

高效离子色谱法

姚彤炜 主讲

一、概述

- 离子色谱（ion chromatography, IC）是由经典的离子交换色谱发展而成的一种液相色谱技术。利用物质在离子交换柱上迁移的差异而达到分离，用于亲水性阴阳离子的测定
- 1975年Small等人在分析柱后接一根抑制柱来扣除背景电导（即淋洗液离子），采用通用而灵敏的电导检测器检测，使离子交换色谱第一次能够快速分离和测定常见无机和有机阴离子。后来就把这种方法称为离子色谱法

• 离子色谱的应用

- 离子色谱自1975年问世以来，已有了惊人的发展。目前离子色谱已广泛应用于环境、水文地质、能源、化工冶金、半导体、食品、饮料、生命科学等有关领域
- 主要用于无机阴阳离子、有机酸、糖醇类、氨基糖类、氨基酸、**核酸**、蛋白质、糖蛋白等物质的定性和定量分析。在**超纯分析、价态和形态分析**方面，离子色谱法显示出独特的优越性
- **2010年版**中国药典收载了离子色谱法

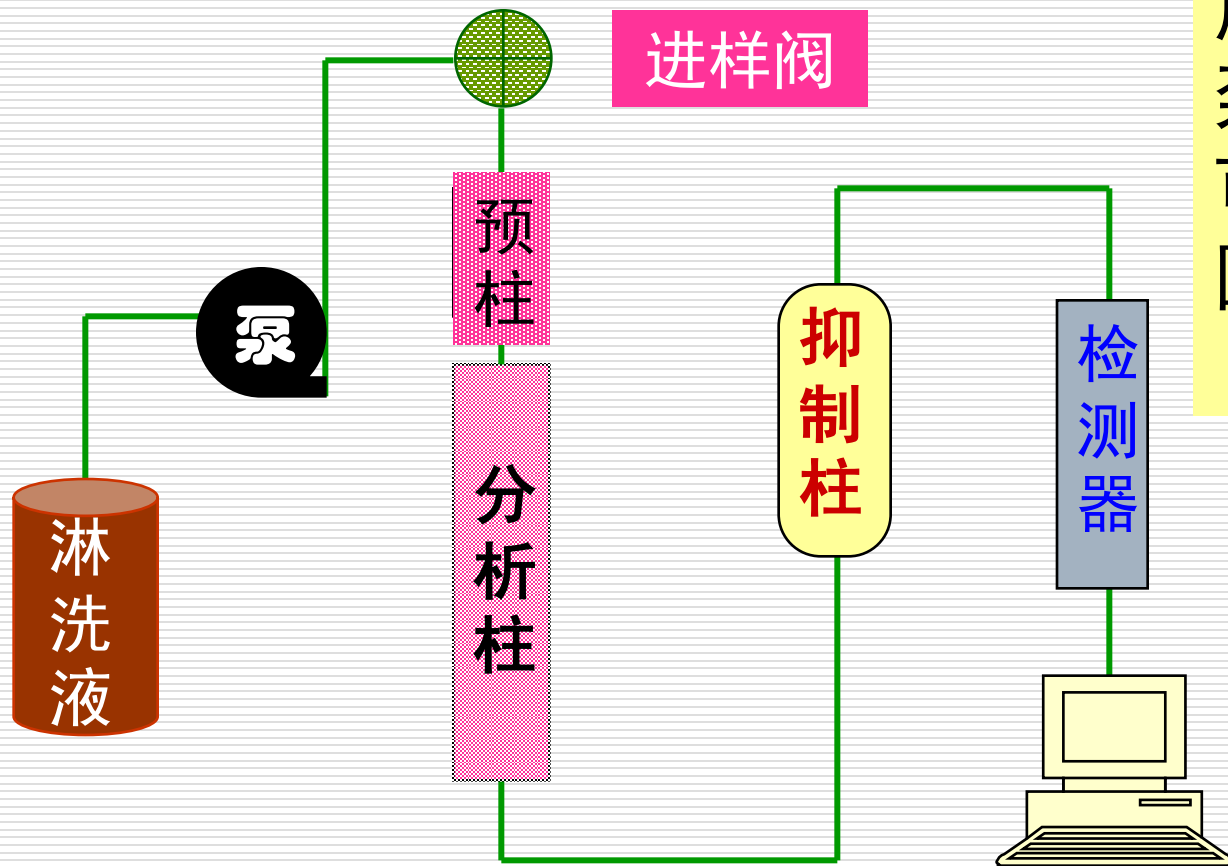
• 离子色谱分离方式

根据分离机理不同，IC的分离方式可分为：

1. **高效离子色谱（HPIC）——离子交换**
 - 用于无机阴阳离子、羧酸化合物(甲酸、乙酸、酒石酸、草酸等)、碳水化合物、胺类化合物分析
2. **高效离子排斥色谱（HPIEC）——离子排斥**
 - 用于有机酸、氨基酸等分析，以及从有机物中分离无机组分
3. **流动相离子色谱(MPIC)——吸附和离子对的形成**
 - 用于疏水性阴、阳离子以及金属络合物等的分离，如 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ， BF_4^- ， SCN^- ， I^- ， ClO_4^- 等

• 离子色谱系统

采用全塑料系统，
无脉冲双往复泵，
用微处理机控制
泵速和温度补偿，
可在pH0~14范
围内使用



• 离子色谱固定相（离子交换剂）

- 作为离子色谱固定相的离子交换剂是一类带有离子交换功能基的**固体微粒**，其结构为在分子骨架上结合可解离的**无机基团**，在离子交换反应中，离子交换剂的本体结构不发生明显变化，仅由其带有的离子与外界同电性离子发生等当量数的离子交换
- 色谱柱填充剂有：**有机聚合物**载体和**无机**载体两种，前者应用广泛，如由苯乙烯-二乙烯基苯共聚物制得的离子交换树脂填料；无机载体一般为**硅胶**

• 离子交换平衡

□ 两个离子A和B的交换，可用方程表示：

□ $Am + Bs \rightleftharpoons As + Bm$ （单价离子）

m表示溶液相
s表示树脂相

□ $bAm + aBs \rightleftharpoons bAs + aBm$ （不同电荷的离子）

□ 平衡常数 $K^A_B = \frac{[A]_s[B]_m}{[B]_s[A]_m}$

K^A_B 也称选择系数，
是衡量被检离子
对离子交换树脂
亲和力大小的量
度

□ 平衡常数 $K^A_B = [A]_s^b [B]_m^a / [B]_s^a [A]_m^b$

□ 式中溶液相浓度用mmol/ml表示，树脂相浓度用 mmol/g表示

• 离子交换平衡

□ 被交换离子A的重量分配系数 $D_g = [A]_s / [A]_m$

□ 根据容量因子 $k' = K \cdot V_s / V_m = \frac{V'_r}{V_m}$ 校正保留体积
 $= \frac{[A]_s \cdot W_s \text{ (干树脂重量)}}{[A]_m \cdot V_m \text{ (流动相体积)}} = D_g \cdot W_s / V_m$ 死体积

□ $V'_r = D_g \cdot W_s$, $D_g = V'_r / W_s$

□ $K^A_B = \frac{[A]_s [B]_m}{[B]_s [A]_m} = V'_r / W_s \cdot [B]_m / [B]_s$

$[B]_m$ —— [淋洗液], $[B]_s$ —— [树脂交换容量]

• 离子交换平衡

$$\square K_B^A = V'_r / W_s \cdot [B]_m / [B]_s = \frac{V'_r \cdot [\text{淋洗液}]}{W_s \cdot [\text{树脂交换容量}]}$$

$$\square V'_r = K_B^A \cdot W_s \cdot [\text{树脂交换容量}] / [\text{淋洗液}]$$

$$\log V'_r = \log K_B^A + \log W_s + \log [\text{树脂容量}] - \log [\text{淋洗液}]$$

- 上式显示各种实验参数对**保留体积**的影响。树脂交换容量越大，淋洗液浓度越小，保留体积越大；淋洗液离子的电荷越高，淋洗能力越强

• 离子的选择性系数

- 在季铵型强碱阴离子交换树脂上，各阴离子的选择性系数 (K_B^A) 次序为：
 $\text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{HSO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{CCL}_3\text{COO}^- > \text{CF}_3\text{COO}^- = \text{NO}_3^- = \text{Br}^- > \text{NO}_2^- = \text{CN}^- > \text{Cl}^- > \text{BrO}_3^- > \text{OH}^- > \text{HCO}_3^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{IO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{F}^-$
- 在强酸型阳离子交换树脂上，各阳离子的选择性系数次序为：
 $\text{Th}^{4+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Tl}^{2+} (\text{SO}_4^{2-}) = \text{pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} = \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Mg}^{2+} > \text{Uo}_2^{2+} (\text{NO}_3)_2 = \text{Mn}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Be}^{2+} (\text{SO}_4^{2-}) = \text{Rb}^+ > \text{Cd}^{2+} > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

• 对各种离子选择系数估计的一般原则

- 高价离子
 - 当量体积较小的离子
 - 极化度较大的离子
 - 与固定相相互作用较强的离子
 - 与淋洗液中其它成分相互作用弱的离子
 - 以上离子有较大的选择性系数
- 同价离子，浓度相同时，随原子量增加与树脂的亲合力增加，因为离子的水合离子半径随着原子量增加而降低
 - 不同价态离子，价态高的离子亲合力强

• 常用淋洗液

- 分离阴离子用的淋洗液——弱酸的碱金属盐或碱溶液（例 NaOH, $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 溶液）
- 分离阳离子用的淋洗液——甲烷磺酸溶液、无机酸溶液（例 HCl, HNO_3 溶液）
- 分离过渡金属离子常用的淋洗液——添加有机络合剂的淋洗液（例 EDTA, 酒石酸盐, 柠檬酸盐, 乳酸盐, α -羟基异丁酸盐等）
- 通过增加或减少洗脱液中酸碱溶液的浓度可以改变洗脱液的洗脱能力, 也可在洗脱液中加入适当比例的甲醇、乙腈等有机改性剂, 以改善色谱峰峰形

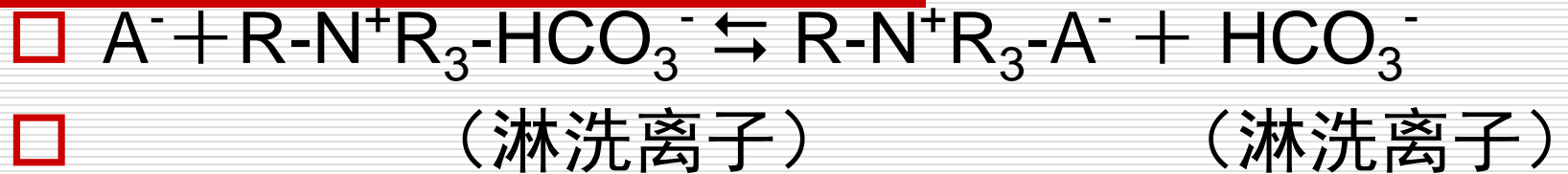
• 检测器

- 通用检测器（总体性能检测器）——对所有离子都有响应。
 - 例 电导检测器——使用最广泛
- 选择性检测器（溶质专一性检测器）——只对某些离子有响应。
 - 例 紫外-可见检测器，安培检测器

二、高效离子色谱 (HPIC)

- HPIC 的分离机制是**离子交换**，是离子色谱法的主要分离方式，用于亲水性阴阳离子的测定。根据是否采用抑制柱又可分为：
 - 抑制型离子色谱
 - 非抑制型离子色谱（单柱离子色谱）

• 离子交换过程



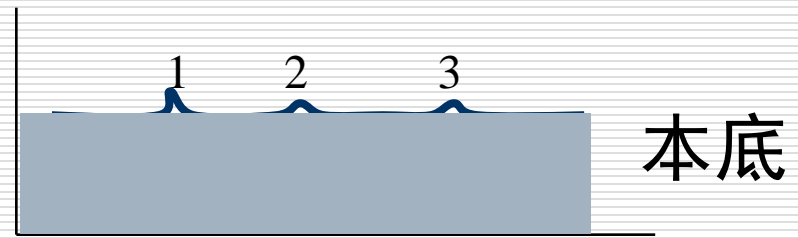
□
$$K = \frac{[R_4N^+ \cdot A^-][HCO_3^-]}{[A^-][R_4N^+ \cdot HCO_3^-]}$$

□ K是选择性系数，K值越大，样品离子的保留时间越长。其值受多种因素影响

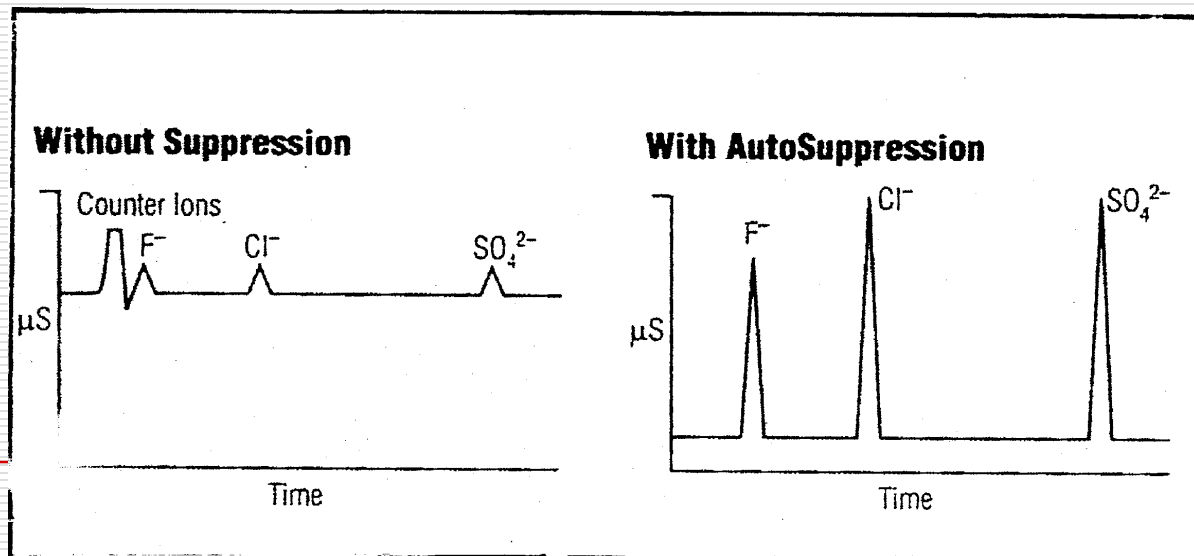
•抑制柱的抑制反应

- 离子色谱法的基础是抑制柱反应。它是构成离子色谱的高灵敏度和选择性的重要因素，也是选择分离柱、抑制柱和淋洗液时必须考虑的重要因素
- 抑制反应——在离子色谱中所用淋洗液是离子型水溶液，用电导检测器检测时，淋洗液信号强，掩盖了样品离子产生的信号，即本底高、样品信号小，信噪比小，难以识别样品离子所产生的信号

抑制柱

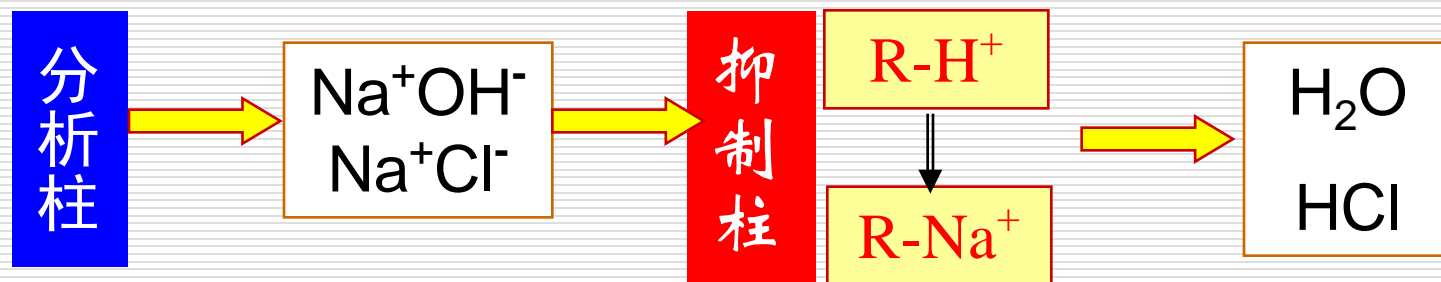


- Small等人提出了一个办法，在分离柱和检测器之间加一个柱子，如果分离阴离子，则加一个H⁺型强酸性阳离子交换树脂柱；若分析阳离子，则加一个OH⁻型强碱性阴离子交换树脂柱。这样淋洗液中离子被中和，降低了本底电导值。这种柱称为抑制柱

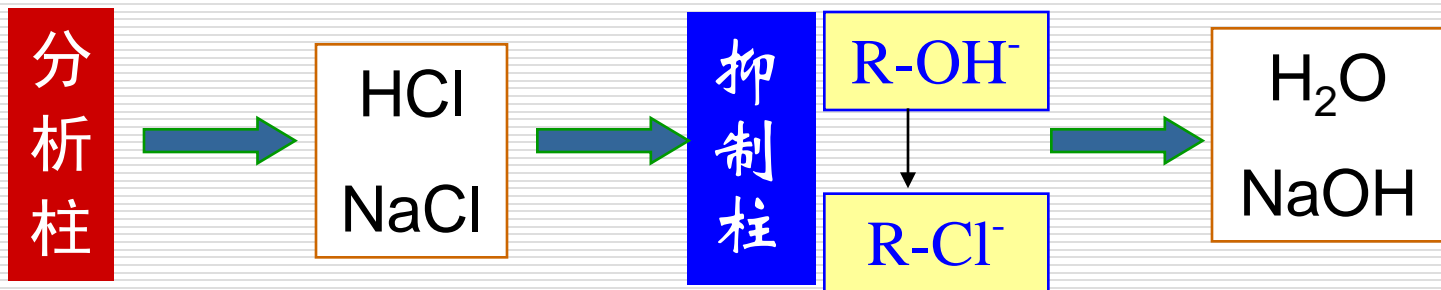


抑制柱作用原理

阴离子（ Cl^- ）分析：氢氧化钠或碳酸盐为淋洗液



阳离子（ Na^+ ）分析：盐酸为淋洗液



•抑制柱作用原理

- 在抑制柱上发生了两个重要的反应：
 - 淋洗液中碱或酸变成了水
 - 被测离子变成了响应的酸或碱
- 抑制柱起了两个重要作用：
 - 将样品离子转变成响应的酸碱后，检测灵敏度大大提高
 - 将淋洗液转变成水或很弱的酸，使本底大大降低
 - 以上两个作用同时改善了信噪比，提高了检测灵敏度

• 水溶液中离子的极限当量电导

阴离子	λ^-	阳离子	λ^+
OH^-	198	H^+	350
F^-	54	Li^+	39
Cl^-	76	Na^+	50
Br^-	78	K^+	74
NO_3^-	71	NH_4^+	73
HCO_3^-	45	Ag^+	62
SCN^-	66	Mg^{2+}	53
SO_4^{2-}	50	Ca^{2+}	60
CO_3^{2-}	72	Cu^{2+}	55
PO_4^{3-}	69	Fe^{3+}	68

• 抑制作用举例

- 用 NaHCO_3 作为淋洗液，测定 Cl^- ，从分析柱出来的溶液含有 NaCl 和 NaHCO_3 。如果不经抑制柱，直接进入电导池，测得的总电导为：
 - 样品 NaCl : $50+76=126$
 - 淋洗液 NaHCO_3 : $50+45=95$
- 经抑制柱处理后，进入检测器的是 HCl 和 H_2CO_3 ，其电导值为：
 - 样品 HCl : $350+76=426$
 - 淋洗液 弱酸电离有限，电导很低

• 抑制作用举例

□ 若用NaOH为淋洗液，则抑制前

■ 淋洗液NaOH: $50+198=248$

■ 样品 NaCl : $50+76=126$

□ 抑制后

■ 淋洗液NaOH \rightarrow H₂O, 电导由248 \rightarrow 0

■ 样品 NaCl \rightarrow HCl, 电导由126 \rightarrow 426

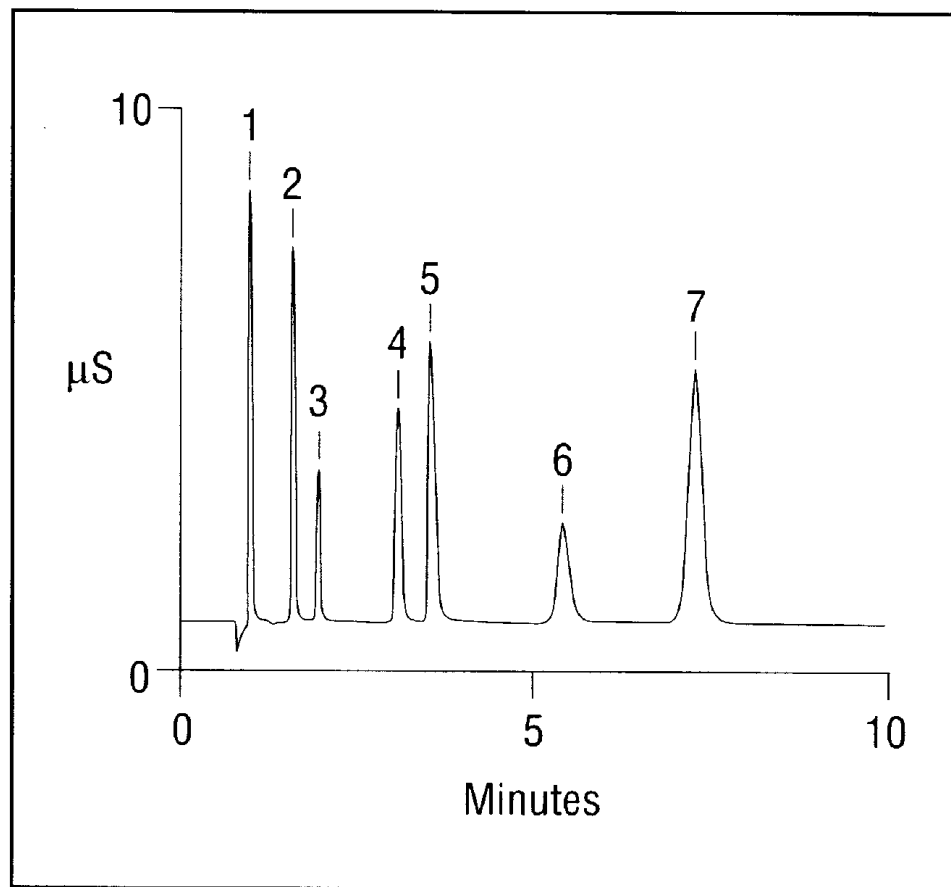
• 淋洗液

- 淋洗液必须具备两个必要条件
 - 能从分离柱树脂置换被测离子
 - 能发生抑制柱反应，反应产物为电导很低的弱电解质（ $pK_a > 6$ ）或水
- 制备洗脱液的去离子水应经过纯化处理，电阻率一般大于 $18.2 M\Omega$ ，使用的洗脱液需经脱气处理

• 常见阴离子淋洗液

淋洗液	淋洗离子	淋洗液强度	抑制产物
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	最弱	H_3BO_3
NaOH	OH^-	弱	H_2O
NaHCO_3	HCO_3^-	弱	H_2CO_3
$\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$	中	H_2CO_3
Na_2CO_3	CO_3^{2-}	强	H_2CO_3
NaNO_3	NO_3^-	最强	/
NaI	I^-	最强	AgI

Rapid Determination of Inorganic Anions



Column:

IonPac® AS4A-SC

Eluent:

1.8 mM Sodium carbonate/

1.7 mM sodium bicarbonate

Detection:

Conductivity with AutoSuppression

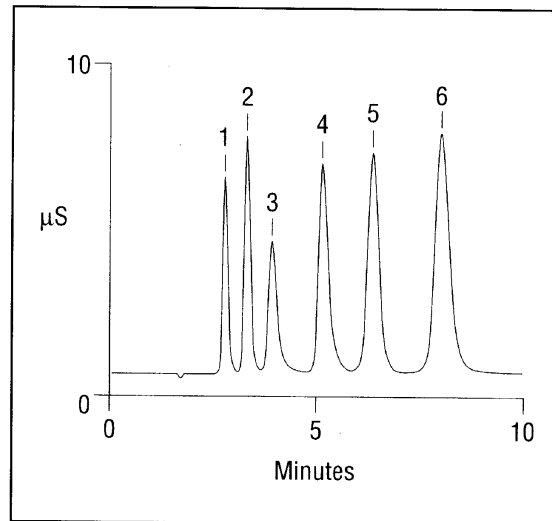
Peaks:

1. Fluoride	2 ppm
2. Chloride	3
3. Nitrite	5
4. Bromide	10
5. Nitrate	10
6. Phosphate	15
7. Sulfate	15

• 常见阳离子淋洗液

- HCl用于淋洗一价阳离子
- HCl/间苯二胺用于淋洗碱土金属离子
- 甲磺酸（ $\text{CH}_3\cdot\text{SO}_3\text{H}$ ）作淋洗液，可同时分离碱金属和碱土金属

Rapid Determination of Alkali Metal and Alkaline Earths



Column:
IonPac CS12 (4 mm)
Eluent:
20 mM Methanesulfonic acid
Detection:
Conductivity with AutoSuppression
Peaks:
1. Lithium 1 ppm
2. Sodium 4
3. Ammonium 5
4. Potassium 10
5. Magnesium 5
6. Calcium 10

三、离子色谱在医药领域中的应用

- 含金属、卤素药物，有机酸盐，胺类等药物和中间体均可用离子色谱法测定
- 药物中无机杂质的检查
- 生物样本中草酸、丙酮酸盐，乳酸盐，香草扁桃酸，以及无机阴阳离子的测定
- 与人体健康有关的各种微量元素的测定
- 糖类、氨基酸、蛋白质、多肽等分析

- 2010年版中国药典附录规定

- 离子色谱法的色谱柱填充剂大多不兼容有机溶剂，且污染后不能用有机溶剂清洗，因此，离子色谱法对样品处理的要求较高
- 对于基质简单的澄清水溶液一般通过稀释和0.45 μm 滤膜过滤后可直接进样分析
- 对于基质复杂的样品，可采用微波消解、紫外光降解、固体萃取等方法除去干扰后进样分析
- 系统适用性试验与HPLC法相同；含量测定方法有：内标法、外标法、面积归一化法等

• 中国药典采用离子色谱法测定的品种

□ 鉴别——肝素钠

□ 检查

■ 氯膦酸二钠中有关物质(氯离子, 亚磷酸, 磷酸)

■ 肝素钠及其注射液中有有关物质(硫酸皮肤素等)

■ 药用辅料富马酸中特殊杂质(马来酸)

□ 含量

■ 氯膦酸二钠注射液及胶囊

■ 注射用帕米膦酸二钠及帕米膦酸二钠注射液