

分类号 : O657.7+2
密级 : 不保密

学校代码 : 10426
学号 : 4013010034

青 岛 科 技 大 学

硕 士 研 究 生 学 位 论 文

论文题目: 基于苯胍、二苯胍间接光度
色谱法分析饱和羧酸类
化合物的研究

姓 名 : 武智强
指导教师 : 范志先
学科专业 : 化学工程
专业代码 : 081701
研究方向 : 色谱分析

二〇一五年六月四日

基于苯胍、二苯胍间接光度色谱法分析饱和羧酸类化
合物的研究

学位论文完成日期：_____

指导教师签字：_____

答辩委员会成员签字：_____

前 言

进入 21 世纪，色谱分析在仪器分析中所占的比重持续增长，特别是色谱分离与各种检测手段相结合，更是引领了分析化学领域的一场变革。但是，对于液相色谱而言，其普及率、性价比最高的 RP-HPLC-DAD，分析无紫外吸收或仅有末端紫外吸收的非共轭阴离子型化合物仍是其短板。这类化合物虽然可通过柱前、柱后衍生或直接采用离子色谱、HPLC-ELSD、色质联用仪或气相色谱等手段检测，其高成本、实用性差、通用性弱等因素仍制约着中、小型实验室。适时创立新的分析理论，采用新技术，开发出用于分析此类化合物的新方法仍是广大科研工作者为之奋斗的目标。

近十多年来，本实验室的研究人员一直致力于有机阴离子型化合物的高效液相色谱紫外检测器分析方法的开发，以及磷酸（盐）类代表性农药品种三乙磷酸铝、草甘膦等定量分析工作。无论离线化学衍生方式，安全可靠的相转移催化衍生技术手段，还是离子对反相高效液相色谱法，离子对探针试剂的筛选，本实验室都进行了大量深入的探讨。日夜更迭，斗转星移，无数个日夜的努力终究换来了令人欣喜的结果。新型离子对探针试剂二苯胍的发现和应用，以及各种 RP 高效液相色谱柱衍生品的推陈出新，促使磷酸（盐）类农药间接光度色谱分析方法开发成功，并对反相间接光度色谱法提出新见解，为饱和羧酸类化合物的研究提供了丰富、扎实的理论基础和技术经验。

间接光度色谱法兴起之初，曾涌现了一大批色谱工作者对紫外检测方法开发的热忱，并建立了较为完善的间接光度色谱法理论知识。之后，由于受色谱柱填料技术和离子对试剂种类的限制，加之 GC-MS、LC-MS 等仪器的推广，间接光度色谱法进入了长久的瓶颈期。

通过对作为离子对探针试剂的二苯胍化学特性的深入研究，筛选出同类型离子对探针试剂苯胍，并用于饱和一元、二元羧酸的间接光度色谱法研究。试图建立针对非共轭阴离子型化合物的一整套间接光度色谱快速分析方法。该前瞻性、引导性的研究工作社会效益将会十分显著，基于苯胍、二苯胍的新型间接光度色谱法用于无紫外吸收的有机阴离子分析工作影响深远。新型离子对探针试剂苯胍、二苯胍的发现，镶嵌酰胺极性基团的 RP8/18 色谱柱的面世，使反相间接光度色谱法真正进入了实用阶段。

基于苯胍、二苯胍间接光度色谱法分析 饱和羧酸类化合物的研究

摘 要

无紫外吸收或仅有末端紫外吸收的有机阴离子型化合物的分析一直是分析学科中难点。随着反相色谱柱固定相键合技术的革新和新型离子对探针试剂的发现,开发建立这类化合物的高效液相色谱-紫外检测器的分析方法已成为现实。本文以苯胍、二苯胍为离子对探针试剂,通过调节饱和羧酸改性剂的种类和浓度,使得苯胍或二苯胍与饱和一元、二元羧酸类化合物在键合极性酰胺基团的 RP8、RP18 色谱柱上形成离子对化合物并得以分离,采用高效液相色谱-紫外检测器对其进行定性、定量分析。通过完善反相间接光度色谱理论,明确其各阶段机理。

在传统间接光度色谱理论基础上,深入研究了固定液极性酰胺基团分子表面,在流动相的作用下,构建的动态平衡模型,提出“平衡、反应、分离”三大机理,探讨了“柱头反应、柱上分离”过程。通过试验,明确了流动相中质子化的离子对探针试剂在固定相上平衡过程“四阶段”,即富集阶段、饱和阶段、扰动阶段、再平衡阶段,发展了固定相表面酰胺基中-O结合氢离子和质子化的苯胍或二苯胍阳离子,或酰胺基中 N^+ 结合改性剂羧酸根阴离子的动态平衡理论。掌握了基于苯胍、二苯胍的反相间接光度色谱法的特征流出曲线(2种情况的四特征峰)。对固定相和流动相中二苯胍的含量进行了测定,计算了二苯胍的分配比,确证了改性剂种类和浓度对固定相中二苯胍的富集量及系统平衡时间的影响。通过酸碱平衡理论及解离常数和分布分数的计算和研究,明确了反相间接光度色谱分析条件快速优化的要点,为其他样品的快速分析奠定基础。

建立了基于苯胍、二苯胍为离子对探针试剂的反相间接光度色谱法对饱和一元羧酸进行分析的方法。采用 RP8 色谱柱,分析甲酸、乙酸和丙酸、丁酸的流动相分别为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ 1.0 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸、 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸水溶液, 232 nm 波长定量;分析戊酸流动相为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/ $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 己酸;分析己酸为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液, 247 nm 波长定量。试验测得,甲酸和乙酸、丙酸和丁酸、戊酸、己酸的 LOD 分别为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;饱和一元羧酸线性关系良好, r 值均大于 0.998 。6 种酸的高、低浓度添加水平的平均回收率在 $98.08\% \sim 102.26\%$ 范围内,8 次平行测定的 RSD 值为 $0.43\% \sim 1.40\%$ 。对样品的测定结果表明,单标对高纯样品的测定结果满意,而对混合样品的测定需要采用标准加入法,后者能够消除基体效应的影响,测定

结果与真值较为一致。本方法与国家标准规定的滴定法测定结果比较发现，两种方法的乙酸、丙酸测定结果接近，而含量较低的甲酸测定结果差异稍大。

同样开发了以苯胍为离子对探针试剂的饱和二元羧酸间接光度定量分析方法。试验分别以 RP18、RP8 色谱柱分析乙二酸和丙二酸、丁二酸和戊二酸，以 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/10.0、2.0、1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸为流动相分析乙二酸、丙二酸和丁二酸、戊二酸，247 nm 波长定量。在上述分析条件下，得到的乙二酸 LOD 为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，丙二酸、丁二酸和戊二酸 LOD 均为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 $10 \sim 1400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内，饱和二元羧酸 r 值均大于 0.998。4 种酸的高、低浓度添加平均回收率为 97.75 % ~ 103.83 %，8 次平行测定的 RSD 值为 0.60 % ~ 0.87 %。准确度和精密度测定结果均能满足常量分析的要求。测定了 4 种酸的样品均与标签标识含量一致。

本文建立的饱和一元、二元羧酸反相间接光度色谱分析方法，操作简便，高效准确，通用性强，易于普及，适于推广，是此类化合物由化学分析向仪器分析方向发展的技术革新之一，对其它非共轭有机阴离子型化合物的分析同样具有实用性和指导意义。

关键词：饱和羧酸类化合物 苯胍 二苯胍 离子对化合物 间接光度色谱法

STUDY ON SATURATED CARBOXYLIC ACID BY INDIRECT PHOTOMETRIC CHROMATOGRAPHY WITH PHENYLGUANIDINE, DIPHENYLGUANIDINE

ABSTRACT

With the technical innovation of reversed phase high liquid chromatographic columns and the discovery of new ion-pair probe reagents, it has established the methods for analysis of organic anion of none or terminal ultraviolet absorption by high performance liquid chromatography with photo-diode array detector, which is difficulty to analyze all the time in analysis field. By regulating the kind and concentration of carboxylic acid modifier, the saturated monocarboxylic and dicarboxylic acids combine with phenylguanidine or diphenylguanidine — ion-pair probe reagents — forming the ion-pair compounds separated on RP8/18 chromatographic column bonded amide polar group, which is quantitatively and qualitatively analyzed by HPLC-UV.

We make further research of the dynamic equilibrium model structured in the surface of amide polar group bonded on the stationary phase, while the mobile phase flows through the column. Meanwhile, we come up with three major mechanisms of balance, reaction and separation, and present the mechanism about reaction on the head of chromatographic column and separation after the head of the column on the base of the traditional theory of IPC. In the experiment process, the four-phase equilibrating process — enrichment, saturation, destabilization, re-equilibrium — of protonated ion-pair probe reagent in the mobile phase combined with stationary phase is obtained. The dynamic equilibrium theory of hydrogen ion and protonated phenylguanidine or diphenylguanidine combine with $-O^-$ group, and the dissociated carboxyl anion link with N^+ group in the amide group bonded on the stationary phase is developed. The characteristic drift curve — 4 characteristic peaks of two conditions — of indirect photometric chromatography on the base of phenylguanidine or diphenylguanidine as ion-pair probe reagent is grasped. We determine the content of diphenylguanidine in the stationary and mobile phase and calculate the distribution ratio, which confirms that the kind and concentration of modifier affects diphenylguanidine amount accumulated on stationary phase and equilibrating time of chromatographic system. According to the theory of acid-base balance and the dissociation constant, calculated distribution fraction, the key point for quickly optimizing analytical experiment condi-

tion of acids and other samples by indirect photometric chromatography is gained.

The method of reversed-phase high performance liquid chromatography for analysis of saturated carboxylic acids with phenylguanidine and diphenylguanidine as the ion-pair probe reagent is established in this experiment. The saturated monocarboxylic acids are all separated with RP8 chromatographic column as stationary phase, and aqueous solution of $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ diphenylguanidine mingling with 1.0, 0.5, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ butyric acid, 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pentanoic acid as mobile phase for respective analysis of formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, aqueous solution of $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phenylguanidine with $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ hexanoic acid for pentanoic acid, aqueous solution of $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ phenylguanidine for hexanoic acid. The flow rate of mobile phase is $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Formic, acetic, propionic, butyric acid are detected at 232 nm wavelength, pentanoic and hexanoic acid are at 247 nm. The testing results show that the LOD of formic acid and acetic acid are $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, propionic acid and butyric acid are $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pentanoic acid is $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, hexanoic acid is $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Saturated monocarboxylic acids present clearly linear relationship in the certain concentration, and the correlation coefficients are all above 0.997. The average recoveries of high and low fortification level are between 98.08 % and 102.26 %, the RSD of 8 parallel samples is among the range of 0.43 - 1.40 %. The determination result indicated that the pure samples can be accurately quantified with the single standard, but for the mixing samples, standard addition method should be adopted to offset the influence of matrix to ensure the results accuracy according to the true value. Comparing with titration method of national standard for determination of formic acid, acetic acid, propionic acid, the results of acetic acid and propionic acid are close determined with two methods, but there is great deviation for formic acid of low content.

Similarly, we explore the quantitative method for analysis of saturated dicarboxylic acid by reversed-phase indirect photometric chromatography using phenylguanidine as ion-pair probe reagent. Oxalic acid and malonic acid are separated between stationary phase of RP18 chromatographic column and mobile phase of aqueous solution of $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ benlguanidine mixed with 10.0, 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pentanoic acid respectively. Succinic acid and glutaric acid are distributed between stationary phase of RP8 chromatographic column and mobile phase of aqueous solution of $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ benlguanidine mixed with 2.0, 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pentanoic acid respectively. These acids are detected at 247 nm wavelength. The LOD of oxalic acid is $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the others are $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Saturated dicarboxylic acids have clearly linear relationship in the concentration range of 10 - 1400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and r values are above 0.998. The average recoveries of high and low fortification level of four acids are between 97.75 -

103.83 %, the RSD values of 8 parallel samples are in the range of 0.60 - 0.87 %. The determination results of accuracy and precision can satisfy the requirement of macro analysis. The contents of samples determined by IPC match with the values marked on the label.

The established method of indirect photometric chromatography for analyzing saturated monocarboxylic and dicarboxylic acids is simple, feasible, extensive and efficient, which is the technical innovation shifting from chemical analysis to instrumental analysis, and makes practical and instructive sense for the study of others non-conjugated organic anionic compound.

KEY WORDS: Saturated carboxylic acids; Phenylguanidine; Diphenylguanidine; Ion-pair compound; Indirect photometric chromatography (IPC)

目 录

前 言	I
摘 要	III
ABSTRACT.....	V
第一章 绪 论	1
1.1 饱和羧酸类化合物概况	1
1.2 饱和羧酸类化合物分析方法研究进展	1
1.3 间接光度色谱分析方法研究进展	2
1.3.1 离子对探针试剂的研究	2
1.3.1.1 二苯胍	2
1.3.1.2 苯胍	2
1.3.1.3 苯胍的表征	3
1.3.1.3.1 紫外吸收光谱	3
1.3.1.3.2 红外吸收光谱	4
1.3.1.3.3 ^{13}C -NMR 核磁共振波谱图	4
1.3.1.3.4 质谱图	5
1.3.2 间接光度色谱法机理的研究进展	6
1.3.3 间接光度色谱法的局限与改进	6
1.4 分析饱和羧酸类化合物的间接光度色谱法提出	8
第二章 基于苯胍、二苯胍的反相间接光度色谱法机理研究	9
2.1 材料与方法	9
2.1.1 仪器与设备	9
2.1.2 试剂和溶液	9
2.1.3 分析条件	10
2.1.3.1 二苯胍分配比及平衡曲线测定	10
2.1.3.2 固定相上二苯胍质量测定	10
2.1.4 解离常数与 pH 关系、分布函数的研究	10
2.1.5 二苯胍分配比及平衡曲线测定	12
2.1.6 固定液分子表面动态平衡模型的提出	12
2.1.7 平衡过程的研究	12
2.1.8 反应机理的研究	12
2.1.9 分离机理的研究	12
2.2 结果与讨论	12
2.2.1 pH 和分布函数计算结果	12
2.2.2 二苯胍分配比的测定结果	16

2.2.3 固定液分子表面动态平衡模型的构建.....	17
2.2.4 平衡机理	20
2.2.5 反应机理	22
2.2.6 分离机理	24
2.3 小结	25

第三章 饱和羧酸类化合物分析方法的建立.....27

3.1 材料与方法	27
3.1.1 仪器与设备	27
3.1.2 试剂和溶液	27
3.1.3 分析条件	27
3.1.3.1 饱和一元羧酸	27
3.1.3.2 饱和二元羧酸	28
3.1.4 分析条件的优化	28
3.1.4.1 饱和一元羧酸	28
3.1.4.2 饱和二元羧酸	29
3.2 结果与讨论	29
3.2.1 饱和一元羧酸分析条件优化结果	29
3.2.1.1 色谱柱	29
3.2.1.2 离子对试剂种类	30
3.2.1.3 离子对试剂浓度	32
3.2.1.4 改性剂种类	33
3.2.1.5 改性剂浓度	34
3.2.2 饱和二元羧酸分析条件优化结果	36
3.2.2.1 色谱柱选择	36
3.2.2.2 离子对试剂种类选择.....	36
3.2.2.3 改性剂种类	37
3.2.2.4 改性剂浓度	38
3.3 小结	40

第四章 间接光度色谱法测定 C₁~C₆ 饱和一元羧酸.....41

4.1 材料与方法	41
4.1.1 仪器及设备	41
4.1.2 试剂与样品	41
4.1.3 分析条件	41
4.1.4 溶液的配制	41
4.1.4.1 流动相的配制	41
4.1.4.2 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸标准储备溶液的配制.....	41

4.1.4.3 样品溶液的配制	42
4.1.4.4 标准加入法混合样品配制	42
4.1.5 方法学数据	42
4.1.5.1 检出限的测定	42
4.1.5.2 标准曲线的绘制	42
4.1.5.3 准确度	42
4.1.5.4 精密度	43
4.1.5.5 饱和一元羧酸含量的测定	43
4.1.6 混合样品标准加入法	43
4.2 结果与讨论	43
4.2.1 方法学数据	43
4.2.1.1 检出限	43
4.2.1.2 标准曲线	43
4.2.1.3 准确度	47
4.2.1.4 精密度	47
4.2.1.5 饱和一元羧酸样品含量测定结果	51
4.2.2 标准加入法测定结果	53
4.3 小结	55
第五章 间接光度色谱法测定 C₂~C₅ 二元饱和羧酸	57
5.1 材料与方法	57
5.1.1 仪器及设备	57
5.1.2 试剂与样品	57
5.1.3 分析条件	57
5.1.4 溶液的配制	57
5.1.4.1 流动相的配制	57
5.1.4.2 乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸标准储备溶液的配制	57
5.1.4.3 样品溶液的配制	58
5.1.5 方法学数据	58
5.1.5.1 检出限的测定	58
5.1.5.2 标准曲线的绘制	58
5.1.5.3 准确度	58
5.1.5.4 精密度	58
5.1.6 乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸样品含量的测定	58
5.2 结果与讨论	58
5.2.1 检出限	58

5.2.2 标准曲线	59
5.2.3 准确度的试验结果	61
5.2.4 精密度的测定结果	62
5.2.5 乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸样品含量测定结果	63
5.3 小结	64
结 论	65
参考文献	67
附录一 饱和羧酸类化合物简介	71
附录二 略缩词表	74
致 谢	75

第一章 绪 论

饱和羧酸类化合物是最重要的有机酸，是基础有机化工原料。在化学工业、农药、医学、橡胶、皮革、印染等行业中有重要的应用，可用作橡胶助剂、医药合成中间体、食品防腐剂、食品调味剂、增塑剂、粘合剂、香料、化学清洗剂等使用。常见的饱和羧酸类化合物主要有饱和一元羧酸（包括 $C_1 \sim C_6$ 短链脂肪酸），饱和二元羧酸（包括 $C_2 \sim C_5$ 短链脂肪酸），多元饱和羧酸等^[1-5]。

1.1 饱和羧酸类化合物概况

见附录一。

1.2 饱和羧酸类化合物分析方法研究进展

饱和羧酸类化合物作为基础化工原料，需求量大，原料的纯度影响深加工产品的质量。市场上也出现了各种类型的有机酸试剂，为了更好地掌握有机酸试剂的产品质量及其有机酸的含量，需要建立简单、快速、准确的有机酸检测方法，以规范有机酸试剂的生产和使用。

目前，国内、外对饱和羧酸类化合物的检测方法主要集中在滴定法^[6-11]、气相色谱法、离子色谱法等^[12-15]。在滴定分析中，弱有机酸在水中溶解度小，需要特殊处理。董慧茹曾尝试数学计数法辅助电位滴定法对二元羧酸测定，并验证了CPV矩阵法的优越性，但实现分级滴定仍是无法逾越的鸿沟，影响溶液中有机酸种类和含量的确定^[16]。依据 GB/T 5009.120-2003 采用气相色谱测定丙酸或丙酸盐化合物时存在色谱柱分离效果差、柱效低，易受有机溶剂干扰，色谱柱使用寿命短等一系列问题^[17]。离子色谱虽可用于一些小分子有机酸的分离分析，但其分离能力差，分子量相近的饱和一元羧酸等难以完全分离。饱和羧酸类化合物结构简单，分子极性大，难以采用常规的仪器设备直接进行分析。

另有文献采用胶束电动毛细管色谱和核磁共振波谱等非常规的测定方法分析部分饱和一元、二元羧酸^[18-21]。以 1-溴甲基-5-氟基苯为反应物的柱前衍生技术，需要复杂的前处理过程^[22]，难以满足分析工作的需求；以磷酸盐与乙腈等有机溶剂的混合溶液作为流动相，需要严格控制有机相的比例，防止缓冲盐析出对设备或管路造成堵塞，且峰形不太理想。

ELSD 是近些年普及率较高的通用性检测器，适用于无紫外吸收的二元羧酸的检测，但其重现性差、灵敏度低的缺点，仍需技术的革新进步。以 Cu^{+} 与丁二酸等二元酸形成络合物后于紫外检测器测定方法的开发，扩展了离子对试剂种类的范围。

1.3 间接光度色谱分析方法研究进展

液相色谱是色谱分离技术中应用最广泛的一种分析方法，若配备合适的检测器会成为一种强有力的分析工具。紫外光谱仪是目前最通用、最方便的检测器，但要求被分析物具有紫外吸收基团，或通过柱前或柱后衍生生成具有紫外吸收的物质，而衍生法对衍生试剂和生成产物要求苛刻。

1.3.1 离子对探针试剂的研究

兴起于上世纪 70 年代用于液-液色谱中的间接光度色谱法开创了无紫外吸收物质全新的分析方法^[23]。活跃于国外上世纪 80 年代后期的间接光度色谱法，主要是以邻苯二甲酸盐、邻磺基苯甲酸等为探针试剂在离子交换色谱柱上采用离子交换的模式分析一些无机的阴、阳离子^[24-29]；发展于国内上世纪 90 年代的间接光度法主要采用 C₈ 或 C₁₈ 反相色谱柱，以吡啶盐、对氨基苯磺酸、麝香草酚磺酸钠等为探针试剂形成离子对化合物的方式分析脂肪族磺酸盐类表面活性剂、草酸盐、脂肪酸、吡啶离子、十八烷基三甲基氯化铵等离子型的化合物。离子交换和离子对间接光度色谱法解决了部分离子型化合物的色谱分析难题^[30-35]。袁成等借助间接检测技术采用烟酰胺、吡啶等探针试剂反相高效液相色谱法测定了无紫外响应的氨基苷类抗生素、西梭霉素、磷霉素、克林霉素、脂肪醇等非离子型化合物^[36-40]。近几年来研究最为活跃的间接光度色谱法是采用毛细管电泳的分离方式，分析生物肽、蛋白、DNA、糖等生物大分子，氨基酸、药物等小分子物质^[41-43]。

本文借鉴前人研究成果，以及前期对草甘膦、三乙膦酸铝等阴离子型化合物的大量试验研究和工作总结^[44-48]，在离子色谱电导检测和离子对反相高效液相色谱蒸发光散射检测的研究基础上，获悉了样品离子为弱酸性物质，要选取碱性的反应底物，并确定了苯胍、二苯胍为最佳离子对探针试剂。试验筛选出的芳香胍类化合物是碱性最强的胍类有机化合物，主要用途是作为橡胶硫化促进剂、防锈剂和染料的原料、示温材料、塑料交联剂、石油分馏、矿石浮选用助剂、中草药中稀土元素富集等。在分析化学中作为标定酸的基准物质、极化波催化体系的底液等。近年来只有一篇关于二苯胍合成的文献，就是与有金属活性的反式-二烷基胺膦氯化铂生成螯合物胍基氯化铂的报道。关于苯胍在分析化学中用途的未见报道，更未见有作为离子对探针试剂用于反相间接光度色谱分析的报道。

1.3.1.1 二苯胍

二苯胍性质，参见文献^[44, 49-51]。

1.3.1.2 苯胍

英文名称: Phenylguanidine;

中文别名: 1-苯基胍; 苯基胍;

英文别名: *N*-phenylguanidine, 1-phenylguanidine, benzeneguanidine

结构式: 见图1-1;

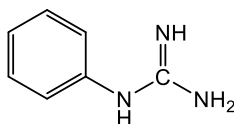


图1 - 1 苯胍化学结构式

Fig.1 - 1 Chemical structure of phenylguanidine

分子式: $C_7H_9N_3$;

相对精确分子量: 135.079 65;

CAS登录号: 2002-16-6。

纯品为无色固体, 不溶于水, 熔点 $66 \sim 67\text{ }^{\circ}\text{C}$, 溶于苯等有机溶剂。苯胍是杀菌剂甲基嘧菌胺合成的中间体。

1.3.1.3 苯胍的表征

1.3.1.3.1 紫外吸收光谱

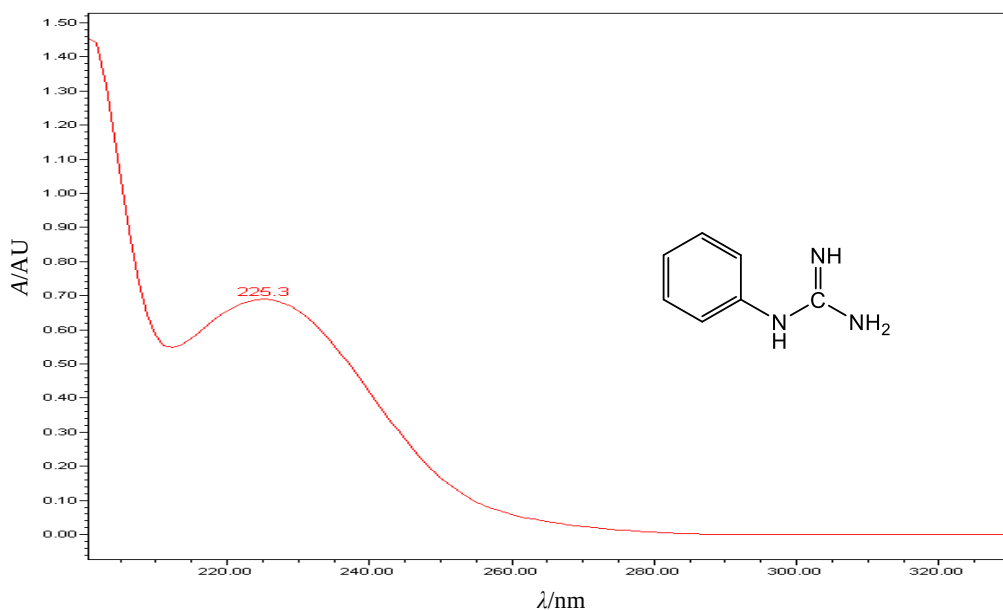


图 1 - 2 苯胍的紫外吸收光谱图

Fig. 1 - 2 The UV spectrum of phenylguanidine

苯胍的紫外吸收光谱见图1-2，其紫外吸收最大波长位于225 nm。饱和一元、二元羧酸类化合物与苯胍形成的离子对化合物紫外最大吸收波长发生红移现象。

1.3.1.3.2 红外吸收光谱

苯胍红外吸收光谱图可知（图1-3）：胍基特征吸收为 1624 cm^{-1} ， 3435 cm^{-1} 和 3310 cm^{-1} 左右的吸收带为分子结构中伯胺非对称伸缩振动吸收带。波数 1580 cm^{-1} 、 1483 cm^{-1} 、 1433 cm^{-1} 的强吸收峰为苯环的特征吸收。 1150 cm^{-1} 为C-N伸缩振动。

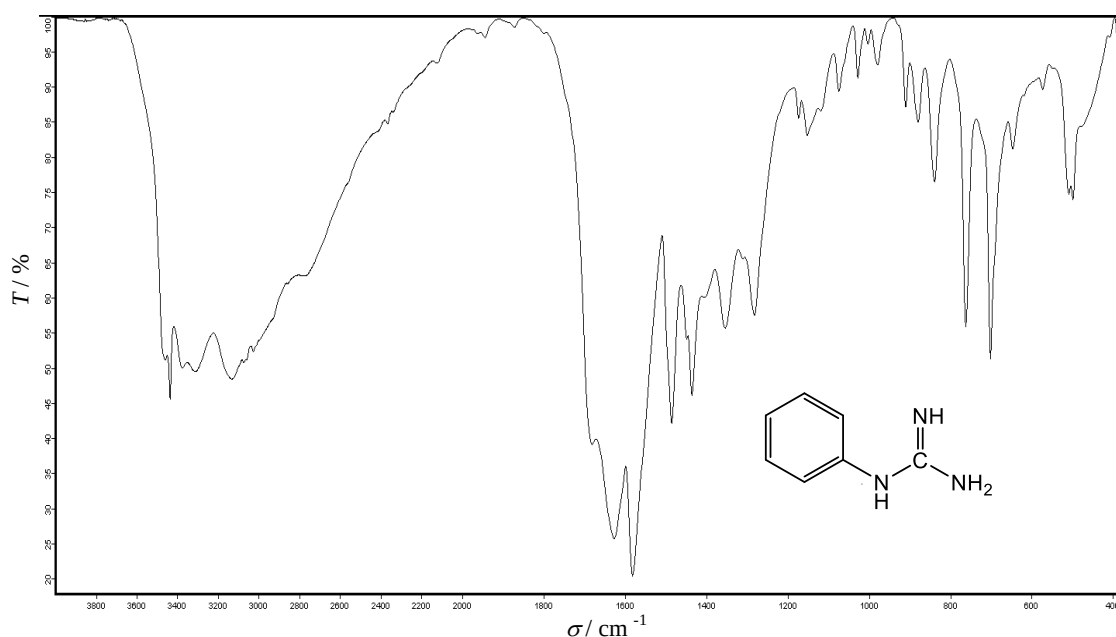


图 1 - 3 苯胍的红外吸收光谱图

Fig. 1 - 3 The IR spectrum of phenylguanidine

1.3.1.3.3 ^{13}C -NMR核磁共振波谱图

苯胍含有七个碳，化学环境不同有5个碳， ^{13}C -NMR的特征峰为（图1 - 4）：胍基碳（1）的化学位移为 $\delta_{\text{C}} 115.15$ ，与胍基氮连接的碳（2）为 $\delta_{\text{C}} 146.34$ ，苯环上的碳（3，4，5）分别为 $\delta_{\text{C}} 122.80$ ，强度最大； $\delta_{\text{C}} 123.80$ ； $\delta_{\text{C}} 128.90$ 。

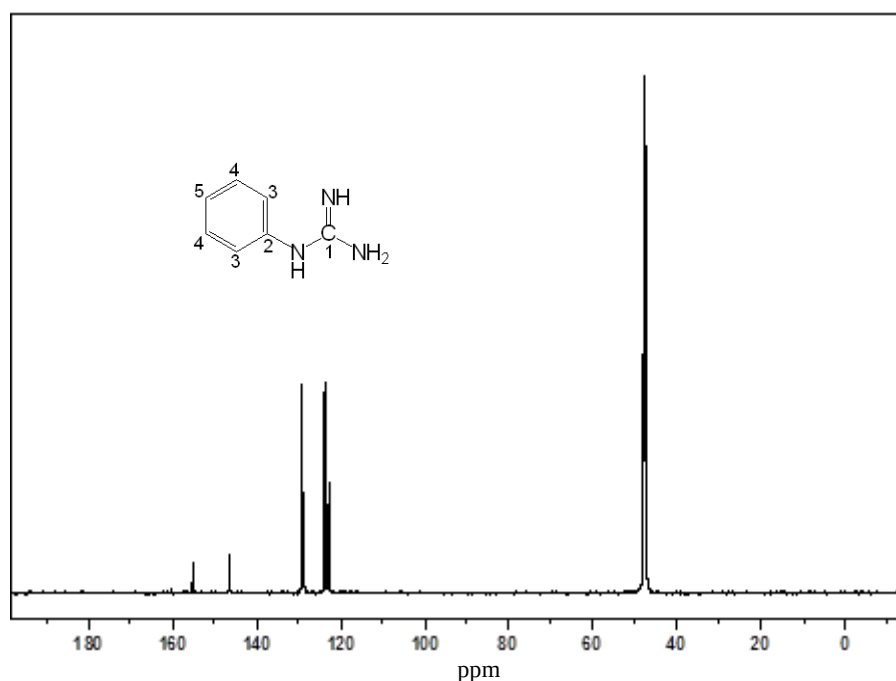


图 1 - 4 苯胍的 ^{13}C -NMR 波谱图

Fig. 1 - 4 ^{13}C -NMR spectrum of phenylguanidine

1. 3. 1. 3. 4 质谱图

苯胍质谱图见图 1 - 5，根据质谱裂解碎片可以看出： m/z 135.1 为分子离子峰，奇数，符合氮律。胍基碳氮键易于断裂并发生氢重排生成基峰 m/z 93，此为优势反应。失去一个 $-\text{NH}_2$ 生成 $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2^+$ m/z 119。 m/z 77、 m/z 66、 m/z 51、 m/z 43、 m/z 39 碎片离子证明分子结构中苯环的存在。

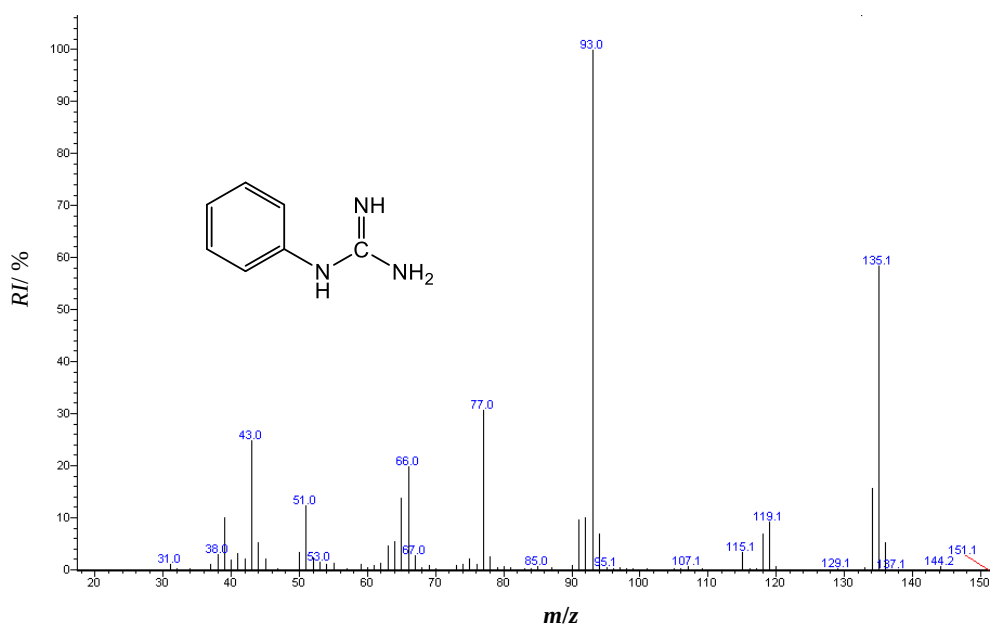


图 1 - 5 苯胍的质谱图

Fig. 1 - 5 The mass spectrum of phenylguanidine (EI)

1.3.2 间接光度色谱法机理的研究进展

间接光度色谱法主要三种分离模式^[52-56]，一是离子交换色谱法：适用于无机离子的分析。原理是将探针试剂加入到流动相中，使之在流动相与固定相间达到分配平衡，基线信号作为背景吸收，当离子型化合物进入时与探针试剂在色谱柱上交换，根据探针试剂的变化产生信号；二是离子对色谱法：适用于除无机离子的离子型化合物。Bidlingmeyer 提出离子对色谱的离子相互作用机理，基本假设是探针试剂和带相反电荷的其它离子在固定相的疏水表面形成一个双电层，先有带正电的探针试剂吸附于固定相上，带负电的洗脱剂吸附于探针试剂上，当负离子样品引入系统后与洗脱剂交换，形成离子对化合物。探针试剂和流动相中添加的反离子形成的离子对与探针试剂和被测组分离子形成的离子对竞争固定相有限的结合容量，从而使洗脱液中探针试剂浓度不断变化，产生色谱响应。三是对于非离子型化合物，主要有反相色谱和正相色谱分离法。关于非电解质的间接检测原理，Banerjee 提出了增溶效应理论，认为被测组分进入色谱系统后，引起洗脱液溶剂强度的改变，增加了探针试剂的溶解度，从而使流动相中探针试剂浓度不断变化，产生色谱峰。

1.3.3 间接光度色谱法的局限与改进

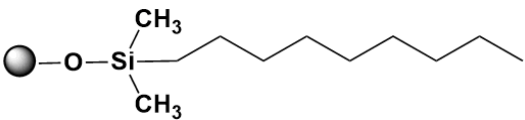
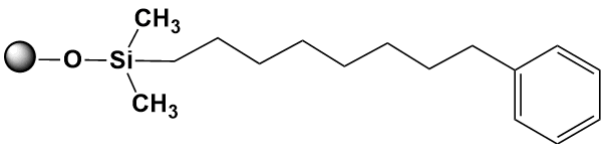
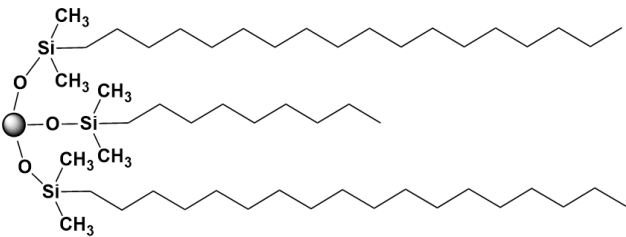
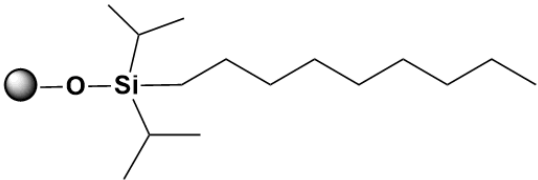
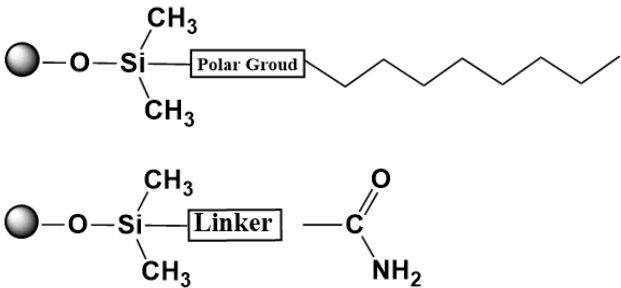
间接光度色谱法未得到广泛应用其主要原因之一是探针试剂的限制。探针试剂通用性差，导致不同的化合物分析前需考虑筛选合适的探针试剂。传统的间接光度色谱法为了避免质子迁移对分析物信号造成干扰，通常选用是对质子惰性的有机试剂，如三丁基苄基氯化铵、对氨基苯磺酸、麝香草酚磺酸钠、对氨基苯酚盐酸盐、吡啶、吡啶二羧酸、结晶紫、烟酰胺等。探针试剂多选用商品化的试剂，也可根据实验需求自己合成。

另一原因是色谱柱技术发展的滞后。固定相研究是HPLC技术发展的重要内容：分离之关键在于柱填料，核心在于固定液^[57-60]。80年代商业化的色谱柱只有三种，色谱柱寿命短、固定液种类简单、重现性差、作用机理不甚清楚、缺少系统性研究等不足，使间接光度色谱法没有发挥太大的作用。色谱柱技术经过近30年的改进，得到了长足的发展。柱内填料由最初的薄壳无孔填料到今天的超纯硅胶或硅碳键杂化硅胶颗粒技术，再到硅胶基质聚合物包被技术和新型担体整体柱的诞生；固定液由原来仅简单为C₈、C₁₈、氰基、苯基基团到今天的基团中间加入极性基团的固定液键合技术。色谱柱技术的革新和进步催生了新的分离分析技术，使其更为成熟、实用化。最初的色谱分离原理仅仅是被分析物在两相中的物理分配过程所致。近年来研究发现，在不同杂化颗粒上键合不同种类固定相的大环境中加入改性剂、反应底物的某些色谱行为是以化学反应为主导的，物理过程

为次要行为或者作为辅助使得分析组分得以良好的分离。本文就是借助于新型色谱柱技术采用超纯硅胶为载体键合有极性基团的C₈、C₁₈色谱柱来开展研究（表1-1）。

表 1 - 1 不同键合相种类

Tab. 1 - 1 The different kinds of bonded phase

键合相种类	俗名	作用	图示
直链饱和烷基		增强固定相的非极性，提高载样量	
苯基		同上	
长、短两种烷基链	水平聚合键合固定相	封闭残留的硅羟基，提高分离效率	
异丙基、异丁基侧链	空间排斥键合相	立体保护立体效应阻碍硅羟基与溶质的相互作用	
中间镶嵌极性官能团（氨基、酰胺基、季铵基、氨基甲酸酯基）	静电屏蔽键合固定相	屏蔽硅羟基与分析物的相互作用	

反相间接光度色谱法的不足还有无法进行梯度洗脱，因为梯度洗脱会破坏离子对探针试剂在固定相上的动态平衡。由于使用了酸性改性剂，色谱柱的寿命会有所缩短。采用反相分离模式，对于生成极性较强的离子对化合物保留不力。

1.4 分析饱和羧酸类化合物的间接光度色谱法提出

现代仪器分析技术已经十分成熟，但是对无紫外或末端吸收的阴离子型化合物还没有满意的直接分析方法。离子交换色谱法长于无机离子分析，对于大量的有机阴离子分析还鞭长莫及；气相色谱法可以分析部分含量较低的有机酸，但是分离效果差，柱效低且对色谱柱和仪器设备腐蚀严重。

本文基于间接光度色谱法机理，针对短链饱和羧酸类化合物探索苯胍、二苯胍离子对探针适宜的分析对象，优化离子对探针浓度和改性剂的种类和浓度^[61]，力图开发出一种先进的、一步到位、适用性广、准确可靠评价羧基阴离子型化合物产品质量的常规分析方法，实现从经典化学分析向仪器分析的革新性进步，从使用专用选择型检测器向通用型检测器的跨越，以促进其质量提高，增强国内、外市场竞争力。建立的通用性强，适用性广泛的反相间接光度色谱法具有重要意义，应用前景光明，值得深入研究。

第二章 基于苯胍、二苯胍的反相间接光度色谱法机理研究

反相间接光度色谱法是在目标阴、阳离子相互作用的基础上,通过显光离子与隐光离子形成离子对化合物而影响流动相中紫外吸光度值的变化,从而实现对被测离子的间接测定。在溶液中,离子的自由运动和反应活性直接影响着离子对化合物的成对效果,其中氢离子的浓度梯度变化决定着非共轭有机阴离子型化合物的质子化进程,关系到间接光度色谱法建立的成败。根据布朗斯特质子酸碱理论,酸碱平衡体系的建立是离子相互间质子授受过程的结果,并伴随着质子自递反应、酸碱解离、中和反应和水解反应^[62]。因此,明确流动相平衡体系的建立、各离子间相互作用、离子对探针的分配比,对探索、揭示反相间接光度色谱法的流动相中各离子在固定相上的平衡机理、阴离子柱头反应机理、离子对化合物分离机理会起到推动作用。

2.1 材料与方法

2.1.1 仪器与设备

高效液相色谱仪: Waters 600 高压泵,配 Waters 2996 紫外可见光二极管阵列检测器(DAD), Rheodyne 7725i 六通阀进样器, Empower Pro 中文版色谱工作站;

色谱柱: Waters SymmetryShield RP8, 3.5 μm (4.6 mm $\times$ 150 mm),

Waters SymmetryShield RP18, 3.5 μm (4.6 mm $\times$ 250 mm);

pH 测定仪: SIN-PH-100/170 型, 杭州联测自动化技术有限公司。

2.1.2 试剂和溶液

冰乙酸, 优级纯; 甲酸、丙酸、戊酸、己酸, 分析纯, 均为国药集团化学试剂有限公司; 丁酸, 分析纯, 天津市巴斯夫化工有限公司;

二苯胍, 分析纯, 99.0 %, 国药集团化学试剂有限公司;

苯胍, 分析纯, 98.0 %, 药明康德化学试剂有限公司;

乙腈, 色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司;

一级水: 自制;

二苯胍 100 mg $\cdot$ L⁻¹ 储备水溶液配制 (约 0.48 mmol $\cdot$ L⁻¹): 称取 0.25 g (精确至 0.000 2 g) 二苯胍于 2500 mL 细口瓶中, 加一级水, 超声波振荡 30 min, 冷却过夜即为二苯胍储备水溶液, 室温放置时间不超过 60 d, 用前稀释 4 倍。

2.1.3 分析条件

2.1.3.1 二苯胍分配比及平衡曲线测定

流动相：0.12 mmol · L⁻¹ 二苯胍；

0.12 mmol · L⁻¹ 二苯胍/ 2 mmol · L⁻¹ 甲酸或乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸水溶液；

0.12 mmol · L⁻¹ 二苯胍/ 2、4、8、16 mmol · L⁻¹ 丙酸水溶液；

0.12 mmol · L⁻¹ 二苯胍/ 2、4、8、16 mmol · L⁻¹ 戊酸水溶液；

流动相流速：1.0 mL · min⁻¹；氦气鼓泡脱气 20 mL · min⁻¹；

检测波长范围：195 nm~400 nm；

定量提取波长：232 nm；

采样速率：1.0；

分辨率：1.2 nm；

仪器控制：自动曝光；

3 D 数据采集；

2 D 谱图比较。

2.1.3.2 固定相上二苯胍质量测定

流动相：0.1 % 乙酸水溶液；

余同 2.1.3.1。

2.1.4 解离常数与 pH 关系、分布函数的研究

以式 2-1 一元羧酸[H⁺]和式 2-2 二元羧酸[H⁺]计算公式，求得饱和羧酸样品分析浓度 200 mg · L⁻¹ 和流动相中不同种类改性剂 0.05 ~ 1.0 mmol · L⁻¹ 的[H⁺]。各饱和羧酸解离常数参见表 2-1。

$$[H^+]^3 + Ka_1 \times [H^+]^2 - (Ka_1 \times c + Kw) \times [H^+] - Ka_1 Kw = 0 \quad (\text{式 2-1})$$

$$[H^+]^4 + Ka_1 \times [H^+]^3 + (Ka_1 Ka_2 - Ka_1 \times c - Kw) \times [H^+]^2 - (Ka_1 Kw + 2Ka_1 Ka_2 c) [H^+] - Ka_1 Ka_2 Kw = 0 \quad (\text{式 2-2})$$

式中：Ka₁ — 一级解离常数；Ka₂ — 二级解离常数；

K_w — 水解电离常数；c — 溶液浓度；

式 2-1、2-2 分别为一元三次方程和一元四次方程，计算难度较大，可通过在线方程计算器直接求得精确结果；或者在 $cKa_1 \geq 10Kw$ 和 $\frac{Ka_2}{[H^+]} \approx \frac{Ka_2}{\sqrt{cKa_1}} < 0.05$ 时，

将式 2-2 可简化为一元二次方程 $[H^+]^2 + Ka_1[H^+] - cKa_1 = 0$ 由求根公式求解。

表 2 - 1 饱和羧酸类化合物解离常数

Tab. 2 - 1 Dissociation constant of saturated carboxylic acid

样品 Samples	Ka_1	pKa_1	Ka_2	pKa_2
甲酸	1.80×10^{-4}	3.74	—	—
乙酸	1.74×10^{-5}	4.72	—	—
丙酸	1.35×10^{-5}	4.87	—	—
丁酸	1.52×10^{-5}	4.82	—	—
戊酸	1.40×10^{-5}	4.85	—	—
己酸	1.39×10^{-5}	4.86	—	—
乙二酸	5.90×10^{-2}	1.23	6.4×10^{-5}	4.19
丙二酸	1.38×10^{-3}	2.86	4.90×10^{-6}	5.31
丁二酸	7.08×10^{-5}	4.15	4.37×10^{-6}	5.36
戊二酸	5.01×10^{-5}	4.30	7.08×10^{-6}	5.15
己二酸	3.98×10^{-6}	5.40	7.41×10^{-6}	5.13

由式 2-3~2-4、2-5~2-7 分别求得 pH 在 0~8 之间各饱和一元羧酸和饱和二元羧酸分布分数曲线，明确某种体系下分子/离子形态的存在比例。

$$\delta_1 = \frac{[H^+]}{[H^+] + Ka} \quad (\text{式 2-3})$$

$$\delta_0 = \frac{Ka}{[H^+] + Ka} \quad (\text{式 2-4})$$

$$\delta_2 = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2} \quad (\text{式 2-5})$$

$$\delta_1 = \frac{Ka_1[H^+]}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2} \quad (\text{式 2-6})$$

$$\delta_0 = \frac{Ka_1Ka_2}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2} \quad (\text{式 2-7})$$

δ_1 — 一元弱酸一价阴离子分布分数； δ_0 — 一元弱酸分子分布分数；

δ_2 — 二元弱酸二价阴离子分布分数； δ_0 — 二元弱酸分子分布分数；

δ_1 — 二元弱酸一价阴离子分布分数。

2.1.5 二苯胍分配比及平衡曲线测定

第一步：活化 RP8 色谱柱。流动相使用 100 %乙腈冲洗色谱柱 30 min，再用 100 %一级水清洗 30 min；第二步：建立平衡曲线。以 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液作流动相， $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速，平衡色谱柱，记录色谱平衡曲线；第三步：测定死时间。在 2.1.3.1 分析条件下进样一级水，测得死时间。第四步：洗脱色谱柱中二苯胍。停泵，卸下色谱柱，以两通连接，用 100 %乙腈清洗管线 15 min；接上色谱柱，以 100 %乙腈冲洗 30 min，收集洗脱液；第五步：测定洗脱的二苯胍。将收集到的二苯胍/乙腈溶液，旋转浓缩，加入 25 mL 水定容，在 2.1.3.2 条件下测定；第六步：以第五步测得的二苯胍的含量减去死体积中二苯胍含量，除以死体积中二苯胍含量求得分配比。3 次重复。

按照上述程序分别测定 2.1.3.1 中各流动相体系下二苯胍的分配比。

2.1.6 固定液分子表面动态平衡模型的提出

依据离子对试剂于色谱柱上的保留行为和试验过程大量的谱图、数据和试验结果，结合 RP8 色谱柱固定相表面化学键的键合的微观情况，提出软固定液平衡理论，并对其平衡机理进行模拟。

2.1.7 平衡过程的研究

通过观察二苯胍在不同种类和浓度改性剂体系下的平衡曲线图，结合对二苯胍分配比的研究结果，推测固定相上发生的微观反应，探讨软固定液平衡过程。

2.1.8 反应机理的研究

以软固定液平衡理论为依据，结合分析过程得到的间接光度色谱图，从微观角度分析样品阴离子与离子对探针试剂在色谱柱头上发生的离子结合反应，明确离子对化合物成键机理。

2.1.9 分离机理的研究

选定苯胍、二苯胍为离子对试剂，通过调节改性剂，对比分析饱和羧酸类化合物优化过程，明确离子对试剂与改性剂对固定相与流动相极性改变的影响。

2.2 结果与讨论

2.2.1 pH 和分布函数计算结果

依据式 2-1、2-2 求得各饱和羧酸分析浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的氢离子浓度和 pH 值，由表 2-2 可知，饱和一元羧酸 pH 值在 3.27 ~ 3.83 间，饱和二元羧酸的 pH

值在 2.94 ~ 3.59 间。由图 2-1 可见, 改性剂在 0.1~10 mmol · L⁻¹ 范围内时, pH 位于 3.38 ~ 4.51。根据饱和羧酸类化合物优化得到的分析条件可知, 本试验改性剂的添加量一般在 1 ~ 2 mmol · L⁻¹, 只有测定解离度较强的乙二酸时, 添加的改性剂浓度较大为 10 mmol · L⁻¹。改性剂的添加量是由分析样品的解离能力决定, 添加的改性剂的种类和浓度与被分析物的解离度有关, 被分析样品溶液中氢离子浓度高于改性剂一个数量级, 且解离常数小于改性剂。

表 2 - 2 饱和羧酸类化合物的酸度与 pH 值

Tab. 2 - 2 Hydriion concentration and pH of saturated carboxylic acid

饱和一元羧酸				饱和二元羧酸			
Saturated monocarboxylic acid				Saturated dicarboxylic acid			
样品	分析浓度	[H ⁺]	pH	样品	分析浓度	[H ⁺]	pH
Samples	Analytical concentration /mmol · L ⁻¹	/mmol · L ⁻¹		Samples	Analytical concentration /mmol · L ⁻¹	/mmol · L ⁻¹	
甲酸	2.173 6	0.542 0	3.27	乙二酸	1.1111	1.1486	2.94
乙酸	3.332 2	0.232 2	3.63	丙二酸	1.9228	1.0840	2.96
丙酸	2.701 4	0.184 3	3.73	丁二酸	1.6945	0.3170	3.50
丁酸	2.271 4	0.178 4	3.75	戊二酸	1.5147	0.2584	3.59
戊酸	1.959 5	0.158 8	3.80				
己酸	1.722 9	0.148 0	3.83				

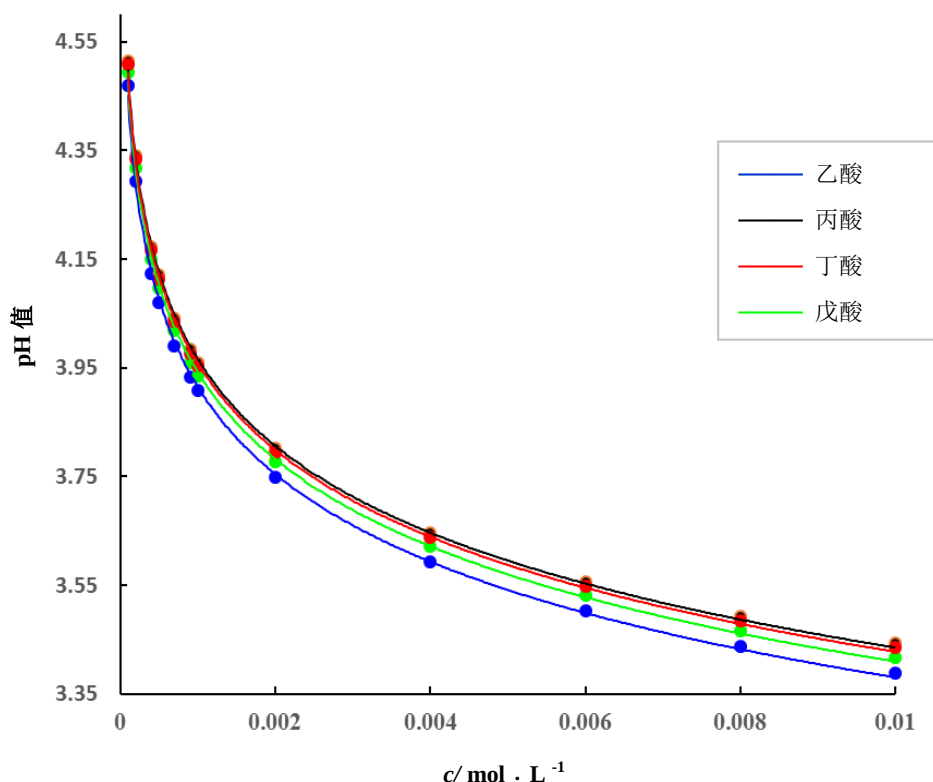


图 2 - 1 不同浓度改性剂体系中的 pH 值

Fig. 2 - 1 Modifiers pH of different concentration

由式 2-3 ~ 2-4 和式 2-5 ~ 2-7 得到的饱和一元羧酸和饱和二元羧酸的分布函数分别见图 2-2、2-3。饱和一元羧酸在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 在 3.27 ~ 3.83，由图 2-2 可见，饱和一元羧酸（除甲酸外）几乎都以分子态形式存在，其分布分数均高于 0.85；甲酸 pH 为 3.27，分布分数约为 0.74，分子态明显少于其他一元酸，从而也明确了同一分析浓度，甲酸的响应值明显高于其他酸的问题。饱和二元羧酸在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 值在 2.94 ~ 3.59 间，由图 2 - 3，93 % 的乙二酸失去一个氢离子，发生一级电离，以 HC_2O_4^- 离子形式存在；丙二酸中， $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$ 与 $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_4^-$ 分布分数比约为 1:1；丁二酸和戊二酸中分子态所占比例较大，只有 18.2 % $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4^-$ 和 16.5% $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_4^-$ 。由此可见，各饱和羧酸于分析浓度下多以分子态存在，饱和二元羧酸由于存在二级解离的问题，尤其是乙二酸和丙二酸的一级和二级解离均较强，使得色谱图上能够略微见到二级解离产生的离子与苯胍形成的离子对化合物。

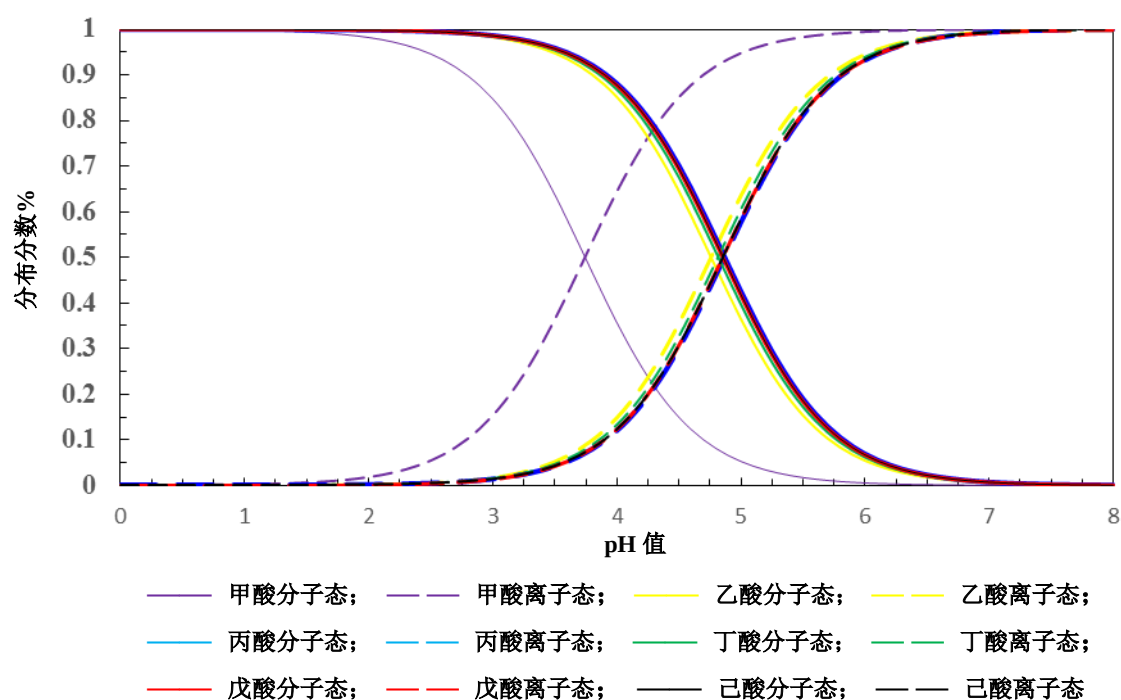


图 2-2 一元羧酸不同 pH 值下的分布分数

Fig.2 - 2 The distribution fraction of saturated monocarboxylic acid

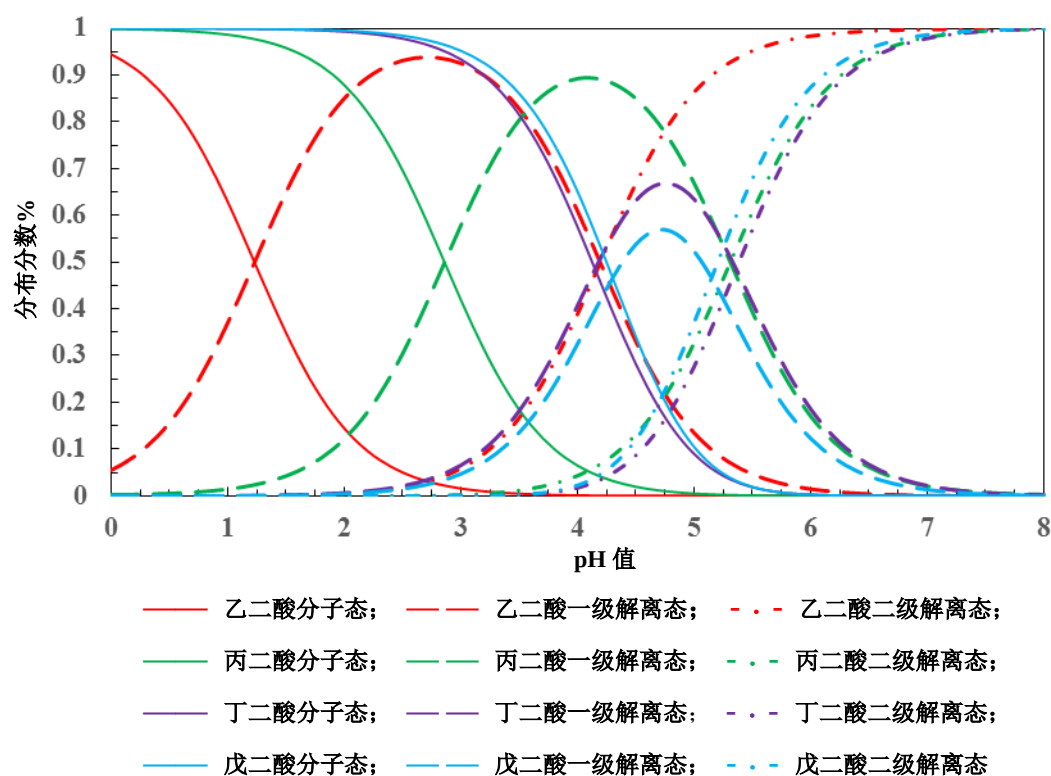


图 2-3 二元羧酸不同 pH 值下的分布分数

Fig.2 - 3 The distribution fraction of saturated dicarboxylic acid

2.2.2 二苯胍分配比的测定结果

对于色谱分离系统，分配比是衡量色谱柱对组分保留能力的重要参数。按照 2.1.5 的试验过程对二苯胍分配比的测定结果见表 2-3 ~ 2-4。由表 2-3 可知， $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/水体系，固定相上吸附的二苯胍最多，分配比最大，说明二苯胍分子大量吸附在色谱柱固定相的表面，形成新的固定相。当添加 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲、乙、丙、丁、戊、己酸改性剂时，随着酸性增强，固定相上吸附的二苯胍减

表 2 - 3 不同种类改性剂时二苯胍分配比的测定结果

Tab. 2 - 3 Result of distribution ratio of diphenylguanidine of different kinds of modifier

流动相组分 Component of mobile phase	总二苯胍质量 Total diphenylgani- dine mass/ng	死体积二苯胍质量 Dead volume diphe- nylguanidine mass/ng	分配比 Distribution ratio	平均分配比 Average dis- tribution ratio
二苯胍	1226.74	41.63	28.47	32.93
	1474.70	41.63	34.43	
	1535.46	41.63	35.89	
二苯胍/甲酸	158.70	23.55	5.74	5.08
	119.46	23.55	4.07	
	151.72	23.55	5.44	
二苯胍/乙酸	107.26	23.90	3.49	3.56
	114.55	23.90	3.79	
	105.18	23.90	3.40	
二苯胍/丙酸	154.50	23.40	5.60	5.37
	143.89	23.40	5.15	
	149.10	23.40	5.37	
二苯胍/丁酸	203.94	23.26	7.77	7.75
	200.40	23.26	7.62	
	205.83	23.26	7.85	
二苯胍/ 戊酸	352.39	24.71	13.27	13.66
	377.07	24.71	14.26	
	357.07	24.71	13.46	
二苯胍/ 己酸	836.98	29.25	27.61	27.70
	815.97	29.25	26.90	
	865.36	29.25	28.58	

少，分配比逐渐降低，甲酸体系由于醛基的影响导致分配比的测定结果异常；分别测定 2、4、8、16 mmol · L⁻¹ 浓度水平的丙酸、戊酸改性剂体系二苯胍的分配比，发现随着改性剂浓度增大，二苯胍在色谱柱固定相上的分配比逐渐减小。由此可见，随着改性剂中[H⁺]浓度增大，流动相中的 H⁺与二苯胍争夺有限的固定液位点，导致二苯胍分配比的降低；通过比较表 2-3 和表 2-4 的测定数据可知，改性剂的种类是影响二苯胍的主要因素，决定着软固定相的结构，而改性剂的浓度影响相对较小，可理解为“改性剂种类为粗调旋钮，pH 值为微调旋钮”。通过对饱和一元和二元羧酸的优化分析可知，低浓度下较长链羧酸更适合做改性剂。

表 2 - 4 不同浓度改性剂时二苯胍分配比的测定

Tab. 2 - 4 Result of distribution ratio of diphenylguanidine of different concentration of modifier

流动相 组分 Component of mobile phase	改性剂 摩尔浓度 Mole concentra- tion/(mmol · L ⁻¹)	总二苯胍质量 Total diphenyl- guanidine mass/ng	死体积二苯胍质量 Dead volume diphe- nylguanidine mass/ng	分配比 Partition ratio
二苯胍/丙 酸	2	203.60	24.30	4.86
	4	204.16	24.30	4.88
	8	199.62	24.30	4.68
	16	236.67	24.30	6.27
二苯胍/戊 酸	2	476.63	66.58	15.60
	4	475.88	66.58	15.57
	8	462.59	66.58	15.03
	16	449.10	66.58	14.49

2. 2. 3 固定液分子表面动态平衡模型的构建

间接光度色谱法的出现，无疑是专为 HPLC-UV 开发的超性能“软件”，拓展了间接光度色谱法的应用范围。但同时流动相中添加的本底试剂和改性剂以及与样品溶液所组成的复杂体系也极大地考验着色谱柱的各项性能指标，也为间接光度色谱法的机理研究和确证带来了挑战。达世禄早于 1989 年就将国内、外间接光度色谱法的检测机理类型做了归纳整理，即：离子交换法、离子对化合物、离子或分子相互作用“平衡扰动”^[52]。

传统双电层理论模式：在以硅胶基质键合碳链为柱内填料的色谱柱中，硅胶表面裸露着大量的硅氧烷键和硅醇键（这不仅对样品的保留与分离以及双电层的构建有影响，而且酸度的耐受范围较窄）。疏水性较强的离子对试剂和带相反电

荷的其他离子在硅胶基质表面建立了“阴阳离子带”的双电层，由于键合相的碳载量极低，第一电层覆盖面小，第二电层易受流动相干扰。样品离子进入后，在静电力与固定相吸附力的驱使下，会在双电层间穿梭；流动相中离子对试剂为保证电中性环境，也相应的发生迁移。流动相中紫外离子对试剂的浓度变化产生了系统峰与样品峰。

“软固定液”动态平衡模式：随着新兴色谱填料技术的诞生，提高了色谱柱的实用性，拓宽了色谱柱的使用范围。本论文在传统双电层色谱理论研究的基础上，针对流动相中离子对探针试剂和改性剂在固定相和流动相中建立的动态平衡，研究了新固定液中基团的结合方式，并提出了“柱头反应、柱后分离”的反应分离机理。试验采用内嵌极性酰胺基团的 RP8 色谱柱，此酰胺基主要以图 2-4 中 (A) 状态存在，部分以 (B) 状态存在；当流动相中二苯胍离子对探针试剂和改性剂混合溶液进入色谱柱时，在固定相和流动性相中形成酸性体系， H^+ 使得部分共轭态 (A) 的酰胺基质子化，或者质子化的二苯胍直接与酰胺基上的 $-O^-$ 结合，而解离的酸根阴离子与酰胺基上的 $-NH^+$ 结合，形成新的固定液。当样品溶液进入色谱柱时，柱头处样品溶液中 H^+ 浓度梯度较大，扰乱平衡的固定液，促使带正电的二苯胍离子与样品阴离子形成中性缔合物，并随流动相在色谱柱中进行分配分离，产生紫外信号，得到间接光度色谱图。软固定液基团结构示意图见图 2-5。

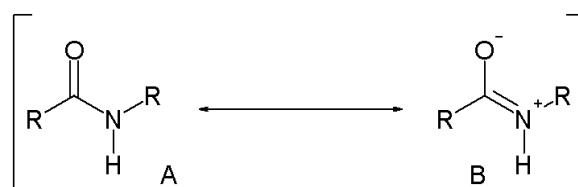


图 2 - 4 固定相酰胺基团结构示意图

Fig. 2 - 4 Structure illustration of amide group on stationary phase

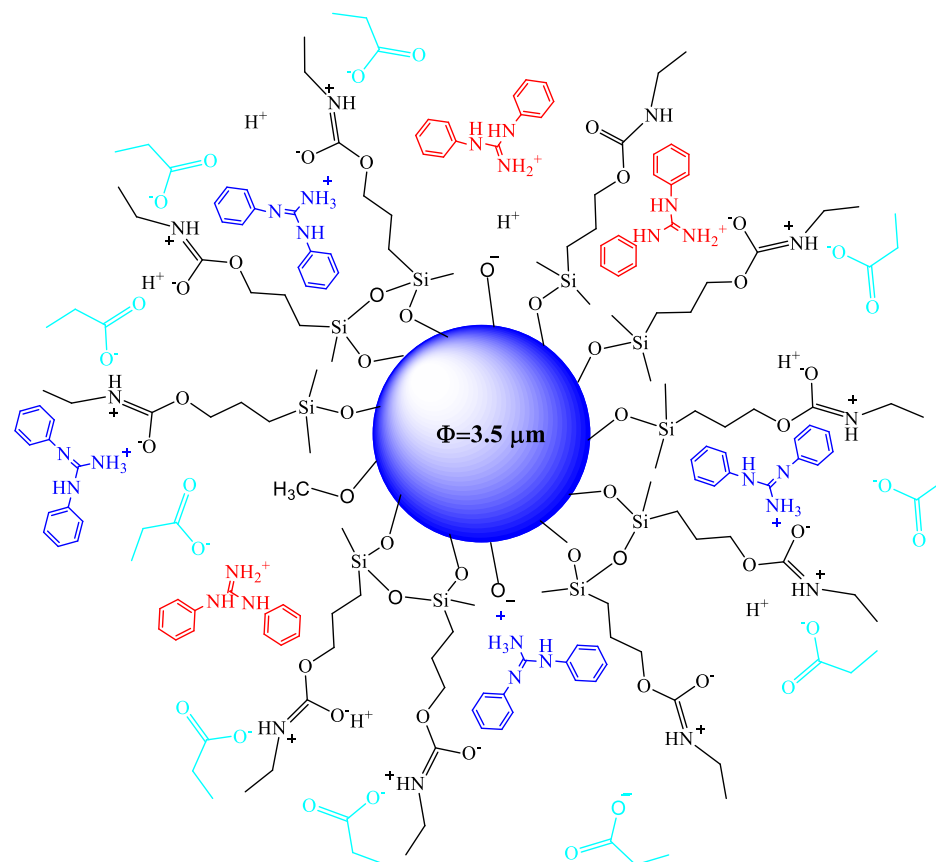


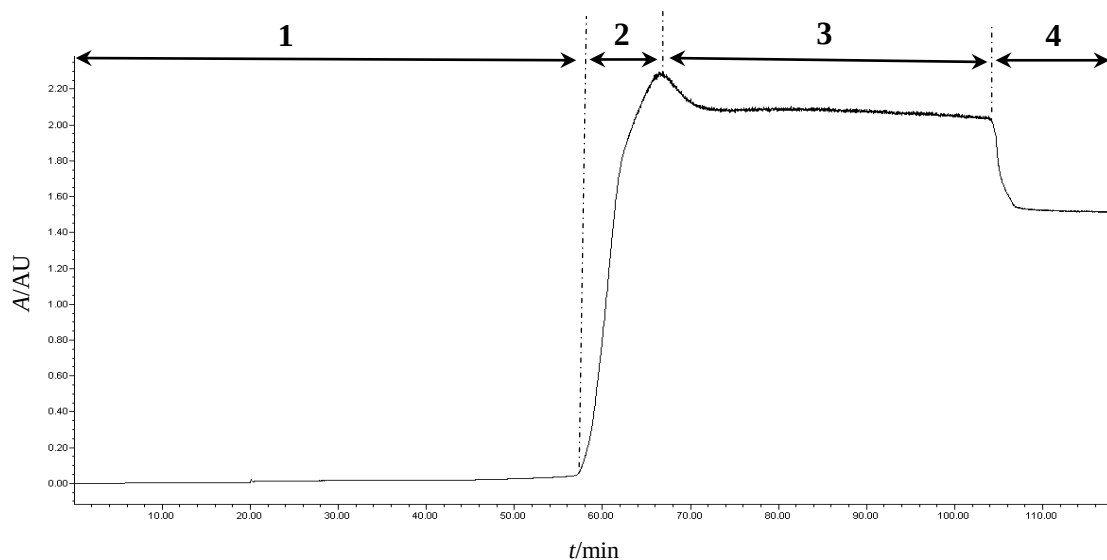
图 2 - 5 固定液分子表面构建示意图

Fig. 2 - 5 The structure building illustration in the surface of the stationary liquid

2.2.4 平衡机理

色谱柱中固定相是间接光度色谱法理论研究的核心内容，含极性酰胺基的 RP8 色谱柱为新固定液的构建提供了保障。在固定相与流动相间形成的非均相体系中，各离子活动都受到溶液中热力学与动力学因素的制约，平衡曲线就是各离子间相互作用力竞争的综合体现。固定相和流动相平衡过程分为四个阶段：富集阶段、饱和阶段、扰动阶段、平衡阶段（图 2-6）。富集阶段：离子对试剂随流动相到达色谱柱头，并逐步在整个色谱柱管富集，由于离子对试剂浓度较低为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，且几乎所有离子对试剂都被吸附在固定相上，因而紫外检测器无响应。由图 2-7 和图 2-8 可以看出，同一浓度甲酸/二苯胍—己酸/二苯胍体系和不同浓度的丁酸/二苯胍体系，随着改性剂酸性降低，富集时间越长，甲酸/二苯胍体系的富集时间仅 10 min，己酸/二苯胍体系多达 1 h，而水/二苯胍体系则需要 6 h 才能达到完全平衡。这也与分配比测定结果相一致，酸性越强，色谱柱上富集的二苯胍越少，酸性越弱富集的量越多；未加任何改性剂时，溶液中氢离子含量较低，水解离提供氢离子过程极为缓慢，平衡所需时间最长。饱和阶段：随着固定相上二苯胍近于饱和，固定相上不再吸附二苯胍，从而使得流出色谱柱的二苯胍含量骤增，经检测器，色谱峰上出现明显的突越。扰动阶段：刚形成的固定液并不牢固，例如己酸、戊酸解离度相对较低，二苯胍富集阶段未达到解离平衡，因而位点多为二苯胍占据，随着色谱体系的逐渐平衡，弱酸解离出的 H^+ 会适当取代二苯胍，而使得色谱柱流出的二苯胍含量高于流动相中的二苯胍含量，呈现出高于平衡态的色谱图。由此可见，改性剂解离度越小，浓度越低，离子间对有效位点的竞争愈发激烈。平衡阶段：完整的软固定液是固定相表面镶嵌了一层“电中性膜”。宏观上，各离子呈现出静态电层带；微观上，离子间有条不紊的进行着动态平衡。

酸根离子富集速率排序：甲酸根~乙酸根 > 丙酸根 > 丁酸根 > 二苯胍 > 戊酸根 > 己酸根（该排序根据富集量与分子式大小推测，严格意义上离子富集是同时进行的），见图 2-7。



1 富集阶段; 2 饱和阶段; 3 扰动阶段; 4 平衡阶段

图 2-6 软固定液构建过程平衡时间曲线

Fig. 2 - 6 Equilibrium curve of the process of building "softy stationary liquid"

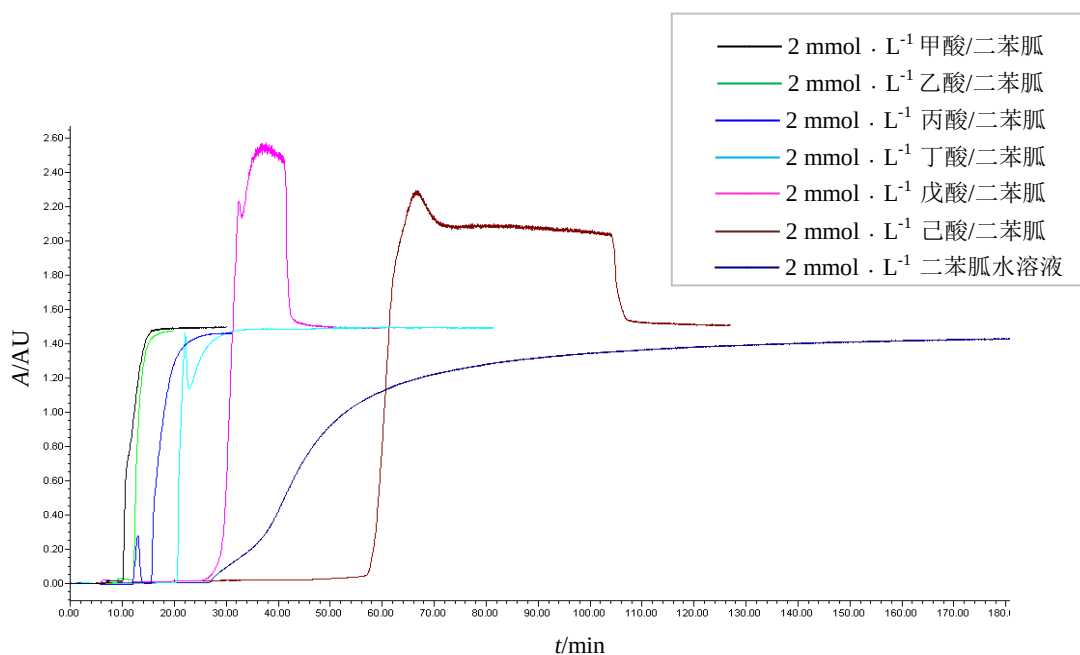


图 2-7 不同改性剂体系软固定液构建过程平衡时间曲线

Fig. 2 - 7 Equilibrium curve of the process of building "softy stationary liquid" of different modifier

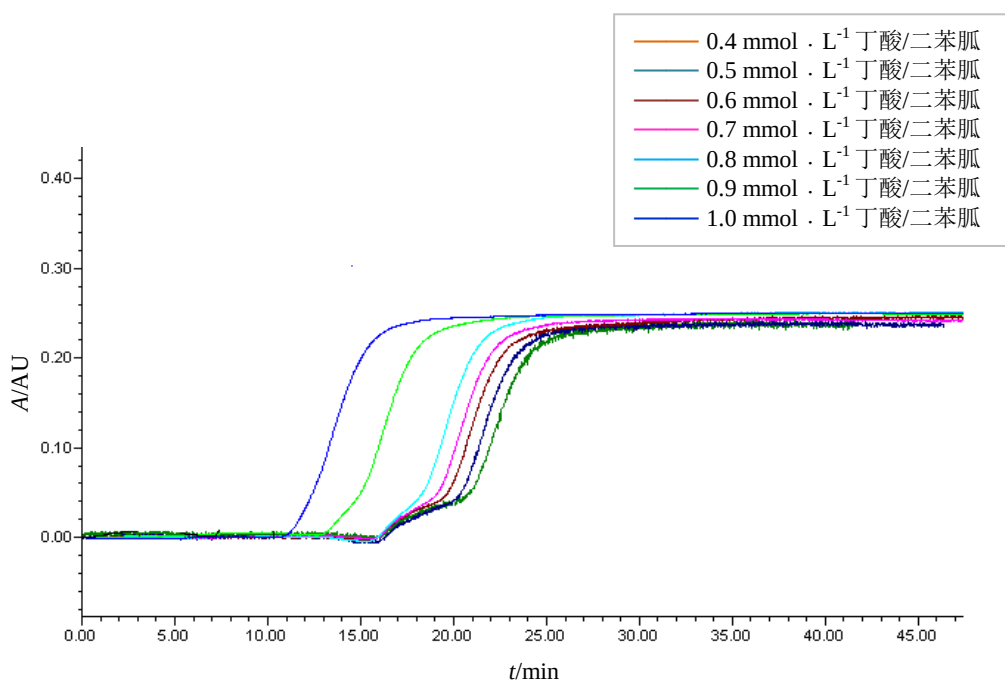


图 2 - 8 不同浓度丁酸平衡时间曲线

Fig. 2 - 8 The equilibrium curves of butyric acid of different concentration

2. 2. 5 反应机理

对于本身没有紫外吸收或只有末端吸收的阴离子型化合物的分析，可以与具有紫外吸收的离子对探针试剂作用生成具有紫外吸收的离子对化合物，以便采用常见的紫外检测器定量测定的目的，这是间接光度色谱法分析的关键，因此掌握离子对化合物的形成过程及规律是方法开发的重点。

目前选用的离子对探针试剂二苯胍和苯胍可以用于有机羧酸等化工产品、草甘膦、三乙磷酸铝等农药^[46]，阿仑膦酸钠、帕米膦酸钠等医药的分析，是一种通用型的离子对探针试剂。下面以二苯胍为例对离子对化合物的形成过程进行阐述。

体系平衡好后，固定液酰胺基上富集质子化的二苯胍、 $[H^+]$ 和酸根阴离子，当水溶解的被分析物进入体系后， $[H^+]$ 浓度瞬间增加，产生浓度梯度，其中的 $[H^+]$ 会取代酰胺基上结合的质子化二苯胍，释放出的质子化二苯胍与被分析物阴离子结合生成离子对化合物，反应过程见图 2-9(A)；或者是 $[H^+]$ 与酰胺基上结合的酸根阴离子结合，酰胺基恢复至共价态，质子化的二苯胍游离出固定相，与被分析物阴离子形成离子对化合物，同时改性剂酸以分子态游离出固定相，反应过程见图 2-9(B)。如果是酸性较强的改性剂，如乙酸、丙酸，其反应过程以 A 为主，而

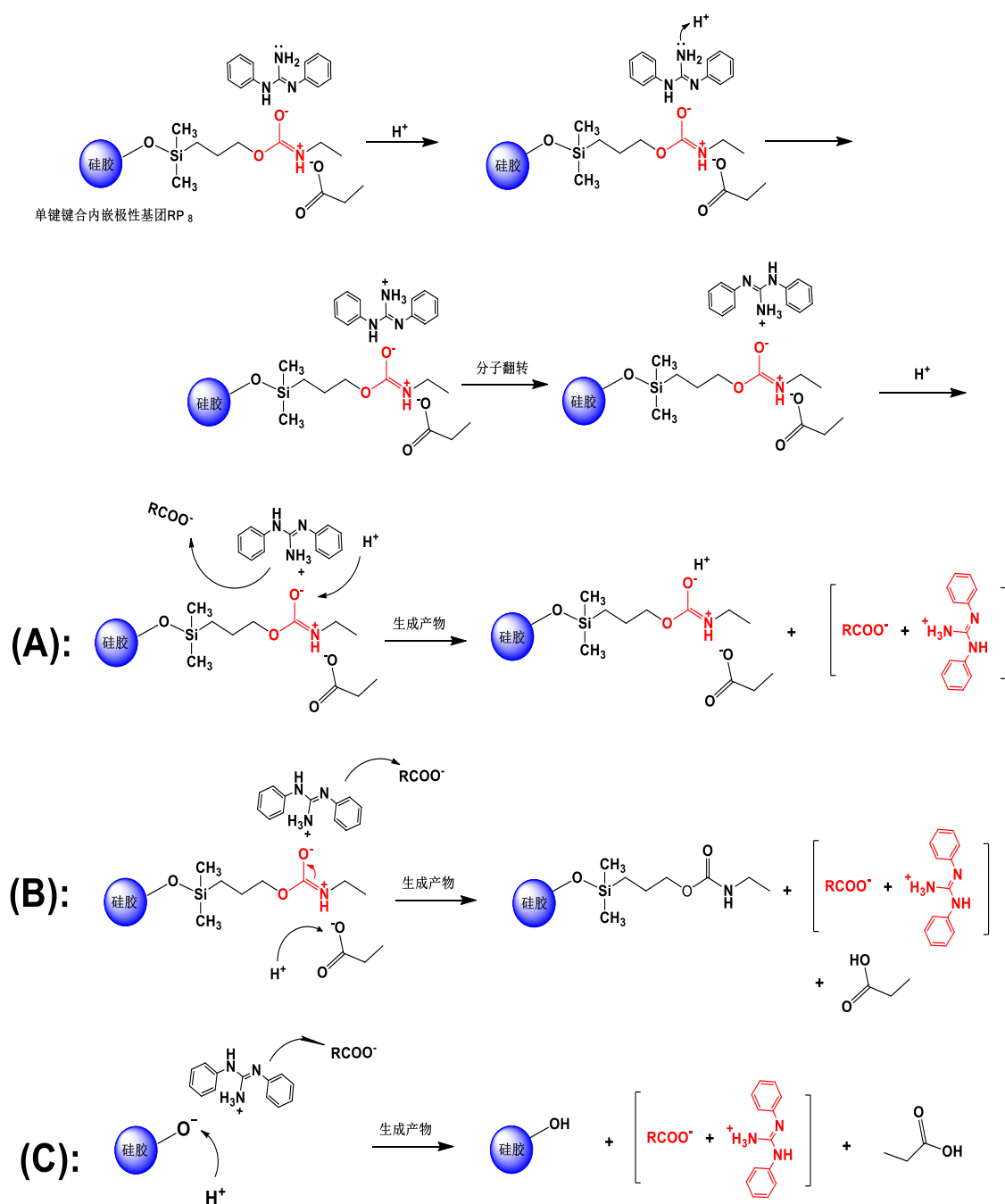


图 2 - 9 饱和羧酸类化合物与二苯胍反应机理图

Fig. 2 - 9 The reaction mechanism of saturated carboxylic acid with 1,3-diphenylguanidine

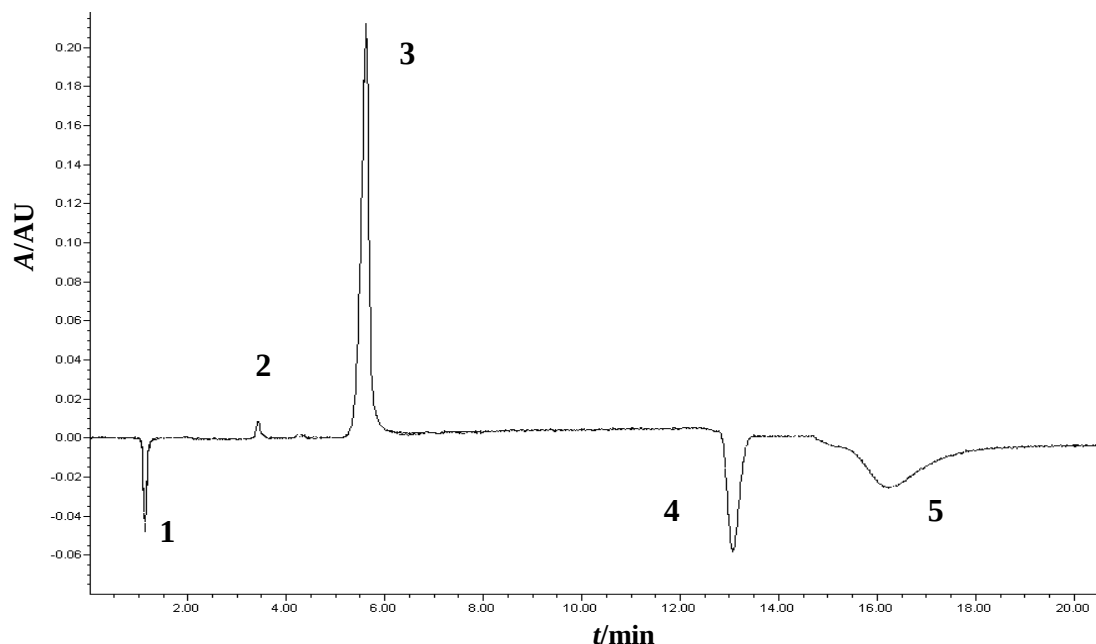
酸性较弱的改性剂如丁酸、戊酸反应是以(B)为主。这是因为以乙酸或丙酸为改性剂时，可以看到谱图上在水峰后不久有乙酸根或丙酸根与质子化的二苯胍形成的离子对化合物，且不会看到改性剂的系统峰；而以丁酸或戊酸为改性剂时，可以在谱图上看到改性剂的倒峰，由此可见乙酸、丙酸改性剂的解离度较大，不易与 $[H^+]$ 结合，因而以(A)为主反应，而丁酸、戊酸的解离度小，易于进样引入的 $[H^+]$

结合，形成分子态的有机酸，在色谱图上以倒峰流出，以(B)为主反应。(C)反应过程与(A)反应机理类似，区别在于其反应场所在封端后残存的硅羟基上。

2.2.6 分离机理

以 RP8 为代表的反相色谱柱中，色谱分离能力是由样品离子在固定相和流动相中的溶解和解析度存在差异决定，分配比是衡量色谱分离能力的重要指标。样品于固液两相间进行反复溶解—解析平衡，最终达到分离效果。

以苯胍、二苯胍为离子对试剂的间接光度色谱法中，平衡过程伴随着离子对试剂和改性剂在固定相上的富集过程，固定液酰胺基结合氢离子或质子化离子对试剂和改性剂，形成了新的固定液（“软固定液”只在特定的流动相和固定相中形成并稳定存在，可根据实验需求自行构建或消除），由于改性剂的种类和浓度存在差异，新固定液的种类和极性存在微弱差别。“软固定液”极性略微增强（苯胍对固定相极性提高贡献大于二苯胍），并引入静电力作用，提高色谱分离效果。以极性较强的苯胍、二苯胍离子对试剂水溶液作为流动相，并适当调节改性剂的种类和浓度，提高了流动相极性。由于流动相极性增量明显高于固定相，导致固液两相间的极性差提高。



1 水系统峰；2 改性剂离子对化合物特征峰；3 样品离子对化合物特征峰；
4 离子对探针试剂系统峰；5 改性剂分子系统峰

图 2-10 反相间接光度色谱法特征谱图

Fig.2 – 10 The feature peaks of RP - IPC

离子对化合物分离主要位于色谱柱柱头端之后，进样浓度的高低影响反应区间宽窄，但相对于色谱柱而言，分离区约占柱长 99 %以上。受固定相极性等因素

素影响，离子对化合物在新型色谱柱中进行更佳有效地分离，图 2-10 为反相间接光度色谱法特征谱图。

样品分离过程中：溶剂水在色谱柱中未保留，随流动相直接流出色谱柱，并稀释流动相中离子对试剂浓度，出现倒峰 1；流动相中改性剂酸解离为酸根离子，与离子对试剂形成离子对化合物，出现小正峰 2；样品阴离子与离子对试剂形成离子对化合物，于新型固定液上保留，出现正峰 3；离子对化合物形成后，大量离子对试剂补缺固定相上相应有限位点，导致流动相中离子对试剂浓度极低，显示大倒峰 4；流动相中分子态的改性剂浓度增加，出现“类水分子稀释效应”，离子对试剂浓度降低，显示小倒峰 5。

间接光度色谱谱图中，水系统峰 1 一直存在；样品离子对化合物特征峰 3 与离子对探针试剂系统峰 4 总是成对出现，被测样品离子种类决定其先后顺序，即：改性剂浓度增加，系统峰 4 保留时间缩短，其与特征峰 3 间保留时间差值增大或缩短；改性剂离子对化合物特征峰 2 与其系统峰 5 有时不同时出现，当改性剂为解离常数较大的短链酸，伴随特征峰 2 出现，反之，改性剂系统峰 5 出现。

当改性剂浓度较低时，离子对化合物极性更接近于流动相，在固定相上表现为“慢进快出”，色谱峰前伸现象严重；反之，改性剂浓度较高时，迫使离子对化合物极性倾向于固定相，在固定相上“快进慢出”，色谱峰后拖尾严重。因此，选定合适的离子对试剂和改性剂对间接光度色谱分离有重要意义。

2.3 小结

反相间接光度色谱法出现解决了无生色团的有机离子型化合物采用 LC-UV 测定的难题，扩展了紫外检测器的通用性。本试验依托发现的苯胍、二苯胍紫外离子对探针试剂，开发了针对饱和羧酸类化合物分析的间接光度色谱法，总结了样品解离度和酸度与改性剂之间的关系，明确了离子对探针试剂在不同种类和浓度改性剂存在时在色谱柱上的分配比，研究了离子对探针试剂和改性剂在色谱柱固定相上的排布方式，明确了固定相新固定液的形成过程及离子对化合物在色谱柱柱头的反应步骤，提出了“平衡、反应、分离”三大新型机理，确定了氢离子在间接光度色谱法中的作用（即：平衡过程的“催化剂”；反应机理的“诱导剂”；分离机理的“调合剂”），为其它被分析物选择离子对探针试剂和改性剂种类和浓度，建立反相间接光度色谱分析方法提供了理论基础

第三章 饱和羧酸类化合物分析方法的建立

在确定离子对探针试剂苯胍、二苯胍的基础上,通过更换色谱柱,改变离子对探针试剂浓度,改变改性剂种类和浓度等色谱工作条件,完成 $C_1\sim C_6$ 饱和一元羧酸和 $C_2\sim C_5$ 饱和二元羧酸的分析条件的优化,建立以羧基为代表的饱和羧酸类化合物的分析方法。依据分析方法的要点及总结的规律,为类似的有机阴离子化合物的反相间接光度分析方法的快速建立奠定基础。

3.1 材料与方法

3.1.1 仪器与设备

色谱柱: Waters XSELECT CSH C_{18} , $2.5\ \mu\text{m}$ ($4.6\ \text{mm}\times 75\ \text{mm}$);
Waters XTerra RP18, $5\ \mu\text{m}$ ($3.9\ \text{mm}\times 150\ \text{mm}$);
Thermo Hypersil GOLD aQ C_{18} , $5\ \mu\text{m}$ ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$);
SinoChrom ODS-BP C_{18} , $5\ \mu\text{m}$ ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$);
Venusil MP C_{18} , $5\ \mu\text{m}$ ($4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$);

余见 2.1.1。

3.1.2 试剂和溶液

乙二酸,优级纯,丁二酸、戊二酸,分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司;

丙二酸,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

苯胍 $80\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备水溶液配制 ($0.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): 称取 $0.16\ \text{g}$ (精确至 $0.0002\ \text{g}$) 苯胍于 $2\ 000\ \text{mL}$ 细口瓶中,加一级水,超声波振荡 $30\ \text{min}$,冷却过夜即为苯胍储备水溶液。

余同 2.1.2。

3.1.3 分析条件

3.1.3.1 饱和一元羧酸

流动相: 分析甲酸: $0.12\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丁酸水溶液;
分析乙酸、丙酸: $0.12\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丁酸水溶液;
分析丁酸: $0.12\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊酸水溶液;
分析戊酸: $0.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯胍/ $0.4\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 己酸水溶液;
分析己酸: $0.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液;
定量提取波长: 二苯胍 $232\ \text{nm}$; 苯胍 $247\ \text{nm}$ 。

余同 2.1.3.1。

3.1.3.2 饱和二元羧酸

流动相：分析乙二酸： $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/ $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸水溶液；
分析丙二酸、丁二酸： $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/ $2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸水溶液；
分析戊二酸： $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/ $1.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸水溶液；
余同 2.1.3.1。

3.1.4 分析条件的优化

3.1.4.1 饱和一元羧酸

3.1.4.1.1 色谱柱的选择

在 3.1.3.1 分析条件下，选用 3.1.1 色谱柱依次对甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸进行测定，选择最佳色谱柱。

3.1.4.1.2 离子对试剂种类的选择

采用 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱，分别以苯胍和二苯胍为离子对试剂对饱和一元羧酸进行测定，确定最佳离子对试剂。

3.1.4.1.3 离子对试剂浓度的选择

采用 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱，选用浓度为 $0.06\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.08\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.12\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.14\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.16\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.18\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液对甲酸、乙酸、丙酸、丁酸进行测定，选用浓度为 $0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.8\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.4\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液对戊酸和己酸进行测定，确定最佳离子对试剂浓度。

3.1.4.1.4 改性剂种类的选择

饱和一元羧酸能否成对或形成离子对的化合物的保留时间、峰形、响应值受流动相改性剂的种类和浓度影响较大。试验采用 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱，流动相为 $0.12\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液或 $0.6\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液，分别加入 $1.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丙酸、丁酸、戊酸和己酸作为改性剂对 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 一元饱和羧酸进行测定，依据其色谱峰型、保留时间及响应值，确定最佳的流动相改性剂。

3.1.4.1.5 改性剂浓度的选择

使用 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱，选定流动相为 $0.12\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液，丁酸改性剂在 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\sim 5.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，以 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度梯度递增，测定甲、乙、丙酸；戊酸改性剂在 $0.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\sim 5.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，以 $1.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度梯度递增，测定丁酸；己酸改性剂在 0.1 mmol

$\cdot \text{L}^{-1} \sim 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 以 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度梯度递增, 测定戊酸和己酸, 选择最佳改性剂浓度。

3.1.4.2 饱和二元羧酸

3.1.4.2.1 色谱柱的选择

在 3.1.3.2 分析条件下, 选用 3.1.1 色谱柱依次对乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸进行测定, 选择最佳色谱柱。

3.1.4.2.2 离子对试剂种类和浓度的选择

同 3.1.4.1.2, 对饱和二元羧酸测定, 确定最佳离子对试剂。

3.1.4.2.3 改性剂的选择

使用 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱, 固定流动相为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液, 分别选用丙酸、丁酸、戊酸、己酸作为改性剂对 $\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 二元饱和羧酸进行测定, 选择最佳改性剂。

3.1.4.2.4 改性剂浓度的选择

使用 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱, 固定流动相为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液, 加入浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊酸改性剂对乙二酸、丙二酸进行测定, 降低改性剂戊酸浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对丁二酸、戊二酸进行测定, 明确最佳改性剂浓度。

3.2 结果与讨论

3.2.1 饱和一元羧酸分析条件优化结果

反相间接光度色谱法不采用流动相作为样品溶剂, 如果这样做进样时会带入高浓度的流动相改性剂阴离子, 导致体系复杂化, 影响被测组分离子对化合物的生成。

3.2.1.1 色谱柱

为了在最短的分析时间内达到符合要求的分离结果, 寻求最适合的色谱柱对 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ 饱和一元羧酸的分析显得尤为重要, 比较 3.1.1 中色谱柱的分离图见图 3-1, 试验发现 Waters SymmetryShield RP8 色谱柱与 Waters Xbridge、Waters Xselect 色谱柱分离效果相似, 保留时间相近, 可用来验证 RP8 色谱柱柱效; Thermo Hypersil 色谱柱保留时间长达 16 min; Venusil 色谱柱出现两个倒系统峰, 与“四特征峰”谱图不符。最终选取 Waters SymmetryShield RP8, $3.5 \mu\text{m}$ ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$) 色

谱柱作为 $C_1 \sim C_6$ 饱和一元羧酸的分离色谱柱。

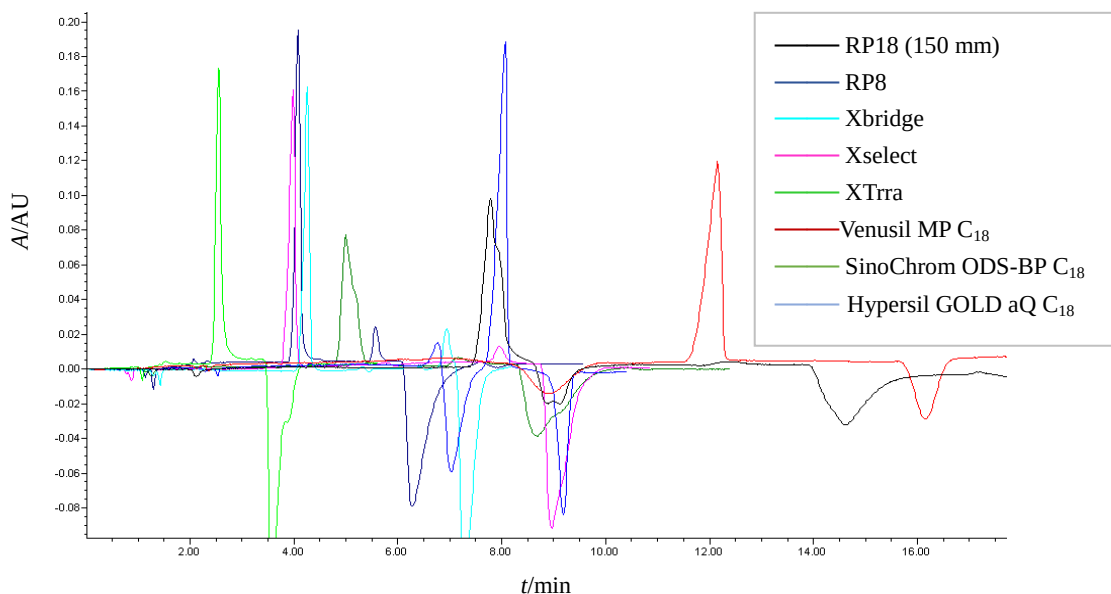


图 3 - 1 几种典型色谱柱的丙酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3 - 1 The chromatogram of propionic acid using several typical column by IPC

3. 2. 1. 2 离子对试剂种类

由图 3-2 和 3-3 可知，苯胍较二苯胍极性更强，平衡周期短，响应值高，易于形成离子对化合物，但分子量较小的羧酸（如甲、乙、丙、丁酸）与苯胍成对后，保留时间太短，而碳链较长的戊酸和己酸则易与苯胍形成离子对化合物，且保留时间比较合适；而二苯胍与 $C_1 \sim C_4$ 的饱和羧酸形成的离子对产物后保留时间较长，比较适用。由此可见苯胍适于分析极性较弱，碳链较长的化合物，而二苯胍则相反。因此，确定甲酸、乙酸、丙酸、丁酸选用二苯胍，戊酸、己酸选用苯胍为离子对探针试剂。

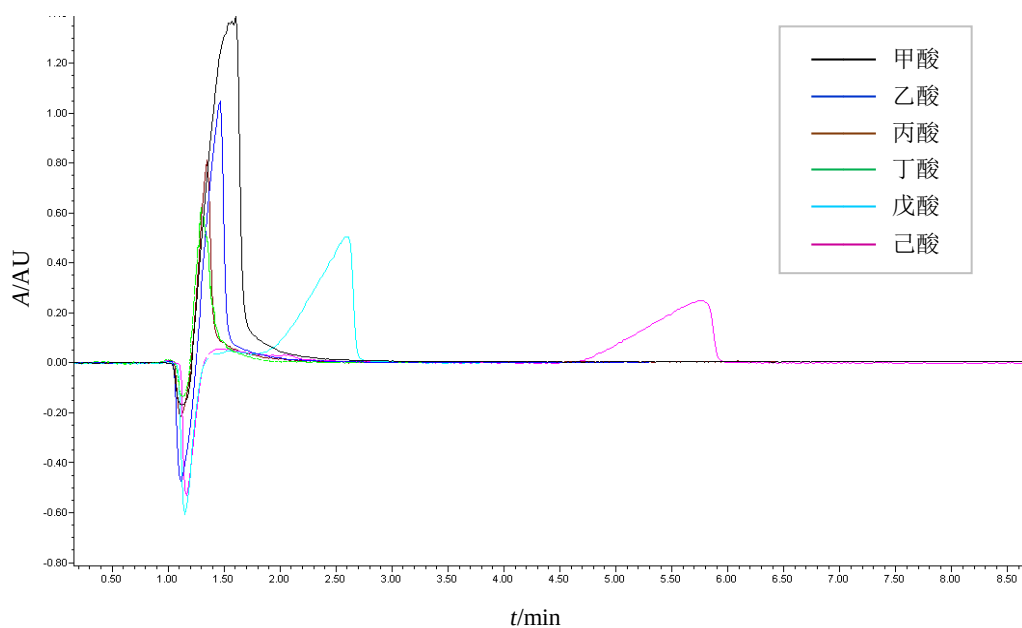


图 3 - 2 以苯胍为离子对探针试剂的饱和一元羧酸间接光度色谱分离图

Fig. 3 - 2 The chromatogram of saturated monocarboxylic acid with phenylguanidine as ion pair probe reagent by IPC

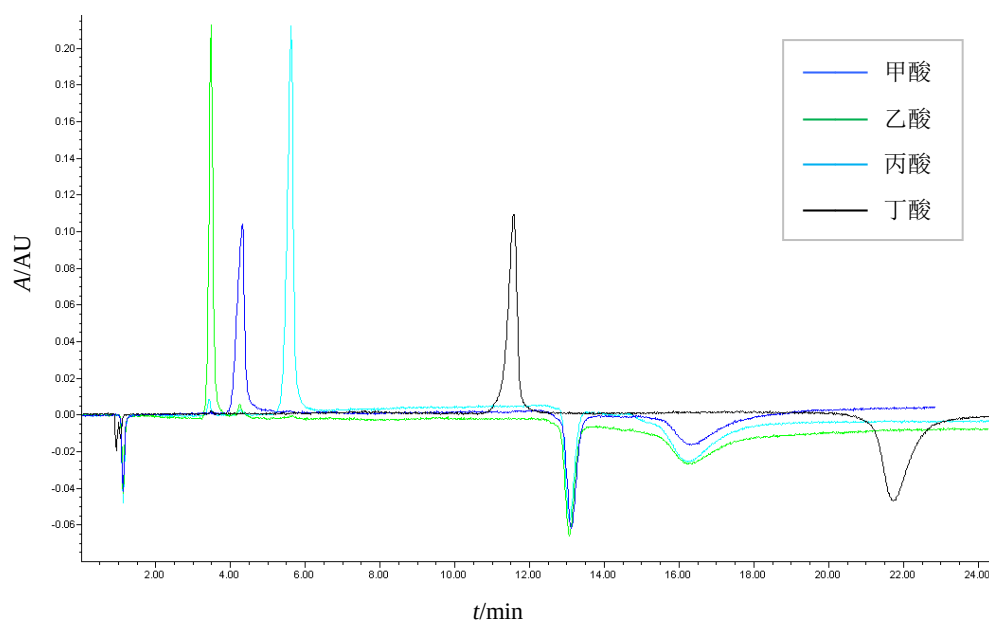


图 3 - 3 以二苯胍为离子对探针试剂甲酸、乙酸、丙酸、丁酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3 - 3 The chromatogram of formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid with diphenylguanidine as ion pair probe reagent by IPC

3.2.1.3 离子对试剂浓度

二苯胍、苯胍离子对试剂浓度变化对测定饱和一元羧酸的趋势基本一致，随着离子对试剂浓度的增加，被分析物的响应值逐渐增加；当二苯胍浓度大于 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，有机酸响应值的增加趋于平缓，且色谱图的基线噪音明显增大；而苯胍浓度大于 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，离子对化合物峰形前伸严重，杂质峰逐步前移，分离效果变差，信噪比降低；综合保留时间、响应值、分离度、信噪比、检测器量程等因素考量，选定 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍作为测定甲酸、乙酸、丙酸、丁酸， $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍测定戊酸、己酸的最佳离子对探针试剂浓度。通过对比三乙膦酸铝和草甘膦的优化得到的离子对探针试剂二苯胍的最佳浓度^[36]，发现其与饱和一元酸优化得到的结果一致，由于作为离子对探针试剂的二苯胍和苯胍添加在流动相中的浓度在紫外检测器上的响应值以空白一级水为原点时基本在量程的中间位置即 1.5 AU （如图 3-4），这一浓度可以作为固定浓度值使用，因此本节优化得到的二苯胍、苯胍的浓度同样能够适用于饱和二元酸化合物的分析，以甲酸为例优化的二苯胍离子对探针试剂浓度的间接光度色谱图见图 3-5。

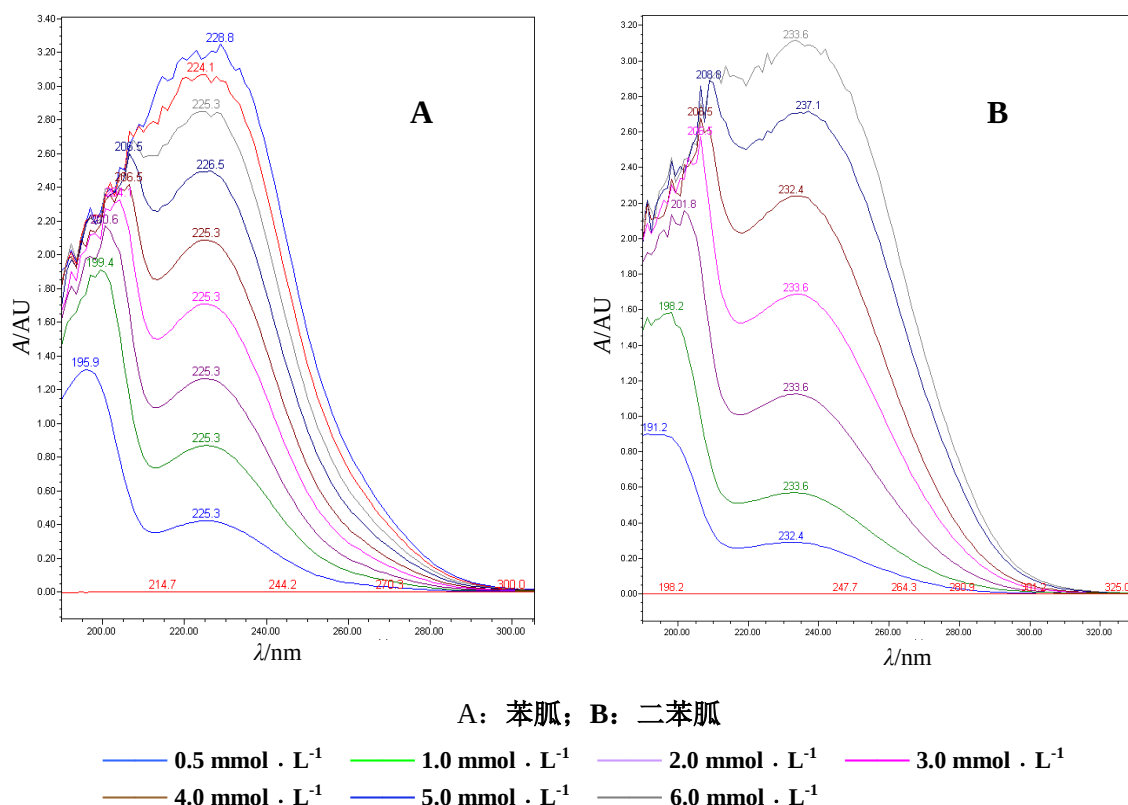


图 3-4 不同浓度离子对探针试剂的紫外吸光度图

Fig. 3 - 4 The UV spectrum of different concentration ion pair probe reagent

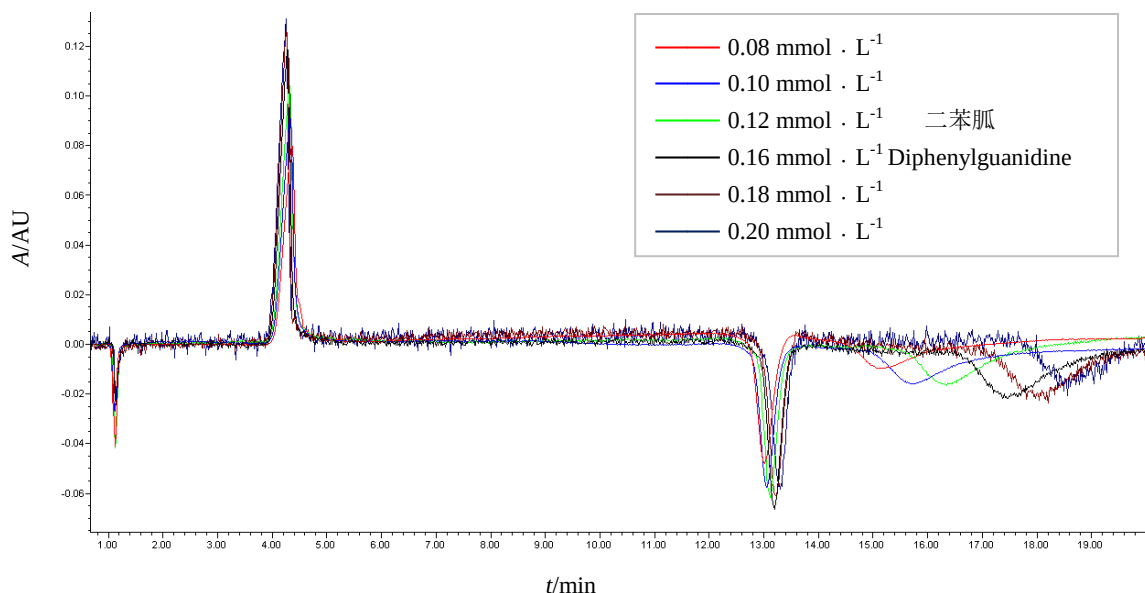


图 3-5 不同浓度离子对探针试剂的甲酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3-5 The chromatogram of different concentration ion pair probe reagent for analysis of formic acid by IPC

3.2.1.4 改性剂种类

在 3.1.4.1.4 条件下，通过对 $C_1 \sim C_6$ 饱和一元羧酸的优化发现，随着改性剂碳数的增多，离子对化合物保留时间变短，响应值增加，而系统峰的保留时间增长。当改性剂极性大于或等于被测定的有机酸时，被测组分不能与离子对试剂“缔合”形成离子对化合物，也就是改性剂一定要比被测组分至少多一个碳。通过比较，考虑到保留时间、峰形、响应值及分析方法的通用性，选择丁酸为分析甲、乙、丙酸的改性剂，戊酸为丁酸的改性剂，己酸为戊酸的改性剂，己酸由于酸性极弱，在不加改性剂时在色谱柱上的保留即可以进行定量分析，因此不需要加入改性剂只用苯胍水溶液体系即可。图 3-6 以甲酸为例说明采用丙、丁、戊酸改性剂的优化效果，图 3-7 以戊酸为改性剂体系优化甲、乙、丙、丁、戊酸得到的谱图。

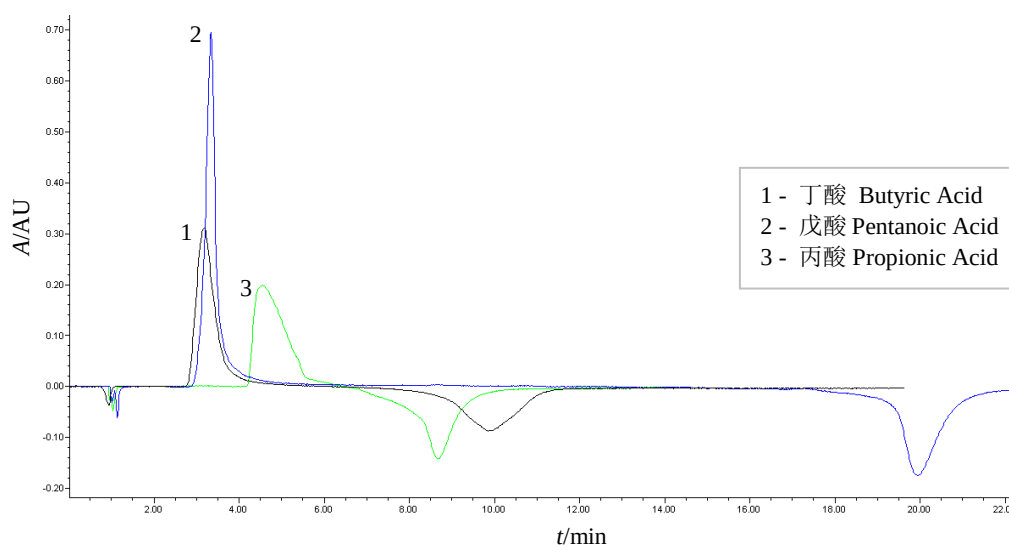


图 3 - 6 不同改性剂的甲酸间接光度色谱分离图

Fig. 3 - 6 The chromatogram of different modifier for analysis of formic acid by IPC

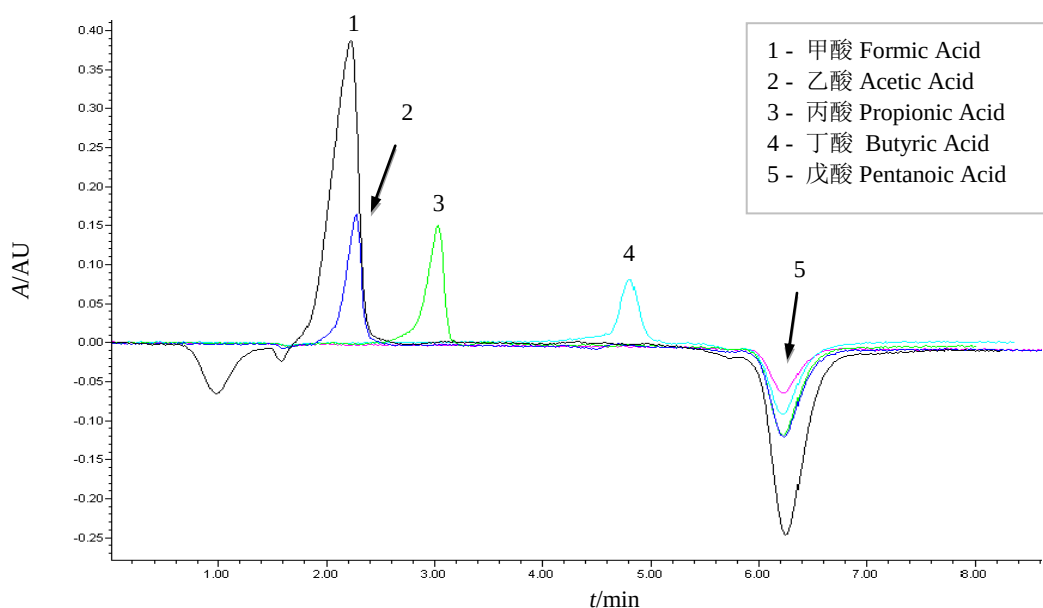


图 3 - 7 戊酸改性剂的饱和一元羧酸间接光度色谱分离图

Fig. 3 - 7 The chromatogram of pentanoic acid modifier for analysis of saturated monocarboxylic acids by IPC

3. 2. 1. 5 改性剂浓度

通过对改性剂优化可以看出，随着改性剂浓度增加，饱和一元羧酸的响应值降低。改性剂浓度较低时，色谱峰峰形前伸，随着浓度增加，色谱峰趋于对称，再增加浓度后色谱峰会拖尾。兼顾离子对化合物的保留时间，峰形，响应值，最终

确定 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸为测定甲酸的改性剂, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸为乙酸和丙酸的改性剂, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸为丁酸的改性剂, $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 己酸为戊酸的改性剂, 甲酸和戊酸的优化结果见图 3-8、3-9。

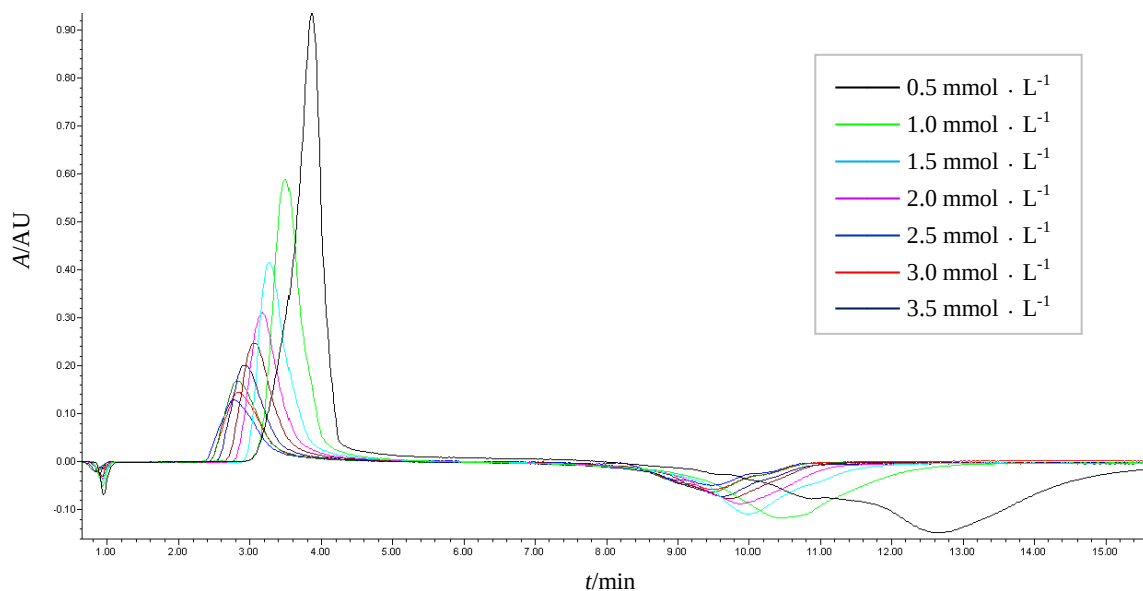


图 3 - 8 不同浓度丁酸改性剂的甲酸离子对化合物色谱分离图

Fig. 3 - 8 The chromatogram of different concentration modifier butyric acid for analysis of formic acid by IPC

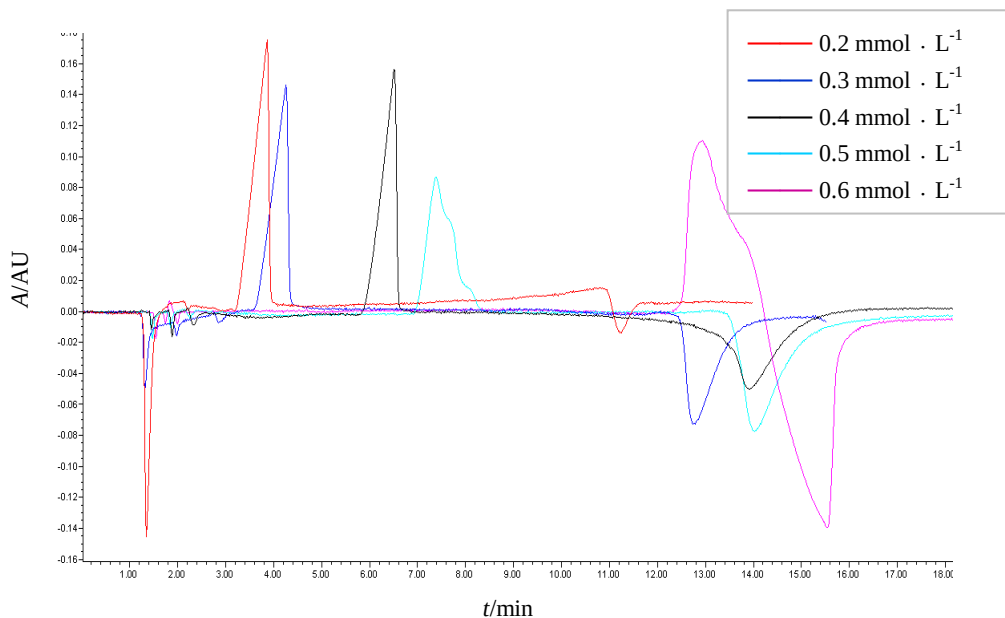


图 3 - 9 不同浓度己酸改性剂的戊酸间接光度色谱分离图

Fig. 3 - 9 The chromatogram of different concentration modifier hexanoic acid for analysis of pentanoic acid by IPC

3.2.2 饱和二元羧酸分析条件优化结果

3.2.2.1 色谱柱选择

3.2.2.1 节饱和一元羧酸采用 Waters SymmetryShield RP8, 3.5 μm (4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱作为反相间接光度色谱法的分析柱也适用于戊二酸和丁二酸的测定；但在采用 PR8 色谱柱在分离乙二酸和丙二酸时，由于二者二级电离都太强，乙二酸二级解离形成的离子对化合物的色谱峰与倒峰接近，而丙二酸形成两个色谱峰，都不适于定量分析，试验发现乙二酸和丙二酸采用 Waters SymmetryShield RP18, 3.5 μm (4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱分离时能够满足要求。

3.2.2.2 离子对试剂种类选择

试验在选择苯胍、二苯胍作为离子对探针试剂时，发现二者均能够与饱和二元羧酸形成离子对化合物，但二苯胍体系形成的离子对化合物峰响应值较低，系统峰的保留时间较长，因此试验优先选择苯胍作为分析饱和二元羧酸的离子对探针试剂，浓度也选用 0.6 mmol $\cdot$ L⁻¹。

未加改性剂条件下，苯胍、二苯胍离子对探针试剂与样品一、二级电离离子均成对，形成两个色谱峰；由于两个色谱峰几乎不保留，难于分离，定量准确度差，可通过改性剂调节，使二元羧酸溶液基本以分子态或一级电离状态存在，满足定量的要求。二苯胍与乙二酸、丙二酸难于优化出适于分析的色谱峰，最终选定低浓度戊酸改性剂调控苯胍溶液对饱和二元羧酸进行分析，见图 3-10。确定二元饱和羧酸均采用苯胍作为离子对探针试剂。

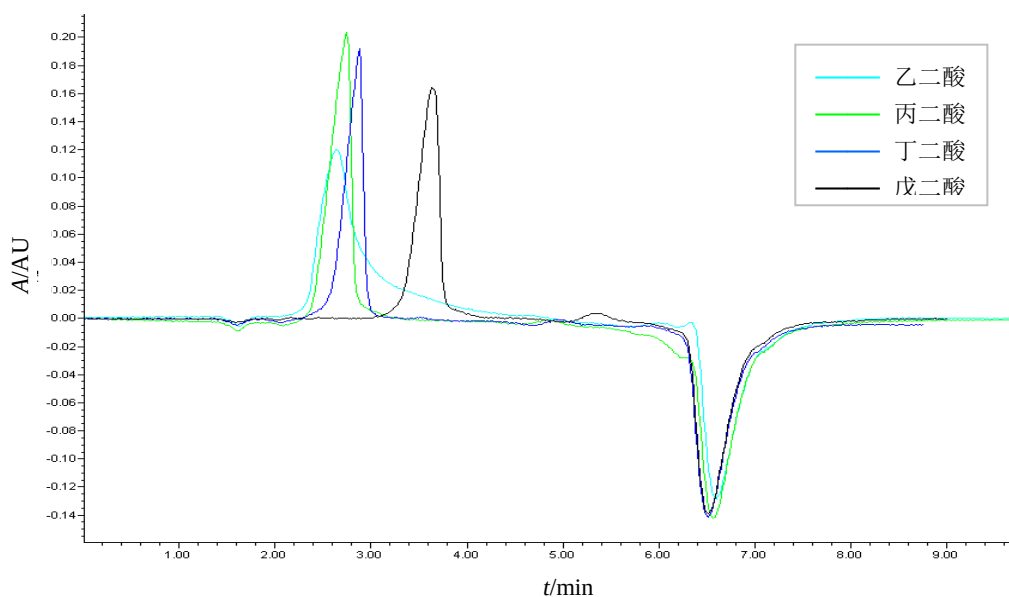


图 3-10 基于苯胍的饱和二元羧酸间接光度色谱分离图

Fig. 3 - 10 The chromatogram of saturated dicarboxylic acid with phenylguanidine

as ion pair probe reagent by IPC

3.2.2.3 改性剂种类

结合 3.2.1.4 分析结果，由于甲酸和乙酸酸性都较强，初步选定丙酸、丁酸、戊酸作为改性剂对 $C_2 \sim C_5$ 饱和二元羧酸进行分析研究。试验发现，丙酸、丁酸由于酸性也较强，导致苯胍和饱和二元羧酸不能成对，只有戊酸为改性剂时，离子对化合物的响应值较高，且峰形尖锐，符合正态分布要求，选定其为最佳改性剂。丁二酸、戊二酸的流动相改性剂优化色谱图见图 3-11 和图 3-12。

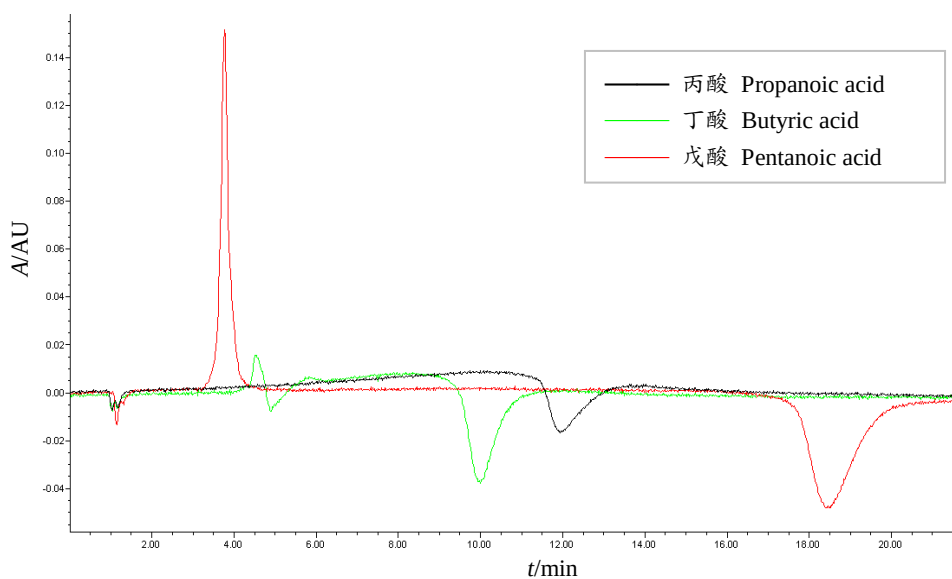


图 3-11 不同种类改性剂的丁二酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3 - 11 The chromatogram of different modifier for succinic acid by IPC

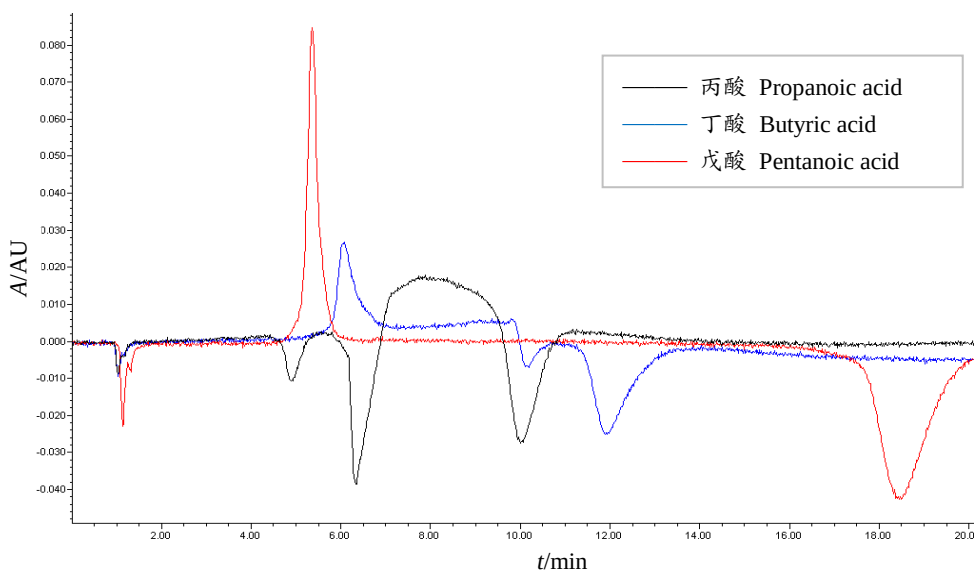


图 3-12 不同种类改性剂的戊二酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3-12 The chromatogram of different modifier for glutaric acid by IPC

3.2.2.4 改性剂浓度

饱和二元羧酸是较饱和一元羧酸更为复杂的样品，存在两级解离。如乙二酸样品溶液在进样之前是一级解离为主，进入流动相体系后由于环境 pH 变化且样品存在一定程度的稀释，乙二酸的一级解离减少，二级解离增加，当改性剂浓度较低时，会导致色谱图上出现二级解离的色谱峰，影响定量分析。因此试验通过增加戊酸改性剂的浓度至 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使得乙二酸主要以一级解离为主，见图 2-2 和图 2-3，保证试验测定结果的准确性。相应的由于丙二酸和丁二酸、戊二酸的一级和二级解离各不相同，需要各自有针对性的优化。图 3-13 ~ 3-16 分别为乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸的戊酸改性剂优化结果谱图。戊酸浓度在 $2 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，pH 值变化约为 $3.43 \sim 3.79$ ，苯胍与乙二酸、丙二酸所形成离子对化合物的响应值响应值呈平稳态势，增幅几乎为零，但峰型效果明显改善；丁二酸、戊二酸均选定在 $0.5 \sim 4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸浓度区间内优化，戊酸浓度递增，其离子对化合物的响应值、峰面积减小，但保留时间延长；随着改性剂浓度增加，达戊二酸测定环境的阈值时，基线出现明显的扰动现象。通过对比谱图分析，最终选定 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸分析乙二酸、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸分析丙二酸和丁二酸、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸分析戊二酸为最佳浓度。

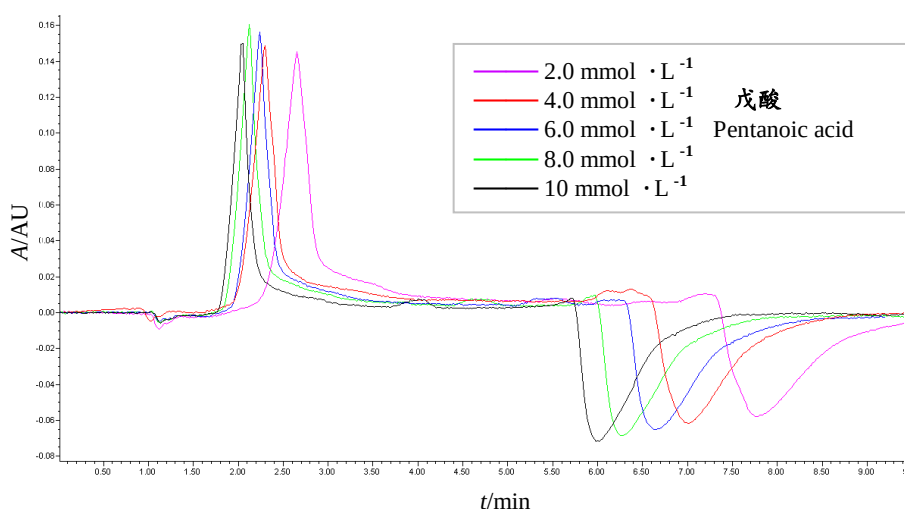


图 3-13 不同浓度改性剂的乙二酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3-13 The chromatogram of different concentration modifier for oxalic acid by IPC

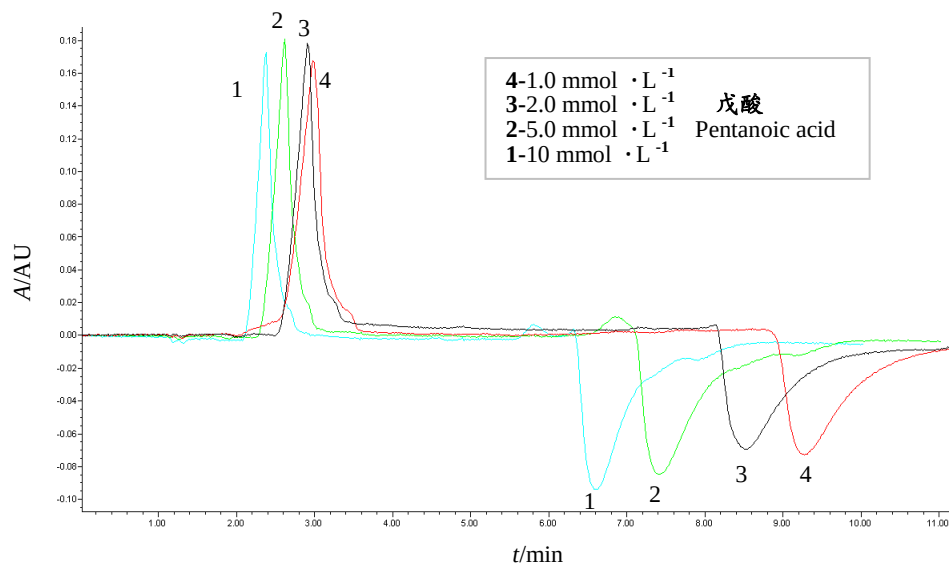


图 3-14 不同浓度改性剂的丙二酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3 - 14 The chromatogram of different concentration modifier for malonic acid by IPC

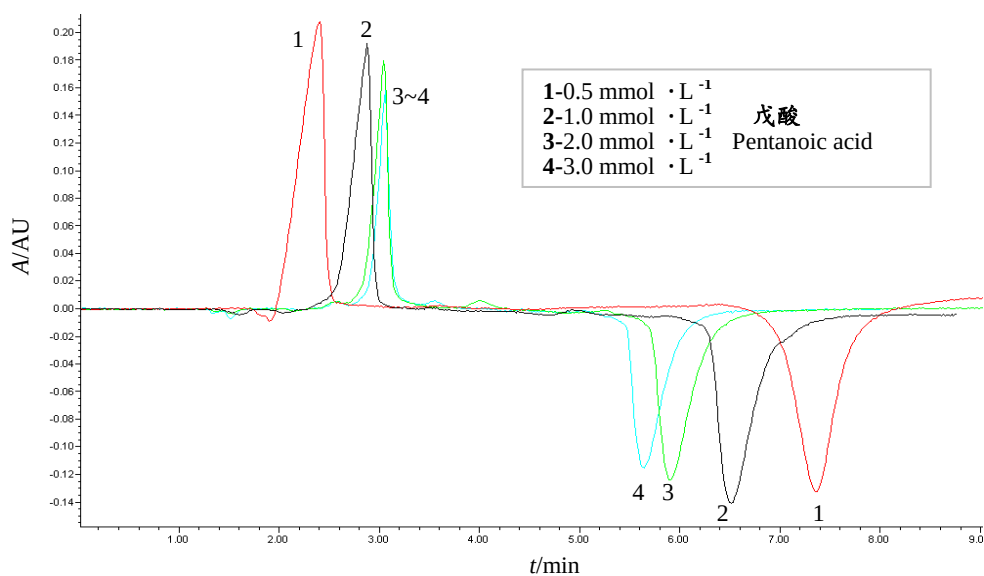


图 3-15 不同浓度改性剂的丁二酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3 - 15 The chromatogram of different concentration modifier for succinic acid by IPC

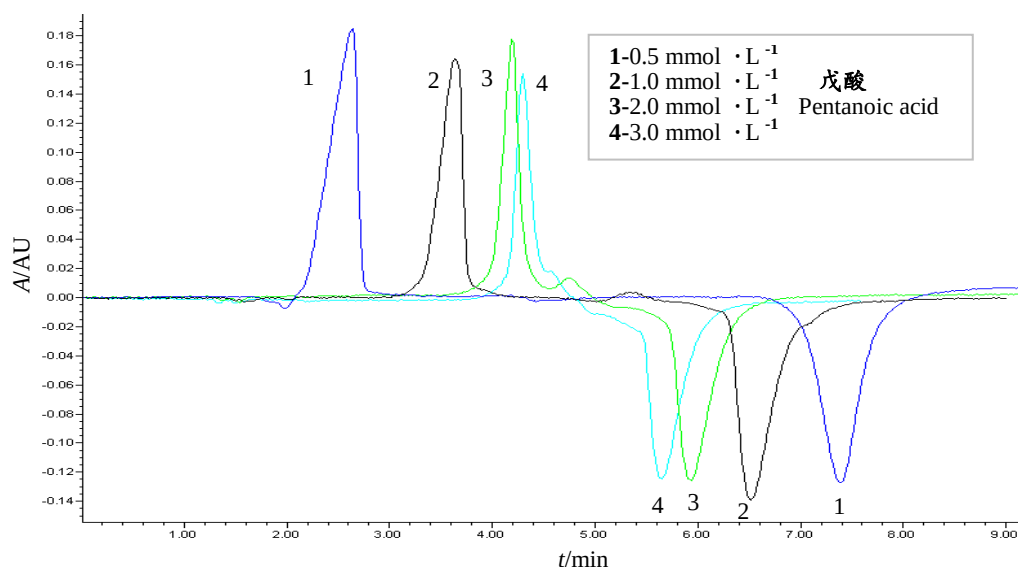


图 3-16 不同浓度改性剂的戊二酸间接光度色谱法分离图

Fig. 3-16 The chromatogram of different concentration modifier for glutaric acid by IPC

3.3 小结

本章通过对色谱柱、离子对试剂种类和浓度、改性剂种类和浓度优化分析，建立了饱和一元、二元羧酸类化合物的反相间接光度色谱分析方法，明确了其最佳分析条件。苯胍和二苯胍离子对探针试剂的最佳浓度是响应值位于最大吸光度量程（一般3.0AU）的中间位置，在这个吸光值附近其信噪比是最大的，因此苯胍的浓度为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，二苯胍的浓度为 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。改性剂的种类决定能够形成离子对化合物及保留时间长短，改性剂浓度则决定其响应值和峰形。本方法以苯胍、二苯胍水溶液，丁酸、戊酸、己酸为改性剂的流动相，成本低廉、安全环保，对HPLC-DAD设备要求低，分析准确、高效、快速，不仅实现了对无紫外吸收或末端紫外吸收的饱和羧酸类化合物采用紫外检测器来进行分析测试的目标，同时对各类无紫外吸收的有机阴离子型化合物的分析也具有重要的借鉴和指导意义。

第四章 间接光度色谱法测定 $C_1 \sim C_6$ 饱和一元羧酸

针对目前饱和一元羧酸分析方法中存在的弊端，如酸碱滴定法不能实现分级滴定^[6-9]、前处理过程复杂^[17, 63]、分离能力差^[64-65]、柱前衍生伴随杂质干扰^[66-69]、非常规测定方法的不成熟^[20, 70]，为了更好地保证有机酸产品质量，并切实结合饱和一元羧酸的强酸性、 pK_a 值相近、紫外末端吸收的特点，需要建立简单、快速、准确的饱和一元羧酸新的检测方法，用以科学评价饱和一元羧酸产品质量。本章拟采用苯胍、二苯胍作为离子对探针试剂，添加相应的改性剂，建立甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸的反相间接光度色谱分析方法。

4.1 材料与方法

4.1.1 仪器及设备

见 3.1.1。

4.1.2 试剂与样品

氢氧化钠 GR，上海埃彼化学试剂有限公司；邻苯二甲酸氢钾，工作基准，99.95%，济南市化工研究所；甲酸、乙酸 1#、乙酸 2#、乙酸 3#、丙酸均从化学试剂商店购买；余见 2.1.2。

4.1.3 分析条件

流动相： $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/ $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊酸水溶液；
余见 3.1.3.1。

4.1.4 溶液的配制

见 2.1.2。

4.1.4.1 流动相的配制

取 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍水溶液于 2 L 细口瓶中，加入 2 mmol 丁酸量，摇匀，即为分析甲酸的流动相；同样，分析乙酸和丙酸的流动相即加入约 1 mmol 丁酸量，分析丁酸则加入约 2 mmol 戊酸量。

取 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液于 2 L 细口瓶中，加入约 0.8 mmol 己酸量，摇匀，作为分析戊酸的流动相。

4.1.4.2 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸标准储备溶液的配制

将适量水注入 100 mL 容量瓶中，称量后去皮归零，分别称取甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸约 0.2 g（精确至 0.000 1 g）置于各自相应的容量瓶中，

摇匀，水定容至刻度线。

4.1.4.3 样品溶液的配制

于 6 个 100 mL 容量瓶中加少量水，称量后去皮归零，分别称取甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸样品约 0.1 g 于各自相应的容量瓶中，水定容至刻度线、摇匀，甲酸稀释 10 倍进样，其它酸均稀释 5 倍进样。

4.1.4.4 标准加入法混合样品配制

取 4.1.4.2 标准储备溶液按表 4-1 配制混合样品溶液，用于标准加入法回收率的验证。

表 4-1 用于标准加入法的混合样品溶液配制方法

Tab. 4 - 1 Method for preparation of sample solution for standard addition method

溶液名称 Solution name	甲酸 Formic acid / mg · L ⁻¹	乙酸 Acetic acid / mg · L ⁻¹	丙酸 Propionic acid / mg · L ⁻¹	丁酸 Butyric acid / mg · L ⁻¹
混合溶液 1#	10	10	150	200
混合溶液 2#	20	150	100	100
混合溶液 3#	50	100	200	150
混合溶液 4#	100	200	200	100
混合溶液 5#	150	200	200	200

4.1.5 方法学数据

4.1.5.1 检出限的测定

分别将 4.1.4.2 所配制的 C₁~C₆ 饱和一元羧酸标准溶液逐级稀释成 10 mg · L⁻¹、5 mg · L⁻¹、2 mg · L⁻¹、1 mg · L⁻¹ 标准工作溶液，在 4.1.3 条件下进样分析，以 S/N=3 计，确定其检出限(LOD)。

4.1.5.2 标准曲线的绘制

将 4.1.4.2 所配制的标准溶液稀释成不同浓度水平。甲酸：10 mg · L⁻¹、20 mg · L⁻¹、40 mg · L⁻¹、60 mg · L⁻¹、80 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、150 mg · L⁻¹、200 mg · L⁻¹、250 mg · L⁻¹、300 mg · L⁻¹、400 mg · L⁻¹；其他酸：20 mg · L⁻¹、50 mg · L⁻¹、100 mg · L⁻¹、200 mg · L⁻¹、300 mg · L⁻¹、400 mg · L⁻¹、500 mg · L⁻¹、600 mg · L⁻¹、800 mg · L⁻¹、1000 mg · L⁻¹、1200 mg · L⁻¹。在 4.1.3 条件下进样分析，以进样量 *m* 对峰面积 *A* 建立 C₁~C₆ 饱和一元羧酸常量分析的标准曲线。

4.1.5.3 准确度

采用倍量法, 分别添加标样于其对应被测样品中。甲酸添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个质量浓度水平; 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸添加 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个质量浓度水平, 甲酸~戊酸高浓度的均稀释 10 倍进样; 己酸添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个质量浓度水平。每个添加水平 5 次重复, 计算其添加回收率。

4.1.5.4 精密度

分别称取 8 份甲酸样品约 0.1 g (精确至 0.0001 g), 乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸样品各约 0.2 g (精确至 0.0001 g) 于各自的 100 mL 容量瓶, 一级水定容, 均稀释 10 倍进样, 计算其相对标准偏差 RSD 值。

4.1.5.5 饱和一元羧酸含量的测定

在 4.1.3 条件下进样分析, 将 4.1.4.3 所配制的样品溶液依次进样分析, 外标法定量, 并与国家标准规定的容量法定量结果对比分析^[6~11]。

4.1.6 混合样品标准加入法

配制背景为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁酸的 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸系列标准工作溶液。

配制背景为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丙酸, 与丙酸浓度相同的丁酸系列标准溶液。

在 4.1.3 条件下测定 4.1.4.4 中配制的 5 个混合样品溶液中丙酸、丁酸的回收率, 并计算其 RSD 值。

4.2 结果与讨论

4.2.1 方法学数据

4.2.1.1 检出限

以 $S/N=3$ 计, 测得甲酸和乙酸的 LOD 为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 丙酸和丁酸的 LOD 为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 戊酸 LOD 为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 己酸 LOD 为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4.2.1.2 标准曲线

以进样质量 m 与对应的峰面积 A 绘制饱和一元羧酸常量分析标准曲线 (图 4-1)。试验测定甲酸在 $10 \sim 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 其线性回归方程 $Y = 94401 + 4455.4 X$, $r = 0.9992$; 在 $20 \sim 1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 乙酸的线性回归方程 $Y = 948802 + 1547.5 X$, $r = 0.9981$; 丙酸的线性回归方程 $Y = 596443 + 1162.3$

X , $r = 0.9981$; 丁酸的线性回归方程 $Y = 19729 + 1027.4X$, $r = 0.9998$; 在 $10 \sim 800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 戊酸的线性回归方程 $Y = 23100 + 711.39X$, $r = 0.9997$; 在 $20 \sim 1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 己酸的线性回归方程 $Y = -93026 + 930.71X$, $r = 0.9996$; 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸的线性相关性均良好, r 都大于 0.998。C₁~C₆ 饱和一元羧酸典型反相间接光度色谱分离图 (图 4-2 ~ 4-7)。

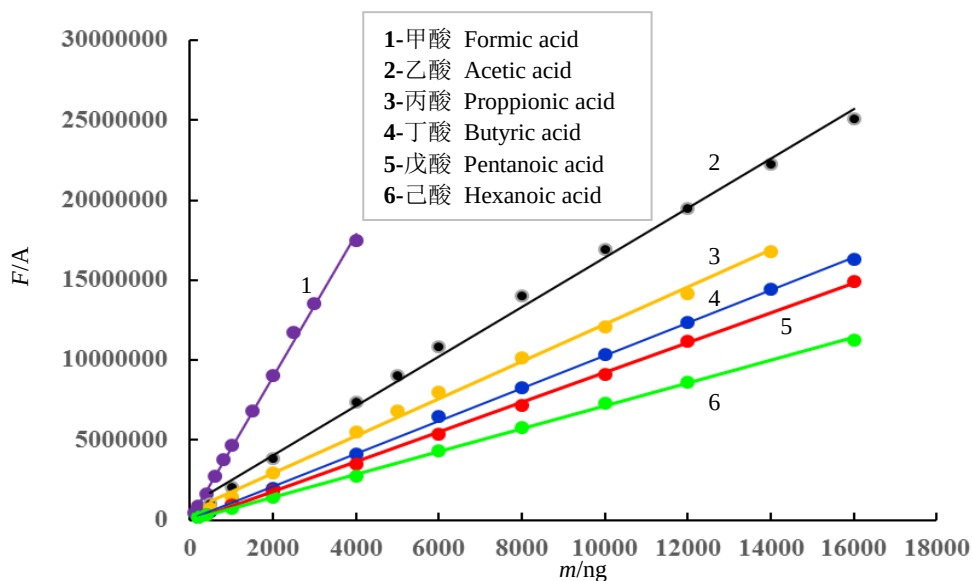


图 4 - 1 饱和一元羧酸的标准曲线

Fig. 4 - 1 The standard curves of saturated monocarboxylic acid

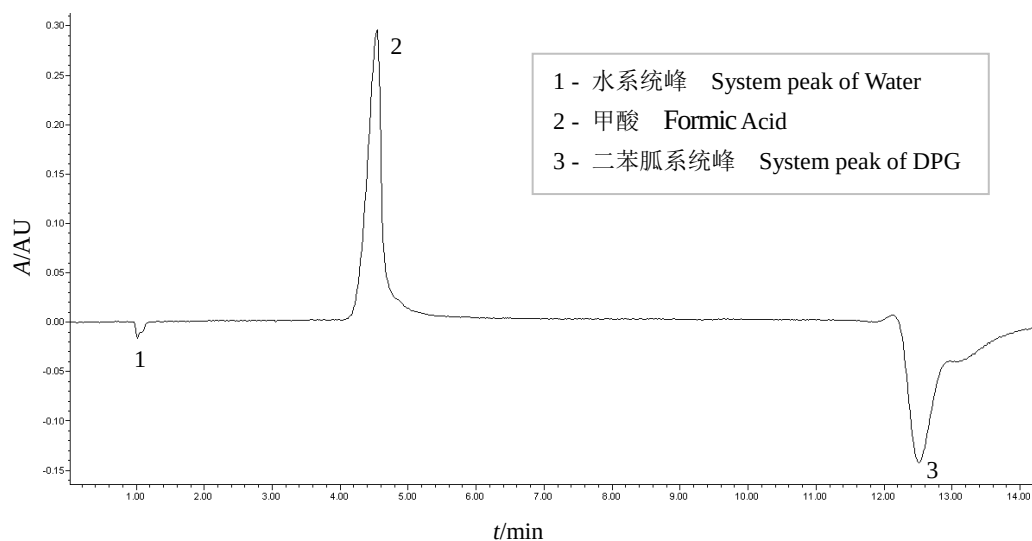


图 4 - 2 甲酸反相间接光度色谱分离图

Fig.4 - 2 The chromatogram of formic acid by IPC

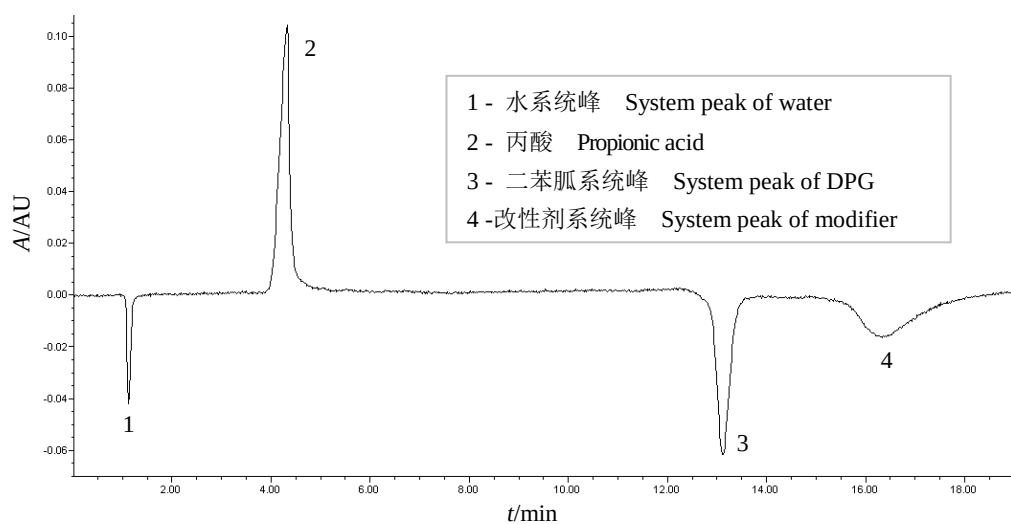


图 4 - 3 乙酸反相间接光度色谱分离图

Fig.4 - 3 The chromatogram of acetic acid by IPC

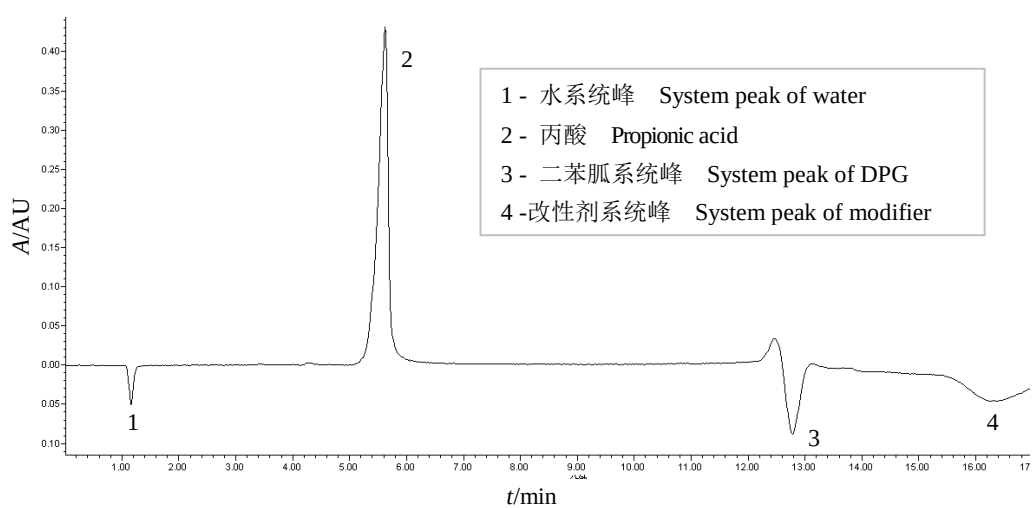


图 4 - 4 丙酸反相间接光度色谱分离图

Fig.4 - 4 The chromatogram of propionic acid by IPC

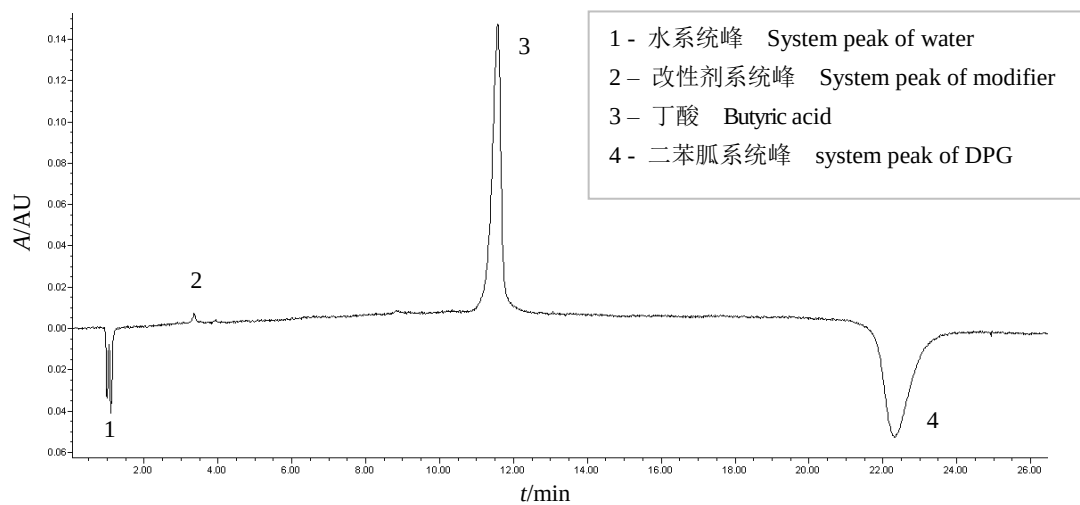


图 4 - 5 丁酸反相间接光度色谱分离图
Fig.4 - 5 The chromatogram of butyric acid by IPC

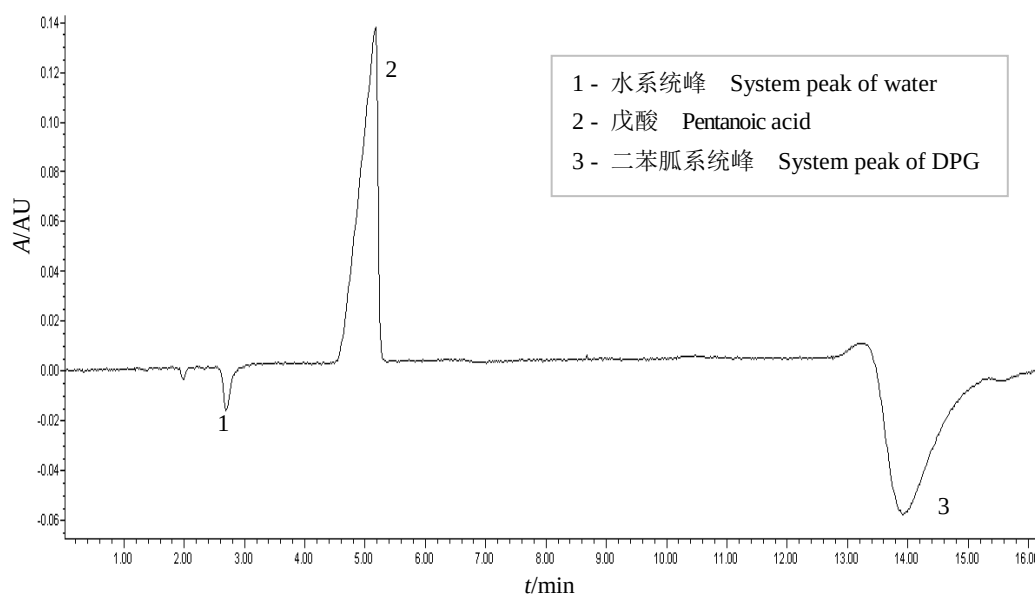


图 4 - 6 戊酸反相间接光度色谱分离图
Fig.4 - 6 The chromatogram of pentanoic acid by IPC

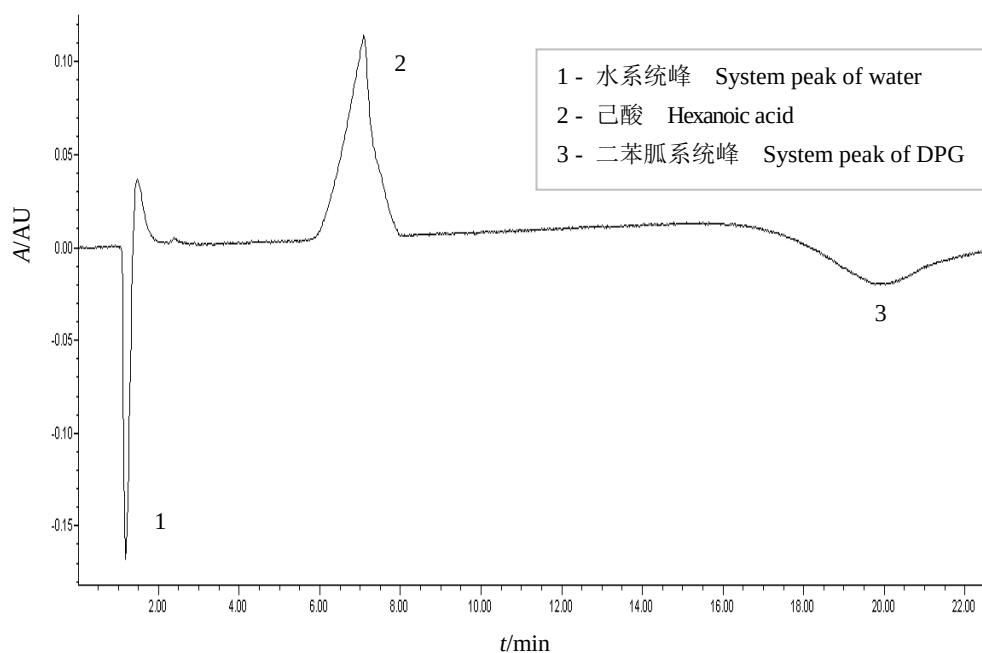


图 4 - 7 己酸反相间接光度色谱分离图

Fig.4 - 7 The chromatogram of hexanoic acid by IPC

4. 2. 1. 3 准确度

测得 $C_1 \sim C_6$ 饱和一元羧酸 2 个水平的添加回收试验结果详见表 4-2。

4. 2. 1. 4 精密度

按照方法学要求，8 组平行样测得 $C_1 \sim C_6$ 饱和一元羧酸的精密度见表 4-3，计算得甲酸 RSD 为 1.40 %、乙酸为 0.43 %、丙酸为 0.46 %、丁酸为 0.43 %、戊酸为 0.64%、己酸为 0.69 %。精密度满足常量分析的要求。

表 4 - 2 饱和一元羧酸添加回收试验结果

Tab. 4 - 2 Recovery of saturated monocarboxylic acid

样品 Samples	低水平添加 Low Adding Levels					高水平添加 High Adding Levels				
	添加量 Fortifica- tion/g	测定值 Measured value/g	回收率 Recov- ery/%	平均回收率 Average/%	RSD /%	添加量 Fortifica- tion/g	测定值 Measured value/g	回收率 Recov- ery/%	平均回收率 Average/%	RSD/ %
甲酸	0.0106	0.0104	98.22	99.84	1.11	0.0998	0.0999	100.12	100.11	0.45
	0.0103	0.0104	100.53			0.1000	0.1002	100.19		
	0.0105	0.0106	101.04			0.0998	0.1007	100.89		
	0.0106	0.0105	99.31			0.1013	0.1010	99.74		
	0.0103	0.0103	100.09			0.1016	0.1012	99.60		
乙酸	0.0197	0.0198	100.39	99.87	0.65	0.2020	0.2037	100.86	100.28	0.62
	0.0204	0.0203	99.72			0.2000	0.1987	99.36		
	0.0203	0.0202	99.44			0.1995	0.2011	100.82		
	0.0205	0.0203	99.13			0.1935	0.1935	100.02		
	0.0203	0.0204	100.69			0.1999	0.2006	100.35		
丙酸	0.0199	0.0197	99.22	100.65	1.55	0.2000	0.2029	101.44	99.73	1.16
	0.0208	0.2013	102.25			0.2006	0.1984	98.90		
	0.0199	0.0197	98.91			0.2001	0.1970	98.47		
	0.0202	0.0206	102.10			0.2000	0.2002	100.11		
	0.0205	0.0207	100.77			0.2004	0.1998	99.72		

表 4 - 2 (续)
Tab. 4 - 2 (Continue)

样品 Samples	低水平添加 Low Adding Levels					高水平添加 High Adding Levels				
	添加量	测定值	回收率	平均回收率	<i>RSD</i>	添加量	测定值	回收率	平均回收率	<i>RSD</i> /
	Fortifica- tion/g	Measured value/g	Recov- ery/%	Average/%	/%	Fortifica- tion/g	Measured value/g	Recov- ery/%	Average/%	%
丁酸	0.0199	0.0201	100.69	99.99	0.50	0.1930	0.1914	99.17	98.08	1.05
	0.0200	0.0200	100.10			0.1964	0.1932	98.37		
	0.0202	0.0202	100.00			0.2046	0.2015	98.51		
	0.0199	0.0199	99.84			0.2035	0.1993	97.92		
	0.0199	0.0198	99.31			0.2075	0.2001	96.41		
戊酸	0.0201	0.0243	105.78	102.13	3.60	0.2000	0.2074	103.93.	100.21	2.06
	0.0200	0.0207	98.04			0.2000	0.2058	100.85		
	0.0201	0.024	103.17			0.2000	0.2131	99.16		
	0.0201	0.0204	106.08			0.2000	0.2041	98.09		
	0.0201	0.0259	97.56			0.2000	0.2057	99.01		
己酸	0.0050	0.00506	100.14	99.14	2.26	0.0502	0.0514	100.78	102.26	1.92
	0.0050	0.00514	97.57			0.0502	0.0505	103.88		
	0.0050	0.00557	96.03			0.0502	0.0545	99.76		
	0.0050	0.00505	100.66			0.0502	0.0549	102.5		
	0.0050	0.00565	101.31			0.0502	0.0539	104.35		

表 4 - 3 饱和一元羧酸精密度测定结果

Tab. 4 - 3 Precision data of saturated monocarboxylic acid

样品 Samples	序号 No.	称样量 sampling weight/g	测定值 Measured value/%	平均值 Average/%	S_x	$RSD/\%$
甲酸	1 [#]	0.1000	97.48	98.44	1.37	1.40
	2 [#]	0.1025	97.93			
	3 [#]	0.1003	100.41			
	4 [#]	0.1004	98.27			
	5 [#]	0.1010	98.24			
	6 [#]	0.1007	100.39			
	7 [#]	0.1010	98.45			
	8 [#]	0.1018	96.37			
乙酸	1 [#]	0.1938	98.53	98.16	0.42	0.43
	2 [#]	0.1977	98.22			
	3 [#]	0.1967	98.00			
	4 [#]	0.1973	97.82			
	5 [#]	0.1949	98.92			
	6 [#]	0.1965	98.33			
	7 [#]	0.1949	97.75			
	8 [#]	0.1946	97.74			
丙酸	1 [#]	0.2003	96.82	96.97	0.44	0.46
	2 [#]	0.1999	96.40			
	3 [#]	0.2002	97.36			
	4 [#]	0.1999	96.54			
	5 [#]	0.2002	97.68			
	6 [#]	0.2001	97.26			
	7 [#]	0.2003	96.65			
	8 [#]	0.2000	97.05			
丁酸	1 [#]	0.1938	99.99	99.38	0.72	0.72
	2 [#]	0.1977	98.77			
	3 [#]	0.1967	99.98			
	4 [#]	0.1972	98.54			
	5 [#]	0.1949	99.20			
	6 [#]	0.1965	100.55			
	7 [#]	0.1949	99.31			
	8 [#]	0.1946	98.73			

表 4 - 3 （续）

Tab. 4 - 3 (Continue)

样品 Samples	序号 No.	称样量 sampling weight/g	测定值 Measured value/%	平均值 Average/%	S_x	$RSD/\%$
戊酸	1 [#]	0.2051	99.82	99.91	0.64	0.64
	2 [#]	0.2043	100.24			
	3 [#]	0.2021	99.73			
	4 [#]	0.2037	101.10			
	5 [#]	0.2059	98.95			
	6 [#]	0.2045	99.37			
	7 [#]	0.2041	99.83			
	8 [#]	0.2028	100.24			
己酸	1 [#]	0.2012	100.38	99.65	0.68	0.69
	2 [#]	0.2038	100.84			
	3 [#]	0.2088	98.94			
	4 [#]	0.2024	99.45			
	5 [#]	0.2029	100.06			
	6 [#]	0.2062	99.16			
	7 [#]	0.2060	99.26			
	8 [#]	0.2033	99.17			

4. 2. 1. 5 饱和一元羧酸样品含量测定结果

在 4.1.3 条件下进样分析，通过外标法测得甲酸、乙酸、丙酸样品的含量（色谱分离图见 4-8），与国家标准规定容量法的测定结果相比较，其测定结果见表 4-4，从表中可以看出，容量分析不能规避其他酸组分的影响，其测定值较间接光度色谱法普遍偏高；由于甲酸分子中存在醛基的影响，偏离程度较大，乙酸、丙酸的测定偏差均小于 3 %。综合分析，由于甲酸中含有一定的硫酸，因此甲酸测定结果间接光度色谱法更为可靠，因为其具有分离能力，但是仍需要进一步的工作来证实。

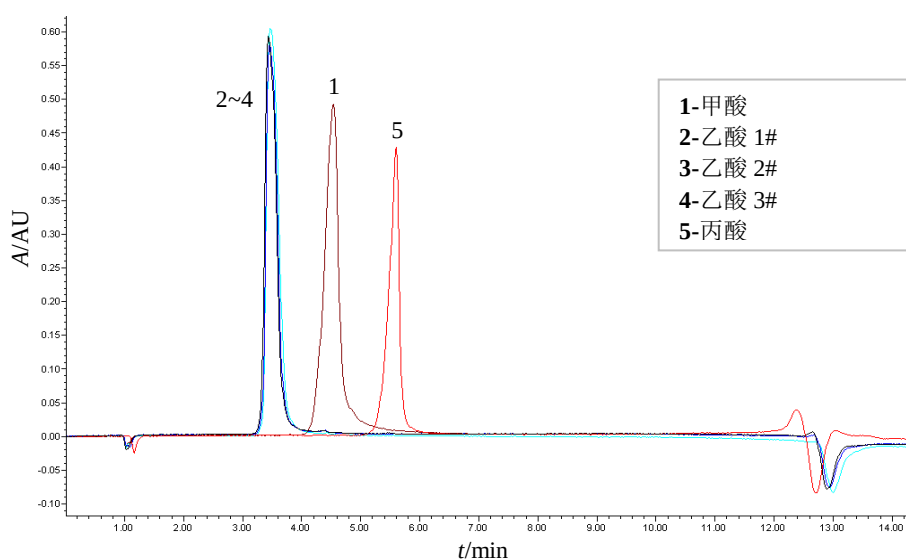


图 4 - 8 甲酸、乙酸、丙酸样品间接光度法色谱图

Fig. 4 - 8 The chromatogram of formic acid, acetic acid, propionic acid by IPC

表 4 - 4 甲酸、乙酸、丙酸和丁酸样品的测定数据

Tab. 4 - 4 The data of formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid

样品 Sample	标称值 / % Nomi- nal values	间接光度色谱法			容量分析法		
		IPC			Volumetric analysis		
		测定值 Measured value/%	平均值 Aver- age/%	RSD/%	测定值 Measured value/%	平均值 Average/%	RSD/%
甲酸	88	80.50	80.62	0.49	86.21	86.21	0.0007
		80.30			86.20		
		81.06			86.21		
乙酸 1 [#]	99.5	98.22	98.01	0.20	99.82	99.87	0.05
		98.00			99.86		
		97.82			99.92		
乙酸 2 [#]	99.9	98.78	99.63	0.75	99.74	99.77	0.05
		100.16			99.75		
		99.95			99.83		
乙酸 3 [#]	99.5	91.35	91.22	0.52	91.42	91.48	0.08
		90.70			91.56		
		91.61			91.47		
丙酸	99.5	96.82	96.84	0.21	99.82	99.73	0.08
		96.65			99.67		
		97.05			99.71		

4.2.2 标准加入法测定结果

在 $50 \sim 1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围, 丙酸其线性回归方程 $Y = 45\,974 + 301.31 X$, $r = 0.999\,8$, 丁酸的线性回归方程 $Y = -25\,071 + 371.28 X$, $r = 0.999\,9$, 线性关系非常好。混酸体系中, 标样和样品处于近乎相同的环境中, 虽然受酸性较强的甲酸、乙酸的影响, 其解离程度减弱, 但标样中丙酸或丁酸与离子对试剂成对量仍呈线性趋势, 说明甲酸等强酸虽然影响弱酸的解离, 但不影响离子对化合物成对数量; 相比于纯酸体系, 规避了基体效应的影响, 测定结果更接近于真实值。图 4-9 中丙酸、丁酸斜率表明其解离常数越小的酸斜率越接近, 即 pK_a 愈大, 基体效应影响越弱。5 种不同配比下的混合样品溶液中丙酸、丁酸的 RSD 值分别为 0.54% 、 1.29% , 见表 4-5。

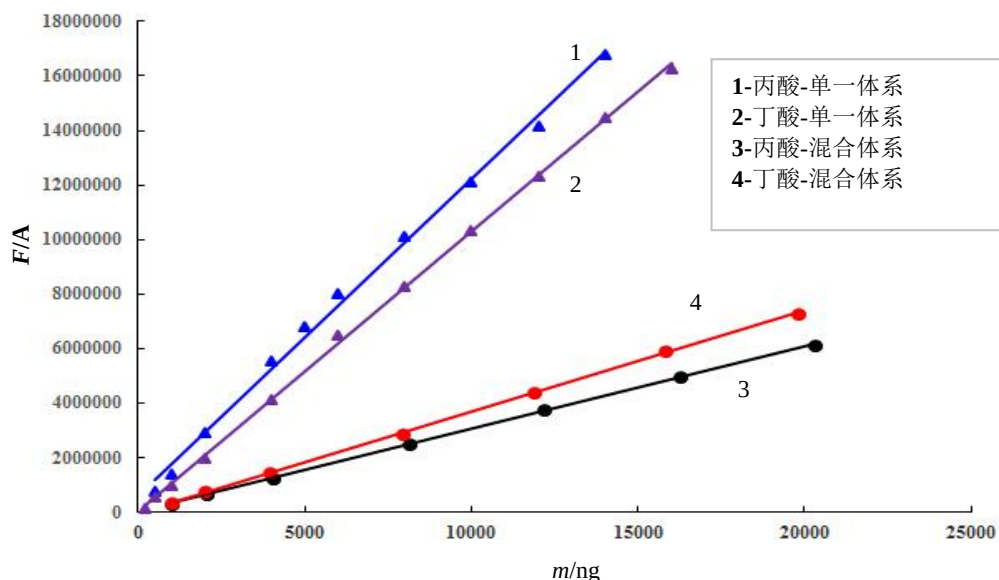


图 4-9 混合酸体系与单一体系丙酸、丁酸标准曲线

Fig. 4 - 9 The standard curves of propionic acid, butyric acid in mixed and solo acid solution

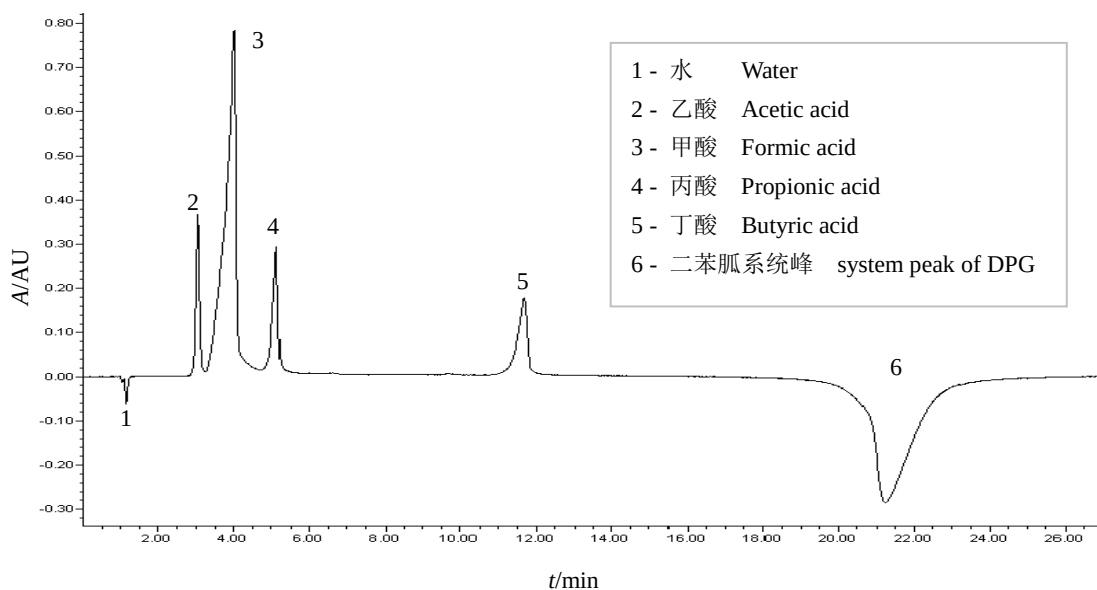


图 4 - 10 甲酸、乙酸、丙酸、丁酸混合溶液间接光度色谱分离图

Fig. 4 - 10 The chromatogram of formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid mixed solution by IPC

表 4 - 5 丙酸和丁酸标准加入法的测定数据

Tab. 4 - 5 The data of propionic acid, butyric acid by standard addition method

样品	添加值				测定值		回收率		RSD/%	
Sampl pes	Fortifica-tion/ mg . L ⁻¹				Measured value/ mg . L ⁻¹		Recovery/%			
	甲酸	乙酸	丙酸	丁酸	丙酸	丁酸	丙酸	丁酸	丙酸	丁酸
	For- mic Acid	Acetic Acid	Pro- pionic Acid	Bu- tyric Acid	Pro- pionic Acid	Bu- tyric Acid	Pro- pionic Acid	Bu- tyric Acid	Propi- onic Acid	Butyr- ic Acid
1#	10.08	102.53	152.36	197.84	151.83	199.82	99.65	101.00		
2#	20.16	153.8	101.58	98.92	100.88	97.43	99.31	98.49		
3#	50.39	102.53	203.15	148.38	203.98	146.81	100.41	98.94	0.54	1.29
4#	100.78	205.07	203.15	98.92	202.80	100.31	99.83	101.41		
5#	151.17	205.07	203.15	203.15	204.44	199.04	100.63	100.61		

4.3 小结

本文建立的饱和一元羧酸分析方法，分析成本低、样品用量少，操作简便、重现性好、灵敏度高和线性范围宽，易于普及应用，将标准加入法与间接光度色谱结合，消除了基体效应的影响，可以满足科研、生产、检测等各种需要。同时为饱和二元羧酸的分析方法建立提供了有力的理论与技术支持，也是酸碱滴定法向仪器分析方向发展的技术革新。

第五章 间接光度色谱法测定 $C_2 \sim C_5$ 二元饱和羧酸

饱和二元羧酸是一大类极其重要的化工原料，在制药行业、药物合成中间体、金属表面清洗、稀土元素提取、纺织印染、皮革加工、催化剂制备以及衍生物的合成等领域发挥着重要作用^[71-74]。饱和二元羧酸包含两个羧基特征官能团，随着碳链数的增长，分子的极性逐渐减弱。现行分析方法中，国家标准多采用酸碱滴定法^[6-10]，其分析成本低，不足之处是无法消除杂质的影响。针对饱和二元羧酸无紫外吸收特点文献报道了对氨基苯酚盐酸盐的间接紫外光度法^[75]、反离子 Cu^+ 的离子对色谱法^[76]，反相高效液相示差折光检测法^[77]，测定解离度相近的丁二酸、戊二酸、己二酸，但是未见采用间接光度色谱法分析乙二酸和丙二酸的报道。本章采用苯胍新型离子对探针试剂分别与 $C_2 \sim C_5$ 饱和羧酸形成具有紫外吸收的离子对化合物，在最优化条件下进行测定，预期获得良好的方法学数据，为二元饱和羧酸类化合物提供一种全新、通用性强的定量分析手段。

5.1 材料与方法

5.1.1 仪器及设备

见 3.1.1。

5.1.2 试剂与样品

见 3.1.2。

5.1.3 分析条件

见 3.1.3.2。

5.1.4 溶液的配制

见 2.1.2。

5.1.4.1 流动相的配制

配制分析乙二酸、丙二酸和丁二酸、戊二酸的流动相，为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/10、2、1 mmol 戊酸水溶液，置于 1 L 细口瓶中，分别加入，摇匀。

5.1.4.2 乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸标准储备溶液的配制

分别称取乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸标准品约 0.2 g（精确至 0.000 2 g）于各自的 100 mL 容量瓶中，一级水定容，摇匀。

5.1.4.3 样品溶液的配制

分别称取乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸样品约 0.1 g (精确至 0.000 2 g) 于各自的 100 mL 容量瓶中, 一级水定容、摇匀, 乙二酸稀释 10 倍, 其它酸稀释 5 倍进样测定。

5.1.5 方法学数据

5.1.5.1 检出限的测定

取 5.1.4.2 所配制的标准溶液, 分别将各饱和二元羧酸逐级稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液, 在 5.1.3 条件下进样分析, 以 $S/N=3$ 计, 确定 LOD。

5.1.5.2 标准曲线的绘制

将 5.1.4.2 所配制的标准溶液稀释成不同浓度水平 (乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸: $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;), 在 5.1.3 条件下进样分析, 以进样量 m 对峰面积 A 建立 $C_2 \sim C_5$ 饱和二元羧酸常量分析的标准曲线。

5.1.5.3 准确度

采用倍量法, 分别添加相应标样于被测样品中。乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸均添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个质量浓度水平, 每个添加水平 5 次重复, 计算其添加回收率。

5.1.5.4 精密度

分别称取 8 份乙二酸样品约 0.1 g (精确至 0.000 2 g), 丙二酸、丁二酸、戊二酸样品约 0.2 g (精确至 0.000 2 g) 于各自的 100 mL 容量瓶, 一级水定容, 摇匀, 稀释 10 倍进样, 计算其 RSD 值。

5.1.6 乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸样品含量的测定

在 5.1.3 条件下, 将 5.1.4.3 所配制的样品溶液依次进样分析, 外标法定量。

5.2 结果与讨论

5.2.1 检出限

以 $S/N=3$ 计, 实测乙二酸的 LOD 为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 丙二酸、丁二酸和戊二酸的 LOD 为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

5.2.2 标准曲线

以进样质量 m 与对应的峰面积 A ，绘制乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸常量分析标准曲线见图 5-1。在 $10 \sim 1400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围，乙二酸其线性回归方程 $Y = 52\,391 + 984.54 X$, $r = 0.999\,1$ ，丙二酸的线性回归方程 $Y = -264\,890 + 1018.8 X$, $r = 0.999\,0$ ；丁二酸的线性回归方程 $Y = -32\,310 + 529.18 X$, $r = 0.998\,5$ ；戊二酸的线性回归方程 $Y = -93\,724 + 773.42 X$, $r = 0.999\,3$ ； $\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 饱和二元羧酸的线性相关性均良好， r 均大于 0.998。 $\text{C}_2 \sim \text{C}_5$ 饱和二元羧酸典型反相间接光度色谱分离图见图 5-2 ~ 5-5。

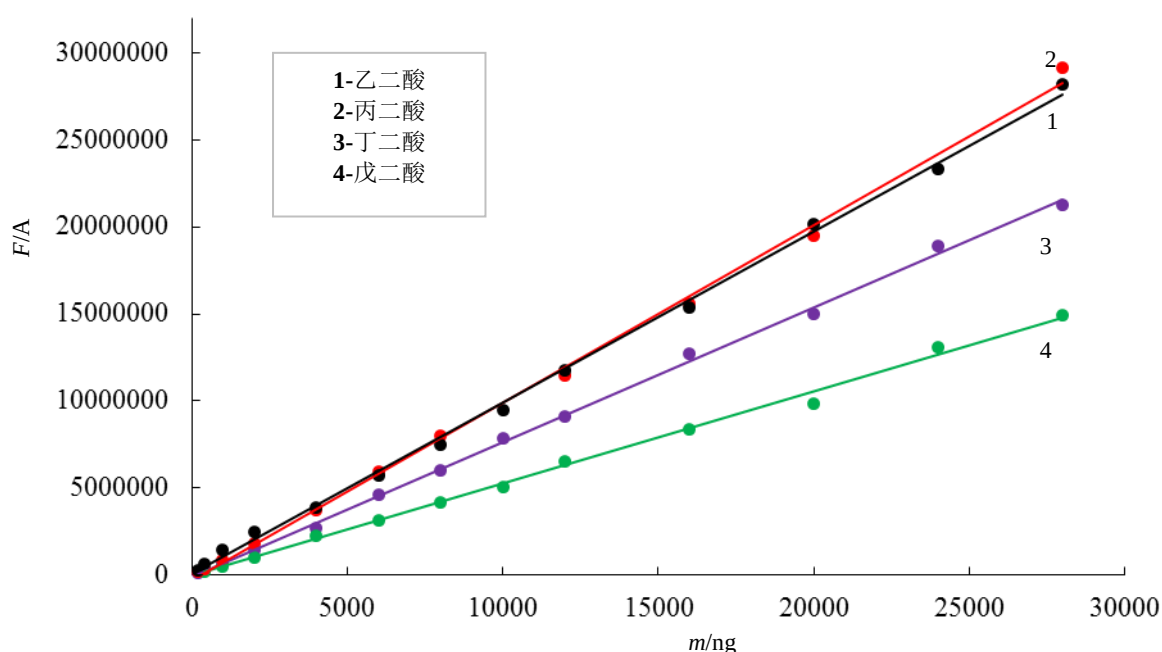


图 5-1 乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸的标准曲线

Fig. 5 - 1 The standard curves of Oxalic Acid, Malonic Acid, Succinic Acid, Glutaric Acid

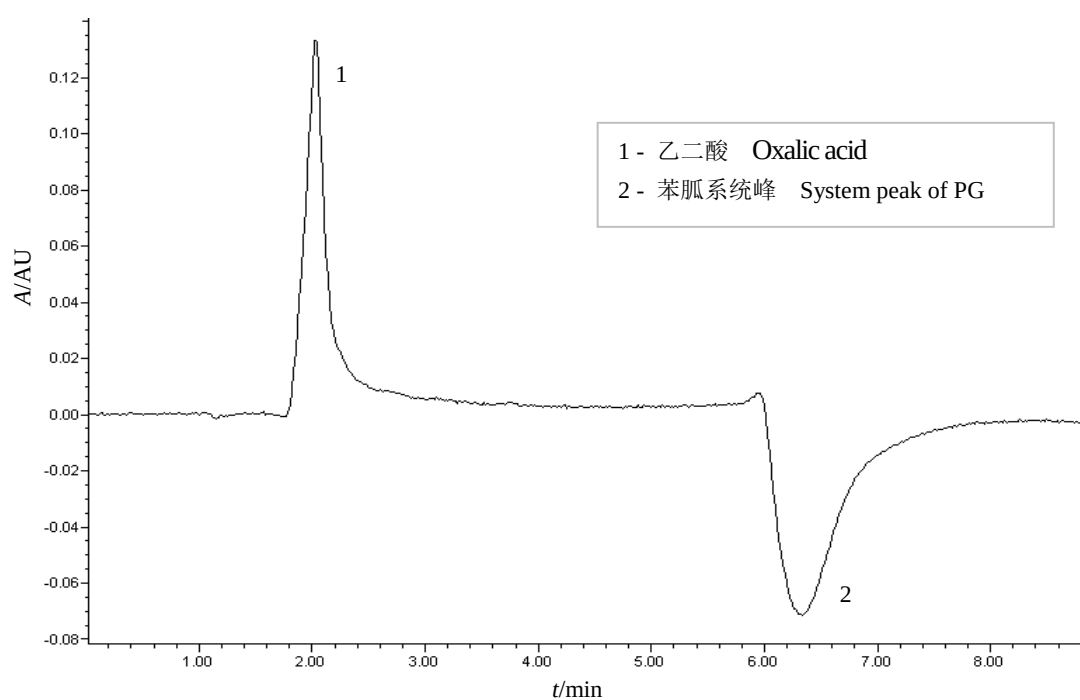


图 5 - 2 乙二酸反相间接光度色谱分离图

Fig.5 - 2 The chromatogram of oxalic acid by IPC

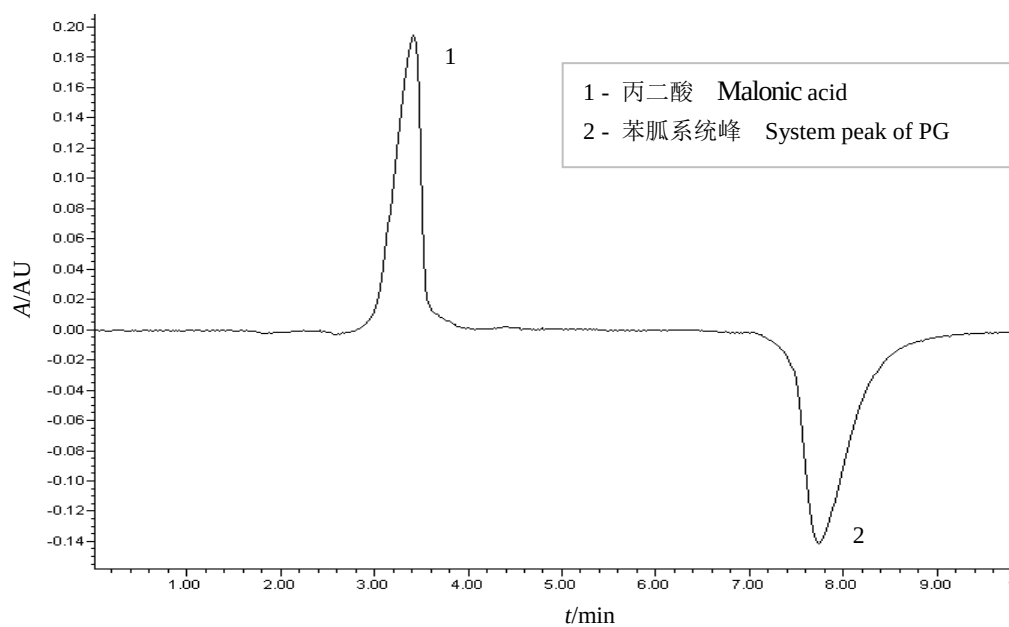


图 5 - 3 丙二酸反相间接光度色谱分离图

Fig.5 - 3 The chromatogram of malonic acid by IPC

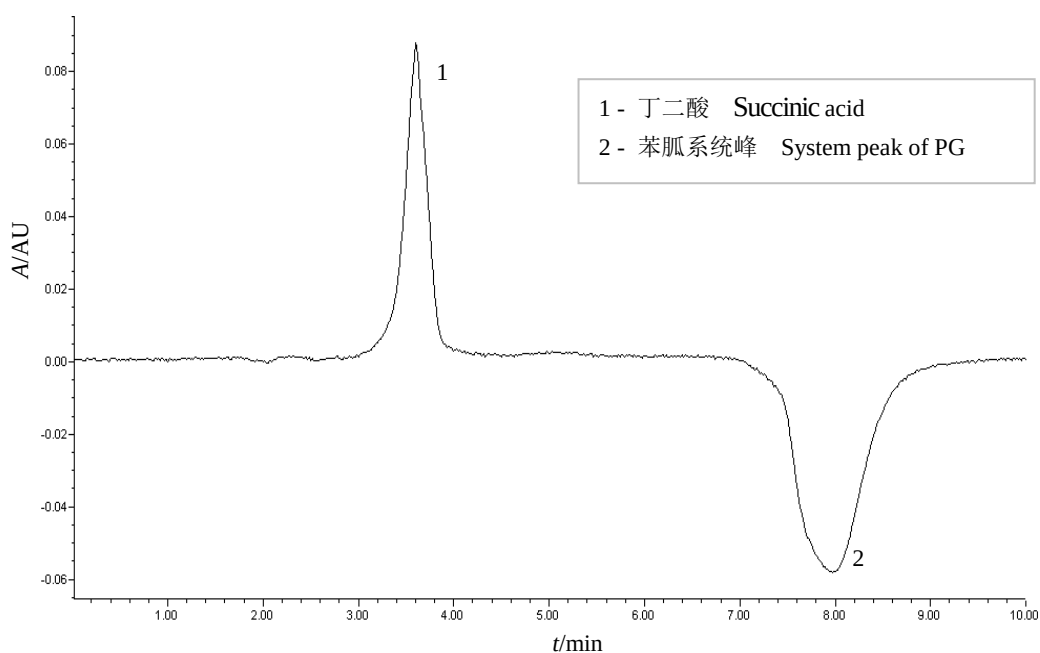


图 5 - 4 丁二酸反相间接光度色谱分离图
Fig.5 - 4 The chromatogram of succinic acid by IPC

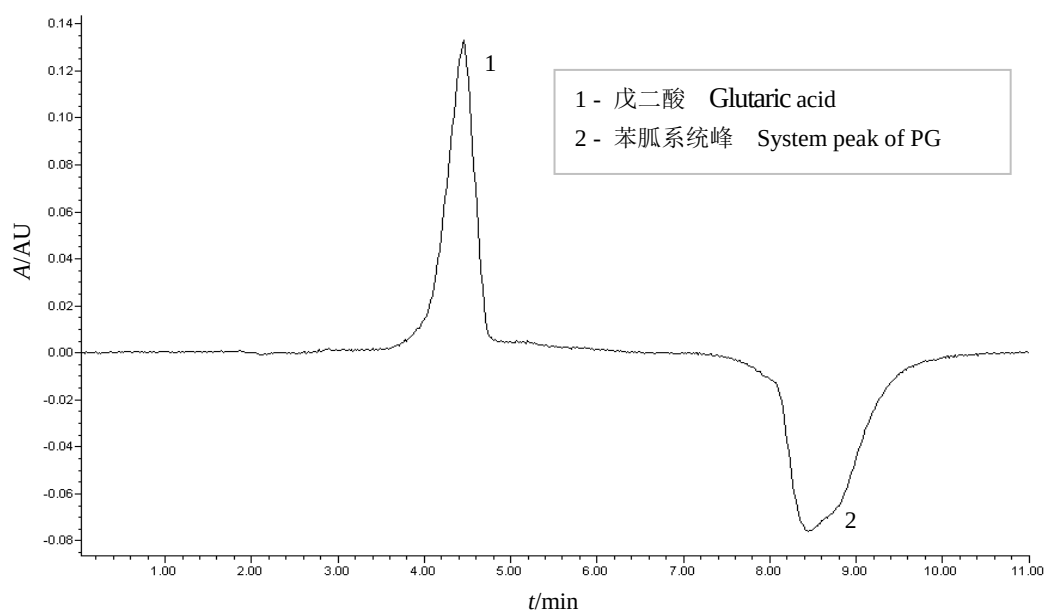


图 5 - 5 戊二酸反相间接光度色谱分离图
Fig.5 - 5 The chromatogram of glutaric acid by IPC

5. 2. 3 准确度的试验结果

总之，在 5.1.3 分析条件下， $C_2 \sim C_5$ 饱和二元羧酸的平均回收率在 97.75 % ~ 103.83 % 范围内，其准确度能够基本满足常量分析的要求。 $C_2 \sim C_5$ 饱和二元羧酸 2 个水平的添加回收试验结果见表 5-1。

表 5 - 1 饱和二元羧酸添加回收试验结果

Tab. 5 - 1 Recovery of saturated dicarboxylic acid

样品 sam- ples	低水平添加(50 mg · L ⁻¹) Low Adding Levels					高水平添加(500 mg · L ⁻¹) High Adding Levels				
	添加量 Fortifi- cation/g	测定值 Meas- ured value/g	回收率 Recov- ery/%	平均回 收率 Aver- age/%	RSD/%	添加量 Fortifi- cation/g	测定值 Meas- ured value/g	回收率 Recov- ery/%	平均回 收率 Aver- age/%	RSD/%
乙二酸	0.0051	0.0102	102.29	101.77	2.16	0.0499	0.1024	104.73	103.83	1.49
	0.0048	0.0168	105.12			0.0501	0.1016	103.06		
	0.0050	0.0166	99.34			0.0499	0.1029	105.86		
	0.0050	0.0169	101.79			0.0502	0.1011	101.83		
	0.0053	0.0173	100.34			0.0500	0.1019	103.68		
丙二酸	0.0049	0.0100	103.57	101.79	1.34	0.0498	0.0994	99.20	99.23	0.11
	0.0050	0.0100	101.73			0.0498	0.0995	99.37		
	0.0053	0.0102	100.38			0.0505	0.1001	99.31		
	0.0056	0.0106	102.7			0.0502	0.0997	99.07		
	0.0056	0.0106	100.58			0.0498	0.0994	99.22		
丁二酸	0.0052	0.0102	99.74	100.97	1.01	0.0501	0.0993	98.34	97.75	0.65
	0.0049	0.0100	100.4			0.0502	0.0987	97.01		
	0.0051	0.0101	100.71			0.0506	0.0991	97.18		
	0.0050	0.0101	101.81			0.05	0.0989	97.83		
	0.0051	0.0102	102.23			0.0503	0.0995	98.38		
戊二酸	0.0051	0.0101	101.30	100.73	0.79	0.0503	0.0999	99.24	98.97	0.54
	0.0047	0.0097	100.27			0.0497	0.0994	98.38		
	0.0047	0.0097	101.14			0.0500	0.0991	98.25		
	0.0051	0.0101	99.55			0.0504	0.0997	98.54		
	0.0052	0.0102	101.13			0.0509	0.1006	99.42		

5. 2. 4 精密度的测定结果

8 次重复测定 C₂ ~ C₅ 饱和二元羧酸得到乙二酸的 *RSD* 为 0.67 %、丙二酸为 0.60 %、丁二酸为 0.67 %、戊二酸为 0.87 %。精密度满足常量分析的要求。计算结果见表 5-2。

表 5 - 2 饱和二元羧酸精密度测定结果

Tab. 5 - 2 Precision data of saturated dicarboxylic acid

样品 Samples	序号 No.	称样量 sampling weight/g	测定值 Measured value/%	平均值 Average/%	S_x	$RSD/\%$
乙二酸	1 [#]	0.0105	99.13	100.28	0.67	0.67
	2 [#]	0.0099	100.40			
	3 [#]	0.0101	99.48			
	4 [#]	0.0104	100.97			
	5 [#]	0.0105	100.21			
	6 [#]	0.0101	100.97			
	7 [#]	0.0098	100.33			
	8 [#]	0.0101	100.78			
丙二酸	1 [#]	0.0206	100.40	99.41	0.60	0.60
	2 [#]	0.0207	99.05			
	3 [#]	0.0212	99.80			
	4 [#]	0.0203	98.66			
	5 [#]	0.0204	100.04			
	6 [#]	0.0205	99.01			
	7 [#]	0.0204	99.03			
	8 [#]	0.0201	99.25			
丁二酸	1 [#]	0.0205	99.31	100.00	0.67	0.67
	2 [#]	0.0202	99.13			
	3 [#]	0.0206	100.48			
	4 [#]	0.0204	99.28			
	5 [#]	0.0200	100.42			
	6 [#]	0.0205	100.65			
	7 [#]	0.0200	99.96			
	8 [#]	0.0201	100.77			
戊二酸	1 [#]	0.0200	100.05	100.64	0.88	0.87
	2 [#]	0.0200	100.40			
	3 [#]	0.0200	99.65			
	4 [#]	0.0201	99.85			
	5 [#]	0.0201	101.90			
	6 [#]	0.0204	100.40			
	7 [#]	0.0198	101.95			
	8 [#]	0.0203	100.92			

5.2.5 乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸样品含量测定结果

在 5.1.3 分析条件下,测得不同生产厂家的样品含量见表 5-3,乙二酸、丙二酸、丁二酸和戊二酸的含量分别为 99.36 %, 99.99 %, 100.79 %, 99.80 %。

表 5-3 饱和二元羧酸样品的测定数据

Tab. 5 - 3 The data of saturated dicarboxylic acid

样品 Samlpes	标称值 Nominal values /%	测定值 Measured value/%	平均值 Average value/%	RSD /%
乙二酸	99.8	100.44 98.72 98.91	99.36	0.95
丙二酸	99	100.48 98.84 100.67	99.99	1.01
丁二酸	99.5	101.36 101.56 99.45	100.79	1.15
戊二酸	99	99.49 100.47 99.45	99.80	0.57

5.3 小结

以 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍为离子对探针试剂, 以不同浓度的戊酸为改性剂, 建立了测定乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸样品反相间接光度色谱分析方法。该方法简便易行, 快速高效, 样品测定结果准确可靠, 较好的解决了采用常规 HPLC-UV 分析无紫外吸收短链饱和二元羧酸的分析难题。

结 论

- 1 以苯胍、二苯胍为离子对探针试剂，采用镶嵌酰胺极性基团的 RP8/18 色谱柱为间接光度色谱法专用分析柱，实现了饱和一元、二元羧酸类化合物采用 HPLC-DAD 检测的目的，将紫外检测器检测范围从单纯的测定具有共轭基团的有机物扩展到有机羧酸（盐）类等离子型有机化合物。二苯胍适用于 $C_1 \sim C_4$ 、苯胍适用于 $C_5 \sim C_6$ 一元饱和羧酸、 $C_2 \sim C_5$ 二元饱和羧酸的定量分析。
- 2 构建了极性酰胺基团分子表面的动态平衡模型，提出“平衡、反应、分离”三大机理。平衡曲线“四阶段”动态过程与固定相和流动相分配比说明了氢离子、质子化的二苯胍和改性剂的酸根阴离子在键合酰胺基团固定液分子表面的排布情况；采用酸碱平衡理论，通过解离常数、分布分数明确进样前样品溶液的 pH 值及离子态和分子态的分布情况；建立了针对不同样品改性剂种类与浓度选择的快捷方法。
- 3 分析方法建立的要点：离子对探针试剂必须有足够大的分配比才能保证生成的离子对化合物产生有定量分析意义的响应值。对于待测物必须要在水溶液中离子化，反应发生后存在分子态快速向离子态平衡过渡。改性剂的选择遵循加碳原则，即在羧基一致的情况下，改性剂的碳数要比待测物多一个。水合离子（氢离子）的浓度梯度是反相间接光度色谱法实现的前提，改性剂的种类决定反应是否能够发生，生成离子对化合物及保留时间长短，改性剂浓度则决定其响应值和峰形。
- 4 建立了饱和一元、二元羧酸的间接光度色谱定量分析方法。甲酸~己酸采用 RP8 色谱柱，甲、乙、丙、丁酸以 $0.12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯胍/丁酸或戊酸水溶液，戊酸以 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/ $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 己酸，己酸用 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍水溶液为流动相；乙二酸和丙二酸采用 RP18 色谱柱，丁二酸和戊二酸用 RP8 色谱柱，流动相为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯胍/戊酸水溶液。该方法的线性相关系数良好均大于 0.998，精密度均满足常量分析要求。采用标准加入法测定的样品含量结果准确可靠，消除了强电解质氢离子的干扰。
- 5 本文开发的方法具有较高的实用价值和指导意义，实现了饱和有机羧酸类化合物含量的测定由化学分析向仪器分析的进步。离子对探针试剂苯胍、二苯胍具有通用性，可以扩展到其他非共轭阴离子型有机化合物的分析，值得推广应用。

参考文献

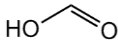
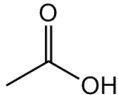
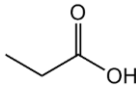
- [1] 闫国庆. 甲酸的生产技术及其市场应用探讨 [J]. 企业技术开发, 2014, 33 (3): 43 - 44.
- [2] 宁忠培, 戴志谦, 李天文, 等. 甲酸生产工艺技术及应用 [J]. 化学工程师, 2009, 163 (4): 52- 55.
- [3] 吕海棠, 韩爱霞, 王兆谦, 等. 乳清发酵法制备乙酸 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (32): 20038 - 20040.
- [4] 菅秀君, 丁文光, 胡望明. 丙酸的生产工艺及应用前景 [J]. 齐鲁石油化工, 2004, 32 (1): 32 - 35.
- [5] 邓名荣, 郭俊, 朱红惠. 微生物催化生产丁酸研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (3): 117 - 122.
- [6] GB/T 15896-1995, 化学试剂 甲酸 [S].
- [7] GB/T 676-2007, 化学试剂 乙酸(冰乙酸) [S].
- [8] GB/T 22145-2008, 饲料添加剂 丙酸 [S].
- [9] HG 2925-1989, 食品添加剂 丙酸 [S].
- [10] GB/T 1626-2008, 工业用草酸 [S].
- [11] GB/T 5009.157-2003, 食品中有机酸的测定 丁二酸 [S].
- [12] 郝鹏飞, 刘东风, 牟志春, 等. 气相色谱-质谱法测定腌渍蔬菜中的丙酸及其应用 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34 (23): 98 - 100.
- [13] 仲维斌, 宋晓娟, 马玉琴. 活性碳吸附-气相色谱法测定空气和废气中的乙酸 [J]. 污染防治技术, 2013, 26 (3): 73 - 74, 79.
- [14] 吴红星. 离子色谱法测定工业废气中的甲酸、乙酸和丙酸 [J]. 北方环境, 2013, 25 (9): 136 - 137.
- [15] 胡琳琳, 容晓文. 离子色谱法测定生物柴油中甲酸、乙酸、丙酸 [J]. 广东化工, 2009, 36 (7): 220 - 221, 237.
- [16] 董慧茹. 同时测定丁二酸、戊二酸和己二酸的两种数据方法比较[J]. 化学通报, 1994, (7): 52 - 55.
- [17] 范明红. 食品中丙酸及丙酸盐的检测方法研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41 (1): 314 - 315, 317.
- [18] 徐远金, 许桂苹, 魏远安. 胶束电动毛细管色谱-间接紫外检测法测定糖蜜酒精废液中的有机酸[J]. 色谱, 2006, 24 (1): 35 - 38.
- [19] Hattori T, Anraku N, Kato R. Capillary electrophoresis of chitooligosaccharides in acidic solution: Simple determination using a quaternary-ammonium-modified column and indirect photometric detection with Crystal Violet [J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2010, 878(3-4), 477-480.
- [20] Campo G D, Berregi I, Caracena R, *et al.* Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl) furfural in soluble coffees by ¹H NMR spectrometry [J]. Talanta, 2010, 81(1-2): 367 - 371.
- [21] Shen X, Tomellini, Sterling A. Indirect photometric and fluoeometric detection in high-performance liquid chromatography: a tutorial review [J]. Critical reviews in analytical

- chemistry, 2007, 37(2): 107 - 126.
- [22] 冯斌, 韶华, 程学美. 高效液相色谱法测定尿中甲酸和乙酸 [J]. 中国卫生检测杂质, 2006, 16 (12): 207 - 208.
- [23] Small H, Miller T E. Indirect photometric chromatography [J]. Anal Chem, 1982, 54(3): 462 - 469.
- [24] 袁建平. 应用高压液相色谱法测定糖液(浆, 蜜)中氯离子和硫酸根离子的研究 [J]. 中国甜菜糖业, 1995, (5): 1 - 6.
- [25] Iskandarani Z, Miller T E. Simultaneous independent analysis of anions and cations using indirect photometric chromatography [J]. Anal Chem, 1985, 57(8): 1591 - 1594.
- [26] Yan Z, Duan Z, Li L *et al.* Simultaneous determination of 1-sulfo-cyclohexane carboxylic acid and sulfate anion in the by-products of caprolactam by high performance liquid chromatography indirect photometric analysis [J]. sepu, 2013, 31(2): 174 - 178.
- [27] Chen H; Da, S; Wu, C. Study on indirect photometric chromatography with o-tolidine as a UV-probe reagent [J]. sepu, 1989, 7(1): 10 - 14.
- [28] 蒋生祥, 刘霞, 苏虎, 等. 间接光度高效液相色谱法分析无机阴离子的研究 [J]. 分析测试技术与仪器, 1995, (4): 7 - 12.
- [29] 齐广才, 刘珍叶, 任乃林. 脂肪二元酸的间接光度反相色谱研究 [J]. 延安大学学报(自然科学版), 1996, (1): 44 - 47.
- [30] 罗惠莉, 杨仁斌, 徐浩然, 等. 土壤中十八烷基三甲基氯化铵的残留分析 [J]. 农药学报, 2009, 11, (4): 515 - 518.
- [31] Da S, Wang Z, Wang H *et al.* Indirect photometric of hydroxyl acids using UV-absorbing alkylpyridinium or quaternary ammonium salts as detection agents and modifiers [J]. Gao deng xuexiao xuebao, 1990, 11(10): 1081 - 1086.
- [32] Hung, B; Hsu, Y; Yang, J. Determination of bethanechol chloride by indirect photometric chromatography Chinese Pharmaceutical Journal [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 1994, 46(2): 123 - 133.
- [33] Chalgeri A; Tan H S.. Assay of citrate in pharmaceutical matrices by indirect photometric liquid chromatography [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 1993, 11(4-5): 353 - 359.
- [34] 罗惠莉, 杨仁斌, 赵佳, 等. 十八烷基三甲基氯化铵在橘园土壤中的残留消解动态 [J]. 农药, 2009, 48, (11): 821 - 822.
- [35] 罗惠莉, 杨仁斌, 徐浩然, 等. 绿清灵在湖南柑橘园土壤中的残留试验研究 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49, (2): 452 - 454.
- [36] 袁成, 王景祥, 梁竹, 等. 高效液相色谱-间接光度检测法测定体液中西梭霉素 [J]. 色谱, 1998, 16, (5): 77 - 79.
- [37] 袁成, 贾暖, 王景祥, 等. 高效液相色谱-间接光度检测法同时测定血清和尿中 5 种氨基苷类抗生素 [J]. 药物分析杂志, 1999, (2): 108 - 111.
- [38] 胡玉玲, 达世禄, 冯钰, 等. 吡啶作为检测试剂的磷霉素间接光度反相高效液相色谱研究 [J]. 色谱, 1999, 17, (3): 271 - 274.
- [39] 梁竹, 袁成, 焦素云, 等. 高效液相色谱-间接光度检测法测定尿中克林霉素浓度 [J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19, (6): 333 - 335.

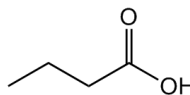
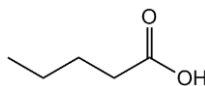
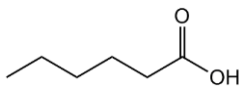
- [40] 薛作英, 袁成, 王景祥. 硫酸奈替米星注射液的 HPLC-间接光度检测法测定 [J]. 中国医药工业杂志, 1999, (6): 274 - 276.
- [41] 周贤婧, 师彦平. 毛细管电泳-间接紫外检测法测定蜂蜜中的氨基酸 [J]. 色谱, 2013, 31, (7): 661 - 666.
- [42] 颜志祥, 段正康, 李立南, 等. 高效液相色谱-间接光度法同时检测己内酰胺副产物中 1-磺酸环己烷羧酸及硫酸根离子 [J]. 色谱, 2013, (2): 174 - 178.
- [43] 王淼煜, 于泓, 李萍, 等. 离子对色谱-间接紫外检测法分析哌啶离子液体阳离子 [J]. 色谱, 2014, 32, (7), 773 - 778.
- [44] 张晖. 磷酸(盐)类农药离子对探针筛选与分析方法开发 [D]. 青岛: 青岛科技大学化工学院, 2013.
- [45] 范志先, 贾淑敏, 丁宁, 等. 离子对反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定三乙磷酸铝的含量 [J]. 色谱, 2009, 27 (6): 849 - 851.
- [46] 丁宁, 范志先, 葛海英, 等. 三乙磷酸铝的纯化与离子色谱分析 [J]. 青岛科技大学学报, 2008, 29 (3): 200 - 203.
- [47] 范志先, 宋述尧, 马凡如, 等. 三乙磷酸铝及其与代森锰锌混剂的顶空气相色谱分析方法 [J]. 色谱, 1993, 11 (5): 285 - 287.
- [48] 范志先, 李娇, 丁宁, 等. 三乙磷酸铝原药全分析 [J]. 现代农药, 2010, 9 (6): 28 - 31.
- [49] Koll A, Rospenk M, Bureiko S F, *et al.* Molecular structure and association of diphenylguanidine in solution [J]. J Phys Org Chem, 1996, 9: 487 - 497.
- [50] Preti C, Tosi G. Conductometric titrations in 2-methoxyethanol with *N,N'*-diphenylguanidine as standard Lewis base [J]. Anal Chem, 1981, 53(1): 48 - 51.
- [51] Gushchin P V, Kuznetsov M L, Haukka M, *et al.* A novel reactivity mode for metal-activated dialkylcyanamide species: addition of *N,N'*-diphenylguanidine to a *cis*-(R₂NCN)₂Pt^{II} center giving an eight-membered chelated platinaguanidine [J]. Inorganic Chemistry, 2009, 48(6): 2583 - 2592.
- [52] 达世禄. 间接光度高效液相色谱 [J]. 分析化学, 1989, 17 (4): 372 - 381.
- [53] 余嘎尔, 徐和德. 间接光度色谱法简介 [J]. 色谱, 1987, 5 (2): 94 - 97.
- [54] Shahbaz A. Maki, Nell D. Danielson. Indirect photometric chromatography of anions using sodium naphthalenetrisulfonate [J]. Anal Chem, 1991, 63(7): 699 - 703.
- [55] McAleese D L. Indirect photometric chromatography of cations and amines on a polymer-based column [J]. Anal Chem, 1987, 59(3): 541 - 543.
- [56] Hamish Small, Theodore E. Miller J. Indirect photometric chromatography [J]. Anal Chem, 1982, 54(3): 462 - 469.
- [57] 王丽娟, 杨更亮, 李煦, 等. 酯型十八烷基键合硅胶整体柱的制备表征及性能评价 [J]. 色谱, 2005, 23 (5): 504 - 507.
- [58] 田毅峰, 李先国, 沙春洁, 等. C₁₈ 反相硅胶键合相的制备与性能评价 [J]. 分析试剂, 2007, 29 (1): 12 - 14.
- [59] 蒋生祥, 刘霞. 硅胶基质高效液相色谱固定相 [J]. 色谱, 2007, 25 (2): 163 - 173.
- [60] 佟巍, 张养军, 秦伟捷, 等. 高效硅胶化学键合固定相的研究进展 [J]. 色谱, 2010, 28 (10): 915 - 922.

- [61] Jenke, Dennis R, Li L. Changes in retention and detector response for weak acid anions as a function of mobile phase PH in indirect photometric chromatography with a singly charged eluent ion [J]. Journal of liquid chromatography & Related technologies, 1998, 21(3): 315 - 329.
- [62] 武汉大学. 分析化学(第五版)上册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006, 111 - 123.
- [63] 郝鹏飞, 刘东风, 牟志春, 等. 气相色谱-质谱法测定腌渍蔬菜中的丙酸及其应用 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34 (23): 98 - 100.
- [64] 吴红星. 离子色谱法测定工业废气中的甲酸、乙酸和丙酸 [J]. 北方环境, 2013, 25 (9): 136 - 137.
- [65] 胡琳琳, 容晓文. 离子色谱法测定生物柴油中甲酸、乙酸、丙酸 [J]. 广东化工, 2009, 36 (7): 220 - 221, 237.
- [66] 辛梅华, 李明春, 徐金瑞, 等. 反相高效液相色谱法测定酸雨中的甲酸、乙酸、丙酸等 [J]. 环境工程, 2003, 21 (1): 57 - 58.
- [67] 黄志英, 赵志辉, 顾赛红. 高效液相色谱法测定饲料酸化剂中的甲酸和丙酸含量 [J]. 饲料工业, 2012, 33 (21): 64 - 66.
- [68] 索德成, 李兰, 樊霞. 饲用酸化剂中甲酸、乙酸、丙酸、乳酸、柠檬酸的同步测定 [J]. 环境工程, 2003, 21 (1): 60 - 62.
- [69] 田辉, 孙懿琳, 周元良, 等. 高效液相色谱法测定酸奶中的四种有机酸 [J]. 食品与机械, 2012, 28 (5): 87 - 90, 158.
- [70] Wang S P, Huang T H. Separation and determination of aminophenols and phenylenediamines by liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 535(2): 207 - 214 .
- [71] 许景寒, 瞿东蕙, 杨文平. 草酸生产技术现状及市场前景分析 [J]. 广东化工, 2012, 39 (10): 91 - 92.
- [72] 王丽杰, 靳鹏. 草酸的生产工艺及市场分析 [J]. 广州化工, 2013, 41 (20): 30 - 31.
- [73] 江镇海. 戊二酸的分离技术和经济效益评述 [J]. 精细化工原料及中间体, 2012, (6): 35 - 36.
- [74] 李英杰, 安磊, 佟天宇, 等. 浅谈琥珀酸制备技术 [J]. 山东化工, 2013, 42 (9): 54 - 57.
- [75] 樊小辉. 高效液相色谱间接紫外光度法的研究 [J]. 化学工业与工程技术, 2002, 31 (3): 34 - 35.
- [76] 王训道, 蒋登高, 周彩. 荣高效液相色谱法测定丁二酸、戊二酸和己二酸 [J]. 化学工业与工程技术, 2002, 23 (6): 36 - 37.
- [77] 蒋宏丽, 樊晓辉, 周宝秋. 高效液相色谱法测定丁二酸、戊二酸和己二酸 [J]. 石油化工高等学校校报, 1995, 8 (1): 33 - 35.

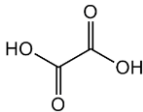
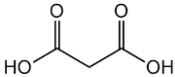
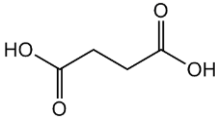
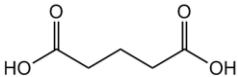
附录一 饱和羧酸类化合物简介

中文名称 Chinese common name	英文名称 English common name	中文别名 Chinese alias	英文别名 English alias	分子式 Molecular formula	化学结构式 Structural formula	相对分子质量 Relative molecular mass	CAS	性质 Nature
甲酸	Formic acid	蚁酸；过氧化甲酸	performic acid；methanoic acid	CH ₂ O ₂		46.03	64-18-6	甲酸，无色透明、有刺激性气味的液体，密度(20 ℃)约为 1.22 g · mL ⁻¹ ，熔点为 8.6 ℃，沸点为 100.8 ℃，闪点为 68.9 ℃，解离常数 pK _a 为 3.744 7，饱和蒸汽压(24 ℃)为 5.33 kPa，折射率为 1.371 4，溶于水，醇、醚等大部分极性有机溶剂。
饱和一元羧酸	乙酸	醋酸；冰醋酸	ethanoic acid	C ₂ H ₄ O ₂		60.02	64-19-7	乙酸，常温下具有强烈刺激性酸味的无色液体。蒸汽压为1.5 kPa(20 ℃)，熔点为16.6 ℃，沸点为117.9 ℃，解离常数 pK _a 为4.759 5，相对密度1.05，闪点39 ℃，爆炸极限4 % ~ 17 % (体积)。易溶于水，乙醇，乙醚、四氯化碳及甘油等有机溶剂。
	丙酸	初油酸；甲基乙酸；乙基甲酸	ethanecarboxylic acid	C ₃ H ₆ O ₂		74.04	79-09-4	丙酸，有刺激性气味的无色液体。密度为0.99 g · mL ⁻¹ ，熔点为-21 ℃(252 K)，沸点为141 ℃，解离常数 pK _a 为4.8697，饱和蒸汽压1.33 kPa(39.7 ℃)，闪点52 ℃，爆炸极限2.9 % ~ 12.1 % (体积)，能溶于水、乙醇、乙醚、氯仿等。

附录一 （续）

中文名称 Chinese common name	英文名称 English common name	中文别名 Chinese alias	英文别名 English alias	分子式 Molecular formula	化学结构式 Structural formula	相对分子质量 Relative molecular mass	CAS	性质 Nature	
饱和一元羧酸	丁酸	Butyric acid	正丁酸；天然丁酸；酪酸	<i>n</i> -butyric acid; natural butyric acid; butanoic acid; alpha-butanoic acid	C ₄ H ₈ O ₂		88.05	107-92-6	丁酸，具有刺激性及难闻气味的无色油状液体。相对密度0.956～0.959（20/4℃），熔点-7.9℃，沸点163.5℃，解离常数 pKa 为4.818 2，饱和蒸汽压0.1 kPa(25℃)，闪点71.7℃，爆炸极限2.0 %～10.0 %（体积），能溶于水、乙醇、乙醚。
	戊酸	Pentanoic acid	正戊酸；丙基乙酸；缬草酸；正穿心排草酸	Valeric acid; propylacetic acid; <i>n</i> -valeric acid; 1-butanecarboxylic acid;	C ₅ H ₁₀ O ₂		102.07	109-52-4	戊酸，有不愉快臭味的无色液体。相对密度0.939（20/4℃），熔点-34.5℃，沸点186～187℃，解离常数 pKa 为4.85，闪点86℃，易溶于水、乙醇、乙醚。
	己酸	Hexanoic acid	天然己酸；羊油酸	capric acid; sigma grade; natural hexanoic acid	C ₆ H ₁₂ O ₂		116.08	142-62-1	己酸，类似羊气味油状液体，密度(25℃)约为0.920 g·mL ⁻¹ ，熔点-3.9℃，沸点205.4℃，解离常数 pKa 为4.86，闪点104℃，微溶于水、溶于乙醇。

附录一 （续）

中文名称 Chinese common name	英文名称 English common name	中文别名 Chinese alias	英文别名 English alias	分子式 Molecular formula	化学结构式 Structural formula	相对分子质量 Relative molecular mass	CAS	性质 Nature
乙二酸	Oxalic acid	草酸； 蓼酸	ethanedioic acid; dicarboxylic acid	C ₂ H ₂ O ₄		90.00	114-62-7	乙二酸，呈单斜片状，为无色透明棱柱体结晶或白色颗粒。高温环境易风化，密度约为1.653 g · mL ⁻¹ ，熔点101 ~102 °C，解离常数 pK ₁ 为1.27，pK ₂ 为4.28，易溶于水、乙醇、乙醚，不溶于三氯甲烷、苯、石油醚。
饱和二元羧酸	丙二酸	缩苹果酸； 胡萝卜酸； 甜菜酸	dicarboxylic acid C ₃ ; methanedicarboxylic acid ; propanedioic acid	C ₃ H ₄ O ₄		104.01	141-82-2	丙二酸，无色片状白色细小结晶。高温环境易风化，密度约为1.619 g · mL ⁻¹ ，熔点135 ~136 °C，解离常数 pK ₁ 为2.86，pK ₂ 为5.31，闪点201.9 °C，易溶于水、甲醇、乙醇、乙醚，丙酮、吡啶等。
	丁二酸	琥珀酸； 亚乙基二羧酸； 1,2-乙烷二甲酸； 乙二甲酸	dicarboxylic acid C ₄ ; ethylenedicarboxylic acid ; bernsteinsäure ; asuccin	C ₄ H ₆ O ₄		118.03	110-15-6	丁二酸，无色单斜柱状或片状结晶。密度约为1.56 g · mL ⁻¹ ，熔点185 ~187 °C，沸点235 °C，解离常数 pK ₁ 为4.15，pK ₂ 为5.36，易溶于水、乙醇、乙醚，不溶于二氯甲烷、氯仿、二硫化碳等。
	戊二酸	胶酸； 1,3-丙二羧酸	1,3-propanedicarboxylic acid ; n-pyrotartaric acid; pentanedioic acid	C ₅ H ₈ O ₄		132.04	110-94-1	戊二酸，无色长单斜棱柱体结晶。密度约为1.619 g · mL ⁻¹ ，熔点92 ~99 °C，沸点302.9 °C，解离常数 pK ₁ 为4.34，pK ₂ 为5.15，闪点151.2 °C，易溶于水、无水乙醇，溶于氯仿、苯，微溶于石油醚。

附录二 略缩词表

略缩词	英文全称	中文名称
A	area	峰面积
BEH	Ethylene Bridged Hybrid	亚乙基桥杂化颗粒
CSH	Charged Surface Hybrid	表面带电杂化颗粒
d	Day	天
DAD	Diode array detector	二极管阵列检测器
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector	蒸发光散射检测器
h	Hour	小时
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
HPT	hybrid particle technology	杂化颗粒技术
IC	Ion Chromatography	离子色谱图或离子色谱法或离子色谱仪
IEC	Ion exchange chromatography	离子交换色谱法
IPC	Ion Pair Chromatography	离子对色谱
IPC	Indirect photometric chromatography	间接光度色谱法
LOD	Limit of detection	检出限
pH	Potential of hydrogen	酸碱度
RP	Reverse phase	反相
RSD	Relative standard deviation	相对标准偏差
S/N	Signal-to-noise ratio	信噪比
t_R	Retention time	保留时间
UV	Ultraviolet	紫外光
UV-vis	Ultraviolet visible	紫外可见光

致 谢

迎面碧海蓝天，回首绿树红瓦；四月樱花飘香，八月酒香四溢。伴随着论文最终定稿，硕士研究生生活已然进入了尾声。昼夜更迭，学习不止，两年的成长与磨练，为我人生旅途积蓄了无尽的动力。至此，我谨向所有曾给予我关心和帮助的人们致以最诚挚的谢意！

感谢导师范志先教授对我的精心指导和亲切关怀，从论文选题，试验开展及论文撰改，无处不倾注了老师大量的心血，使得我硕士论文能够顺利完成。经师易遇，人师难遇。范老师从严治学，一丝不苟，学思缜密、工作忘我，对待科研、教学精益求精，时刻展现着一名杰出教师的学术修养与人格魅力，是我今后学习与工作的标杆，让我终身受益；日常生活中范老师乐善好施，营造出一种团结和睦的大家庭氛围，让我这个常年在外的学子时刻感受着家的温暖。再次感谢恩师对我的谆谆教诲，借得大江千斛水，研为翰墨颂师恩。

感谢赵文英老师对我师弟般的关怀，实验室的每一个角落都有你悉心指点的印记，我每一份的成长蜕变都是你殷勤汗水的浇灌。感谢孙素莉老师大姐般的照顾，你的每一句鼓励，每一份关怀促使我乘风破浪继续前行。

感谢 2010 级本科毕业生景学超、李巍、陈曦、牟小超、常海霞、温荣会、吕祖怡陪伴我一起成长，一起蜕变；感谢 2011 级本科毕业生马琳淇、唐鹏、段佳伟、谢其昌、徐银、周磊陪我度过最后的校园时光。

特别感谢我的家人一直以来为我默默的付出，你们永远是最坚实的后盾。

值此，特别感谢评阅我论文的专家和答辩委员会的全体老师们，感谢您们在百忙之中参加我的硕士论文答辩，给予真诚的指教！

二〇一五年四月十九日于青岛

