

# 离子液体作高效液相色谱流动相添加剂测定水杨酸

董影杰, 于泓, 黄旭, 王婧菲

(哈尔滨师范大学 化学化工学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘要:**建立了以离子液体作反相高效液相色谱流动相添加剂测定水杨酸的方法。实验以 ZORBAX ODS 反相色谱柱为分离柱, 采用紫外检测方法, 研究了检测波长、离子液体烷基链长度、离子液体溶液的浓度以及 pH 值等对分离和测定的影响。优化的色谱条件为: 以体积比 60:40 的甲醇-3.0 mmol/L 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐溶液(乙酸调 pH 3.0)为流动相; 检测波长 300 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样体积 20  $\mu$ L; 柱温 30  $^{\circ}$ C。在该优化条件下, 水杨酸的保留时间约为 4.4 min, 检出限为 0.059 mg/L, 标准曲线在 2~100 mg/L 范围内线性关系良好( $r=0.9999$ )。方法的平均加标回收率为 100%, 相对标准偏差为 0.11%。将方法应用于足菌清酞剂药品的分析, 结果满意。

**关键词:** 离子液体; 高效液相色谱法; 水杨酸; 紫外检测; 药品

中图分类号: O657.72; Q946.8283 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)03-0302-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.03.014

## Determination of Salicylic Acid by High Performance Liquid Chromatography with Ionic Liquids as Mobile Phase Additives

DONG Ying-jie, YU Hong, HUANG Xu, WANG Jing-fei

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

**Abstract:** A reverse phase high performance liquid chromatographic method was established for the determination of salicylic acid by using ionic liquids as mobile phase additives. The chromatographic separation of salicylic acid was performed on a ZORBAX ODS column (250 mm  $\times$  4.6 mm i. d., 5  $\mu$ m). The detection of salicylic acid was carried out by ultraviolet (UV) detection. The effects of detection wavelength, pH value, concentration and alkyl chain length of ionic liquids on the separation and determination of salicylic acid were investigated. The optimum chromatographic conditions were as follows: mobile phase: methanol-3.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate aqueous solution (pH 3.0, adjusted with acetic acid) (60:40, by volume), UV detection wavelength: 300 nm, flow rate: 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, column temperature: 30  $^{\circ}$ C. Under the optimal conditions, the retention time of salicylic acid was about 4.4 min. The calibration curve showed a good linearity over the range of 2-100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> for salicylic acid with a correlation coefficient of 0.9999. The detection limit was 0.059 mg/L. The average spiked recovery was 100% with relative standard deviation of 0.11%. The method was successfully applied in the determination of the content of salicylic acid in the pharmaceutical of Zujunqing Tinctura.

**Key words:** ionic liquid; high performance liquid chromatography; salicylic acid; ultraviolet detection; pharmaceutical

离子液体 (Ionic liquids, ILs), 又称室温离子液体、室温熔融盐、液态有机盐等, 由体积较大的有机阳离子 (如烷基铵、烷基咪唑、烷基吡啶等) 和无机阴离子 (如 Br<sup>-</sup>、PF<sub>6</sub><sup>-</sup>、BF<sub>4</sub><sup>-</sup> 等) 或有机阴离子 (如 [(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N]<sup>-</sup>、(CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sup>-</sup> 等) 组成, 在室温或临近室温下呈液态。ILs 具有液体状态温度范围宽、蒸气压低、溶解能力强、导电性好等物理和化学特性, 作为对环境友好的新型绿色溶剂, 广泛应用于萃取、有机合成、催化、电化学、环境保护和分析化学等领域<sup>[1-3]</sup>。近年来, ILs 在色谱分析领域的应用日益受到关注<sup>[4-8]</sup>, 其应用范围包括用于气相色谱固定相、高效液相色谱流动相添加剂和固定

收稿日期: 2010-10-04; 修回日期: 2010-11-02

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (B200909)

通讯作者: 于泓, Tel: 0451-88060570, E-mail: yuhonghsd@yahoo.com.cn

相以及毛细管电泳电解质添加剂等。目前报道 ILs 作高效液相色谱流动相添加剂分离分析的物质有麻黄素<sup>[9]</sup>、儿茶酚胺<sup>[10]</sup>、苯胺类<sup>[11-12]</sup>、核苷酸<sup>[13]</sup>、氨基酸<sup>[14-15]</sup>以及植物激素<sup>[16]</sup>等化合物, 但 ILs 作高效液相色谱流动相添加剂分析芳香族羧酸尚未见报道。

水杨酸作为一种芳香族羧酸, 应用领域非常广泛, 因其具有消炎、去角质等多重功效, 在药品和化妆品中得到广泛应用, 但高浓度的水杨酸具有一定的伤害性。许多国家将水杨酸列为限用添加剂。我国国标 GB7916-1987<sup>[17]</sup>规定其最高允许含量的质量分数为 0.5% (以酸计)。为满足制造工艺及控制质量的要求, 须了解产品中水杨酸的实际含量, 因此建立准确、简便分析水杨酸含量的方法十分必要。目前, 文献报道检测水杨酸的方法主要有高效液相色谱法<sup>[18-19]</sup>、离子排斥色谱法<sup>[20]</sup>、毛细管电泳<sup>[21]</sup>以及离子色谱法<sup>[22]</sup>等。本文建立了应用 ILs 作高效液相色谱流动相添加剂测定水杨酸的方法, 对检测波长、ILs 溶液浓度、离子液体烷基链长度以及 pH 值等影响水杨酸保留的因素进行了考察, 确定了最佳色谱条件。将方法应用于药品足菌清酞剂中水杨酸含量的测定, 结果满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), 配有 G1311A 四元泵、G1329A 标准型自动进样器、G1316A 色谱柱温箱、G1315B DAD 检测器和安捷伦 Revision B. 04. 01 中文色谱工作站; DOA-P504-BN 型无油真空泵(美国 IDEX 公司); Simplicity 纯水系统(美国 Millipore 公司); PHSF-3F 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); 0.22  $\mu\text{m}$  过滤膜。

离子液体 1-乙基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([EMIm]BF<sub>4</sub>)、1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([BMIm]BF<sub>4</sub>)、1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐 ([HMIm]BF<sub>4</sub>) (纯度不低于 99%, 上海成捷化学有限公司); 甲醇为色谱纯(上海星可生化有限公司); 水杨酸、乙酸、氢氧化钠均为分析纯; 足菌清酞剂为市售药品, 批号为吉卫健用字 [2006] 第 063 号; 所用水为电阻率 18.2 M $\Omega$ ·cm 的超纯水; 实验中均用乙酸调节离子液体溶液的 pH 值。

### 1.2 色谱分析条件

色谱柱: ZORBAX ODS (250 mm  $\times$  4.6 mm i. d., 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-3.0 mmol/L pH 3.0 的 [BMIm]BF<sub>4</sub> 溶液(体积比 60:40); 紫外检测波长 300 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样体积 20  $\mu\text{L}$ ; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.3 溶液的配制

对照品储备液: 准确称取水杨酸 0.025 0 g, 加 20% 甲醇溶解, 移入 50 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 配成 0.5 g/L 的水杨酸储备液, 置冰箱中保存。

对照品溶液: 精密量取对照品储备液 1.0 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 得 20 mg/L 的水杨酸对照品溶液。

样品溶液: 精密量取样品足菌清酞剂 1.0 mL, 置于 100 mL 容量瓶中加水定容; 所得溶液再精密量取 1.0 mL, 置于 25 mL 容量瓶中, 用水定容, 摇匀, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱分析条件的优化

2.1.1 检测波长 水杨酸的最大吸收波长约在 200 nm, 但在此临界检测波长下进行实验, 溶剂吸收较强, 基线不稳定。通过进一步实验发现, 检测波长 300 nm 时水杨酸的吸收灵敏度较高, 且基线稳定, 故选用 300 nm 为检测波长。

2.1.2 流动相 将色谱柱温度设定为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流速为 1.0 mL/min, 进样体积为 20  $\mu\text{L}$ , 比较了体积比均为 40:60 的甲醇-水、甲醇-50 mmol/L 乙酸水溶液(氢氧化钠调 pH 3.0)和甲醇-0.5 mmol/L [BMIm]BF<sub>4</sub> 溶液(用乙酸调 pH 3.0) 3 种流动相对水杨酸测定结果的影响, 结果见图 1。由图 1 可知, 流动相中添加 0.5 mmol/L 离子液体溶液的分选效果明显优于流动相中添加浓度为 50 mmol/L 的乙酸溶液<sup>[19]</sup>, 更优于有机水相对水杨酸的测定结果。文献[9, 11]研究表明, 离子液体作流动相成分可以减弱由于被分离组分与固定相的残余硅烷醇基团的相互作用而产生的色谱峰拖尾现象, 提高被测物的检

测灵敏度。此外,本实验流动相中 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 的紫外吸收波长在210 nm左右,而水杨酸的紫外检测波长为300 nm,其紫外吸收波长的差值较大也可能是提高水杨酸检测灵敏度的一个原因。从保留时间上看,离子液体 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 作流动相添加剂时水杨酸的保留时间长于其它两种流动相,此时流动相中的甲醇含量为40%,相对较低。一般情况下,随着有机组分含量的逐渐升高,分析物的保留时间会逐渐缩短。因此,实验选用离子液体 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 作为流动相添加剂。

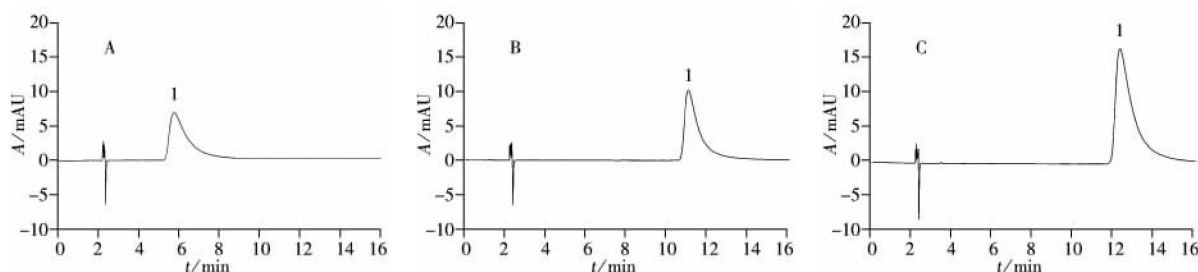


图1 不同流动相条件下测定水杨酸的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of salicylic acid using different mobile phases

A: methanol-water(40:60, by volume), B: methanol-50 mmol/L pH 3.0 acetic acid solution(40:60),  
C: methanol-0.5 mmol/L pH 3.0  $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$  solution(40:60); peak: 1. salicylic acid

**2.1.3 甲醇含量** 在 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液(0.5 mmol/L, pH 3.0)为流动相组分的条件下,考察了甲醇的体积分数分别为40%、50%、60%和70%时对水杨酸测定结果的影响。结果表明,随着甲醇体积分数的增加,水杨酸的保留时间逐渐缩短。这是由于甲醇体积分数的增大,降低了流动相的表面张力,增加了流动相的疏水性,从而减弱了水杨酸与固定相的亲合力。甲醇含量在60%时的色谱峰形最好,因此选定甲醇的体积分数为60%,此时甲醇与 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液(pH 3.0)的体积比为60:40。该条件下,水杨酸的保留时间约4.6 min。

**2.1.4  $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的浓度** 考察了 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液浓度分别为0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 mmol/L时对水杨酸测定结果的影响。结果表明,随着 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的浓度逐渐增大,水杨酸的保留时间先增长后缩短,检测灵敏度逐渐升高,色谱峰形也逐渐尖锐和对称。这主要是因为咪唑阳离子能够与被分析物的极性基团竞争固定相表面的硅羟基;其次是由于咪唑阳离子在 $\text{C}_{18}$ 柱的表面形成一个弱双电层的带电薄膜,薄膜与被分析物之间发生作用,减小了被测化合物色谱峰拖尾现象,从而改善了检测结果<sup>[9]</sup>。但当 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的浓度增至3.0 mmol/L后再继续增大时,水杨酸的检测灵敏度几乎无变化,且其色谱峰形较之稍有前伸,因此实验选用离子液体的最佳浓度为3.0 mmol/L。

**2.1.5  $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的pH值** 考察了 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的pH值分别为2.5、3.0和3.5时对测定结果的影响(见图2)。由图2可知,作为酸性化合物,流动相的pH值对分析物在 $\text{C}_{18}$ 柱上的行为影响较大。随着 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液pH值逐渐增大,水杨酸的保留时间逐渐缩短,但当 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的pH值增至3.5时,水杨酸的色谱峰形明显前伸,且检测灵敏度也明显降低。 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的pH为3.0时,水杨酸的检测灵敏度和色谱峰形最好,保留时间约4.4 min。因此实验选定 $[\text{BMIIm}]\text{BF}_4$ 溶液的最佳pH值为3.0。

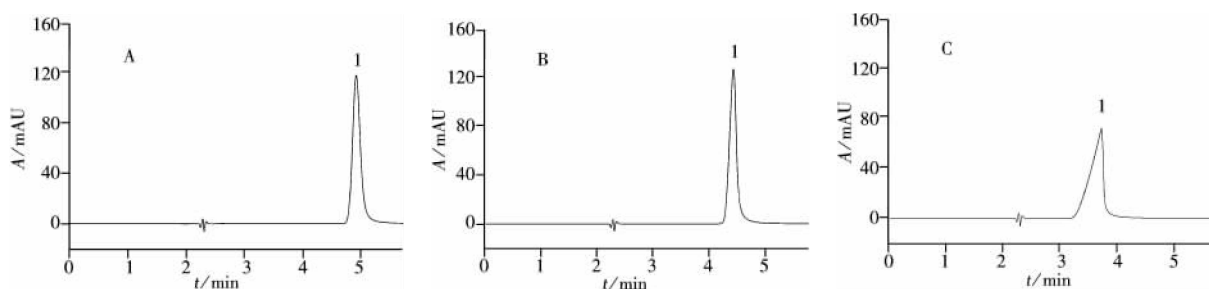


图2 不同流动相pH值时测定水杨酸的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of salicylic acid with mobile phases in different pH

pH: A. 2.5, B. 3.0, C. 3.5; peak 1: salicylic acid

**2.1.6 离子液体的烷基链长度** 考察了离子液体咪唑环上3种不同的烷基链长度对分离的影响, 结果表明, 随着离子液体的咪唑阳离子烷基取代链从乙基增加到丁基再增加到己基, 水杨酸的保留时间和色谱峰形均几乎无变化, 但检测灵敏度变化较大。其中离子液体[BMIm]BF<sub>4</sub>为流动相添加剂时, 水杨酸的检测灵敏度明显大于[EMIm]BF<sub>4</sub>和[HMIIm]BF<sub>4</sub>为流动相添加剂时的检测灵敏度。因此实验选择离子液体[BMIm]BF<sub>4</sub>作流动相添加剂。

## 2.2 定量分析参数

精密量取对照品储备液适量, 加水稀释成质量浓度分别为2、10、20、50、100 mg/L的混合对照品溶液。在优化条件下, 将上述稀释对照品溶液分别进样测定5次, 以峰面积平均值 $y$ 为纵坐标, 对照品溶液的质量浓度 $x$ (mg/L)为横坐标作标准曲线。结果表明, 水杨酸在质量浓度为2~100 mg/L范围内线性关系良好, 回归方程为 $y = 28.79x - 18.51$ , 相关系数 $r = 0.9999$ ; 以3倍信噪比计算水杨酸的检出限为0.059 mg/L; 峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.06%。

## 2.3 回收率实验

精密量取“1.3”样品溶液1.0 mL, 置于25 mL容量瓶中, 添加0.5 g·L<sup>-1</sup>的水杨酸对照品储备液, 加水定容, 摇匀。经0.22 μm微孔滤膜过滤后, 进行回收率实验。平行测定6次, 分析结果见表1。

## 2.4 实际样品的测定

采用本方法测定了足君清酊剂药品中水杨酸的含量。按“1.3”方法配制样品溶液, 在优化条件下进行分析。按外标法以峰面积进行计算, 检测结果见表1, 样品的色谱图见图3。

表1 足君清酊剂中水杨酸的含量和回收率  
Table 1 Content and recovery of salicylic acid in Zujunqing Tinctura

Analyte	Diluted	Original	RSD	Added	Found	Recovery	RSD
	$\rho_D / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_0 / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$s_r / \%$	$\rho_A / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$R / \%$	$s_r / \%$
Salicylic acid(水杨酸)	17.71	44.27	0.14	16.00	33.69	100	0.11

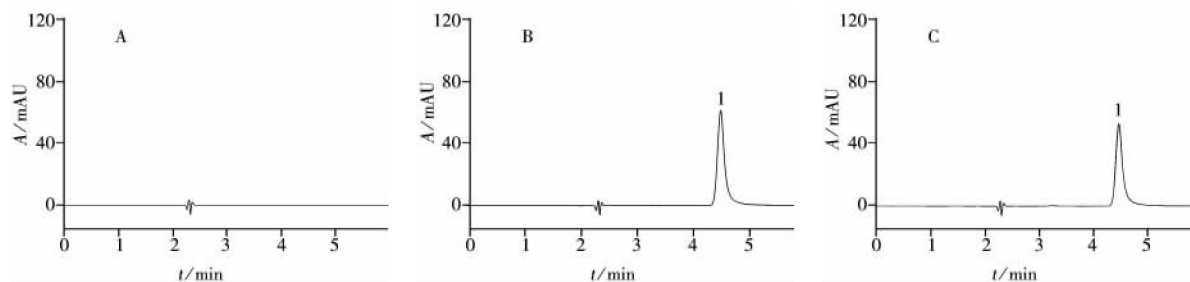


图3 空白样品(A)、对照品(B)以及实际样品(C)的色谱图  
Fig. 3 Chromatograms of blank sample(A), contrast sample(B) and real sample(C)  
peak 1: salicylic acid

## 3 结论

本文建立了以离子液体作反相高效液相色谱流动相添加剂, 高效液相色谱测定水杨酸的分析方法。结果表明, 与以往分析芳香族羧酸的高效液相色谱法相比, 本方法优势明显。用浓度非常小(3.0 mmol/L)的离子液体溶液, 可更好地完成对水杨酸的测定, 明显提高了水杨酸的检测灵敏度, 抑制了有机水相所造成的色谱峰拖尾, 同时也减小了对色谱柱和仪器的损害。方法简便快捷, 重复性、线性等均能满足定量分析要求。将方法应用于药品足菌清酊剂中水杨酸含量的测定, 其结果准确、可靠。

### 参考文献:

- [1] 寇元, 何玲. 离子液体与绿色化学: 为了今天还是为了未来? [J]. 化学进展, 2008, 20(1): 5-10.
- [2] 何小稳, 蒋懿, 蒋晔. 离子液体在微萃取方面的应用进展[J]. 分析测试学报, 2009, 28(12): 1471-1476.

- [3] LIU R, LIU J F, YIN Y G, HU X L, JIANG G B. Ionic liquids in sample preparation[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(3): 871-883.
- [4] 李广, 牛金刚, 刘霞, 蒋生祥. 咪唑键合硅胶固定相微柱液相色谱分离酚类和胺类化合物[J]. 色谱, 2009, 27(3): 368-371.
- [5] 何丽君, 吕芳, 伍艳, 谢洪学. 室温离子液体在分离分析中的应用[J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 139-144.
- [6] BERTHOD A, RUIZ-ÁNGEL M J, CARDA-BROCH S. Ionic liquids in separation techniques[J]. J Chromatogr: A, 2008, 1184(1/2): 6-18.
- [7] BUSZEWSKI B, STUJZINSKA S. A review of ionic liquids in chromatographic and electromigration techniques[J]. Chromatographia, 2008, 68(1/2): 1-10.
- [8] 高微, 于泓, 周爽. 色谱分析中离子液体的应用及其测定[J]. 色谱, 2010, 28(1): 14-22.
- [9] HE L J, ZHANG W Z, ZHAO L, LIU X, JIANG S X. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography[J]. J Chromatogr: A, 2003, 1007(1/2): 39-45.
- [10] ZHANG W Z, HE L J, GU Y L, LIU X, JIANG S X. Effect of ionic liquids as mobile phase additives on retention of catecholamines in reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Anal Lett, 2003, 36(4): 827-838.
- [11] XIAO X H, ZHAO L, LIU X, JIANG S X. Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids[J]. Anal Chim Acta, 2004, 519(2): 207-211.
- [12] MARTÍN-CALERO A, PINO V, AYALA J H, GONZÁLEZ V, AFONSO A M. Ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods[J]. Talanta, 2009, 79(3): 590-597.
- [13] POLYAKOVA Y, JIN Y Z, ZHENG J Z, ROW K H. Effect of concentration of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, for retention and separation of some amino and nucleic acids[J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2006, 29(12): 1687-1701.
- [14] YOO C G, YI S C, MUN S. Effect of ionic liquid on the retention and separation behavior of various amino acids in reversed phase chromatography[J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2007, 30(20): 2989-3006.
- [15] YOO C G, HAN Q, MUN S. Reversal of elution sequence and selectivity resulting from the use of an ionic liquid as a mobile phase modifier[J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2008, 31(8): 1104-1122.
- [16] 江海亮, 应丽艳, 王强, 沈昊宇, 应敏, 曾甜甜. 离子液体作添加剂对高效液相色谱分离植物激素的影响[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1327-1330.
- [17] GB 7916-87. 化妆品卫生标准[S].
- [18] 孙剑奇, 吴海龙. 交替三线性分解算法结合高效液相色谱法同时测定水杨酸与龙胆酸[J]. 分析测试学报, 2007, 26(5): 686-689.
- [19] 董影杰, 于泓, 张小东. 芳香族羧酸的高效液相色谱法测定及其在药品分析中的应用[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 564-567.
- [20] 于泓, 王艳, 原小寓. 直接电导检测-离子排斥色谱法测定芳香族羧酸[J]. 分析化学, 2008, 36(3): 393-396.
- [21] 张强, 张莉, 邱娟, 吴烈钧. 测定酚醛树脂中水杨酸的高效毛细管区带电泳法[J]. 分析测试学报, 2001, 20(3): 76-77.
- [22] 林华影, 林风华, 盛丽娜, 李一丹, 张琼. 淋洗液自动发生-离子色谱法同时测定食品中的21种有机酸[J]. 色谱, 2007, 25(1): 107-111.

(上接第301页)

- [10] VETTER W, LEHNERT K, HOTTINGER G. Enantioseparation of chiral organochlorines on permethylated  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin, as well as 1:1 mixtures of them[J]. J Chromatogr Sci, 2006, 44(10): 596-601.
- [11] QI S H, AI P, WANG C Y, YUAN L M, ZHANG G Y. The characteristics of a mixed stationary phase containing permethylated- $\beta$ -CD and perpentylated- $\beta$ -CD in gas chromatography[J]. Sep Purif Technol, 2006, 48(3): 310-313.
- [12] KREIDLER D, CZESLA H, SCHURIG V. A mixed stationary phase containing two versatile cyclodextrin-based selectors for the simultaneous gas chromatographic enantioseparation of racemic alkanes and racemic  $\alpha$ -amino acid derivatives[J]. J Chromatogr: B, 2008, 875(1): 208-215.
- [13] SHI X Y, LIANG P, GAO X W. The capillary gas chromatographic properties of four  $\beta$ -cyclodextrin derivatives with allyl groups or propyl groups on 3-position or 6-position of  $\beta$ -cyclodextrin[J]. Anal Chim Acta, 2005, 548(1/2): 86-94.
- [14] TAKAHISA E, ENGEL K H. 2,3-Di-O-methoxymethyl-6-O-tert-butylidimethylsilyl- $\gamma$ -cyclodextrin: a new class of cyclodextrin derivatives for gas chromatographic separation of enantiomers[J]. J Chromatogr: A, 2005, 1063(1/2): 181-192.
- [15] 史雪岩, 邵青龙, 陶丹妮, 顾峻岭, 傅若农. 一种苜蓿基取代的环糊精衍生物的合成及其气相色谱性能研究[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(7): 1098-1101.