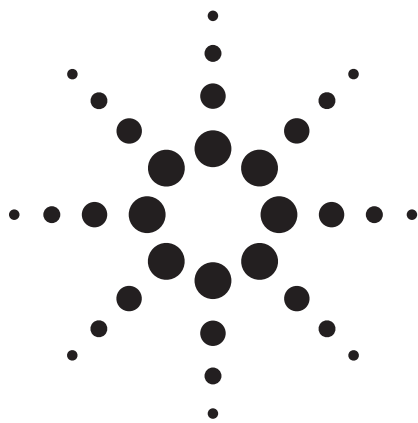


使用具有独特选择性的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱和稳定的键合苯基柱分离潜在的有害偶氮染料



应用

生活日用品

作者

John W. Henderson Jr. and William J. Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

使用具有独特选择性的 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱以及与 MS 兼容的流动相，梯度分离来源于偶氮染料中的九个芳香胺。然后使用一种具有不同选择性的 Agilent ZORBAX StableBond 苯基柱作为第二种液相色谱方法，这两种苯基固定相在化学性能上有明显的差别，从而把它们结合起来可以成功地分离含有苯基的胺类化合物。

前言

您每天使用的彩色生活日用品中很多都含有偶氮染料（染料和色素），这些东西广泛地用于纺织品、皮革、墨水和塑料中，并且常常用在化妆品和食品中。有些偶氮染料会分解形成胺类化合物：



因为生活日用品可能要和皮肤或口腔接触，偶氮染料可能会还原成有毒的胺，许多国家禁止在生活日用品中使用偶氮染料，表 1 中列出一些源于某些偶氮染料的有毒芳香胺，在本研究中将测定它们在血液中的含量。

表 1. 按照欧盟指定 2002/61/EC [1] 绝对不允许在生活日用品中存在的芳香胺

名称	美国化学文摘(CA)号
联苯胺	92-87-5
联苯-4-胺	92-67-1 2
2-萘胺	91-59-8
4-氯-o-甲苯胺	95-69-2
2,2'-二氯-4,4'-亚甲基二苯胺	101-14-4
4-氯苯胺	106-47-8
3,3'-二氯联苯胺	91-94-1
3,3'-甲氧基联苯胺	119-90-4
3,3'-二甲基联苯胺	119-93-7
4,4'-亚甲基二苯胺	101-77-9
4,4'-亚甲基-邻-甲苯胺	838-88-0
4-甲基-间-苯二胺	95-80-7
2-甲氧基苯胺	90-04-0
4-甲氧基-间-苯二胺	615-05-4
6-甲氧基-间-甲苯胺	120-71-8
4,4'-氧二苯胺	101-80-4
4,4'-硫代二苯胺	139-65-1
4-o-甲苯偶氮基-邻-甲苯胺	97-56-3
o-甲苯胺	95-53-4
5-硝基-邻-甲苯胺	99-55-8
2,4,5-三甲基苯胺	137-17-7

含苯基固定相与含甲醇的流动相结合，与含烷基的固定相（如 C8 和 C18）[2] 相比，对芳香胺具有十分不同的选择性，含苯基固定相可用于含苯基结构的分析物，因而对于芳香胺分析来说是首选的固定相。被分离的 9 种胺类化合物，包括苯胺和特殊偶氮染料还原形成的 8 种有毒胺类化合物，图 1 是它们的结构以及在 ZORBAX



Eclipse 苯基己基柱上按下面所述实验条件进行的洗脱次序。

实验部分

HPLC 分析采用 Agilent 1200 快速分离液相色谱 (RRLC) 系统进行:

- G1312B SL 型二元泵, 使用流动相 A: 10 mM 乙酸铵和乙酸的水溶液, pH 4.7; B: 甲醇, 流速 1 mL/min, 梯度为: 初始 25% B, 在 9 min 内提高到 90% B
- G1376C 自动液体进样器 (ALS) SL 进样体积为 2.0 μL
- G1316B SL 型温控柱温箱, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$
- G1315C 二极管阵列检测器 (DAD) 波长为 220, 4 nm Ref=off, 带 G1315-60024 微量流通池(光程 3 mm, 体积 2 μL).

ZORBAX 色谱柱:

- ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱 4.6 mm x 100 mm, 5 μm
- ZORBAX StableBond 苯基柱 4.6 mm x 100 mm, 5 μm

样品瓶: 琥珀色螺口盖
(安捷伦部件号 5182-0716)

样品瓶盖: 蓝色螺口盖
(安捷伦部件号 5282-0723)

样品瓶插管: 100 μL 玻璃/聚合物支脚
(安捷伦部件号 5181-1270)

各种芳香胺购自 Sigma-Aldrich, 并溶解在 MeOH 中, 浓度大约为 1 mg/mL. 然后混合成为试样, 每种胺溶液分别取 100- μL , 然后用水稀释为 1:10 的混合物。

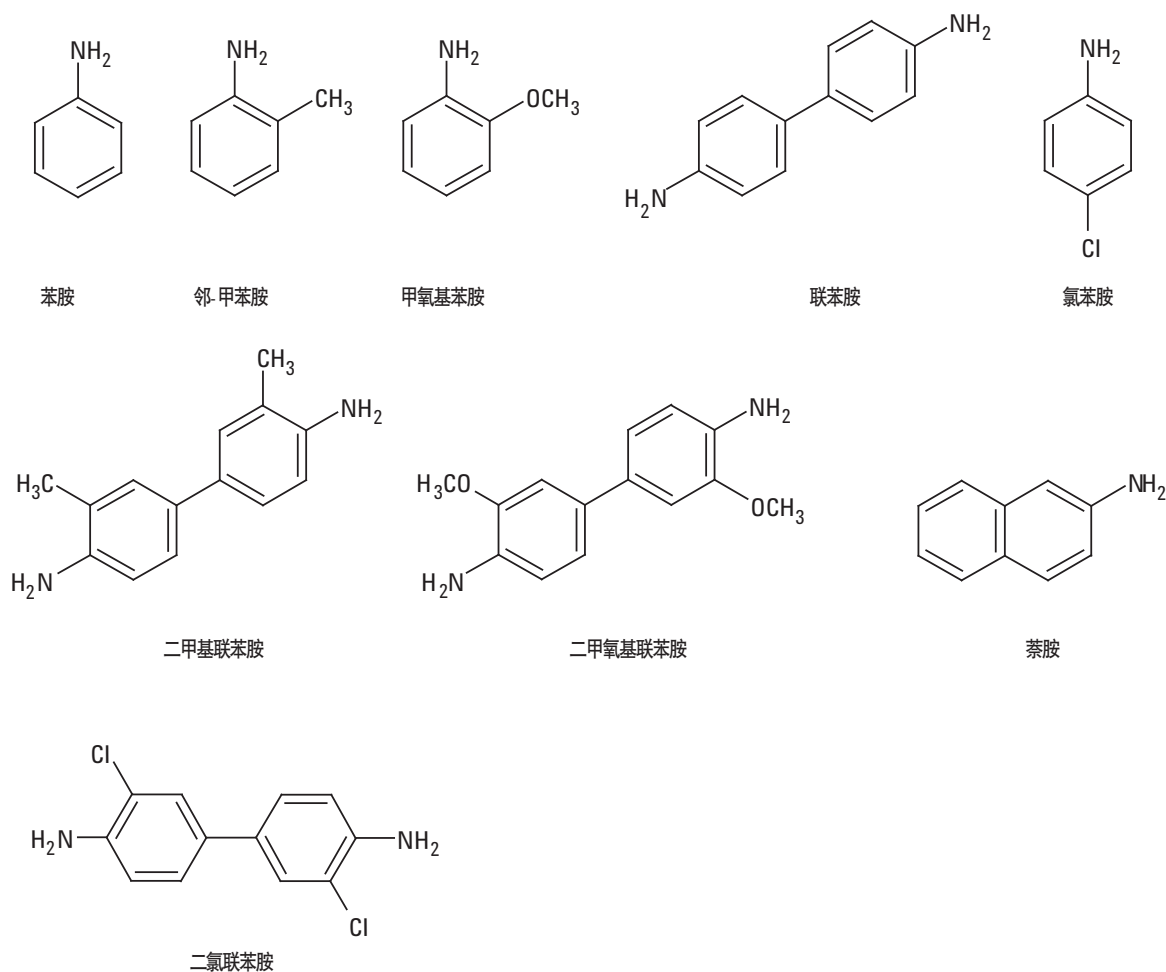


图 1. 芳香胺的结构

结果与讨论

针对不同的胺类化合物可以使用一个最适合的流动相梯度，以使它们在合适的时间里得到最好的分离，我们选择甲醇做流动相的有机组分，这就让被分析物和流动相之间的苯基产生 π - π 相互作用力，甲醇的 π - π 相互作用力要比乙腈强[2, 3]，使用乙酸铵缓冲溶液(pH 4.7)与使用 0.1% 甲酸(pH 2)流动相相比，可以增加胺类化合物的保留时间。胺类化合物的反相分析一般使用 pH > 2 的流动相，因为在低 pH 下铵(NH₄⁺)离子的水溶性更好，这样它就不易在柱上保留。在 pH 5 时形成质子化的 NH₃，可以较好地固定在固定相上保留。由于使用接近于被分析物 pKa 的流动相使峰型变坏并不明显，这可能是由于把梯度集中于被分析物的谱带。缓冲溶液也有挥发性，使其适合于 MS 检测器。

图 2 是在 ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱和 ZORBAX StableBond 苯基柱上分离偶氮染料胺类化合物的色谱图。方法相同，只是色谱柱(固定相)不同。

比较色谱图所有的被分析物都有各自的保留(k')因子,因而就有各自不同的选择性(α)和分离度。甚至一些被分析物有不同的洗脱次序,如联苯胺和氯苯胺,或者二甲氧基联苯胺和萘胺。由于色谱柱之间的选择性不同,使 ZORBA XEclipse Plus 苯基-己基柱和 ZORBAX StableBond 苯基柱成为很好的一对色谱柱,用以分析禁用的偶氮染料胺类化合物,因为许多法规方法中常常需要有两种色谱方法进行确认。使用相同的流动相和方法参数,可以用利用色谱柱切换阀(安装在柱恒温室中的选件),在 Agilent 1200 液相色谱仪上以一个自动程序按次序运行两个方法。

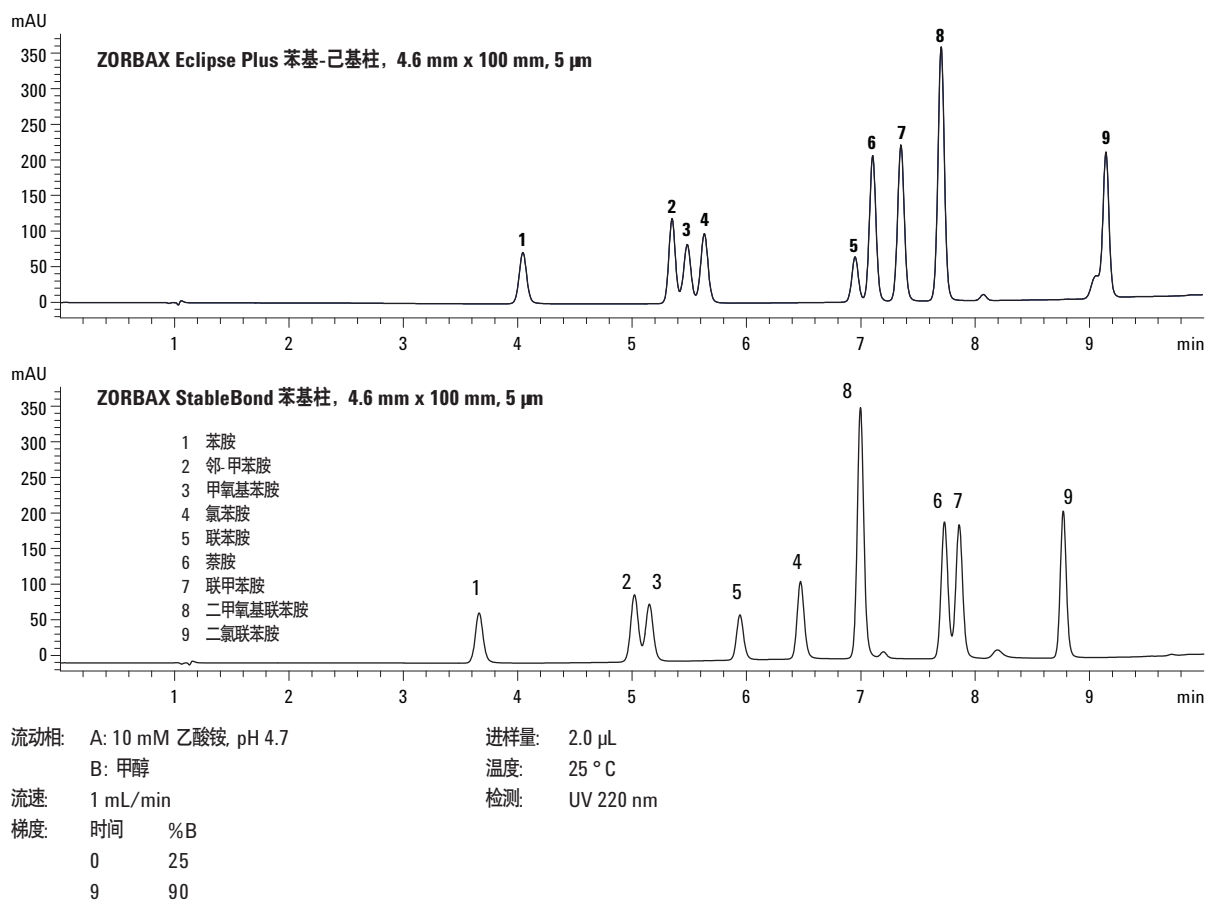


图 2. 在不同的 Agilent ZORBAX 苯基柱上分离芳香胺表现出明显不同的选择性

表 2. 两种 Agilent ZORBAX 苯基柱化学性质的差别会导致选择性的巨大差异

	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱	ZORBAX StableBond 苯基柱
封端	是	无, 但是在硅烷键上有立体的二异丁基基团
苯基连接	己基	丙基
% 碳载量	9%	6%
硅胶基	改进的 B 型(ZORBAX)	B 型(ZORBAX)

两种苯基固定相选择性的不同, 可以用两个因素来解释, (1)碳氢化合物含量和(2)封端的不同, 总结在表 2 中。己基和丙基连接基会影响两种固定相的选择性, 没有封端 SB 固定相连接有二异丙基大的立体基团与苯基己基硅烷上只有小的甲基以及它在硅胶上有浓集的封端相比, 也会影响选择性的差别。总体上对色谱柱就有明显的差别。

结论

ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱和 ZORBAX StableBond 苯基柱是分离含苯基结构的化合物如芳香胺类被分析物的最佳选择。ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱是一种具有特殊性能的色谱柱, 例如己基连接基团和对硅醇基彻底的封端, 这就造成与 ZORBAX StableBond 苯基柱不同的选择性。这些独特的固定相与甲醇流动相的选择性相结合增强了被分析物与固定相苯基之间的化学作用力。

参考文献

1. Opinion on: Report (Final Draft) on “ Assessment of the risks to human health posed by azo colorants in toys, writing inks and paper products, and analysis of the advantages and drawbacks of restrictions on their marketing and use.” Opinion expressed at the 24th CSTEEN plenary meeting, Brussels, 12 June 2001 (http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sct/docshtml/sct_out109_en.htm)
2. M. Yang, et al, “ Impact of Methanol and Acetonitrile on Separations Based on π - π Interactions with Reversed Pphase Phenyl Column,” *J. of Chromatography*, 1097, 124– 129, 2005
3. W. Long and J. Henderson, “ Unique Selectivity and High Throughput Applications of SB-Phenyl RRHT,” 安捷伦科技出版物 5989-6067EN, 2007

附录

可提供的 Agilent ZORBAX 苯基-己基柱

959990-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 4.6 mm x 250 mm
959993-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 4.6 mm x 150 mm
959963-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 4.6 mm x 150 mm
959996-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 4.6 mm x 100 mm
959961-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 4.6 mm x 100 mm
959964-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 4.6 mm x 100 mm
959933-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 4.6 mm x 75 mm
959946-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 4.6 mm x 50 mm
959943-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 4.6 mm x 50 mm
959941-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 4.6 mm x 50 mm
959936-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 4.6 mm x 30 mm
959931-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 4.6 mm x 30 mm
959993-312	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 3.0 mm x 150 mm
959963-312	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 3.0 mm x 150 mm
959961-312	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 3.0 mm x 100 mm
959964-312	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 3.0 mm x 100 mm
959941-312	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 3.0 mm x 50 mm
959701-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 2.1 mm x 150 mm
959763-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 2.1 mm x 150 mm
959793-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 2.1 mm x 100 mm
959764-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 2.1 mm x 100 mm
959746-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 5 μm , 2.1 mm x 50 mm
959743-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 2.1 mm x 50 mm
959741-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 2.1 mm x 50 mm
959733-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 3.5 μm , 2.1 mm x 30 mm
959731-912	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基柱, 1.8 μm , 2.1 mm x 30 mm
820950-938	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基保护柱, 5 μm , 4.6 mm x 12.5 mm (4 个一包)
821125-938	ZORBAX Eclipse Plus 苯基-己基保护柱, 5 μm , 2.1 mm x 12.5 mm (4 个一包)

可提供的 Agilent ZORBAX SB-苯基柱

877250-112	ZORBAX PrepHT SB-苯基柱, 21.2 mm x 250 mm, 7 微米卡套
861954-312	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm , 3.0 mm x 100 mm
863954-312	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm , 3.0 mm x 150 mm
835975-912	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm , 4.6 mm x 50 mm
866953-912	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm , 4.6 mm x 75 mm
863953-912	ZORBAX SB-Phenyl 3.5 μm , 4.6 mm x 150 mm
860975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 2.1 mm x 50 mm
883700-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 2.1 mm x 150 mm
883975-312	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 3.0 mm x 150 mm
880975-312	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 3.0 mm x 250 mm
820975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 4.0 mm x 80 mm (ZGC)
883975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 4.6 mm x 150 mm
880975-912	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 4.6 mm x 250 mm
880975-212	ZORBAX SB-Phenyl 5 μm , 9.4 mm x 250 mm
820950-917	ZORBAX SB-苯基保护柱 5 μm , 4.6 mm x 12.5 mm 4/包 (ZGC)
861753-912	ZORBAX SB-快速分离窄径苯基柱 3.5 μm , 2.1 mm x 100 mm
861953-912	ZORBAX SB-快速分离苯基柱, 4.6 mm x 100 mm, 3.5 μm

如需获得详细信息

如需详细有关我们产品和服务的信息请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦公司对本材料中可能存在的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本文中的信息、说明和规格，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2008

中国印刷
2008年7月10日
5989-8542CHCN