

## 硅胶基质固定相离子对反相液相色谱法测定 强离解化合物的正辛醇/水分配系数

刘小兰<sup>1</sup>, 高 薇<sup>1</sup>, 梁 超<sup>2</sup>, 乔俊琴<sup>1\*</sup>, 王 康<sup>1</sup>, 练鸿振<sup>1\*</sup>

(1. 生命分析化学国家重点实验室, 南京大学化学化工学院, 南京大学现代分析中心, 江苏 南京 210023;  
2. 济川药业集团有限公司, 江苏 泰兴 225441)

**摘要:**反相液相色谱(RPLC)是测定正辛醇/水分配系数( $\log P$ )的有效方法,但由于缺少同类型模型化合物,RPLC在测定强离解化合物的 $\log P$ 时遇到挑战。该文在硅胶基质 C18 色谱柱上,采用离子抑制反相液相色谱(IS-RPLC)和离子对反相液相色谱(IP-RPLC)分别对中性化合物、酚酸、羧酸、磺酸及部分两性化合物的保留行为进行了系统研究。在 IS-RPLC 模式下,利用中性化合物、弱离解的酚酸和苯甲酸作为模型化合物,建立了表观正辛醇/水分配系数( $\log D$ )与纯水相保留因子对数值( $\log k_w$ )的定量结构-保留行为关系(QSRR)模型,测定了 19 种离解化合物的 $\log D$ 值,作为后续 IP-RPLC 的模型化合物及验证化合物。在 IP-RPLC 模式下,将中性、弱离解和强离解化合物作为混合模型组,以溶质静电荷  $n_e$ 、氢键酸碱性参数  $A$  和  $B$  为桥梁,建立了线性良好的  $\log D$ - $\log k_{w,IP}$  模型,采用 3 种不同类型的离解化合物进行了外部验证实验,预测值误差低于 10%,证实了模型的可靠性。在此基础上,预测了 8 种强离解化合物的  $\log D_{7.0}$  值(pH 7.0 条件下的  $\log D$  值)。研究表明,利用结构相关参数沟通不同类型的模型化合物,是实现 IP-RPLC 测定强离解化合物  $\log D$  值的一种行之有效的方法。与聚乙烯醇基质色谱柱相比,通用型的硅胶基质色谱柱上尽管存在着更多的次级作用,但可以为强离解化合物  $\log D$  的测定提供更灵活的选择。

**关键词:**离子对反相液相色谱;强离解化合物;正辛醇/水分配系数;定量结构-保留行为关系;硅胶基质色谱柱  
**中图分类号:** O658      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-8713(2021)11-1230-09

## Prediction of *n*-octanol/water partition coefficient of strongly ionized compounds by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with silica-based stationary phase

LIU Xiaolan<sup>1</sup>, GAO Wei<sup>1</sup>, LIANG Chao<sup>2</sup>, QIAO Junqin<sup>1\*</sup>, WANG Kang<sup>1</sup>, LIAN Hongzhen<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science, School of Chemistry & Chemical Engineering and Center of Materials Analysis, Nanjing University, Nanjing 210023, China;  
2. Juncan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Taixing 225441, China)

**Abstract:** The *n*-octanol/water partition coefficient ( $\log P$ ) is an important parameter to characterize the overall hydrophobicity of organic compounds. Reversed-phase liquid chromatography (RPLC) has been recommended as an effective method for the indirect determination of  $\log P$  by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Using RPLC, most studies focus on the determination of  $\log P$  or the apparent *n*-octanol/water partition coefficient ( $\log D$ ) of neutral compounds and weakly ionized compounds. However, the experimental  $\log P$  or  $\log D$  values of strongly ionized compounds have rarely been reported. In our previous work, the experimental  $\log D$  of strongly ionized compounds could be determined well

收稿日期:2021-04-26

\* 通讯联系人.Tel:(025)83686075,E-mail:qiaojunqin@nju.edu.cn(乔俊琴);Tel:(025)83686075,E-mail:hzlian@nju.edu.cn(练鸿振).  
基金项目:国家自然科学基金(21577057,91643105,21874065);江苏省自然科学基金(BK20171335).

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21577057, 91643105, 21874065); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20171335).

by ion-pair reversed-phase liquid chromatography (IP-RPLC) on an octadecyl-poly(vinyl alcohol) column using the  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  model established by different types of model compounds. However, the universality of this strategy for different chromatographic columns has yet to be verified. In this study, the retention behavior of neutral compounds, phenolic acids, carboxylic acids, sulfonic acids, and some amphoteric compounds was systematically investigated on a silica-based C18 column (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m) via ion-suppressed RPLC (IS-RPLC) and IP-RPLC, respectively. In the IS-RPLC mode, methanol and 20 mmol/L ammonium dihydrogen phosphate buffer (pH 7.0) were used as the mobile phase to perform isocratic elution at different methanol ratios. The  $\log k_w$  values of the test compounds were obtained using the linear solvent strength (LSS) model. Neutral compounds, weakly ionized phenolic acids and benzene carboxylic acids were then used as model compounds to establish the  $\log D$ - $\log k_{w-IS}$  model. The quantitative structure-retention relationship (QSRR) model, including structure-related descriptors like the charge ( $n_e$ ) and Abraham solvation parameters ( $A$  and  $B$ ), exhibited much better correlation than the unary linear regression model between  $\log D$  and  $\log k_{w-IS}$ . The  $\log D_{7.0}$  ( $\log D$  under pH 7.0) values of 19 ionized compounds were then determined by the model; the determined compounds were used as model compounds and validation compounds in IP-RPLC. In the IP-RPLC mode, besides methanol and ammonium dihydrogen phosphate buffer, the mobile phase also contained tetrabutylammonium bromide, as an ion-pair reagent. The retention behaviors of all tested compounds conformed well with the LSS model even under IP-RPLC, with a  $\log k$ - $\varphi$  linear correlation coefficient ( $R^2$ ) greater than 0.99. The  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  model was then established using 62 compounds as a mixed model set, including neutral, weakly ionized, and strongly ionized compounds. Similarly, by introducing  $n_e$ ,  $A$ , and  $B$ , the  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  model showed good linearity, with  $R^2$  greater than 0.94. Comparing the  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  model established on the silica-based C18 column in this work with that established on a poly(vinyl alcohol)-based C18 column in our previous work,  $n_e$ ,  $A$ , and  $B$  contributed more to the model in this work, indicating there was a greater secondary effect on the silica-based column. To confirm the reliability of the  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  model, three different types of acidic compounds were used as validation compounds. The predicted  $\log D$  of the three ionic compounds was very similar to that determined by the shake-flask method (SFM)/slow stirring method (SSM) or IS-RPLC method in this work, confirming the reliability of the model. Based on the above results, the  $\log D_{7.0}$  values of eight strongly ionized compounds were predicted by IP-RPLC. The findings suggested that IP-RPLC is a promising method to predict the experimental  $\log D$  of strongly ionized compounds, and that the conventional silica-based C18 column offers more flexible options in  $\log D$  determination.

**Key words:** ion-pair reversed-phase liquid chromatography (IP-RPLC); strong ionized compounds;  $n$ -octanol/water partition coefficient ( $\log P$ ); quantitative structure-retention relationship (QSRR); silica-based column

引用本文:刘小兰,高薇,梁超,乔俊琴,王康,练鸿振. 硅胶基质固定相离子对反相液相色谱法测定强离解化合物的正辛醇/水分配系数. 色谱, 2021, 39(11):1230-1238.

LIU Xiaolan, GAO Wei, LIANG Chao, QIAO Junqin, WANG Kang, LIAN Hongzhen. Prediction of  $n$ -octanol/water partition coefficient of strongly ionized compounds by ion-pair reversed-phase liquid chromatography with silica-based stationary phase. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(11):1230-1238.

正辛醇-水分配系数( $\log P$ )是化合物亲酯性/亲水性的量度,是表征化合物整体疏水性的重要参数,可用于研究有机小分子和生物体之间的相互作用,在指导药物合理设计及毒性机理研究<sup>[1]</sup>、环境风险评价<sup>[2,3]</sup>以及生物降解研究<sup>[4]</sup>中具有重要作用。 $\log P$ 测定的经典方法为摇瓶法(SFM)<sup>[5]</sup>和慢搅法(SSM)<sup>[6]</sup>,但测试需要大量样品,成本很高且费时。反相液相色谱法(RPLC)是经济合作与发展组织(OECD)推荐的间接测定 $\log P$ 的有效方法,它是利用与待测物质结构相似且已有准确可靠 $\log P$ 值的化合物作为模型化合物,通过测得特定条件下模型化合物的保留因子对数值 $\log k$ ,建立 $\log P$ 与 $\log k$ 之间的定量结构-保留行为关系(QSRR)模型,进而求得被测化合物的 $\log P$ 值<sup>[7]</sup>。 $\log P$ 对应化合物中性状态的疏水性,对于离解性化合物,通常采用表观正辛醇-水分配系数( $\log D$ )来表征物质在不同 pH 条件下的疏水性。研究发现,与 $\log P$ - $\log k$ 模型相比,以 100% 水相作流动相时的保留因子对数值( $\log k_w$ )与 $\log P$ 或 $\log D$ 之间具有更好的相关性,即 Collander 方程<sup>[8]</sup>。目前,利用 RPLC 研究中性化合物的 $\log P$ <sup>[9]</sup>以及利用离子抑制反相液相色谱法(IS-RPLC)研究弱酸或弱碱化合物的 $\log P$ 或 $\log D$ 已经比较成熟<sup>[10,11]</sup>。然而,对于强离解化合物,使用 IS-RPLC 法分析时,即使在极低比例的有机调节剂和极端 pH 条件下,也很难得到有效保留。

离子对反相液相色谱(IP-RPLC)作为 IS-RPLC 的补充,通过在流动相中添加离子对试剂增强溶质的保留,专门用于强离解化合物的分离分析<sup>[12-15]</sup>。但有实验 $\log P$ 或 $\log D$ 值的强离解化合物很少,不利于 QSRR 模型的建立,目前,IP-RPLC 用于强离解化合物 $\log P$ 或 $\log D$ 的研究还非常少。20 世纪 90 年代,邹汉法等<sup>[16]</sup>利用 IP-RPLC 以苯磺酸作为模型化合物,建立了 $\log D$ - $\log k_w$ 预测模型,但模型化合物 $\log D$ 的获取均来源于计算方法,因此,对于 $\log D$ 实验值预测的准确性不能保障。最近,本课题组 Liang 等<sup>[17]</sup>在聚乙烯醇基质 C18 柱上,以溶质静电荷( $n_e$ )、氢键酸性参数( $A$ )和氢键碱性参数( $B$ )沟通了有实验 $\log D$ 值的中性化合物、弱酸和强酸化合物,作为混合模型组,建立了更为可靠的 $\log D$ 预测模型,为强离解化合物 $\log D$ 实验值的获取提供了研究基础。

然而,聚乙烯醇基质色谱柱的柱效和寿命均比

传统硅胶基质色谱柱低,为了考察 Liang 等<sup>[17]</sup>提出的测定强离解化合物 $\log D$ 模型的通用性,本文采用最常规的硅胶基质 C18 柱,通过扩大模型化合物的范围,以磷酸二氢铵为缓冲盐,四丁基溴化铵作为离子对试剂,甲醇为有机调节剂,使用等度洗脱的方法获取了 26 种中性化合物、47 种离解化合物分别在 IS-RPLC 和 IP-RPLC 模式下的 $\log k_w$ 值,建立了相应的 $\log D$ - $\log k_w$  QSRR 模型。

## 1 实验部分

### 1.1 药品与试剂

实验中所用色谱级甲醇购自 Honeywell 公司(USA),所用水均为饮用纯净水(杭州娃哈哈集团);分析纯磷酸二氢铵、氨水(25%~28%)和磷酸(85%)均购自南京化学试剂股份有限公司,分析纯四丁基溴化铵(99%)购自北京百灵威科技有限公司。

实验中所用化合物列于表 1, $\log P$ 和 $pK_a$ 值为 ACD/Labs 软件数据库模块中的文献实验值,溶质静电荷 $n_e$ 、氢键酸碱性参数 $A$ 、 $B$ 由 <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>获取。这些化合物分别购自 Accu Standard(USA)、TCI(Japan)、国药集团化学试剂有限公司(上海)、Acros Organics(USA)、Matrix Scientific(USA)和 Sigma-Aldrich(USA),所有物质的纯度均大于 98%。

### 1.2 仪器与设备

实验所用高效液相色谱仪为 Waters Alliance 2695(Waters, USA),配有真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱和紫外-可见二极管阵列(PDA)检测器。数据的采集和处理均在 Waters Empower 色谱管理系统中进行。

pH 值的测量使用 SevenMulti 型 pH/电导率/离子综合测试仪(Mettler-Toledo, Switzerland),校准溶液为 pH 4.01、7.02 和 9.26(25 °C)的标准缓冲溶液(Mettler-Toledo)。

### 1.3 色谱条件

实验所用色谱柱为 Welch Ultimate<sup>®</sup> XB-C18(150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m, 月旭科技(上海)股份有限公司),硅胶基质,孔径 12 nm,比表面积 320 m<sup>2</sup>/g,载碳量 17%,封尾,耐受 pH 为 1.5~10.0。实验中柱温始终保持在 30 °C,流速为 1.0 mL/min,等度洗脱,每个化合物在最佳吸收波长处检测。实验中各化合物的进样浓度均为 50 mg/L(甲醇配制),进样量为 5  $\mu$ L。

表 1 实验用化合物的  $\log P$ 、 $pK_a$ 、 $\log D_{7.0}$ 、 $\log k_{w-IS}$ 、 $\log k_{w-IP}$ 、 $n_e$ 、 $A$  和  $B$  值  
**Table 1  $\log P$ ,  $pK_a$ ,  $\log D_{7.0}$ ,  $\log k_{w-IS}$ ,  $\log k_{w-IP}$ , charges ( $n_e$ ), and Abraham solvation parameters ( $A$  and  $B$ ) of all investigated compounds**

Compound type	No.	Compound	$\log P$	$pK_a$	$\log D_{7.0}$	$\log k_{w-IS}$	$\log k_{w-IP}$	$n_e$	$A$	$B$
Neutral	N1	benzyl alcohol	1.10	NA	1.10	1.32	1.32	0.00	0.39	0.56
	N2	1,4-xylene	3.15	NA	3.15	3.23	3.23	0.00	0.00	0.16
	N3	toluene	2.73	NA	2.73	2.66	2.66	0.00	0.00	0.14
	N4	ethylbenzene	3.15	NA	3.15	3.20	3.20	0.00	0.00	0.15
	N5	anisole	2.11	NA	2.11	5.60	5.60	0.00	0.00	0.29
	N6	benzyl chloride	5.50	NA	5.50	2.64	2.64	0.00	0.00	0.14
	N7	hexamethyl-benzene	4.61	NA	4.61	4.65	4.65	0.00	0.00	0.12
	N8	pentachlorobenzene	5.18	NA	5.18	4.84	4.84	0.00	0.00	0.00
	N9	1,2-xylene	3.12	NA	3.12	3.09	3.09	0.00	0.00	0.16
	N10	biphenyl	4.01	NA	4.01	3.75	3.75	0.00	0.00	0.26
	N11	phenyl ether	4.21	NA	4.21	3.73	3.73	0.00	0.00	0.19
	N12	naphthalene	3.30	NA	3.30	3.13	3.13	0.00	0.00	0.20
	N13	2-methylnaphthalene	3.86	NA	3.86	3.65	3.65	0.00	0.00	0.20
	N14	1,3-dichlorobenzene	3.53	NA	3.53	3.32	3.32	0.00	0.00	0.02
	N15	tribromobenzene	4.51	NA	4.51	4.34	4.34	0.00	0.00	0.00
	N16	chlorobenzene	2.89	NA	2.89	2.72	2.72	0.00	0.00	0.07
	N17	bromobenzene	2.99	NA	2.99	2.84	2.84	0.00	0.00	0.09
	N18	benzhydrol	2.67	NA	2.67	2.86	2.86	0.00	0.41	0.77
	N19	pentabromotoluene	5.87	NA	5.87	5.62	5.62	0.00	0.00	0.00
	N20	hexabromobenzene	6.80	NA	6.80	5.63	5.63	0.00	0.00	0.00
	N21	benzaldehyde	1.47	NA	1.47	1.33	1.33	0.00	0.00	0.39
	N22	1,3-xylene	3.20	NA	3.20	3.19	3.19	0.00	0.00	0.12
	N23	benzene	2.22	NA	2.22	2.08	2.08	0.00	0.00	0.14
	N24	1,4-diacetoxybenzene	0.98	NA	0.98	1.45	1.45	0.00	0.00	0.77
	N25	1,4-dibromonaphthalene	5.02	NA	5.02	4.51	4.51	0.00	0.00	0.16
	N26	1-bromonaphthalene	4.22	NA	4.22	3.77	3.77	0.00	0.00	0.13
Carboxylic acids and phenolic acids	W1	benzoic acid	1.87	4.20	-0.93	0.43	1.68	-1.00	0.59	0.40
	W2	2-bromobenzoic acid	2.20	2.85	-1.95	0.48	1.82	-1.00	0.60	0.43
	W3	3-bromobenzoic acid	2.87	3.81	-0.32	1.46	2.76	-1.00	0.64	0.27
	W4	2-chlorobenzoic acid	2.05	2.94	-2.01	0.55	1.74	-1.00	0.70	0.43
	W5	4-chlorobenzoic acid	2.65	3.98	-0.37	1.34	2.64	-1.00	0.63	0.27
	W6	3-methylbenzoic acid	2.37	4.27	-0.36	1.10	2.21	-1.00	0.60	0.40
	W7	3,5-dimethylbenzoic acid	2.81	4.30	0.11	1.67	2.69	-1.00	0.59	0.38
	W8	phenylacetic acid	1.41	4.31	-1.28	0.77	1.79	-1.00	0.59	0.61
	W9	4-bromophenylacetic acid	2.31	4.19	-0.50	1.75	2.82	-1.00	0.61	0.56
	W10	2-chlorophenylacetic acid	2.10	4.07	-0.83	1.22	2.25	-1.00	0.61	0.55
	W11	2-methylphenylacetic acid	1.96	4.35	-0.69	1.16	2.15	-1.00	0.60	0.65
	W12	2-naphthalenecarboxylic acid	3.28	4.16	0.44	1.89	2.92	-1.00	0.65	0.46
	W13	1-naphthaleneacetic acid	2.74	4.24	-0.02	1.97	2.98	-1.00	0.60	0.67
	W14	2-chlorophenol	2.15	8.35	2.13	1.95	2.12	-0.03	0.32	0.31
	W15	4-bromophenol	2.59	9.31	2.59	2.37	2.52	0.00	0.67	0.20
	W16	2,6-dibromophenol	3.36	6.80	2.95	2.30	3.06	-0.55	0.47	0.22
	W17	2,4-dibromophenol	3.06	7.85	3.00	2.57	3.08	-0.15	0.49	0.27
	W18	2,4,6-trichlorophenol	3.69	6.21	2.83	2.74	3.73	-0.86	0.42	0.15
	W19	2,4,6-tribromophenol	4.33	5.95	3.24	3.13	4.26	-0.86	0.42	0.15
	W20	pentachlorophenol	4.69	5.12	2.80	3.82	4.93	-1.00	0.70	0.00
	W21	1,4-benzenedicarboxylic acid	NA	NA	/	/	1.27	-2.00	1.14	0.77
	W22	1,3,5-benzenetriol	NA	NA	/	0.23	0.96	-0.01	1.40	0.82
	W23	2-amino-5-nitrophenol	NA	NA	/	1.15	1.66	-0.04	0.76	0.64
	W24	1,4-benzenediol	NA	NA	/	0.21	0.60	0.00	1.06	0.57
	W25	2-amino-4-nitrophenol	NA	NA	/	0.74	1.86	-0.04	1.01	0.43



表 1 (续)  
Table 1 (Continued)

Compound type	No.	Compound	log $P$	p $K_a$	log $D_{7.0}$	log $k_{w-IS}$	log $k_{w-IP}$	$n_e$	$A$	$B$
	W26	5-nitroisophthalic acid	NA	NA	/	2.89	2.86	-2.00	1.25	0.87
	W27	4-aminobenzoic acid	NA	NA	/	/	0.45	-0.99	0.80	0.76
	W28	2-aminophenol	NA	NA	/	0.65	0.78	0.00	0.60	0.66
	W29	4-hydroxyphenethyl alcohol	NA	NA	/	1.09	1.06	0.00	0.81	0.67
	W30	3-aminophenol	NA	NA	/	0.33	0.59	0.00	0.65	0.78
	W31	ethyl gallate	NA	NA	/	1.26	2.98	-0.15	1.35	0.93
	W32	2-amino-4- <i>tert</i> -butylphenol	NA	NA	/	2.58	2.68	0.00	0.51	0.59
	W33	3,5-dihydroxybenzoic acid	NA	NA	/	/	1.01	-1.00	1.56	0.93
Sulfonic acids	S1	benzenesulfonic acid	NA	NA	/	0.30	1.70	-1.00	0.31	0.88
	S2	1,5-naphthalenedisulfonic acid	NA	NA	/	/	2.30	-2.00	0.63	1.71
	S3	4-chlorobenzenesulfonic acid	NA	NA	/	1.27	2.57	-1.00	0.31	0.87
	S4	4-methylbenzenesulfonic acid	NA	NA	/	1.04	2.11	-1.00	0.31	0.88
	S5	5-amino-2-naphthalenesulfonic acid	NA	NA	/	0.94	2.09	-1.00	0.54	1.26
	S6	2-amino-1,4-benzenedisulfonic acid	NA	NA	/	/	1.75	-2.00	0.85	1.90
	S7	1-naphthalenesulfonic acid	NA	NA	/	1.66	2.95	-1.00	0.31	0.94
	S8	2-naphthalenesulfonic acid	NA	NA	/	1.65	2.86	-1.00	0.31	0.94
	S9	2,4-dimethylbenzenesulfonic acid	NA	NA	/	1.28	2.64	-1.00	0.31	0.89
	S10	4-sulfobenzoic acid	NA	NA	/	/	1.54	-2.00	0.88	1.21
	S11	3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid	NA	NA	/	1.95	3.75	-1.14	0.81	0.90
	S12	3,5-dicarbomethoxybenzenesulfonic acid	NA	NA	/	1.63	2.90	-1.00	0.31	1.55
	S13	4-hydroxybenzenesulfonic acid	NA	NA	/	/	1.15	-1.01	0.81	1.15
	S14	3-sulfobenzoic acid	NA	NA	/	/	1.85	-2.00	0.88	1.21

The *n*-octanol/water partition coefficients (log  $P$ ) and p $K_a$  were literature values obtained from the database module of ACD/Labs software; log  $D_{7.0}$  (log  $D$  under pH 7.0) were calculated with log  $P$ , p $K_a$  and pH; log  $k_{w-IS}$  was log  $k_w$  value in IS-RPLC mode extrapolated by linear solvent strength (LSS) model; log  $k_{w-IP}$  was log  $k_w$  value in IP-RPLC mode extrapolated by LSS model;  $n_e$ ,  $A$  and  $B$  values were obtained from <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>; NA: no literature log  $P$ , p $K_a$  value available; /: not available.

在本实验中,流动相的 pH 测定采用的方法是  $w$  pH<sup>[18]</sup>,即在有机调节剂混合之前,以水溶液作为 pH 电极的参比溶液,单独测定水相流动相的 pH 值。IS-RPLC 流动相:甲醇-20 mmol/L 磷酸二氢铵缓冲溶液 (pH 7.0); IP-RPLC 流动相:(甲醇+10 mmol/L 四丁基溴化铵)-(20 mmol/L 磷酸二氢铵+10 mmol/L 四丁基溴化铵,pH 7.0)。

#### 1.4 实验方法

在 IS-RPLC 和 IP-RPLC 色谱模式下,分别测定各化合物的保留时间 ( $t_R$ ),使用尿嘧啶测定死时间 ( $t_0$ )。根据化合物疏水性的差异,每个化合物的  $t_R$  至少在 4 个不同的甲醇比例下 ( $\varphi = 80\% \sim 10\%$ , 间隔 10% 或 5%,  $\varphi$  是流动相中甲醇的体积分数)测定,  $t_R$  使用双点校正法 (DP-RTC) 进行校正<sup>[19,20]</sup>。实验中所有化合物的  $t_R$  均为至少 3 次独立进样的平均值。

保留因子  $k$  由公式  $k = (t_R - t_0) / t_R$  计算得到,然后通过线性溶剂强度 (LSS) 模型 (log  $k = \log k_w - S\varphi$ , 其中,  $\varphi$  是流动相中有机调节剂的体积分数,  $S$  是线性回归得到的常数) 获取每个溶质的 log  $k_w$ , 随后建立 log  $D$ -log  $k_w$  模型。采用 Origin 9.4 拟合模型并

进行相关数据分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 log $k_w$ 值的获取

分别建立每个化合物的 log  $k$ - $\varphi$  线性关系,外推获得 log  $k_w$  值,IS-RPLC 模式下记为 log  $k_{w-IS}$ , IP-RPLC 模式下记为 log  $k_{w-IP}$ 。我们在前期工作<sup>[21]</sup>中已证明,中性化合物的保留时间几乎不受离子对试剂加入的影响,且由于中性化合物的疏水性较大,往往需要在较高的有机调节剂比例下获得合适的保留,而在含盐的高比例有机调节剂下再加入离子对试剂,更容易造成盐的析出从而堵塞色谱柱和仪器,因此,对于中性化合物,我们只测定了 IS-RPLC 模式下的  $t_R$  值,并以 IS-RPLC 模式下推导的 log  $k_{w-IS}$  实验值代表了 IP-RPLC 模式下的 log  $k_{w-IP}$  值,即 log  $k_{w-IS}$  等于 log  $k_{w-IP}$ 。在未加入离子对试剂的条件下,强离解化合物 (W21、W27、W33、S2、S6、S10、S13、S14) 在色谱柱上的保留极弱,即使在  $\varphi = 10\%$  时,保留时间依然小于死时间,因此,无法获取它们的 log  $k_{w-IS}$ 。当加入离子对试剂后,大部分离解化

合物尤其强离解化合物的保留均得到明显增强。 $\log k-\varphi$  关系显示,所有化合物的线性相关系数 ( $R^2$ ) 均大于 0.99,表明在硅胶基质 C18 柱上,中性、弱离解化合物及强离解化合物的保留行为均符合 LSS 模型。部分弱离解和强离解化合物在离子对试剂加入前后的  $\log k-\varphi$  关系如图 1 所示,各化合物的  $\log k_{w-IS}$  和  $\log k_{w-IP}$  列于表 1。

## 2.2 $\log D-\log k_{w-IS}$ 模型

中性化合物的  $\log D_{7.0}$  值 (pH 7.0 条件下的  $\log D$  值) 等于其  $\log P$  值。对于有  $\log P$  和  $pK_a$  文献实验值的弱离解酸性化合物,其  $\log D_{7.0}$  值由其  $\log P$ 、 $pK_a$  以及流动相 pH 计算获取<sup>[22]</sup>,结果列于表 1。部分无  $\log D_{7.0}$  值的离解化合物 (如 W22~26、W29~32、S1、S3 等) 在 IS-RPLC 模式下有明显保留,根据 LSS 模型能够获取其  $\log k_{w-IS}$  值 (见表 1),因此,可以基于  $\log D_{7.0}-\log k_{w-IS}$  模型测定这部分化合物的  $\log D_{7.0}$  值。在 IS-RPLC 模式下,我们以 26 种中性化合物 (N1~26) 和 20 种弱离解酸性化合物 (W1~20) 为模型化合物,首先在不引入其他参数的情况

下,建立  $\log D_{7.0}-\log k_{w-IS}$  模型:

$$\log D_{7.0} = -0.072 (\pm 0.022) \log k_{w-IS} + 3.928 (\pm 0.596)$$

$$N=46, R^2=0.1745 \quad (1)$$

其中,  $N$  为模型化合物的个数。可以看出,模型 (1) 的线性极差,说明除疏水作用外,还存在着其他次级作用影响溶质的保留。因此,我们尝试在  $\log D_{7.0}-\log k_{w-IS}$  模型中分别引入氢键参数  $A$  和  $B$  以及静电荷  $n_e$  (列于表 1),分别建立相应的模型:

$$\log D_{7.0} = 1.251 (\pm 0.08) \log k_{w-IS} - 1.790 (\pm 0.40)A - 0.630 (\pm 0.32)$$

$$N=46, R^2=0.9254 \quad (2)$$

$$\log D_{7.0} = 1.360 (\pm 0.105) \log k_{w-IS} - 1.271 (\pm 0.684)B - 1.054 (\pm 0.446)$$

$$N=46, R^2=0.8993 \quad (3)$$

$$\log D_{7.0} = 1.205 (\pm 0.064) \log k_{w-IS} + 1.420 (\pm 0.190)n_e - 0.480 (\pm 0.232)$$

$$N=46, R^2=0.9525 \quad (4)$$

显然,引入氢键参数  $A$  或  $B$  后,模型的线性相

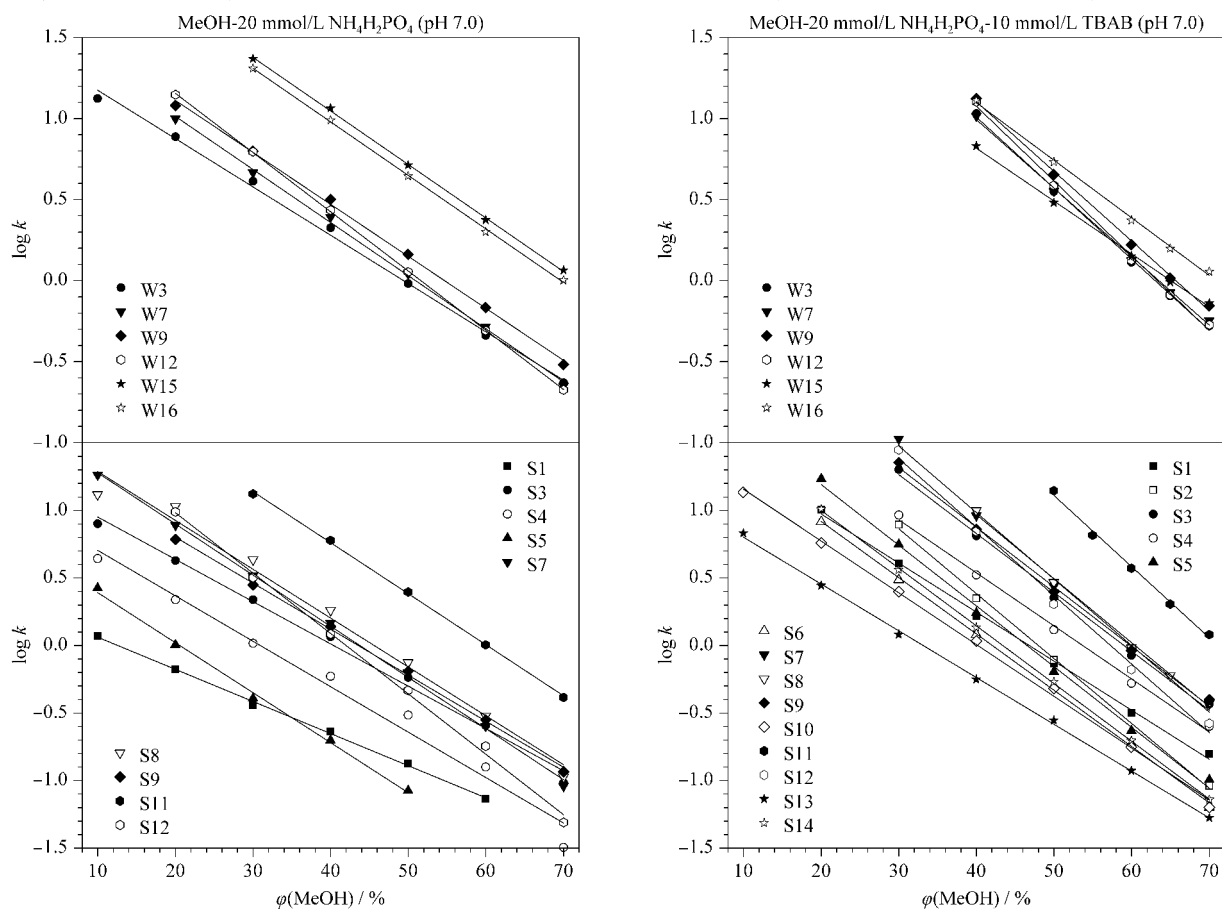


图 1 部分弱离解和强离解化合物在不同流动相下的  $\log k-\varphi$  关系

Fig. 1  $\log k-\varphi$  relationship of some weakly and strongly ionized compounds with different mobile phases

关性均得到了极大地改善,引入  $n_e$  后模型的改善更为明显( $R^2=0.9525$ )。这是由于在 pH 7.0 的条件下,模型中所用弱酸性化合物大多数处于离解状态,且离解状态不同,而此时硅胶基质色谱柱上的硅羟基部分解离,因此,溶质与固定相之间会表现出较强的氢键相互作用和静电相互作用。通过继续优化模型发现,将  $n_e$ 、 $A$  和  $B$  同时引入后的模型(5)相关性最佳且均方差最小,模型如下:

$$\begin{aligned} \log D_{7.0} = & 1.097(\pm 0.077) \log k_{w-IS} + \\ & 1.648(\pm 0.293) n_e + 0.524(\pm 0.500) A - \\ & 1.236(\pm 0.448) B + 0.090(\pm 0.332) \\ & N = 46, R^2 = 0.9583 \end{aligned} \quad (5)$$

随后,我们选用模型(5)预测了在 IS-RPLC 模式下有保留的 19 种离解化合物的  $\log D_{7.0}$  值,结果列入表 2 中,测定的数据将用于后续 IP-RPLC 模型的建立和模型的验证。

### 2.3 $\log D$ - $\log k_{w-IP}$ 模型的建立及强离解化合物 $\log D$ 的测定

Liang 等<sup>[17]</sup>的研究表明,在 IP-RPLC 模式下,通过引入  $n_e$ 、 $A$  和  $B$  可以将中性化合物、弱离解以及强离解酸性化合物联系起来建立测定强离解化合物  $\log D$  值的模型。基于此,我们以中性化合物 N1~26、弱离解酸性化合物 W2~19 以及由 IS-RPLC 测得  $\log D_{7.0}$  值的离解化合物 W22~26、W28~32、S1、S3~5、S7~9、S11 共同作为混合模型组,建立 IP-RPLC 模式下  $\log D_{7.0}$  测定的多元线性模型(6):

$$\begin{aligned} \log D_{7.0} = & 1.075(\pm 0.077) \log k_{w-IP} + \\ & 2.366(\pm 0.166) n_e + 0.120(\pm 0.245) A - \\ & 1.554(\pm 0.320) B + 0.150(\pm 0.310) \\ & N = 62, R^2 = 0.9425 \end{aligned} \quad (6)$$

可以看出,模型(6)的  $R^2$  可以达到 0.94,说明模型具有良好的线性相关性,充分证明在硅胶基质 C18 色谱柱上以不同类型化合物作为模型化合物建

表 2 待测化合物的  $\log D_{7.0}$  实验预测值

Table 2 Experimental prediction  $\log D_{7.0}$  values of compounds to be tested

No.	Compound	$\log D_{7.0}$		Error <sup>(d)</sup>
		ACD/Labs <sup>(a)</sup>	Predicted in this work	
W22	1, 3,5-benzenetriol	0	0.04 <sup>(b)</sup>	0.04
W23	2-amino-5-nitrophenol	1.13	0.90 <sup>(b)</sup>	-0.23
W24	1,4-benzenediol	0.62	0.17 <sup>(b)</sup>	-0.45
W25	2-amino-4-nitrophenol	0.66	0.84 <sup>(b)</sup>	0.18
W26	5-nitroisophthalic acid	-2.80	-0.46 <sup>(b)</sup>	2.34
W28	2-aminophenol	0.49	0.30 <sup>(b)</sup>	-0.19
W29	4-hydroxyphenethyl alcohol	0.85	0.88 <sup>(b)</sup>	0.03
W30	3-aminophenol	0.61	-0.18 <sup>(b)</sup>	-0.79
W31	ethyl gallate	1.22	0.79 <sup>(b)</sup>	-0.43
W32	2-amino-4- <i>tert</i> -butylphenol	2.27	2.46 <sup>(b)</sup>	0.19
S1	benzenesulfonic acid	-4.05	-2.16 <sup>(b)</sup>	1.89
S3	4-chlorobenzenesulfonic acid	-3.34	-1.08 <sup>(b)</sup>	2.26
S4	4-methylbenzenesulfonic acid	-2.57	-1.34 <sup>(b)</sup>	1.23
S5	5-amino-2-naphthalenesulfonic acid	-3.91	-1.81 <sup>(b)</sup>	2.10
S7	1-naphthalenesulfonic acid	-2.87	-0.74 <sup>(b)</sup>	2.13
S8	2-naphthalenesulfonic acid	-2.87	-0.75 <sup>(b)</sup>	2.12
S9	2,4-dimethylbenzenesulfonic acid	-2.18	-1.09 <sup>(b)</sup>	1.09
S11	3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid	-3.15	-0.33 <sup>(b)</sup>	2.82
S12	3,5-dicarbomethoxybenzenesulfonic acid	-3.23	-1.53 <sup>(b)</sup>	1.70
W21	1,4-benzenedicarboxylic acid	-2.13	-4.28 <sup>(c)</sup>	-2.15
W27	4-aminobenzoic acid	-1.41	-2.79 <sup>(c)</sup>	1.38
W33	3,5-dihydroxybenzoic acid	-2.10	-2.39 <sup>(c)</sup>	-0.29
S2	1,5-naphthalenedisulfonic acid	-6.60	-4.69 <sup>(c)</sup>	1.91
S6	2-amino-1,4-benzenedisulfonic acid	-7.73	-5.55 <sup>(c)</sup>	2.18
S10	4-sulfobenzoic acid	-5.54	-4.70 <sup>(c)</sup>	0.84
S13	4-hydroxybenzenesulfonic acid	-5.14	-2.70 <sup>(c)</sup>	2.44
S14	3-sulfobenzoic acid	-5.36	-4.36 <sup>(c)</sup>	1.00

(a) calculated using ACD/Labs software V11.02 (© 1994–2021 ACD/Labs); (b) predicted by model (5) using IS-RPLC method; (c) predicted by model (6) using IP-RPLC method; (d)  $\log D_{7.0}$  predicted in this work— $\log D_{7.0}$  calculated using ACD/Labs.

立  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  模型的可行性。Liang 等<sup>[16]</sup> 在聚乙烯醇基质 C18 柱上得到的多元线性模型如下:

$$\begin{aligned} \log D_{7.0} = & 1.18(\pm 0.07) \log k_{w-IP} + \\ & 1.55(\pm 0.26)n_e - 0.09(\pm 0.44)A - \\ & 0.44(\pm 0.26)B - 0.82(\pm 0.31) \\ & N=50, R^2=0.954 \end{aligned} \quad (7)$$

对比发现,本工作中在硅胶基质 C18 柱上模型的相关性与 Liang 等在聚乙烯醇基质 C18 柱上模型的相关性非常接近。同时发现,本工作模型中  $\log k_{w-IP}$  的系数更接近于 1,而  $n_e$ 、 $A$  和  $B$  3 个参数的系数均大于在聚乙烯醇基质 C18 柱上得到的模型系数,尤其是  $n_e$  的系数,这表明在硅胶基质 C18 柱上存在着更强的次级作用,参数  $n_e$ 、 $A$  和  $B$  对模型的贡献更大。

为了验证模型的可靠性,我们选取 3 种不同类型的离解化合物作为验证化合物,分别为五氯酚(W20)、苯甲酸(W1)和 3,5-二(甲氧基羰基)苯磺酸(S12),其中 3,5-二(甲氧基羰基)苯磺酸无 SFM/SSM 文献  $\log D_{7.0}$  值,其  $\log D_{7.0}$  标准值采用模型(5)得到的测定值。将 3 个验证化合物的  $\log k_{w-IP}$ 、 $n_e$ 、 $A$  和  $B$  带入模型(6),测定其  $\log D_{7.0}$ ,结果见表 3。

表 3  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  模型的外部验证  
Table 3 External validation of  $\log D$ - $\log k_{w-IP}$  model

Compound	$\log D_{7.0}$			Errors	
	SFM/SSM <sup>(a)</sup>	IP-RPLC <sup>(c)</sup>	ACD/Labs <sup>(d)</sup>	1	2
Pentachlorophenol	2.80	2.52	3.20		
Benzoic acid	-0.93	-0.97	-1.12	-0.04	-0.15
3,5-Dicarbomethoxybenzenesulfonic acid	-1.53 <sup>(b)</sup>	-1.47	-3.23	0.06	-1.70

(a) literature SFM/SSM data obtained from database module of ACD/Labs software; (b) predicted by model (5) using IS-RPLC method in this work; (c) predicted by model (6) using IP-RPLC method in this work; (d) calculated values using ACD/Labs software V11.02 (© 1994-2021 ACD/Labs). Errors: 1.  $\log D_{7.0}$ (IP-RPLC)- $\log D_{7.0}$ (SFM/SSM); 2.  $\log D_{7.0}$ (ACD/Labs)- $\log D_{7.0}$ (SFM/SSM).

### 3 结论

本文在硅胶基质 C18 色谱柱上分别研究了中性、弱离解和强离解化合物在 IS-RPLC 和 IP-RPLC 中的保留行为。研究发现,IS-RPLC 模式下,当模型化合物的离解不能被完全抑制时,引入静电荷  $n_e$ 、氢键参数  $A$  和  $B$  可以有效改善模型的相关性。更为重要的是,在 IP-RPLC 模式下,我们通过扩大模型化合物的范围,证明了在硅胶基质 C18 柱上测定强离解化合物  $\log D$  的可行性,证实了本课题组 Liang 等提出的利用不同类型化合物作为模型化合物构建 QSRR 模型用于测定强离解化合物  $\log D$  值

从表 3 中可以看出,用模型(6)预测的 3 种离解化合物的  $\log D_{7.0}$  与 SFM/SSM 法(苯甲酸和五氯酚)或者本文 IS-RPLC 法(3,5-二(甲氧基羰基)苯磺酸)测定得到的  $\log D_{7.0}$  非常相近,误差在 10% 以内,说明所建立模型既能测定弱离解化合物的  $\log D$  值也能测定强离解化合物的  $\log D$  值,充分证明了模型的可靠性。ACD/Labs 软件是公认的最准确的  $\log P$  和  $\log D$  计算软件,由表 3 可见,与标准值相比,当化合物结构较为简单时,如五氯酚和苯甲酸,用 ACD/Labs 软件计算得到的  $\log D$  值比较准确,但是当待测化合物的结构稍复杂时,如 3,5-二(甲氧基羰基)苯磺酸,由 ACD/Labs 软件计算得的  $\log D$  值存在较大的误差,与俞慧敏等<sup>[23]</sup> 的发现一致。

利用模型(6)预测了对苯二甲酸、对氨基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸、1,5-萘二磺酸、苯胺-2,5-二磺酸、4-磺基苯甲酸、4-羟基苯磺酸和 3-磺基苯甲酸的  $\log D_{7.0}$  值,结果一并列于表 3 中。结果显示,对这类离解性强、结构较为复杂的化合物,其  $\log D_{7.0}$  值与 ACD/Labs 软件计算得到的值之间差别较大,也说明用 ACD/Labs 软件计算强极性化合物和结构复杂的化合物时需要谨慎。

的方案在不同基质色谱柱上的通用性。

### 参考文献:

- [1] Pliska V, Testa B, Vande Waterbeemed H. Lipophilicity in Drug Action and Toxicology. Weinheim, Germany: VCH, 1995
- [2] Pandey S K, Roy K. Ecotox Environ Safe, 2021, 208: 111411
- [3] Zhang J M, Liu G J, Wang R J, et al. Environ Pollut, 2017, 130: 61
- [4] Xia D, Gao L R, Zheng M H, et al. J Hazard Mater, 2019, 371: 449
- [5] Ishak H, Mokbel I, Saab J, et al. J Chem Thermodyn, 2019, 131: 286
- [6] Vieira N S M, Bastos J C, Rebelo L P N. Chemosphere,



- 2019, 216: 576
- [7] Yamagami C, Masaki Y. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(12): 907
- [8] Braumann T. *J Chromatogr A*, 1986, 373: 191
- [9] Ogden P B, Dorsey J G. *J Chromatogr A*, 2019, 1601: 243
- [10] Han S Y, Liang C, Yu H M, et al. *RSC Adv*, 2015, 5: 28840
- [11] Liang C, Qiao J Q, Han Y Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(12): 1240  
梁超, 乔俊琴, 韩艺源, 等. *色谱*, 2016, 34(12): 1240
- [12] Zhang Y, Huang D, Liu X X, et al. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 32(6): 652  
张艳, 黄丹, 刘秀秀, 等. *华西药理学杂志*, 2017, 32(6): 652
- [13] Olkiewicz M, Debski J, Jablonska P, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1517: 66
- [14] Li L, Foley J P, Helmy R. *J Chromatogr A*, 2019, 1601: 145
- [15] Wu Z C, Wu E G, Yang Z Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(10): 1118  
吴智超, 吴恩国, 杨仲毅, 等. *色谱*, 2019, 37(10): 1118
- [16] Zou H F, Zhang Y K, Hong M F, et al. *J Chromatogr A*, 1992, 625(2): 169
- [17] Liang C, Qiao J Q, Lian H Z. *J Chromatogr A*, 2017, 1528: 25
- [18] Canals I I, Portal J A, Bosch E, et al. *Anal Chem*, 2000, 72(8): 1802
- [19] Han S Y, Qiao J Q, Zhang Y Y, et al. *Chemosphere*, 2011, 83(2): 131
- [20] Liang C, Qiao J Q, Ge X, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(4): 426  
梁超, 乔俊琴, 葛欣, 等. *色谱*, 2014, 32(4): 426
- [21] Liang C. [PhD Dissertation]. Nanjing, Nanjing University, 2018  
梁超. [博士学位论文]. 南京: 南京大学, 2018
- [22] Ming X, Han S Y, Qi Z C, et al. *Talanta*, 2009, 79(3): 752
- [23] Yu H M, Han S Y, Deng H S, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(6): 958  
俞慧敏, 韩疏影, 邓海山, 等. *分析化学*, 2016, 44(6): 958