

12种邻苯二甲酸盐

超高效液相色谱与高效液相色谱分析对比

摘要：近年来，随着科技的进步，出现了1.7 μm 颗粒状反相色谱介质和相应先进的液体处理系统，能够在更高压力下处理装满这类物质的色谱柱。从理论上说，无论是在分析速度、分辨率还是在灵敏度方面，超高效液相色谱技术的优点都已经非常突出，尤其是在节省时间和溶剂用量上。本文探讨了用来分离12种邻苯二甲酸盐的一种新的分析方法，并将分析结果与使用高效液相色谱得到的结果进行比较。同时，对技术、系统适用性检测数据方面存在的差异以及超高效液相色谱的优缺点进行了讨论。

关键词：色谱柱液相色谱 超高效液相色谱 邻苯二甲酸盐

导言

超高效液相色谱可以看作是液相色谱一个新的发展方向。超高效液相色谱的首家生产商沃特世表示：这项技术意味着“速度、分辨率和灵敏度”¹。

根据众所周知的范第姆特方程，色谱过程的效率与颗粒大小成反比。

根据范第姆特描述谱带加宽、表示理论塔板当量高度（HETP）与线速度关系的模型，其中一个术语（路径依赖术语）取决于装入色谱柱的颗粒的直径大小。在色谱柱长度一定的情况下，减小硅石颗粒的大小能大大降低HETP。由此得出结论，使用更小颗粒将使范第姆特图在高线速度下呈现更小的最低值和曲率（图1）。

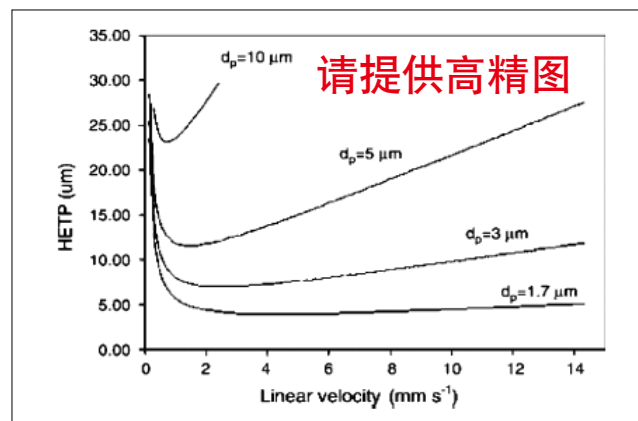
但是，更小颗粒的使用所要求的压力要比传统高效液相色谱系统大得多（> 6,000磅/平方英寸）。沃特世 Acquity 超高效液相色谱系统是第一台专门设计用来承受高于一般背压的商用仪器。传统液相色谱中，背压的最大值只有35-40兆帕，具体大小取决于使用的仪器。而超高效液相色谱中，背压的最大值可达103.5兆帕（15,000磅/平方英寸为规范给定值）。经过改造，系统能承受高达15,000磅/平方英寸压力的高压二元泵和自动进样器。样品注入有以下几个特点：速度快、注入量低、残留物可忽略不计、温度控制在4~40摄氏度之间。因此超高效液相色谱分析具有快速和高灵敏度的特点。

使用10毫米长路径、500nL细胞量的纤维光学流式细胞探测器的特点是高采样率、最低色散、高获取率（20-80点

s-1）。系统体积被降到最低，以保证分析的速度、分辨率和灵敏度^{1,2}。

超高效液相色谱系统装有特别设计的内含第二代X-Terra吸附剂的超高效液相色谱柱。该混合材料使用桥接乙烯基硅氧烷-二氧化硅混合结构；颗粒仅有1.7 μm 大小。BEH技术确保了色谱柱在高压状态下以及比第一代X-Terra吸附剂或者传统固相更大的PH值范围内（1-12）保持稳定。Acquity超高效液相色谱柱现有C₁₈、Shield RP₁₈、C₈和苯基固相³三种。

为比较这两种色谱方法的相对性能，我们对12种邻苯二甲酸盐进行了检测。由于具有相容性和软化能力，邻苯二甲酸盐是以PVC为主要原料的产品中应用最广泛的可塑剂⁴。在



HETP (μm)

Linear Velocity (mm s^{-1}) === 线速度 (mm s^{-1})

图1 d_p 、10、5、3和1.7 μm 颗粒的范第姆特曲线

消费品中，例如儿童玩具、儿童护理用品、电缆、PVC地板、水管等家用及工业用器具，应用都十分广泛。近年来，出现了探讨邻苯二甲酸盐在不同基质中分析方法的研究论文。这些方法包括高效液相色谱^{1,5-10}、气相色谱¹¹⁻¹⁷以及气相色谱-质谱联用^{11,17-26}。

虽然有不少文章讨论邻苯二甲酸盐在不同基质中的常规分析，但几乎未见专文探讨使用超高效液相色谱分离邻苯二甲酸盐。本论文旨在探讨研制一种使用超高效液相色谱进行分离的新方法，并将超高效液相色谱和高效液相色谱对12种邻苯二甲酸盐进行的分离结果相对比。

实验用化学制品和试剂

邻苯二甲酸二甲氧乙酯 (DMGP) 购自西格玛 (中国北京)。邻苯二甲酸二丙酯 (DPP) 及邻苯二甲酸二异丁酯 (DIBP) 购自Dr Ehrenstorfer (中国北京)。邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯 (BBP)、邻苯二甲酸二环己酯 (DCHP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP)、邻苯二甲酸二辛酯 (DNOP)、邻苯二甲酸二戊酯 (DAP) 和邻苯二甲酸二己酯 (DHP) 购自Accu Standard (中国北京)。

用于分析的所有溶剂都是高效液相色谱等级的。高效液相色谱等级的甲醇购自飞世尔科技 (中国北京)。纯净水是使用Millipore公司Milli-Q水净化系统制备的。

标准溶液的制备

个别含有1,000–4,000mgL⁻¹的邻苯二甲酸盐母液是在甲醇中制备的。含有每种邻苯二甲酸盐各100mg L⁻¹的工作标准溶液是通过使用甲醇适当稀释母液制备的。

参照标准溶液的制备

用于分析塑料制品的参照标准溶液是通过在50-mL量瓶中小用甲烷溶解5mL标准母液、并用甲烷稀释至一定体积的方法制备的。

色谱

超高效液相色谱是使用沃特世 (中国北京) 带有 PDA 探测器、冷却自动取样器和能够控制分析柱温度的柱式加热炉的 Acquity 超高效液相色谱仪完成的。数据采集和处理使用的是 Empower 软件。注射是在部分回路模式下使用 10- μ L 回路完成的。超高效液相色谱分离是在50毫米 \times 2.1毫米、1.7- μ m 大小颗粒的 Acquity 超高效液相色谱BEH苯基色谱柱 (沃特世) 上进行的，温度设定在45摄氏度。流动相是用甲烷 (成分A) 和水 (成分B) 制备的梯度。1分半后，A 的量从50%增至78%，持续1分钟。然后直线设定，1分钟后 A 增至 100%，持续1分钟。然后回到初始状态，重新平衡 2 分钟。整个运行

表1 12种邻苯二甲酸盐分析的系统适用性数据

| 特征 | 方法 | DMP | DMGP | DEP | DPP | DIBP | DBP | BBP | DAP | DCHP | DHP | DEHP | DNOP |
|----------------------------------|---------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|
| Wh (s) ^a | 高效液相色谱 | 5.05 | 5.53 | 5.32 | 5.53 | 5.24 | 5.29 | 5.29 | 4.66 | 5.02 | 4.66 | 4.28 | 4.07 |
| | 超高效液相色谱 | 2.38 | 2.29 | 1.79 | 1.19 | 1.45 | 1.36 | 1.37 | 1.61 | 1.73 | 2.18 | 1.36 | 1.30 |
| 分辨率 | 高效液相色谱 | – | 2.21 | 4.13 | 9.27 | 8.51 | 1.63 | 2.28 | 7.12 | 3.26 | 3.89 | 7.87 | 2.79 |
| | 超高效液相色谱 | – | 1.55 | 4.77 | 9.63 | 8.10 | 1.57 | 1.66 | 6.60 | 1.57 | 7.29 | 13.96 | 2.31 |
| 拖尾因子 | 高效液相色谱 | 1.07 | 1.09 | 1.06 | 1.14 | 1.06 | 1.02 | 1.04 | 1.05 | 1.06 | 0.99 | 1.05 | 0.93 |
| | 超高效液相色谱 | 1.12 | 1.11 | 1.10 | 1.08 | 1.13 | 1.09 | 1.10 | 1.13 | 1.11 | 1.15 | 1.20 | 1.09 |
| 可重复性, A (相对标准偏差, %) | 高效液相色谱 | 0.50 | 1.27 | 0.75 | 0.88 | 0.67 | 0.47 | 0.77 | 0.95 | 1.37 | 1.24 | 0.52 | 0.63 |
| | 超高效液相色谱 | 0.09 | 1.01 | 0.26 | 0.69 | 0.52 | 0.52 | 0.41 | 0.48 | 1.09 | 0.54 | 0.99 | 0.67 |
| 可重复性, t _R (相对标准偏差, %) | 高效液相色谱 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.03 | 0.03 |
| | 超高效液相色谱 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.05 | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| 分析所用时间(分钟) | 高效液相色谱 | 18.00 | | | | | | | | | | | |
| | 超高效液相色谱 | 7.00 | | | | | | | | | | | |
| 溶剂用量(毫升) | 高效液相色谱 | 18.0 | | | | | | | | | | | |
| | 超高效液相色谱 | 2.8 | | | | | | | | | | | |

a半高峰宽

时间是7分钟。流动相流速是0.4毫升/分钟。系统操作压力初始梯度状态下是7500磅/平方英寸。对混合物的UV检测是以225nm的速度进行的。

高效液相色谱分析是使用配有四元溶剂输送系统、自动取样器和色谱柱加热器的安捷伦（中国北京）1100仪器完成的。混合物是在25摄氏度下、250毫米×4.6毫米、5- μm 大小颗粒安捷伦SB-苯基色谱柱上分离的。流动相是用甲烷（成分A）和水（成分B）制备的梯度。5分钟后，A的量从70%增至85%，然后直线设定，4分钟后A增至100%，持续4分钟。然后回到初始状态，重新平衡4分钟。这样，整个运行时间是18分钟。流动相流速是1.0毫升/分钟。对混合物的UV检测是以225nm的速度进行的。

系统适用性检测

标准溶液分别用超高效液相色谱和高效液相色谱进行了10次分析。分析色谱柱和系统使用适当流速对所有混合物的峰保留时间和系统适用性检测（SST）数据进行了检查。详细结果见表1。对所有混合物的SST数据（半高峰宽、峰拖尾、峰分辨率、峰面积相对标准偏差）和保留时间的相对标准偏差进行了计算。度量标准和接受限度依据相应药典²⁷。

结果和讨论

高效液相色谱和超高效液相色谱方法都是为分离12种邻苯二甲酸盐而研制的。从表1即可看出，超高效液相色谱比传

统的高效液相色谱效率高得多。高效液相色谱方法向超高效液相色谱方法的转变体现在流动相梯度、流动相流速和注入量减少等方面。

从表1所列SST数据可以明显看出：超高效液相色谱中的12种邻苯二甲酸盐的半高峰宽是高效液相色谱中的二分之一，超高效液相色谱所用分析时间是传统高效液相色谱的2/5。从图2可以看出差别很明显。溶剂用量减少了近1/6。两项技术的分辨率和拖尾因子都比较接近。

超高效液相色谱分析的峰面积可重复性相对标准偏差值略好一些。两项技术的保留时间可重复性相对标准偏差值较接近。

结论

本文探讨了一种新研制的用来分离12种邻苯二甲酸盐的超高效液相色谱方法。将高效液相色谱和超高效液相色谱分析进行了对比。超高效液相色谱的突出优势体现在速度、分辨率和灵敏度的改进上。

主要优势在于大大缩短了分析时间，同时减少了溶剂用量。该研究表明分析时间减少了2/5，溶剂用量减少了5/32。分析时间、溶剂用量和分析成本对很多分析实验室来说都很重要。用于优化新方法的时间也大大减少了。使用梯度洗提和方法确认时色谱柱平衡所需时间大大缩短。

灵敏度可以通过研究半高峰宽进行对比。研究发现超高效液相色谱的灵敏度远远高于传统的高效液相色谱。

两项技术的拖尾因子和分辨率等其它SST数据很接近，峰面积可重复性（如相对标准偏差）和峰保留时间可重复性（相对标准偏差）也很接近。均达到规定标准²⁷。

超高效液相色谱的不足之处在于背压比传统的高效液相色谱要高。由于调高色谱柱温度是一个降低系统背压很好的方法，本研究中色谱柱温度设定为45摄氏度。这样，背压高的话也不会产生任何不良影响。

总之，超高效液相色谱与传统的高效液相色谱相比，似乎在速度、灵敏度和分辨率方面获得了极大改进。这预示着未来应用前景广泛。

致谢

感谢中国科技部对该项目（2006BAK10B03和2007JK015）在财政上给予的支持。同时非常感谢沃特世公司为我们提供超高效液相色谱设备和图1中的范第姆特图。

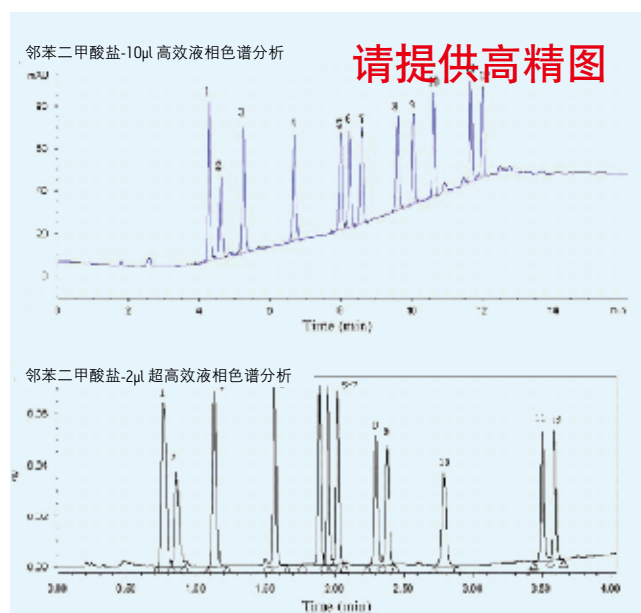


图2 高效液相色谱（最高注入量10- μL ）和超高效液相色谱（最低注入量2- μL ）对12种邻苯二甲酸盐（10毫克/升）分析的对比。色谱峰代码：1 = DMP、2 = DMGP、3 = DEP、4 = DPP、5 = DIBP、6 = DBP、7 = BBP、8 = DAP、9 = DCHP、10 = DHP、11 = DEHP、12 = DNOP

参考文献

- [1] Waters Corporation (2004) Ultra performance LC by design. Waters Corporation USA, 720000880EN:LL. &LW-UL
- [2] Waters Corporation (2004) Acquity ultra performance LC. Waters Corporation, USA, 720000820EN AG-UL
- [3] Waters Corporation (2005) Acquity UPLC columns. Waters Corporation, 7200001140EN
- [4] Ash MI (ed) (1989) Plasticizers, stabilizers and thickeners, Vol 3. Chemical Publishing, London
- [5] Fischer J, Ventura K, Prokes^ˇ B, Jandera P (1993) Chromatographia 37(1/2):47. doi:10.1007/BF02272187
- [6] Castillo M, Oubin^ˆ a A, Barcelo^ˆ D (1998) Environ Sci Technol 32:2180. doi:10.1021/es971042z
- [7] Snell RP (1993) J AOAC Int 76:531
- [8] Dong MW, DiCesare JL (1982) J Chromatogr Sci 20:517
- [9] Silva MJ, Malek NA, Hodge CC, Reidy JA, Kato K, Barr DB et al (2003) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 789:393. doi:10.1016/S1570-0232(03)00164-8
- [10] Mitani K, Narimatsu S, Izushi F, Kataoka H (2003) J Pharm Biomed Anal 32:469. doi:10.1016/S0731-7085(03)00221-8
- [11] Wahl HG, Hoffmann A, Haring HU, LiebichHM (1999) J Chromatogr A 847:1. doi:10.1016/S0021-9673(99)00138-7
- [12] Castillo M, Barcelo^ˆ D, Pereira AS, Aquino Neto FR (1999) Trends Analyt Chem 18:26. doi:10.1016/S0165-9936(98)00066-1
- [13] Nakamura Y, Oohata T, Tsuji H, Ito Y, Tatsuno T, Tomita I (1993) Nippon Hosokakkaishi 2:230
- [14] Peterson JH (1991) Food Addit Contam 8:701
- [15] Teiryck OA, Rosseel MT (1985) J Chromatogr A 342:399
- [16] Marin ML, Jimenez A, Lopez J, Vilaplana J (1996) J Chromatogr A 750:183. doi:10.1016/0021-9673(96)00393-7
- [17] Li X, Zeng Z, Chen Y, Xu Y (2004) Talanta 63:1013. doi:10.1016/j.talanta.2004.01.006
- [18] Petersen J, Breindahl T (2000) Food Addit Contam 17(2):133. doi:10.1080/026520300283487
- [19] Ching NPH, Jahm GN, Subbarayan C, Bowen DV, Smit ALC Jr, Grossi CE et al (1981) J Chromatogr A 222:171
- [20] Sugita T, Hirayama K, Niino T, Ishibashi T, Yamada T (2001) Shokuhin Eiseigaku Zasshi 42:48. doi:10.3358/shokueishi.42.48 (J Food Hyg Soc Japan)
- [21] Tsumura Y, Ishimitsu S, Nakamura Y, Yoshii K, Okuda M, Tonogai Y (2000) Shokuhin Eiseigaku Zasshi 41:254. doi:10.3358/shokueishi.41.254 (J Food Hyg Soc Japan)
- [22] Sjoberg P, Bondesson U (1985) J Chromatogr A 344:167
- [23] Brumley WC, Shafter EM, Tillander PE (1994) J AOAC Int 77:1230
- [24] Earls AO, Axford IP, Braybrook JH (2003) J Chromatogr A 983:237. doi:10.1016/S0021-9673(02)01736-3
- [25] Niino T, Ishibashi T, Itho T, Sakai S, Ishiwata H, Yamada T et al (2002) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 780:35. doi:10.1016/S1570-0232(02)00413-0
- [26] Shen H (2005) Talanta 66:734. doi:10.1016/j.talanta.2004.12.021
- [27] Pharmacopoeia of the People's Republic of China, China, 2005

