23±0.10)%的甲醇,也提示在较窄的有机调节剂比例范围内, $q_{\text{MeOH}/\text{HAc}}$ 仅与色谱柱有关,而与溶质无关,且乙酸与甲醇的洗脱强度之间亦存在简单的加权关系. 则甲醇-水在加入有少量乙酸后所起的有机调节剂作用的大小,可以根据洗脱强度大小换算过来.

用类似的方法,定量地研究了乙酸与乙腈洗脱强度之间的关系. 绘制在固定流动相中乙腈比例(p_{ACN})时,6种中性化合物在两种色谱柱上的保留值与加入乙酸的体积分数(C_{HAc})之间的关系曲线. 结果表明,随着乙酸体积分数的增大,溶质容量因子明显

减小,而且表 7 显示各化合物的 $\log k-C_{\text{HAc}}$ 回归方程均具有良好的线性($r > 0.99$),这些都进一步说明乙酸符合有机调节剂的特征. 根据表 2 提供的中性化合物的 $\log k - C_{\text{B}}$ 基准关系,可以得到流动相中以乙腈计的有机调节剂的总体积分数(C_{ACN}'). 以 C_{ACN}' 对 C_{HAc} 作图,得到良好的线性关系(表 8).

对于 Phenomenex Gemini C₁₈ (A)和 Waters X-Terra C₁₈ 柱, p_{ACN} 的回归结果分别为 0.50±0.00 和 0.45±0.00,与流动相中固定的乙腈体积分数完全吻合; $q_{\text{ACN}/\text{HAc}}$ 则为单位体积分数乙酸相当于乙腈的体积分数. 在相同的色谱条件下,对于所有的溶质而言,

表 7 6 种中性化合物 $\log k-C_{\text{HAc}}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A), C _{ACN} = 0.50		X-Terra C ₁₈ , C _{ACN} = 0.45	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$\log k = 0.291 - 3.021 C_{\text{HAc}}$	0.9996	$\log k = 0.293 - 3.365 C_{\text{HAc}}$	0.9986
2	$\log k = 0.418 - 2.621 C_{\text{HAc}}$	0.9996	$\log k = 0.388 - 3.123 C_{\text{HAc}}$	0.9989
3	$\log k = 0.617 - 2.693 C_{\text{HAc}}$	0.9996	$\log k = 0.603 - 3.207 C_{\text{HAc}}$	0.9982
4	$\log k = 0.681 - 2.363 C_{\text{HAc}}$	0.9996	$\log k = 0.609 - 2.816 C_{\text{HAc}}$	0.9990
5	$\log k = 0.916 - 2.566 C_{\text{HAc}}$	0.9997	$\log k = 0.895 - 3.093 C_{\text{HAc}}$	0.9992
6	$\log k = 1.106 - 3.015 C_{\text{HAc}}$	0.9997	$\log k = 1.112 - 3.808 C_{\text{HAc}}$	0.9993

表 8 6 种中性化合物 $C_{ACN}' - C_{HAc}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A)		X-Terra C ₁₈	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$C_{ACN}' = 0.502 + 1.028 C_{HAc}$	0.9996	$C_{ACN}' = 0.455 + 1.076 C_{HAc}$	0.9986
2	$C_{ACN}' = 0.502 + 0.884 C_{HAc}$	0.9996	$C_{ACN}' = 0.455 + 0.971 C_{HAc}$	0.9989
3	$C_{ACN}' = 0.501 + 0.840 C_{HAc}$	0.9996	$C_{ACN}' = 0.454 + 0.918 C_{HAc}$	0.9982
4	$C_{ACN}' = 0.501 + 0.799 C_{HAc}$	0.9996	$C_{ACN}' = 0.454 + 0.882 C_{HAc}$	0.9990
5	$C_{ACN}' = 0.500 + 0.770 C_{HAc}$	0.9997	$C_{ACN}' = 0.454 + 0.831 C_{HAc}$	0.9992
6	$C_{ACN}' = 0.500 + 0.723 C_{HAc}$	0.9997	$C_{ACN}' = 0.454 + 0.813 C_{HAc}$	0.9993

乙酸与乙腈洗脱强度之间保持一个几乎恒定的 $q_{ACN/HAc}$ 值, 而在两根柱上, 1%的乙酸分别相当于 (0.84±0.11)%和 (0.92±0.10)%的乙腈, 提示在较窄的有机调节剂比例范围内, $q_{ACN/HAc}$ 仅与色谱柱有关, 而与溶质无关, 乙酸与乙腈的洗脱强度之间存在简单的加权关系. 则乙腈-水在加入有少量乙酸后所起的有机调节剂作用的大小, 可以根据洗脱强度大小换算过来.

3.1.4 三乙胺的有机调节剂作用

用类似的方法, 定量地研究了 三乙胺与甲醇洗脱强度之间的关系. 绘制在固定流动相中甲醇比例

(p_{MeOH})时, 6 种中性化合物在两种色谱柱上的保留值与加入三乙胺体积分数(C_{TEA})的关系曲线. 结果表明, 随着三乙胺体积分数的增大, 溶质容量因子明显减小, 而且表 9 显示各化合物的 $\log k - C_{TEA}$ 回归方程均具有良好的线性($r > 0.99$), 这些都进一步说明三乙胺符合有机调节剂的特征. 根据表 2 提供的中性化合物的 $\log k - C_B$ 基准关系, 可以得到流动相中以甲醇计的有机调节剂的总体积分数(C_{MeOH}'). 以 C_{MeOH}' 对 C_{TEA} 作图, 得到良好的线性关系(表 10).

对于 1~5 溶质而言, 在 Phenomenex Gemini C₁₈ (A)和 Waters X-Terra C₁₈ 柱上, p_{MeOH} 的回归结果分别为 0.60±0.00 和 0.56±0.00, 与流动相中固定的甲醇体

表 9 6 种中性化合物 $\log k - C_{TEA}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A), $C_{MeOH} = 0.60$		X-Terra C ₁₈ , $C_{MeOH} = 0.55$	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$\log k = 0.243 - 4.966 C_{TEA}$	0.9665	$\log k = 0.225 - 2.284 C_{TEA}$	0.9946
2	$\log k = 0.479 - 7.786 C_{TEA}$	0.9904	$\log k = 0.412 - 4.923 C_{TEA}$	0.9983
3	$\log k = 0.666 - 5.473 C_{TEA}$	0.9859	$\log k = 0.602 - 3.208 C_{TEA}$	0.9980
4	$\log k = 0.780 - 5.460 C_{TEA}$	0.9904	$\log k = 0.636 - 3.317 C_{TEA}$	0.9975
5	$\log k = 1.051 - 7.081 C_{TEA}$	0.9903	$\log k = 0.970 - 4.344 C_{TEA}$	0.9984
6	$\log k = 1.042 - 16.275 C_{TEA}$	0.9965	$\log k = 0.970 - 15.351 C_{TEA}$	0.9963

表 10 6 种中性化合物 $C_{MeOH}' - C_{TEA}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (A)		X-Terra C ₁₈	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$C_{MeOH}' = 0.594 + 1.843 C_{TEA}$	0.9665	$C_{MeOH}' = 0.562 + 0.917 C_{TEA}$	0.9946
2	$C_{MeOH}' = 0.602 + 2.420 C_{TEA}$	0.9904	$C_{MeOH}' = 0.562 + 1.600 C_{TEA}$	0.9983
3	$C_{MeOH}' = 0.601 + 1.559 C_{TEA}$	0.9859	$C_{MeOH}' = 0.557 + 0.966 C_{TEA}$	0.9980
4	$C_{MeOH}' = 0.601 + 1.631 C_{TEA}$	0.9904	$C_{MeOH}' = 0.557 + 1.055 C_{TEA}$	0.9975
5	$C_{MeOH}' = 0.598 + 1.747 C_{TEA}$	0.9903	$C_{MeOH}' = 0.554 + 1.123 C_{TEA}$	0.9984
6	$C_{MeOH}' = 0.658 + 3.254 C_{TEA}$	0.9965	$C_{MeOH}' = 0.618 + 3.417 C_{TEA}$	0.9963

积分分数吻合, $q_{\text{MeOH/TEA}}$ 则为单位体积分数三乙胺相当于甲醇的体积分数, 在相同的色谱条件下, 对于间二硝基苯、氯化苯、甲苯和对二氯苯而言, 三乙胺与甲醇洗脱强度之比保持一个比较恒定的 $q_{\text{MeOH/TEA}}$ 值, 在两根不同柱上, 1% 的三乙胺分别相当于(1.70%±0.13%)和(1.02%±0.09%)的甲醇. 则甲醇-水在加入有少量三乙胺后所起的有机调节剂作用的大小, 可以根据洗脱强度大小换算过来. 1,3,5-三甲氧基苯和 1,2-二苯乙酮在以三乙胺为离子抑制剂的流动相中, 对应的 $q_{\text{MeOH/TEA}}$ 偏大, 而在以乙酸为离子抑制剂的流动相中, 对应的 $q_{\text{MeOH/HAc}}$ 正常, 且 $q_{\text{MeOH/HAc}}$ 的标准偏差比 $q_{\text{MeOH/TEA}}$ 要小, 表明乙酸和三乙胺作为有机调节剂时, 作用机理可能是不相同的. Huber^[23]提出, 三乙胺会和固定相上残留的硅羟基结合, 还会与 C_{18} 发生疏水作用. 三乙胺的存在会减弱溶质与固定相的相互作用, 促使溶质更快地从固定相上被流动相洗脱. 本小组^[7-9]在前期工作中, 定性地提到了乙酸的有机调节剂作用, 指出尽管乙酸的疏水性较小, 流动相中大量的乙酸分子还是利用数量的优势和固定相 C_{18} 发生疏水作用, 使溶质易于洗脱, 导致溶质保留值下降.

对于本实验中 1,3,5-三甲氧基苯, $q_{\text{MeOH/TEA}}$ 偏大, 这是由于上述三乙胺的有机调节剂作用, 1,3,5-三甲氧基苯又具有较大的位阻效应, 在 RPLC 中的保留减弱更加明显. 而对于 1,2-二苯乙酮, 一方面, 较大的分子结构导致了与 1,3,5-三甲氧基苯相似的位阻效应; 另一方面, 其 $\alpha\text{-H}$ 呈弱酸性, 能够在三乙胺的强碱性的环境下成盐, 分子极性增大.

用类似的方法, 定量地研究了三乙胺与乙腈洗脱强度之间的关系. 绘制在固定流动相中乙腈比例 (p_{ACN}) 时, 6 种中性化合物在两种色谱柱上的保留值与三乙胺体积分数 (C_{TEA}) 的关系曲线. 结果表明, 随着三乙胺体积分数的增大, 溶质容量因子明显减小, 而且表 11 显示各化合物的 $\log k\text{-}C_{\text{TEA}}$ 回归方程均具有良好的线性 ($r > 0.99$), 这些都进一步说明三乙胺符合有机调节剂的特征. 根据表 2 提供的中性化合物的 $\log k\text{-}C_{\text{B}}$ 基准关系, 可以得到流动相中以乙腈计的有机调节剂的总体积分数 (C_{ACN}'). 以 C_{ACN}' 对 C_{TEA} 作图, 得到良好的线性关系(表 12).

对于 1~5 溶质而言, 在两根柱上, p_{ACN} 的回归结果分别为 0.49 ± 0.00 和 0.45 ± 0.00 , 与流动相中固定的乙腈体积分数吻合. 在相同的色谱条件下, 对于 1~5

表 11 6 种中性化合物 $\log k\text{-}C_{\text{TEA}}$ 的关系

No.	Gemini C_{18} (A), $C_{\text{ACN}} = 0.50$		X-Terra C_{18} , $C_{\text{ACN}} = 0.45$	
	Relation equation	r	Relation equation	r
1	$\log k = 0.322 - 7.484 C_{\text{TEA}}$	0.9983	$\log k = 0.308 - 4.5634 C_{\text{TEA}}$	0.9942
2	$\log k = 0.446 - 7.772 C_{\text{TEA}}$	0.9986	$\log k = 0.403 - 5.162 C_{\text{TEA}}$	0.9976
3	$\log k = 0.654 - 8.706 C_{\text{TEA}}$	0.9979	$\log k = 0.608 - 4.779 C_{\text{TEA}}$	0.9963
4	$\log k = 0.707 - 7.070 C_{\text{TEA}}$	0.9985	$\log k = 0.622 - 4.009 C_{\text{TEA}}$	0.9962
5	$\log k = 0.927 - 7.854 C_{\text{TEA}}$	0.9955	$\log k = 0.889 - 4.397 C_{\text{TEA}}$	0.9982
6	$\log k = 0.918 - 16.408 C_{\text{TEA}}$	0.9976	$\log k = 0.847 - 15.280 C_{\text{TEA}}$	0.9944

表 12 6 种中性化合物 $C_{\text{ACN}}'\text{-}C_{\text{TEA}}$ 的关系

No.	Gemini C_{18} (A)		X-Terra C_{18}	
	Relation equation	r	Relation equation	r
1	$C_{\text{ACN}}' = 0.491 + 2.547 C_{\text{TEA}}$	0.9983	$C_{\text{ACN}}' = 0.450 + 1.459 C_{\text{TEA}}$	0.9943
2	$C_{\text{ACN}}' = 0.492 + 2.620 C_{\text{TEA}}$	0.9986	$C_{\text{ACN}}' = 0.450 + 1.605 C_{\text{TEA}}$	0.9976
3	$C_{\text{ACN}}' = 0.490 + 2.715 C_{\text{TEA}}$	0.9979	$C_{\text{ACN}}' = 0.453 + 1.368 C_{\text{TEA}}$	0.9963
4	$C_{\text{ACN}}' = 0.492 + 2.392 C_{\text{TEA}}$	0.9985	$C_{\text{ACN}}' = 0.450 + 1.256 C_{\text{TEA}}$	0.9962
5	$C_{\text{ACN}}' = 0.497 + 2.359 C_{\text{TEA}}$	0.9955	$C_{\text{ACN}}' = 0.455 + 1.181 C_{\text{TEA}}$	0.9982
6	$C_{\text{ACN}}' = 0.545 + 3.936 C_{\text{TEA}}$	0.9976	$C_{\text{ACN}}' = 0.511 + 3.263 C_{\text{TEA}}$	0.9944

溶质而言, 三乙胺与乙腈洗脱强度之间保持一个比较恒定的 $q_{ACN/TEA}$ 值, 而在两根柱上, 1% 的三乙胺分别相当于(2.53%±0.15%)和(1.37%±0.17%)的乙腈. 则乙腈-水在加入有少量三乙胺后所起的有机调节剂作用的大小, 可以根据洗脱强度大小换算过来. 对于 1,2-二苯乙酮而言, $q_{ACN/TEA}$ 与其他五个溶质各自的 $q_{ACN/TEA}$ 相差很远, 原因在前面已经提及.

3.2 以缓冲溶液为离子抑制剂时酸碱离子抑制剂的有机调节剂作用

3.2.1 甲醇-乙酸铵溶液和乙腈-乙酸铵溶液中 $\log k$ 与 C_B 基准线性关系的考察

选用 Phenomenex Gemini C₁₈ (B) 和 Kromasil C₁₈ 两根色谱柱, 分别在甲醇-水、甲醇-100 mmol/L 乙酸铵溶液、乙腈-水、乙腈-100 mmol/L 乙酸铵溶液的流动相条件下, 建立了 6 种中性化合物在 RPLC 中的 $\log k$ 与有机调节剂(甲醇或乙腈)浓度 C_B 之间的关系, 结果显示, 当甲醇或乙腈的比例相同时, 中性化合物在加入乙酸铵与不加乙酸铵的流动相中的容量因子几乎相同, 这表明加入乙酸铵对中性化合物保留的影响是微乎其微的.

分别在甲醇-100 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈-100 mmol/L 乙酸铵溶液流动相条件下, 建立了 6 种中性化合物在 Phenomenex Gemini C₁₈ (B) 和 Kromasil C₁₈ 柱上的 RPLC 容量因子对数值 $\log k$ 与有机调节剂(甲

醇或乙腈)浓度 C_B 之间的线性关系, 得到各溶质分别在甲醇-100 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈-100 mmol/L 乙酸铵溶液体系中的 $\log k-C_B$ 关系. 由表 13 可以看出, $\log k-C_B$ 的线性关系回归结果非常好($r > 0.99$), 可以作为各溶质分别在甲醇-乙酸铵溶液和乙腈-乙酸铵溶液中 $\log k-C_B$ 的基准关系.

3.2.2 乙酸铵-乙酸缓冲溶液中乙酸的有机调节剂作用

在 100 mmol/L 乙酸铵溶液中加入乙酸调节缓冲溶液的 pH, 以甲醇-乙酸铵缓冲溶液为流动相, 绘制在固定流动相中甲醇比例(p_{MeOH})时, 6 种中性化合物在两种色谱柱上的保留值与乙酸体积分数(C_{HAc})之间的关系曲线. 结果显示, 随着乙酸体积分数的增大(pH 减小), 溶质容量因子明显减小, 而且表 14 显示各化合物的 $\log k - C_{HAc}$ 回归方程均具有良好的线性($r > 0.99$), 这些都说明乙酸铵-乙酸缓冲溶液中存在的乙酸, 也符合有机调节剂的特征. 同样, 根据表 13 提供的中性化合物在甲醇-乙酸铵溶液中的 $\log k-C_B$ 基准关系, 可以得到流动相中以甲醇计的有机调节剂的总体积分数(C_{MeOH}'). 以 C_{MeOH}' 对 C_{HAc} 作图, 得到良好的线性关系(表 15).

对于 Phenomenex Gemini C₁₈ (B) 和 Kromasil C₁₈ 柱, p_{MeOH} 的回归结果分别为 0.60 ± 0.00 和 0.66 ± 0.00 , 与流动相中固定的甲醇体积分数吻合; 对所有的溶

表 13 6 种中性化合物在甲醇-乙酸铵和乙腈-乙酸铵溶液中 $\log k-C_B$ 的关系

Columns	No.	Methanol - NH ₄ Ac solution		Acetonitrile - NH ₄ Ac solution	
		Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
Gemini C ₁₈ (B)	1	$\log k = 1.791 - 2.628 C_B$	0.9998	$\log k = 1.733 - 2.941 C_B$	0.9999
	2	$\log k = 2.377 - 3.169 C_B$	0.9994	$\log k = 1.880 - 2.977 C_B$	0.9997
	3	$\log k = 2.756 - 3.472 C_B$	0.9998	$\log k = 2.189 - 3.195 C_B$	0.9997
	4	$\log k = 2.797 - 3.338 C_B$	0.9998	$\log k = 2.136 - 2.959 C_B$	0.9996
	5	$\log k = 3.473 - 4.047 C_B$	0.9998	$\log k = 2.564 - 3.357 C_B$	0.9991
	6	$\log k = 4.345 - 5.044 C_B$	0.9995	$\log k = 3.174 - 4.208 C_B$	0.9987
Kromasil C ₁₈	1	$\log k = 2.111 - 2.933 C_B$	0.9995	$\log k = 1.846 - 2.917 C_B$	0.9990
	2	$\log k = 2.635 - 3.316 C_B$	0.9996	$\log k = 2.010 - 2.944 C_B$	0.9993
	3	$\log k = 3.055 - 3.666 C_B$	0.9996	$\log k = 2.345 - 3.185 C_B$	0.9994
	4	$\log k = 3.101 - 3.504 C_B$	0.9995	$\log k = 2.307 - 2.928 C_B$	0.9994
	5	$\log k = 3.806 - 4.206 C_B$	0.9996	$\log k = 2.763 - 3.352 C_B$	0.9992
	6	$\log k = 4.683 - 5.199 C_B$	0.9991	$\log k = 3.369 - 4.238 C_B$	0.9987

表 14 6 种中性化合物在两种色谱柱上 $\log k-C_{\text{HAc}}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (B), C _{MeOH} = 0.60		Kromasil C ₁₈ , C _{MeOH} = 0.65	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$\log k = 0.221 - 3.495 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$\log k = 0.161 - 3.155 C_{\text{HAc}}$	0.9999
2	$\log k = 0.476 - 3.874 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$\log k = 0.431 - 3.482 C_{\text{HAc}}$	0.9994
3	$\log k = 0.675 - 3.978 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$\log k = 0.620 - 3.678 C_{\text{HAc}}$	0.9995
4	$\log k = 0.795 - 3.789 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$\log k = 0.775 - 3.495 C_{\text{HAc}}$	0.9995
5	$\log k = 1.044 - 4.546 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$\log k = 1.014 - 4.164 C_{\text{HAc}}$	0.9989
6	$\log k = 1.316 - 5.888 C_{\text{HAc}}$	0.9994	$\log k = 1.234 - 5.349 C_{\text{HAc}}$	0.9993

表 15 6 种中性化合物在 C_{MeOH}'-C_{HAc} 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (B)		Kromasil C ₁₈	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$C_{\text{MeOH}}' = 0.598 + 1.330 C_{\text{HAc}}$	0.9997	$C_{\text{MeOH}}' = 0.664 + 1.076 C_{\text{HAc}}$	0.9999
2	$C_{\text{MeOH}}' = 0.600 + 1.223 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$C_{\text{MeOH}}' = 0.665 + 1.050 C_{\text{HAc}}$	0.9994
3	$C_{\text{MeOH}}' = 0.599 + 1.146 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$C_{\text{MeOH}}' = 0.664 + 1.003 C_{\text{HAc}}$	0.9995
4	$C_{\text{MeOH}}' = 0.600 + 1.135 C_{\text{HAc}}$	0.9989	$C_{\text{MeOH}}' = 0.664 + 0.997 C_{\text{HAc}}$	0.9995
5	$C_{\text{MeOH}}' = 0.600 + 1.123 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$C_{\text{MeOH}}' = 0.664 + 0.990 C_{\text{HAc}}$	0.9995
6	$C_{\text{MeOH}}' = 0.600 + 1.167 C_{\text{HAc}}$	0.9995	$C_{\text{MeOH}}' = 0.664 + 1.029 C_{\text{HAc}}$	0.9988

质而言, 乙酸与甲醇洗脱强度之间保持一个几乎恒定的 $q_{\text{MeOH}/\text{HAc}}$ 值, 而在两根不同的色谱柱上, 1% 的乙酸则分别相当于 (1.19%±0.08%) 和 (1.02%±0.03%) 的甲醇, 提示在较窄的有机调节剂比例范围内, $q_{\text{MeOH}/\text{HAc}}$ 仅与色谱柱有关, 而与溶质无关, 乙酸铵-乙酸缓冲溶液中存在的乙酸与甲醇的洗脱强度之间也存在简单的加权关系. 则甲醇-乙酸铵溶液在加入有少量乙酸后所起的有机调节剂作用的大小, 可以根据洗脱强度大小换算过来.

用类似的方法, 定量地研究了乙酸铵-乙酸缓冲溶液中存在的乙酸与乙腈洗脱强度之间的关系. 绘制在固定流动相中乙腈比例 (p_{ACN}) 时, 6 种中性化合物在两种色谱柱上的保留值与乙酸体积分数 (C_{HAc}) 的关系曲线. 结果显示, 随着乙酸体积分数的增大, 溶质容量因子明显减小, 而且表 16 显示各化合物的 $\log k-C_{\text{HAc}}$ 回归方程均具有良好的线性 ($r > 0.999$), 这些都进一步说明乙酸符合有机调节剂的特征. 根据表 13 提供的中性化合物在乙腈-乙酸铵溶液中的 $\log k-C_{\text{B}}$ 基准关系, 可以得到流动相中以乙腈计的有机调节剂的总体积分数 (C_{ACN}'). 以 C_{ACN}' 对 C_{HAc} 作图, 得到良好的线性关系 (表 17).

对于 Phenomenex Gemini C₁₈ (B) 和 Kromasil C₁₈ 柱, p_{ACN} 的回归结果分别为 0.50 ± 0.00 和 0.50 ± 0.00 , 与流动相中固定的乙腈体积分数完全吻合; $q_{\text{ACN}/\text{HAc}}$ 则为单位体积分数的乙酸相当于乙腈的体积分数. 在相同的色谱条件下, 对于所有的溶质而言, 乙酸与乙腈洗脱强度之间保持一个比较恒定的 $q_{\text{ACN}/\text{HAc}}$ 值, 而在两根柱上, 1% 的乙酸分别相当于 (0.81%±0.12%) 和 (0.78%±0.13%) 的乙腈, 提示在较窄的有机调节剂比例范围内, $q_{\text{ACN}/\text{HAc}}$ 仅与色谱柱有关, 而与溶质无关, 乙酸与乙腈的洗脱强度之间存在简单的加权关系. 则乙腈-乙酸铵溶液在加入有少量乙酸后所起的有机调节剂作用的大小, 可以从洗脱强度大小换算过来. $q_{\text{ACN}/\text{HAc}}$ 的标准偏差略大于 $q_{\text{MeOH}/\text{HAc}}$, 这可能是因为甲醇在 ODS 固定相表面呈单分子层吸附状态, 而乙腈以多分子层的状态吸附^[19].

3.3 有机调节剂洗脱强度排序

表 18 列出了不同色谱柱条件下, 对应的有机碱离子抑制剂所具有的有机调节剂作用的定量结果, 即 1% 的乙酸或三乙胺相当于甲醇或乙腈的体积百分数. 从表 18 可以看出, $q_{\text{ACN}/\text{TEA}} > 1$, 表明洗脱强度三

表 16 6 种中性化合物 $\log k-C_{\text{HAc}}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (B), C _{ACN} = 0.50		Kromasil C ₁₈ , C _{ACN} = 0.50	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$\log k = 0.284 - 3.003 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$\log k = 0.393 - 2.902 C_{\text{HAc}}$	0.9998
2	$\log k = 0.410 - 2.578 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$\log k = 0.544 - 2.439 C_{\text{HAc}}$	0.9998
3	$\log k = 0.608 - 2.615 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$\log k = 0.756 - 2.484 C_{\text{HAc}}$	0.9998
4	$\log k = 0.672 - 2.284 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$\log k = 0.847 - 2.156 C_{\text{HAc}}$	0.9997
5	$\log k = 0.899 - 2.449 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$\log k = 1.089 - 2.331 C_{\text{HAc}}$	0.9995
6	$\log k = 1.081 - 2.827 C_{\text{HAc}}$	0.9995	$\log k = 1.250 - 2.686 C_{\text{HAc}}$	0.9991

表 17 6 种中性化合物 $C_{\text{ACN}}'-C_{\text{HAc}}$ 的关系

No.	Gemini C ₁₈ (B)		Kromasil C ₁₈	
	Relation equation	<i>r</i>	Relation equation	<i>r</i>
1	$C_{\text{ACN}}' = 0.493 + 1.021 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$C_{\text{ACN}}' = 0.498 + 0.995 C_{\text{HAc}}$	0.9998
2	$C_{\text{ACN}}' = 0.494 + 0.866 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$C_{\text{ACN}}' = 0.498 + 0.829 C_{\text{HAc}}$	0.9998
3	$C_{\text{ACN}}' = 0.495 + 0.818 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$C_{\text{ACN}}' = 0.499 + 0.780 C_{\text{HAc}}$	0.9998
4	$C_{\text{ACN}}' = 0.495 + 0.772 C_{\text{HAc}}$	0.9999	$C_{\text{ACN}}' = 0.499 + 0.736 C_{\text{HAc}}$	0.9997
5	$C_{\text{ACN}}' = 0.496 + 0.730 C_{\text{HAc}}$	0.9998	$C_{\text{ACN}}' = 0.499 + 0.695 C_{\text{HAc}}$	0.9995
6	$C_{\text{ACN}}' = 0.497 + 0.672 C_{\text{HAc}}$	0.9995	$C_{\text{ACN}}' = 0.500 + 0.634 C_{\text{HAc}}$	0.9991

表 18 不同色谱柱条件下获得的定量结果

Columns	Carbon (%)	Surface area (m ² /g)	$q_{\text{MeOH/ACN}}$	Ion-suppressors					
				HAc or TEA			NH ₄ Ac-HAc buffer		
				$q_{\text{MeOH/HAc}}$	$q_{\text{ACN/HAc}}$	$q_{\text{MeOH/TEA}}$	$q_{\text{ACN/TEA}}$	$q_{\text{MeOH/HAc}}$	$q_{\text{ACN/HAc}}$
Gemini C ₁₈ (A)	14.4	398	1.08±0.03	1.18±0.08	0.84±0.11	1.70±0.13	2.53±0.15		
X-Terra C ₁₈	14.2	166	1.20±0.04	1.23±0.10	0.92±0.10	1.02±0.09	1.37±0.17		
Gemini C ₁₈ (B)	13.8	376						1.19±0.08	0.81±0.12
Kromasil C ₁₈	19	418						1.02±0.03	0.78±0.13

乙胺>乙腈; $q_{\text{ACN/HAc}} < 1$, 洗脱强度乙腈>乙酸; $q_{\text{MeOH/HAc}} > 1$, 洗脱强度乙酸>甲醇. 综上, 本实验中有有机调节剂洗脱强度排序是: 三乙胺>乙腈>乙酸>甲醇.

四种有机调节剂的 $\log K_{\text{ow}}$ 大小排序为: 三乙胺(1.44) > 乙酸(-0.31) > 乙腈(-0.34) > 甲醇(-0.66)^[22]. 其中三乙胺的 $\log K_{\text{ow}}$ 最大, 洗脱能力最强, 与本实验得出的结果一致, 而乙腈与乙酸的排序与实验结果相比次序颠倒, 推测其可能原因为: 乙酸和乙腈的 $\log K_{\text{ow}}$ 比较接近, 乙腈完全起有机调节剂的作用, 而乙酸会有部分离解, 离子状态的乙酸根使得乙酸洗脱强度弱于乙腈. 以 pH 为 4.0 为例, 乙酸的表现正辛醇分配系数($\log K_{\text{ow}}$)^[7]为 -0.38. 本实验为有机调节剂洗脱强度排序提供了一种合理的评判方法. 从

表 18 还可以看出, 使用不同色谱柱, 1%的乙酸或三乙胺相当于甲醇或乙腈的体积百分数, 数值并不完全相同, 这可能是由于不同品牌的色谱柱, 填料的比表面积(m²/g)不同, 表面键合官能团的量(含碳量)也不同.

4 结论

在离子抑制反相液相色谱(IS-RPLC)中, 流动相的有机酸、有机碱离子抑制剂, 包括用于调节缓冲溶液 pH 的有机酸和有机碱均具有离子抑制剂和有机调节剂的双重作用. 几种常见有机调节剂在 ODS 固定相上的洗脱强度顺序依次为: 三乙胺 > 乙腈 > 乙酸 > 甲醇. 在流动相中加入有机酸或有机碱或多或少

会给 RPLC 保留行为预测带来误差, 即使在使用缓冲溶液作为离子抑制剂时也不能例外, 因此在预测时要

充分考虑有机离子抑制剂的有机调节剂作用, 特别是在流动相 pH 值偏高或偏低时.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(批准号: 20575027)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB421601)和国家自然科学基金创新研究群体项目(批准号: 20821063)资助, 特此一并致谢.

参考文献

- Schoenmakers P J, van Molle S, Hayes C M G, Uunk L G M. Effects of pH in reversed-phase liquid-chromatography. *Anal Chim Acta*, 1991, 250(1): 1—19
- Marko-Varga G, Barcelo D. Liquid chromatographic retention and separation of phenols and related aromatic compounds on reversed phase columns. *Chromatographia*, 1992, 34(3-4): 146—154
- Gardner M S, Voyksner R D, Haney C A. Analysis of pesticides by LC-electrospray-MS with postcolumn removal of nonvolatile buffers. *Anal Chem*, 2000, 72(19): 4659—4666
- 商振华, 卢佩章, 杜伟强. 反相液相色谱(RPLC)中移动相 pH 值对有机酸、有机碱和两性离子保留行为的影响. *中国科学 B 辑: 化学*, 1986, (5): 462—468
- Crescenzi C, Di Corcia A, Marchese S, Samperi R. Determination of acidic pesticides in water by a benchtop electrospray liquid-chromatography mass-spectrometer. *Anal Chem*, 1995, 67(13): 1968—1975
- 刘江云, 杨学东, 徐丽珍, 杨世林. 天然酚酸类化合物的反相高效液相色谱分析. *色谱*, 2002, 20(3): 245—248
- Lian H Z, Wang W H, Li D N. Retention behavior of o-phthalic, 3-nitrophthalic, and 4-nitrophthalic acids in ion-suppression reversed-phase high performance liquid chromatography using acids instead of buffers as ion-suppressors. *J Sep Sci*, 2005, 28(11): 1179—1187
- Ming X, Han S Y, Qi Z C, Sheng D, Lian H Z. Chromatographic retention prediction and octanol-water partition coefficient determination of monobasic weak acidic compounds in ion-suppression reversed-phase liquid chromatography using acids as ion-suppressors. *Talanta*, 2009, 79(3): 752—761
- Han S Y. Acids as the ion-suppressors used directly in ion-suppression reversed-phase liquid chromatography for retention prediction and hydrophobicity estimation of weak acidic compounds. The Master Graduation Thesis, Nanjing University, 2008
- Qi Z C, Han S Y, Chen F Y, Cao X W, Lian H Z. Retention prediction and octanol-water partition coefficient measurement of weakly ionizable basic compounds in ion-suppression reversed-phase liquid chromatography using bases as ion-suppressors. *J Chromatogr A*, (revised)
- 于亿年, 商振华, 陈谨之, 王俊德, 周良模. 反相液相色谱中冲洗剂组成和性质对有机酸保留行为的影响. *分析化学*, 1991, 19(11): 1243—1248
- LoBrutto R, Jones A, Kazakevich Y V, McNair H M. Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes. *J Chromatogr A*, 2001, 913(1-2): 173—187
- Nikitas P, Pappa-Louisi A. New equations describing the combined effect of pH and organic modifier concentration on the retention in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2002, 971(1-2): 47—60
- Snyder L R. Principles of Adsorption Chromatography. New York: Marcel Dekker, 1968
- 于世林. 高效液相色谱方法及应用. 北京: 化学工业出版社, 1999
- Snyder L R, Dolan J W, Gant J R. Gradient elution in high-performance liquid-chromatography. 1. Theoretical basis for reversed-phase systems. *J Chromatogr*, 1979, 165(1): 3—30
- 卢佩章, 卢小明, 李秀珍, 张玉奎. 液-固色谱中流动相组成对保留值的影响-基本关系式的推导. *科学通报*, 1982, 27(19): 1175—1177
- Lu P C, Lu X M. Development of a high-performance liquid chromatograph with artificial-intelligence. *J Chromatogr*, 1984, 292(1): 169—188

- 19 陈农, 张玉奎, 卢佩章. 疏水分配常数用于反相液相色谱保留值的预测. 分析化学, 1993, 21(4): 384—387
- 20 陈农, 张玉奎, 包绵生, 董礼孚, 卢佩章. 反相液相色谱保留值的预测模式. 色谱, 1989, 7(5): 280—282
- 21 Flieger J. Effect of mobile phase composition on the retention of selected alkaloids in reversed-phase liquid chromatography with chaotropic salts. J Chromatogr A, 2007, 1175(2): 207—216
- 22 Leo A, Hansch C, Elkins D. Partition coefficients and their uses. Chem Rev, 1971, 71(6): 525—616
- 23 Huber C G. Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. J Chromatogr A, 1998, 806(1): 3—30

Organic modification effects of ion-suppressors in reversed-phase liquid chromatography

QI ZhengChun, MEI ShaoBO & LIAN HongZhen*

Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science (Ministry of Education of China), School of Chemistry & Chemical Engineering and Center of Materials Analysis, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: Influences of acids, bases and buffers used as ion-suppressors on reversed-phase liquid chromatographic (RPLC) retention behaviors of neutral compounds are systematically investigated in this paper. Organic modification effects of organic acids and bases are studied emphatically. Elution strength relationships between methanol and acetonitrile, methanol and acetic acid, methanol and triethylamine (TEA), acetonitrile and acetic acid, and acetonitrile and TEA are quantitatively established on octadecyl silane bonded phase, which supplies an evaluation method for elution strength order of organic modifiers in RPLC. In addition, different interaction mechanisms of acetic acid and TEA as organic modifiers are discussed. These experiment results are of referential significance for rapid establishment and accurate optimization of RPLC separation.

Keywords: reversed-phase liquid chromatography (RPLC), ion-suppressor, acetic acid, triethylamine (TEA), buffer, organic modifier