

(3) D.R.Jones<sup>1</sup>, H.C. Tung, S.E. Manahan, Anal. Chem., 48,7(1976).

(收稿日期: 1988年1月18日)

The Structure of Interface for On-Line HPLC-AAS  
*Xia Lijun, Xue Changfa, Tao Fengjun and Zhu Shutao Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica*

The structure of interface for on-line HPLC-AAS was studied. the effects of the structure of interface and the properties of make-up agent on the peak broadening were examined. This method was applied to separation of ferrocene derivatives and determination of tetraethyllead (TEL) in gasoline by RP-HPLC.

## 4,4'-(3,3'-二甲基)联苯二胺(o-Tolidine)作紫外 探针试剂的间接光度色谱法研究\*(1)

### ——o-Tolidine在反相色谱柱上的吸附性能

陈 洪

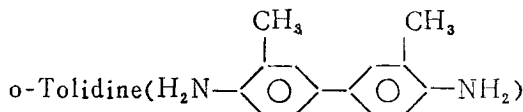
达世禄 吴采樱

(商业部食品检测科学研究所, 北京)

(武汉大学化学系)

**【摘要】** 用甲醇-水缓冲溶液作流动相, 测定紫外探针试剂o-Tolidine在反相(ODS)柱上的吸附等温线。Freundlich吸附等温方程能解释探针试剂在ODS上的吸附。分别得到了在不同流动相条件下o-Tolidine的吸附等温方程。流动相的组成如流动相的pH值、甲醇含量以及有机添加剂的性质和浓度均影响o-Tolidine在柱上的吸附。o-Tolidine在反相色谱柱上的吸附量与间接光度色谱中的溶质保留和检测响应有一定的关系。

间接光度色谱法(IPC)(1)是一种具有新颖检测方法的液相色谱技术。它不需要柱前、柱后衍生化, 只要在流动相中加入有光吸收的物质就可以直接用光度检测器检测“透明”的无机(1,2)、有机(3,4)和生化样品(5,6)。在IPC系统中这种有光吸收的物质被称为探针试剂, 有紫外和可见探针试剂之分。



在酸性条件下的最大吸收峰在254nm附近, 使与o-Tolidine带相反电荷的紫外透明样品特别是有机酸样品在紫外检测器254nm波长上有高响应而被检测。用o-Tolidine作紫外探针试剂还未见文献报道。

探针试剂在色谱系统的吸附性能, 是影响溶质间接光度色谱响应和保留值的重要因素(7), 测定o-Tolidine在反相色谱柱上的吸

附量, 探讨o-Tolidine在柱上的吸附模式, 研究o-Tolidine吸附量对透明样品在间接光度色谱系统的保留和响应的影响。从微观的角度来探寻IPC系统样品保留和响应机理。

### 实 验 部 分

(一) 仪器 岛津 LC-4A 型高效液相色谱仪, 配有 SPD-1 型可变波长光度检测器。150×4mm 不锈钢色谱柱(填充天津试剂二厂10 $\mu\text{m}$  YWG-C<sub>18</sub>固定相)在20℃下操作。岛津 UV-300 型双波长双光束紫外可见分光光度计。

(二) 主要溶剂和试剂 甲醇(A.R., 上海试剂总厂), 二次蒸馏水。溶剂均需过滤。

o-Tolidine(Merck试剂, Germany), 四甲基氯化铵(TMAC)C.P. (上海试剂总厂), 四乙基氯化铵(TEAC)Merck试剂, (Germany), 四丁基溴化铵(TBAB)C.P.,

\* 国家自然科学基金资助课题

(北京化工厂),癸基三甲基溴化铵(DTMAB) C.P.,(北京化工厂)。

(三) 样品 丙二酸,丁二酸,戊二酸,己二酸,庚二酸,丁烯酸和丁醇。

(四) 实验方法 将SIL-2A 手动进样器各流路进行改动,就能比较方便的测量 o-Tolidine 在色谱柱上的总吸留量。o-Tolidine在柱上吸附平衡后,用甲醇清洗柱前流路,最后将柱上o-Tolidine洗到一容量瓶中进行定量。

### 结果和讨论

(一) 吸附量的测定  
间接光度色谱中,探针试剂在流动相和

固定相之间实现动态平衡,色谱柱内探针试剂的总吸留量( $P_t$ )包括两部分:固定相表面吸附探针试剂的量( $P_s$ )和柱填料孔穴内和填料颗粒间滞留的探针试剂的量( $P_p$ )。即

$$P_t = P_s + P_p \quad (1)$$

$P_s$ 不能直接测得,它与固定相比表面、流动相的组成、探针试剂在流动相中的浓度( $C_M$ )有关。 $P_p$ 取决于色谱柱的体积( $V$ )、固定相颗粒的总孔隙度( $\epsilon_s$ )(8)和 $C_M$ 。即按下式可以计算出 $P_p$ ,

$$P_p = \epsilon_T V C_M \quad (2)$$

o-Tolidine 作探针试剂时,  $P_t$ 由实验测得,  $P_p$ 由(2)式测得,  $P_s$ 由(1)式求得,结果见表1。

表1 不同甲醇配比下总吸留量 $P_t$ 与表面吸附量 $P_s$ 之间的关系

流动相中 (o-Tolidine) 浓度 $C_M$ (mol/l)	柱上 (o-Tolidine) 的滞留量 $P_p$ ( $\mu\text{mol}$ )	流动相中甲醇百分比														
		1.0%			1%			10%			30%			40%		
		$P_t$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s/P_t$	$P_t$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s/P_t$	$P_t$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s/P_t$	$P_t$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s/P_t$	$P_t$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s$ ( $\mu\text{mol}$ )	$P_s/P_t$
$1 \times 10^{-5}$	0.015	0.606	0.535	0.875	0.550	0.535	0.972	0.250	0.235	0.940	0.100	0.085	0.850	0.075	0.060	0.800
$2 \times 10^{-5}$	0.030	1.175	1.145	0.974	0.600	0.570	0.950	0.500	0.470	0.940	0.200	0.170	0.850	0.125	0.095	0.760
$5 \times 10^{-5}$	0.075	2.625	2.550	0.971	1.750	1.675	0.957	0.993	0.919	0.924	0.410	0.335	0.817	0.250	0.175	0.700
$1 \times 10^{-4}$	0.150	5.875	5.725	0.974	2.000	2.650	0.946	2.020	1.570	0.925	0.825	0.675	0.818	0.400	0.250	0.625
$2 \times 10^{-4}$	0.300	8.650	8.330	0.965	4.500	4.200	0.930	3.420	3.120	0.912	2.220	1.920	0.860	1.040	0.740	0.710
$5 \times 10^{-4}$	0.750	17.50	16.750	0.957	11.500	10.750	0.930	5.770	5.020	0.870	3.625	2.875	0.790	2.700	1.950	0.720

条件: 流动相中( $\text{KCl}$ )= $1 \times 10^{-3}$ mol/L, ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )= $1 \times 10^{-3}$ mol/L.

从表1看,流动相中甲醇含量增加时,  $P_s/P_t$ 之比下降。即表面吸附量在总吸留量中所占比例下降,滞留在固定相孔穴内和颗粒间的量  $P_p$  所占比例增加。因此,在1%, 10%甲醇配比下  $P_s/P_t$ 在0.93以上,  $P_s$ 可以用实测的  $P_t$  代替(9)。高甲醇配比下,  $P_s/P_t$  在0.8左右,  $P_s$ 就应考虑从  $P_t$  中除去滞留量  $P_p$ 。在下面的讨论中,为了更准确的描述 o-Tolidine 在反相柱上的吸附模式,我们均采用表面吸附量  $P_s$ 。

(二) 流动相中甲醇比对 o-Tolidine 吸附的影响

表1可看出,无论流动相中 o-Tolidine 浓度高或低,其在反相柱上吸吸附量  $P_s$  随流

动相中甲醇含量增加而减小。这同一般的反相色谱一样增加极性流动相的有机溶剂含量,必然会减小反相柱对疏水有机物的吸附。

(三) o-Tolidine 在反相柱上的吸附等温线

控制流动相中甲醇配比,改变 o-Tolidine 在其中的浓度  $C_M$ , 得到不同甲醇配比下 o-Tolidine 的吸附等温线,见图1所示。o-Tolidine 在流动相中浓度增大时,其在柱上的吸附量增大,尤其是在低甲醇配比下这种增加更迅速。柱上 o-Tolidine 的吸附量很大程度上取决于其在流动相中的浓度。

在  $P_s$  与  $C_M$  作回归处理时,  $\lg P_s$  与  $\lg C_M$  有

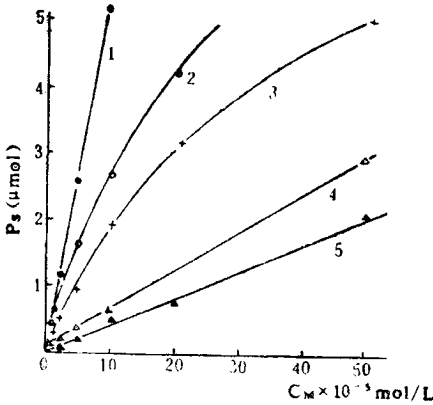


图 1 不同甲醇配比下o-Tolidine的吸附等温线  
条件同表 1  
1. 1.1%, 2. 10%, 3. 20%, 4. 30%, 5. 40%.

线性关系(图略)。因此o-Tolidine在柱上的吸附可以用 Freundlich 吸附等温方程  $P_s = k [C_M]^{\frac{1}{n}}$  ( $k, n$  为参数) 描述。不同流动相

条件下o-Tolidine吸附等温方程如下

流动相含 1% 甲醇时:

$$P_s = 4.27 \times 10^4 C_M^{0.97}$$

流动相含 10% 甲醇时:

$$P_s = 2.00 \times 10^3 C_M^{0.72}$$

流动相含 20% 甲醇时:

$$P_s = 4.7 \times 10^3 C_M^{0.85}$$

流动相含 30% 甲醇时:

$$P_s = 2.09 \times 10^2 C_M^{0.87}$$

流动相含 40% 甲醇时

$$P_s = 1.78 \times 10^3 C_M^{0.92}$$

各参数单位  $P_s (\mu\text{mol}), C_M (\text{mol/l})$ 。

(四) 流动相中季铵盐添加剂对 o-Tolidine 吸附等温线的影响

季铵盐是离子对色谱的重要离子对试剂或称改性剂, 它加入流动相中会与 o-Tolidine 竞争吸附固定相的疏水表面, 增大流动相中季铵盐的浓度导致 o-Tolidine 在柱上的吸附量  $P_s$  降低, 见图 2 中 4。

流动相中存在的季铵盐性质不同时, 对 o-Tolidine 吸附产生的影响也不同, 见图 2。流动相加入 TEAC 时 o-Tolidine 在反相柱上的吸附等温线 2 稍低于无季铵盐时

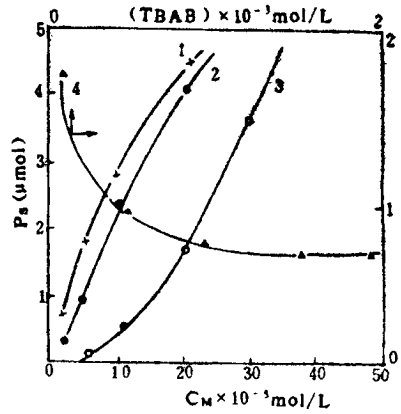


图 2 季铵盐的性质和浓度对o-Tolidine吸附的影响  
条件: 流动相  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}=90:10$ ;  
 $[\text{KCl}]=[\text{H}_3\text{PO}_4]=1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$

- 图中
1. 无季铵盐,
  2.  $(\text{TEAC})=1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$
  3.  $(\text{TBAB})=1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$
  4.  $(\text{o-Tolidine})=1 \times 10^{-4} \text{mol/L}$

o-Tolidine 的吸附等温线 1, 但等温线的形状相似仍可用 Freundlich 方程描述:

$$P_s = 1.11 \times 10^4 [C_M]^{0.825}$$

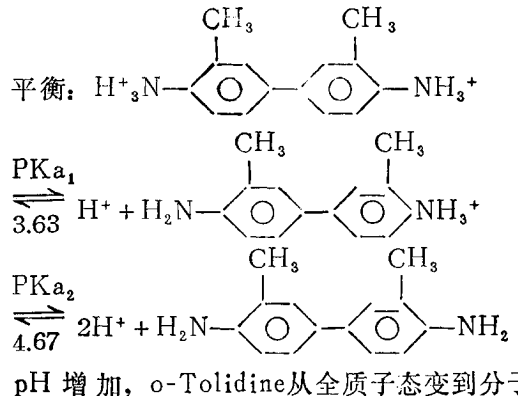
因为 TEAC 是一种短链季铵盐, 其疏水基团小, 它的引入对 o-Tolidine 吸附影响小。

流动相含有中等链长的 TBAB 时, 由于其有较大的疏水基团, 在与 o-Tolidine 竞争吸附 ODS 的疏水表面时, 不仅使  $P_s$  减少, 而且改变了 o-Tolidine 在柱上的吸附模式, 见图 2 中 3 曲线。

(五) 酸度对 o-Tolidine 吸附的影响

流动相中加入  $\text{H}_3\text{PO}_4$  改变其酸度, 得到  $\text{pH} \sim P_s$  关系图。

o-Tolidine 在流动相中存在下列的电离



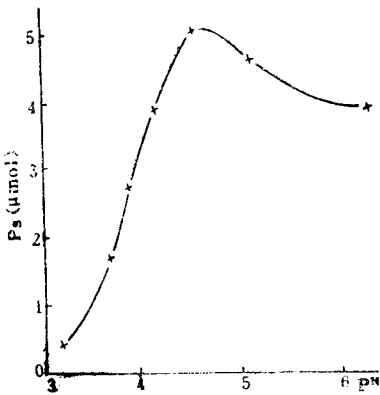


图3 酸度对o-Tolidine吸附的影响  
条件: 流动相CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O=10:90  
(o-Tolidine)=1×10<sup>-4</sup>mol/L  
(KCl)=1×10<sup>-8</sup>mol/L

态极性减小, 固定相疏水表面对其吸附增加。当 pH>6.7 后流动相主要以分子态的 o-Tolidine 存在, 理论上推导出 P<sub>s</sub> 应最大而且维持不变, 但大量的分子态 o-Tolidine 存在流动相中, 提高了流动相对疏水物质的洗脱能力, 导致 pH>4.67 后, P<sub>s</sub> 有下降的趋势。

(六) P<sub>s</sub> 对溶质保留和响应的影响 (见表 2)

1. 对保留的影响: 在 Bidlingmeyer(7) 的离子对双电层理论中, 样品保留由 (1) o-Tolidine 在固定相表面形成的双电层的静电作用; (2) 样品本身的疏水性与固定相疏

表 2 o-Tolidine 在反相柱上的吸附量与有机酸样品保留和响应的关系

流动相 pH 值	丁二酸			戊二酸			己二酸			庚二酸			丁烯酸			丁醇			
	k'	ε	RF	k'	ε	RF	k'	ε	RF	k'	ε	RF	k'	ε	RF	k'	ε	RF	
3.12	0.25	0.59	4.44	5.50×10 <sup>4</sup>	1.50	4.9	6.60×10 <sup>4</sup>	3.79	15.3	2.13×10 <sup>6</sup>	10.71	25.6	3.46×10 <sup>6</sup>	3.29	83.7	1.13×10 <sup>6</sup>	3.97	36.0	4.86×10 <sup>6</sup>
3.40	0.96	0.64	20.7	2.82×10 <sup>6</sup>	1.74	11.0	1.50×10 <sup>6</sup>	3.69	11.7	1.53×10 <sup>6</sup>	10.93	106.7	1.44×10 <sup>6</sup>	3.32	92.6	1.25×10 <sup>6</sup>	3.81	30.7	2.70×10 <sup>6</sup>
3.84	3.12	0.78	192.6	2.60×10 <sup>6</sup>	1.52	140.0	1.89×10 <sup>6</sup>	3.60	57.0	7.70×10 <sup>6</sup>	10.93	89.6	1.21×10 <sup>6</sup>	3.14	154.8	2.09×10 <sup>6</sup>	3.83	19.6	1.43×10 <sup>6</sup>
4.03	4.10	1.00	360.0	4.36×10 <sup>6</sup>	1.50	423.7	5.70×10 <sup>6</sup>	3.53	179.3	2.42×10 <sup>6</sup>	10.50	200.0	2.7×10 <sup>6</sup>	3.09	274.1	3.70×10 <sup>6</sup>	3.71	3.70	5.00×10 <sup>4</sup>
4.60	5.20	—	—	—	—	—	—	3.56	935.0	1.33×10 <sup>7</sup>	—	—	—	3.10	1067	1.44×10 <sup>7</sup>	3.73	3.00	4.00×10 <sup>4</sup>

(—表示溶质响应很小, 未检出)

k' 为样品容量因子。

ε: 为每单位摩尔浓度下样品的吸光度值, 又称透明样品在 IPC 系统中的表现吸光系数 (O.D·ml/mmol)

RF: 响应因子, 单位进样量下样品在检测器上响应的峰面积 (mm<sup>2</sup>/mmol)

条件: 流动相同图 3, 检测器波长: 254nm, 0.03AUFS, 流量: 1ml/min, 记录仪纸速: 5mm/min。

水表面的吸附力作用决定。从表 2 中看出 o-Tolidine 在柱上的吸附量非常少, 样品的保留主要由疏水基团的吸附力决定。但丁二酸例外, 它极性大, 与固定相表面的吸附力较小, 与双电层的静电作用不能忽视, 而且 P<sub>s</sub> 增大, 受静电力作用越大, 丁二酸的保留就增加。

2. 对响应的影响: 反相柱上 o-Tolidine 的吸附量增大, 溶质的响应也增大。我们认为“透明”溶质在紫外检测器上响应的实质是溶质进入柱受双电层静电力作

用而使 o-Tolidine 在液固两相发生“扰动” P<sub>s</sub> 越大, 双电层静电作用越大, 这种 o-Tolidine 的扰动就越大。中性分子丁醇与双电层的静电作用小, 其响应也小。pH = 4.60 时分子态的 o-Tolidine 比例较大, 这种双电层静电作用就小, 从而溶质响应就小, 甚至没有响应。对于己二酸和丁烯酸其 k' 值与 o-Tolidine 形成的系统峰 k' 相近, 因此在 pH = 4.60 时它们响应出现极大值<sup>(3)</sup>。

3. 脂肪二元酸的分离和检测。“透明”的脂肪二元酸无法用紫外检测器检测,

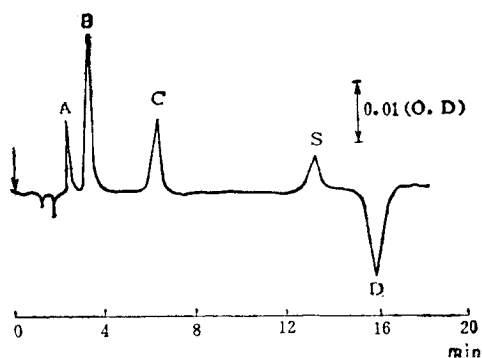


图 4 脂肪二元酸的分离色谱图

条件: 流动相 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=10:90$ ,  
 $(o\text{-Tolidine})=1\times 10^{-4}\text{mol/L}$   
 $(\text{KCl})=1\times 10^{-3}\text{mol/L}, (\text{H}_3\text{PO}_4)=1.25\times 10^{-3}\text{mol/L},$   
 $(\text{TEAC})=1\times 10^{-3}\text{mol/L}$

样品: A.丁二酸(200nmol), B.戊二酸(400nmol),  
 C.己二酸(200nmol), D.庚二酸(200nmol).

流速: 1ml/min. 检测波长254nm.

在IPC系统中就能满意的解决。见图4。图中系统峰S的出现和样品正负峰规律我们将在以后报道。

### 参 考 文 献

- (1) H.Small, T.E. Miller Jr. Anal. Chem., 54, 462 (1982).
- (2) W.E.Barber, P.W. Carr, J. Chromatogr., 260,89(1983).

- (3) M.Denkert, L. Hackzell, G. Schill, E.Sjögen, J. Chromatogr., 218,31(1981).
- (4) J.E.Parkin J. Chromatogr., 287, 457(1984).
- (5) 达世禄, J.Vialle, 色谱, 3,2(1985).
- (6) T.Gnanasambandan, H.Freiser, Anal. Chem., 54, 2379(1982).
- (7) B.A.Bidlingmeyer, S.N. Deming et al., J. Chromatogr., 136,419,(1979).
- (8) 张仁斌等, 《高效液相色谱的微粒型固定相》, 科学出版社, 北京, P.17,1980.
- (9) A.Bartha, G.Vigh, J.Chromatogr., 260, 337 (1983).

(收稿日期: 1988年4月22日)

Study on Indirect Photometric Chromatography (IPC) with *o*-Tolidine as a UV-Probe Reagent (I) The Adsorption Properties of *o*-Tolidine on Reversed-Phase Column Chen Hong Institute for Food Testing and Inspection Ministry of Commerce, Beijing, Du Shilu & Wu Caiying Department of Chemistry, Wuhan University

The adsorption isotherms of *o*-Tolidine on reversed phase (ODS) column are determined in methanol-aqueous buffer eluents. The Freundlich isotherm equation can be used to explain the adsorption of UV-probe reagent on ODS column. The isotherm equations of *o*-Tolidine were gained in different mobile phase. The mobile phase parameters, such as, pH value, concentration of methanol, nature and concentration of organic additives, etc. influence the adsorption of *o*-Tolidine on reversed-Phase column. The adsorption amounts of *o*-Tolidine on ODS column are associated with the retention and the response of sample in IPC.

### ★ ★ ★ ★ ★ 会议消息 ★ ★ ★ ★ ★

### 全国生物医药液相色谱学术会议在北京召开

全国生物医药液相色谱学术会议于88年11月15日—18日在军事医学科学院召开。来自全国19个省、市的代表125位参加了会议。会议聘请了七位专家就“HPLC在药物代谢中的作用”、“生物大分子色谱保留机制”、“核酸分离的分析新进展”、“色谱专家系统进展”及“80年代电泳方法和应用的进展”等方面做了专题报告,有36篇论文在会上进行了宣读,55篇论文进行了墙报交流。论文涉及到蛋白质多肽,氨基酸、核酸及有关化合物,亲和色谱、药物分析、血药浓度、色谱理论、等电聚焦、双向电泳等多个方面。会议附设的小型展览会由Waters公司,中国惠普公司及北京分析仪器厂等展出了他们的最新产品。

著名色谱学家卢佩章、俞惟乐、马立人等都到会并以丰富的资料介绍了液相色谱及电泳技术的最新进展。与会代表普遍反映这是一次内容比较丰富、收获颇大的会议,并希望能将这样的学术交流活动继续坚持下去。

据初步协商,第二届全国生物医药液相色谱学术会议将于1990年在南京召开。

(姚志建)