

## 用强阴离子交换毛细管电色谱分离阴离子化合物

雷政登 叶明亮 邹汉法\* 吴仁安 倪坚毅

(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** 对阴离子性化合物在强阴离子交换毛细管电色谱中的保留行为进行了研究。发现样品在固定相上的吸附使样品的保留因子  $k'$  变小, 柱子的分离能力减小; 而电压的增大, 使酸性样品的  $k'$  也增大, 并且电压的改变也能改变分离的选择性; 样品保留因子的对数值随着缓冲液离子强度的对数值的增大而线性减小; 样品在强阴离子交换毛细管电色谱和毛细管区带电泳中有不同的保留行为。

**关键词** 毛细管电色谱, 强阴离子交换, 离子性化合物, 保留机理

### 1 引 言

毛细管电色谱(CEC)是新近发展起来的微柱分离技术,它结合了毛细管区带电泳(CZE)的高效性和高效液相色谱(HPLC)的高选择性。在 CEC 中,中性物质的分离与 HPLC 中的一样,都是通过溶质在固定相和流动相之间分配差异而分离的;而对带电物质的分离,色谱机理依然存在,并且,电泳的机理也起作用。迄今为止,在 CEC 中最常用的填料是 ODS<sup>[1,2]</sup>,同时,CEC 所用的填料也已扩展到硅胶<sup>[3,4]</sup>,强阳离子交换<sup>[5-7]</sup>和强阴离子交换填料<sup>[8,9]</sup>,以及各种手性填料<sup>[10,11]</sup>。

用反相电色谱(RP-CEC)分析阴离子化合物是比较困难的。这是因为在这种模式下,电渗流的方向是从正极到负极;与阴离子化合物的电泳方向正好相反。而在强阴离子交换毛细管电色谱(SAX-CEC)中,电渗流的方向与溶质电泳的方向是相同的。因此,SAX-CEC 是比较适用于分析阴离子化合物。Li 等<sup>[8]</sup>用 SAX-CEC 分离了无机阴离子;叶明亮等<sup>[9]</sup>分离了一些有机酸性物质。本文探讨了一些因素对 SAX-CEC 的保留机制的影响。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器和材料

电压对保留影响的电色谱实验在 Beckman 公司的 P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪上进行,其它电色谱和电泳实验都在 P/ACE 2200 型毛细管电泳仪上完成。柱制备中使用的泵为 Spectra-Physics 泵(Spectra-Physics 公司)。内径 50  $\mu\text{m}$ , 外径 365  $\mu\text{m}$  的石英毛细管购自河北永年光导纤维厂。5  $\mu\text{m}$  粒径的 Spherisorb-SAX 填料购自 Waters Phase Separation(Milford, MA, USA)。

#### 2.2 样品与溶剂

芳香族氨基磺酸类样品由大连理工大学化工学院染料教研室合成。

乙腈为色谱纯,其它化学试剂均为分析纯。超纯水由 Milli-Q water system(美国 Millipore 公司)制得。样品首先用乙腈溶解,进样前用流动相稀释至适当的浓度。100 mmol/L 磷酸缓冲液的制备:将 3.90 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶解在 200 mL 的超纯水中,用磷酸调节至适当的 pH,最后定容于 250 mL 的容量瓶中。流动相的制备:将适量的乙腈,适量的 100 mmol/L 磷酸缓冲液混合,用超纯水定容于 50 mL 的容量瓶中。实验前,流动相用超声波脱气 30 min。

#### 2.3 毛细管电色谱柱的制备

采用匀浆法制备电色谱柱,其制备过程见文献<sup>[2]</sup>。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 吸附对保留的影响

在分离7种芳香族氨基磺酸类样品的实验中,我们发现随着进样次数的增加,溶剂峰的出峰时间增

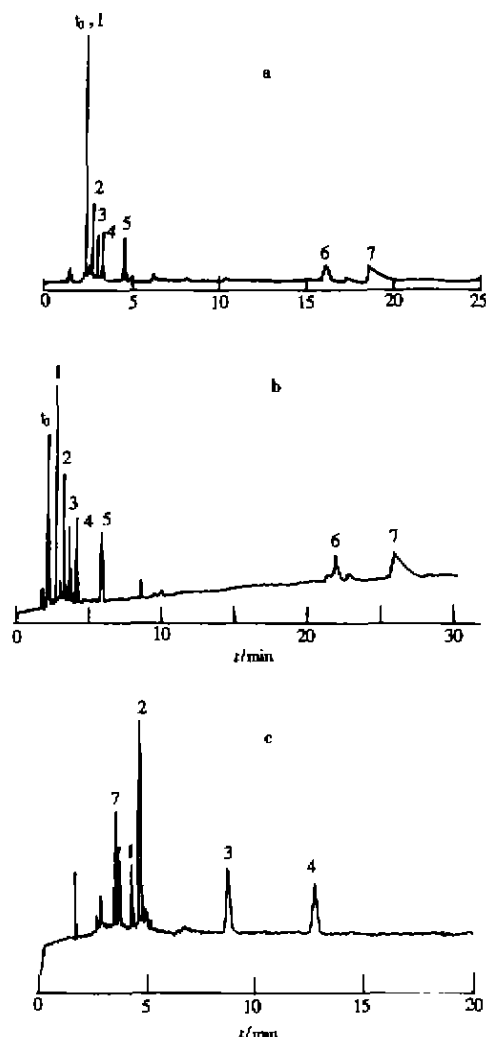


图1 7种芳香族氨基磺酸类化合物的 SAX-CEC 和 CZE 分离谱图

Fig.1 Chromatograms for separation of 7 aromatic amino acids by strong anion-exchange capillary electrochromatography (SAX-CEC) and capillary zone electrophoresis (CZE)

实验条件(experimental conditions): (a)和(b):柱长(column length):有效长度(effective length)/总长度(total length) = 6.5 cm/26.5 cm; 电压(applied voltage): 5 kV; 进样条件(injection): 5 kV/5s; 流动相(mobile phase): 20 mmol/L 磷酸缓冲溶液含 50% 乙腈(pH 3.0) (20 mmol/L phosphate buffer with 50% acetonitrile, pH 3.0); 柱温(column temperature): 20°C; 检测波长(detection wavelength): 214 nm; (c)柱长(column length):有效长度(effective length)/总长度(total length) = 30 cm/37 cm; 电压(applied voltage): 20 kV; 压力进样(pressure injection): 3.45kPa × 3s; 流动相(mobile phase): 30 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 3.0) (30 mmol/L phosphate buffer, pH 3.0)。其它条件同图 1a (other conditions and solutes were the same as in Fig. 1a)。1,2-氨基-5-硝基-苯磺酸(2-amino-5-nitro-benzene sulfonic acid); 2,3-氨基-4-氯-苯磺酸(3-amino-4-chloro-benzene sulfonic acid); 3,2-氨基-5-甲基-苯磺酸(2-amino-5-methyl-benzene sulfonic acid); 4,3-氨基-6-氯-苯磺酸(3-amino-6-chloro-benzene sulfonic acid); 5,5-氨基-萘磺酸(5-amino-naphthalene sulfonic acid); 6,4,4'-二氨基-2,2'-二磺酸基-联苯(4,4'-diamino-biphenyl-2,2'-disulfonic acid); 7,7-氨基-1,5-二磺酸基-萘(7-amino-naphthalene-1,5-disulfonic acid);  $t_0$  为溶剂峰,其他峰为杂质峰( $t_0$  was solvent peak, and other peaks were peaks of unidentified impurities)。(a)电渗流和(b)注射器冲洗电色谱柱(the CEC column was rinsed by (a) EOF and (b) a syringe); (c)毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis)。

大,而溶质峰的出峰时间却减小。经过约 3、4 次的进样之后,溶剂和溶质的出峰时间才能稳定。图 1a 是我们在多次进样后形成稳定状态下得到的 CEC 谱图。但是,在这种状态下,柱分离能力有所减弱,其原因可能是进样后部分样品吸附在固定相上,使固定相的表面电荷密度减小,从而使电渗流变小,样品与固定相之间的相互作用也减弱,结果使柱子的分离能力变小。在实验中,我们发现用电渗流长时间平衡并不能使样品从固定相上脱附下来。而将柱子与注射器相连,采用压力冲洗柱子时,能够使样品脱附下来,并能够得到重现的 CEC 谱图(图 1b)。

为了评价上述两种柱处理方法的重现性,我们分别进行了 10 次连续运行。CEC 保留因子( $k'$ )的定义如下<sup>[12]</sup>:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1)$$

其中,  $t_R$  是溶质的保留时间,  $t_0$  是死时间,在本实验中用溶剂峰表示。在每次运行前用压力冲洗时,分离的重现性从一开始就比较好;而不用压力冲洗时,在刚开始的 3 次分离中,  $k'$  随运行次数的增加而减小,此后趋于稳定。用注射器冲洗色谱柱的  $t_0$  的相对标准偏差(RSD)为 1.47%, 7 个峰  $k'$  的 RSD 为 2.96% ~ 4.76%; 而用电渗流冲洗色谱柱的  $t_0$  的 RSD 为 1.53%,  $k'$  的 RSD 为 1.80% ~ 5.00% (采用运行

次稳定后的数据)。

### 3.2 电压对保留的影响

Kitagawa 等<sup>[13]</sup>报道了在阴离子交换毛细管电色谱中电压诱导可能使分配平衡常数改变,说明电压

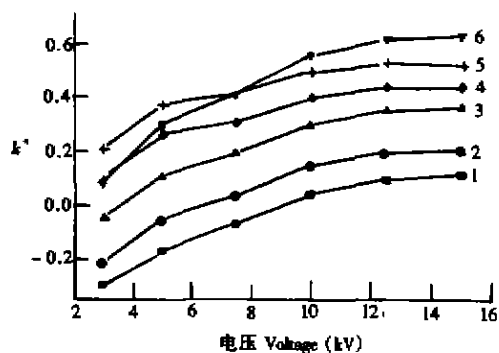


图 2 在 SAX-CEC 中电压对  $k'$  的影响

Fig. 2 Effect of the applied voltage on the  $k'$  values in SAX-CEC

实验条件 (experimental conditions): 柱长 (column length): 有效长度 (effective length)/总长度 (total length) = 10 cm/31 cm; 电压 (applied voltage): 3-15 kV; 进样条件 (injection): 5 kV/2 s; 流动相 (mobile phase): 10 mmol/L 磷酸缓冲溶液含 50% 乙腈 (pH 2.2) (10 mmol/L phosphate buffer with 50% acetonitrile, pH 2.2); 柱温 (column temperature): 25°C; 检测波长 (detection wavelength): 214 nm. 1. 3,5-二硝基苯甲酸 (3,5-dinitrobenzoic acid); 2. 对-硝基苯甲酸 (*p*-nitrobenzoic acid); 3. 对-溴苯甲酸 (*p*-bromobenzoic acid); 4. 邻-甲基苯甲酸 (*o*-toluic acid); 5. 苯乙酸 (phenylacetic acid); 6. 邻-溴苯甲酸 (*o*-chlorobenzoic acid).

不仅通过电泳机理对溶质的分离有影响,而且对溶质在两相间的分配也有影响。在 CEC 中,离子化合物的分离也可以通过改变所加的电压来改变其选择性<sup>[14]</sup>。我们考察了在 SAX-CEC 中电压对酸性化合物的保留的影响,结果如图 2 所示。随着电压的增大,酸性溶质的  $k'$  也增大。图 3 是 6 种酸性化合物分别在 5 kV 和 15 kV 运行时得到的电色谱图。从图 3 可以看出,在 5 kV 时溶质的保留相当弱,甚至有两个化合物在  $t_0$  前出峰。而在 15 kV 时保留变强,所有溶质都在  $t_0$  后被洗脱出来。并且,在电压改变时,分析物的洗脱顺序也发生了变化,这说明我们可以通过调节电压来改变选择性。

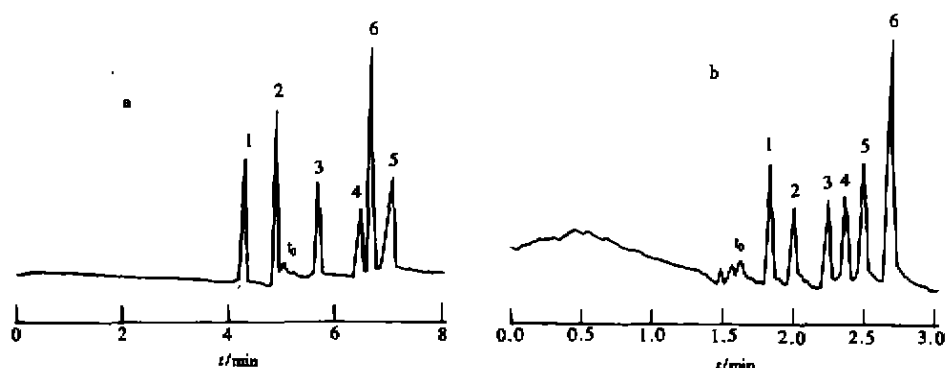


图 3 酸性化合物在不同电压下的 SAX-CEC 分离谱图

Fig. 1 Chromatograms for separation of acidic compounds at different applied voltages by ASX-CEC

实验条件 (experimental conditions): 电压 (applied voltage): (a) 5 kV; (b) 15 kV. 其它条件同图 2 (other conditions and solutes were the same as in Fig. 2).

### 3.3 电解质离子浓度对保留的影响

在离子交换液相色谱中,容量因子的对数值 ( $\log k'$ ) 随着洗脱液离子浓度的对数值 ( $\log [C]$ ) 的增大而线性减小<sup>[15]</sup>:

$$\log k' = -\frac{A}{E} \log [C] + \log Const, \quad (2)$$

其中,  $k'$  是容量因子,  $A$  和  $E$  分别是分析物和洗脱液离子的电荷绝对值,  $[C]$  是洗脱液离子浓度,  $Const$  是常数。由式 (2) 可以推测出: 对某一分析物来说,  $\log k'$  对  $\log [C]$  具有线性关系。叶明亮等<sup>[16]</sup>报道了在强阳离子交换毛细管电色谱 (SCX-CEC) 中, 一价阳离子的  $\log k'$  与  $\log [C]$  有很好的线性关系。这说明在分离过程中离子交换占主导作用, 而电泳作用较弱。但对保留小的溶质来说, 即该分析物与离子交换固定相的作用比较弱, 因而其线性关系不是很好。

在本实验中,我们发现在 SAX-CEC 中,  $\log k^*$  与  $\log[C]$  也有很好的线性关系(见图 4),并且,带有两个磷酸基的分析物的保留时间明显大于带有一个磷酸基的分析物。这说明保留行为主要决定于磷酸基的数目,而氨基虽然在低 pH 时能够部分质子化而带正电,但对保留影响较小。其原因可能是带负电的磷酸基在离子交换作用中起主导作用。另外,这两种溶质虽然都带有两个磷酸基,但其斜率并不是带一个磷酸基溶质斜率的 2 倍,这可能与氨基的质子化有关。

### 3.4 SAX-CEC 与 CZE 的选择性比较

在 SAX-CEC 中,固定相表面带正电荷,因此阴离子化合物的电泳与电渗流方向相同。但在 CZE 中,阴离子化合物的电泳与电渗流反向;如果某一溶质的电泳淌度与电渗流淌度接近,则该溶质可能不出峰或是出峰时间很长。

在分离 7 种芳香族氨基磷酸类样品的 CZE 所获得的电泳谱图如图 1c 所示。在低 pH 条件下,电渗流很小,样品主要按电泳的方向迁移。溶质 7 最先出峰,这是因为它带有两个磷酸基和一个氨基,其有效负电荷数在 7 种溶质中最大,因而电泳淌度最大,最先出峰。溶质 5 和溶质 6 在 40 min 内没有被洗脱出来,其原因可能是:在此条件下,氨基比较完全质子化而带正电,因此其有效负电荷数很小,电泳淌度小,而电泳与电渗方向相反,所以它们没有出峰或出峰时间很长。

在 SAX-CEC 和 CZE 中,二者的分离机理是不同的。在 CZE 中,分离的实现依赖于分析物之间的电泳淌度差异。但在 SAX-CEC 中,溶质与固定相之间的相互作用大小对保留起主要作用。由于分离机理的不同,因此相同化合物在二者中的分离选择性也不同。比较图 1b 和图 1c,样品的出峰顺序是不同的。可以说,SAX-CEC 和 CZE 是两种互补的高效的微柱分离技术。

### References

- 1 Yan C, Dadoo R, Zhao H, Zare R N. *Anal. Chem.*, 1995, 67:2026 ~ 2029
- 2 Zhang Y, Shi W, Zhang L, Zou H. *J. Chromatogr. A*, 1998, 802:59 ~ 71
- 3 Wei W, Luo G, Hua G, Yan C. *J. Chromatogr. A*, 1998, 817:65 ~ 74
- 4 Ye Mingliang(叶明亮), Zou Hanfa(邹汉法), Liu Zhen(刘震), Zhang Lihua(张丽华), Ni Jianyi(倪坚毅), Zhang Yukui(张玉奎). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1999, 27(9):1007 ~ 1012
- 5 Wei Wei(魏伟), Wang Yiming(王义明), Luo Guoan(罗国安). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱), 1997, 15(2):110 ~ 113
- 6 Ye M, Zou H, Liu Z, Ni J. *J. Chromatogr. A*, 2000, 869:385 ~ 394
- 7 Wei Wei(魏伟), Hu Ping(胡平), Wang Yiming(王义明), Wang Ruji(王如骥), Luo Guoan(罗国安). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 1997, 25(10):1132 ~ 1137
- 8 Li D, Knobel H H, Remcho V T. *J. Chromatogr. B*, 1997, 695:169 ~ 174
- 9 Ye M, Zou H, Liu Z, Ni J. *J. Chromatogr. A*, 2000, 887:223 ~ 231
- 10 Deng Y, Zhang J, Tsuda T, Yu P H, Boulton A A, Cassidy R M. *Anal. Chem.*, 1998, 70:4586 ~ 4593
- 11 Lloyd D K, Li S, Ryan P. *J. Chromatogr. A*, 1995, 694:285 ~ 296
- 12 Ye Mingliang(叶明亮), Zou Hanfa(邹汉法), Liu Zhen(刘震), Zhu Jun(朱军), Ni Jianyi(倪坚毅), Zhang Yukui(张玉奎). *Science in China (Series B)*(中国科学 B 辑), 1999, 42:639 ~ 648
- 13 Kitagawa S, Tsuda T. *Anal. Sci.*, 1998, 14:571 ~ 575
- 14 Eimer T, Unger K K, Greef J V D. *Trends in Anal. Chem.*, 1996, 15:463 ~ 468
- 15 Rocklin R D, Pohl C A, Schübler J A. *J. Chromatogr.*, 1987, 411:107 ~ 119

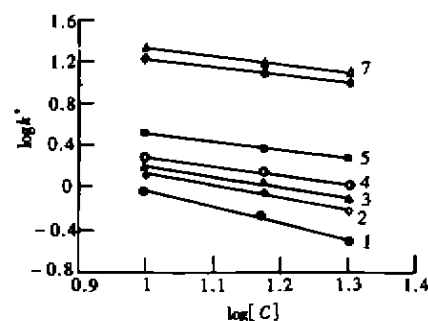


图 4  $\log k^*$  与  $\log[C]$  的线性关系图

Fig. 1 Linear relationship of  $\log k^*$  and  $\log[C]$

1.  $\log k^* = -1.53\log[C] + 1.50, r = 0.9911$ ; 2.  $\log k^* = -1.14\log[C] + 1.26, r = 0.9948$ ; 3.  $\log k^* = -0.96\log[C] + 1.16, r = 0.9935$ ; 4.  $\log k^* = -0.89\log[C] + 1.17, r = 0.9950$ ; 5.  $\log k^* = -0.80\log[C] + 1.31, r = 0.9995$ ; 6.  $\log k^* = -0.80\log[C] + 2.03, r = 0.9999$ ; 7.  $\log k^* = -0.79\log[C] + 2.11, r = 0.9998$ .

## Separation of Anionic Compounds by Strong Anion-exchange Capillary Electrochromatography

Lei Zhengdeng, Ye Mingliang, Zou Hanfa\*, Wu Ren'an, Ni Jianyi

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

**Abstract** The separation of anionic compounds by strong anion-exchange capillary electrochromatography (SAX-CEC) was carried out. It was found that the analytes could be absorbed onto the stationary phase, and this would lessen the retention factors ( $k^*$ ) of the analytes, thus the column separation capability decreased. For the acidic compounds,  $k^*$  increased with increase of applied voltage. And the change of the applied voltage could provide different separation selectivity for the solutes. The separation with different eluent was studied. It showed that the logarithm of the capacity factor linearly decreased with increase of the logarithm of the ionic strength. The different retention behavior of the anionic compounds in SAX-CEC and CE was also studied.

**Keywords** Capillary electrochromatography, strong anion-exchange, anionic compounds, separation mechanism

(Received 29 May 2000; accepted 28 November 2000)

### 中国化学会第十一届现代有机分析及生物分析科学学术研讨会征文通知

由中国化学会举办的第十一届现代有机分析及生物分析科学学术研讨会定于 2001 年 11 月在福州召开。并拟邀请国内外著名专家学者与会作大会报告。现将会议有关事宜通知如下：

#### (一) 征文内容

(1) 现代有机分析及生物分析方法(包括色谱、波谱、电分析、光分析、有机元素分析、核酸分析、蛋白质分析、免疫分析等)的机理及其应用研究。(2) 现代有机分析及生物分析技术在化学、生物学、医学、药学及纯化和分离科学等领域中的应用。(3) 现代有机分析及生物分析教学成果研讨。(4) 现代有机分析及生物分析仪器设备、试剂及相关产品的研制、开发。(5) 计算机化学及国际互联网资源在现代有机分析及生物分析中的应用。

#### (二) 征文要求

(1) 应征论文是在国内外刊物及学术会议上尚未发表的研究成果。(2) 应征论文请将论文详细摘要及英文摘要共 2 页以内一式二份,连同本单位推荐信于 2001 年 6 月 15 日前寄福州市福州大学化学系庄惠生、张颂明收(邮编 350002),请注明会议征文。论文摘要请用 A4 纸小 4 号字打印。本次会议论文集拟以正规刊物出版。(3) 论文请注明联系作者、姓名、单位详细地址及邮编。(4) 论文由专家评审录用,论文及会议具体事宜将通知作者,并酌收一定版面费。

为方便仪器厂家介绍产品,会议期间将举办分析仪器展览,欢迎有关单位踊跃参展。会议期间拟组织到武夷山等地考察。

联系电话:庄惠生 0591-7892493,张颂明 0591-7893229。

第十一届现代有机分析及生物分析科学学术研讨会筹备组

2000 年 10 月 30 日