

卤代乙酸及其结构相近化合物的高效毛细管电泳分离

关福玉 吴惠芳 罗毅

(军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘要 氟、氯、溴等卤代乙酸是结构非常相近的离子型化合物,对它们的分离测定比较困难。用高效毛细管电泳法在碱性或酸性缓冲液条件下可将它们分离。在酸性缓冲液条件下,可提高有机酸分离的选择性。较低的操作电压有利于提高阴离子的分离度,而改变温度对分离度的影响不大。

关键词 高效毛细管电泳,卤代乙酸,有机酸,阴离子

1 前言

高效毛细管电泳(HPCE)是八十年代发展起来的一种新型分离技术,具有分离效率高、分析速度快等优点。HPCE 离子分析则是近几年发展起来的一种分析技术^[1-5],可以分析无机或有机阴、阳离子。同现有的离子分析技术相比,具有不少优点,特别是用于阴离子分析,尤为特色。本文用 HPCE 分离了卤代乙酸及其结构相近化合物,探索了在酸性缓冲液条件下改善有机酸分离的选择性,这方面的工作未见文献报道。

2 实验部分

2.1 试剂

溴化十六烷基三甲铵(CTAB),配成 5mmol/L 溶液,用时稀释。邻苯二甲酸氢钾,重结晶,配成 50mmol/L 溶液,用 1mol/L NaOH 调节至所需 pH 值。对羟基苯甲酸,化学纯,配成 50mmol/L 溶液,用 1mol/L NaOH 调节至所需 pH 值。氨性缓冲液,50mmol/L,用 1mol/L HCl 调至所需 pH 值。有机酸,分析纯或化学纯,配成 1.0mg/mL 水溶液,用时用水稀释至所需浓度。所用其它试剂均为分析纯。水为石英重蒸水。

2.2 仪器与测定方法

BioFocus 30000 型毛细管电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),配以电泳工作站;国产石英毛细管,50cm × 50μm i. d.。采用阴极进样、阳极检测的测定方式;检测波长:选择背景吸收物质的最大吸收波长 249nm(对羟基苯甲酸)或 230nm(邻苯二甲酸氢钾);采用压力进样(34.5kPa × s)或电进样(8kV × 5s);毛细管温度 25℃。毛细管冲洗程序:每天做实

验之前先用 0.1mmol/L NaOH 冲洗 10min,再用去离子水冲洗 5min,最后用缓冲液冲洗 10min,每次实验之间用缓冲液冲洗 2min。

3 结果与讨论

3.1 碱性条件下有机酸的分离

在预实验基础上,选择 5mmol/L 对羟基苯甲酸为背景吸收物质,以 10mmol/L 氨水为缓冲液,考察了 CTAB 浓度(0.1, 0.3, 0.5mmol/L)、缓冲液 pH 值(8.840, 9.053, 9.262)、运行电压(12.5, 15, 17.5kV)、毛细管温度(15℃, 20℃, 25℃)等因素对甲酸、乙酸、氟乙酸、氯乙酸、溴乙酸等有机酸分离的影响,从中选出较好的条件为:CTAB 浓度 0.3mmol/L, pH 值 9.262,电压 12.5kV;温度影响不大。在上述所选条件下,甲酸、乙酸、氟乙酸、氯乙酸、溴乙酸接近基线分离。一些有机酸的相对迁移时间见表 1,其实验条件为:5mmol/L 对羟基苯甲酸 + 0.3mmol/L CTAB + 10mmol/L 氨/氯化铵(pH 9.262),运行电压 12.5kV,检测波长 249nm,毛细管温度 25℃,样品浓度 10μg/mL。卤代乙酸同结构相近的化合物能够分离。

3.2 酸性条件下有机酸的分离测定

在酸性条件下,选择邻苯二甲酸氢钾为背景吸收物质兼作缓冲液(pH4.012),用正交设计法(L₉3⁴表)考察了 CTAB 浓度(0.1, 0.3, 0.5mmol/L)、运行电压(10, 12.5, 15kV)、毛细管温度(15℃, 20℃, 25℃)等因素对有机酸分离的影响。以氟乙酸与溴乙酸的分离度为考察指标,用 SAS 统计软件进行数据处理,结果表明,电压影响最大,温度影响最小。最佳因素水平为:电压 10kV,CTAB 浓度 0.3mmol/L,

温度 25℃。

表 1 氟乙酸及其结构相近化合物在碱性缓冲液中的相对迁移时间(min)

Table 1 Relative migration time of several organic acids in basic buffer

丙二酸 Malonic acid	顺丁烯二酸 Maleic acid	丁二酸 Succinic acid	酒石酸 Tartaric acid	甲酸 Formic acid	乙酸 Acetic acid	氟乙酸 Fluoroacetic acid	氯乙酸 Chloroacetic acid	溴乙酸* Bromoacetic acid
0.722	0.754	0.775	0.797	0.814	0.928	0.960	0.979	1.00

* 内标物溴乙酸的迁移时间为 3.76min。

* Migration time of internal standard bromoacetic acid is 3.76min.

在上述所选条件下, 氟乙酸、氯乙酸、溴乙酸接近基线分离, 乙酸的迁移时间(t_m)较大, 远离前三者的峰, 但甲酸与氟乙酸未分离。由于 pH 值对于有机酸的分离起着决定性的作用, 因此我们改变了缓冲液的 pH 值, 结果表明, 在 pH 值为 4.504 时, 卤代乙酸与其结构相近化合物的分离最好, 见表 2 和图 1。

表 2 的实验条件: 缓冲液为 5mmol/L 邻苯二甲酸氢钾 + 0.3mmol/L CTAB, 运行电压为 -10kV, 检测波长 230nm, 毛细管温度 25℃, 样品浓度 10 μ g/mL。由图 1 可以看出, 甲酸、氟乙酸、氯乙酸能够很好地分离。

表 2 氟乙酸及其结构相近化合物在不同 pH 值下的迁移时间(t_m , min)和分离度(R_s)

Table 2 Migration times (t_m) and resolutions (R_s) of several organic acids at different pH

化合物 Compound	pH 4.012		pH 4.220		pH 4.504	
	t_m	R_s	t_m	R_s	t_m	R_s
甲酸 Formic acid	3.39		3.59		3.80	
		0		1.72		2.22
氟乙酸 Fluoroacetic acid	3.39		3.74		4.10	
		1.93		3.28		3.47
溴乙酸 Bromoacetic acid	3.56		3.97		4.35	
		0.66				
酒石酸 Tartaric acid	3.45		3.64		3.72	
丙二酸、顺丁烯二酸、丁二酸 Malonic, maleic and succinic acid	3.69		4.22		4.77	
乙酸 Acetic acid	>4.6		>4.7		>4.9	

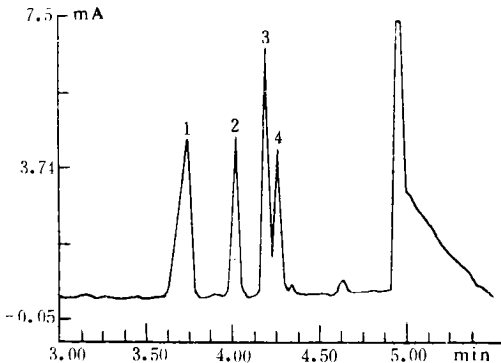


图 1 甲酸(1)、氟乙酸(2)、氯乙酸(3)和溴乙酸(4)的电泳图

Fig. 1 Electropherogram of formic(1), fluoroacetic(2), chloroacetic(3) and bromoacetic(4) acids

在上述条件下, 选择溴乙酸作内标, 内标法测定氟乙酸, 线性范围为 1~10 μ g/mL, 最低检测限 0.4 μ g/mL。若采用电进样, 则线性范围为 0.1~1.0 μ g/mL, 最低检测限 0.1 μ g/mL。

在碱性条件下, 有机酸以酸根的形式存在, 依酸根所带电荷和质量进行分离。而在酸性条件下, 有机酸以酸根和酸两种形式存在, 二者的比例随 pH 值的变化而变化, 从而造成电泳淌度的变化, 因此分离选择性发生变化。

根据 HPCE 理论, 分离度与电压的平方根成正比。但是, 在我们的实验中发现, 降低运行电压, 反而有利于提高分离度, 其机理尚不清楚。

参 考 文 献

608:59

- 1 关福玉. 分析化学, 1995, 23(1): 待发表
- 2 Jackson P E, Haddad R P. Trends in Anal Chem, 1993, 12(6): 231
- 3 Buchberger W, Haddad R P. J Chromatogr, 1992, 608: 59
- 4 Tindall G W, Wilder D R, Perry R L. J Chromatogr, 1993, 641: 163
- 5 Groh T, Baechmann K. Chem Abstr, 1992, 117: 163015g

Separation of Halo-Acetic Acids and Structurally Related Compounds by Capillary Zone Electrophoresis

Guan Fuyu, Wu Huifang and Luo Yi

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing, 100850)

Abstract Chromatographic separation of halo-acetic acids is difficult because of their closely related structure and ionic property. In this paper, we describe capillary zone electrophoresis (CZE) separation of these structurally related compounds. These UV non-absorptive anions were detected indirectly. Phthalate or *p*-hydroxyl benzoate was chosen as "background absorption agent" for indirect detection. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used as electroosmotic flow (EOF) reverser. The separation was performed in both acidic and basic electrolyte buffers. Separation conditions, such as buffer pH, the concentration of CTAB, capillary temperature and run voltage, were optimized by using orthogonal design. At the optimal conditions, halo-acetic acids were nearly baseline-separated in acidic or basic buffer. The separation selectivity of organic acids is improved in acidic (5mmol/L) phthalate buffer, as compared with basic ammonium buffer. The resolution is improved at lower running voltage (10kV/50cm). This does not agree to the common rule for CZE resolution and the reason is unknown at present.

Key words high performance capillary electrophoresis, halo-acetic acid, organic acid, anion

新书《现代实用高效液相色谱分析法》征购

由 R. Macrae 教授著, 曹志军等译, 天则出版社出版的新书《现代实用高效液相色谱分析法》实用性很强, 是一部当今从事 HPLC 工作的不可多得的工具书, 特别适合于食品、医药、农化、化工、环保、卫生、商检、检疫部门及高等院校等应用高效液相色谱仪的分析实验室人员使用。定价: 12.5 元, 个人订购享受八折优惠 (10.00 元), 免收邮费。欲购者请与《色谱》编辑部孙树平联系。