

# 离子对高效液相色谱-磺化四苯基吡啶 光度法同时测定痕量锌和铜的研究\*

雷呈宏 汤福隆\*\* 汤森荣 陈秀华

(杭州大学化学系 杭州 310028)

**摘要** 用TPPS<sub>4</sub>作柱前衍生试剂,寻找试剂与锌(Ⅰ)和铜(Ⅰ)的最佳反应条件,然后在ODS柱上,以乙腈-水体系(24:76, V/V)作流动相,四乙基碘化铵作离子对试剂,在415nm处检测,确立了离子对高效液相色谱-光度法快速分离测定痕量锌和铜的新方法,检测下限( $\times 10^{-9}$ g/mL):Zn 0.10, Cu 0.09。所建立的方法用于花生样品中锌和铜的测定,结果令人满意。

**关键词** 反相高效液相色谱,离子对柱前衍生化,锌,铜,花生

## 1 前言

磺化四苯基吡啶(TPPS<sub>4</sub>)光度法单独测定锌和铜已有报道<sup>[1-3]</sup>,由于它们的配合物的吸收峰很接近,测定时相互干扰严重,若将高效液相色谱(HPLC)与光度分析结合起来,便可建立痕量金属离子的高选择性和高灵敏度的分离分析方法。本文以乙腈-水体系(24:76, V/V)作流动相,四乙基碘化铵(TEA·I)作离子对试剂,建立了离子对高效液相色谱-TPPS<sub>4</sub>光度法快速分离分析痕量锌和铜的新方法。两个元素在8min内出峰完毕,且彼此相互分离,检测下限( $\times 10^{-9}$ g/mL):Zn 0.10, Cu 0.09。此法灵敏、快速、选择性好,适用于花生样品中锌和铜的测定。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

日本岛津LC-6A型高效液相色谱仪,配有SPD-6AV型可调波长紫外检测器,CR-3A型色谱数据处理系统以及SCL-6A型中心控制系统,色谱柱为Shim-pack CLC-ODS(5 $\mu$ m, 6mm i. d.  $\times$  150mm);岛津UV-265型紫外可见分光光度计;pHS-4型酸度计(杭州亚美电子仪器厂)。

TPPS<sub>4</sub>按文献<sup>[4]</sup>制备和提纯,经元素分析分子式为C<sub>44</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>,理论值:C 56.52%, N 5.99%, H 3.23%,测定值C 56.66%, N 5.90%, H 3.23%,并配成 $1.5 \times 10^{-4}$ mol/L水溶液;Zn(Ⅰ)和Cu(Ⅰ)标准溶液分别以高纯ZnO, CuO酸溶配制成1mg/mL溶液,临用时稀释至所需浓度;其

余试剂均为分析纯以上;所用的水为二次重蒸水。

### 2.2 柱前衍生方法

移取Zn(Ⅰ), Cu(Ⅰ)各0.5~3.0 $\mu$ g于25mL棕色容量瓶中,依次加入 $1.5 \times 10^{-4}$ mol/L TPPS<sub>4</sub>溶液1.5mL, pH 4.45的HAc-NaAc缓冲液1.5mL,于沸水浴中加热45min,冷却,稀释至刻度。

### 2.3 柱上色谱分离

以乙腈-水(24:76, V/V)的混合溶剂为流动相,内含50mmol/L TEA·I, 10mmol/L HAc-NaAc,控制溶液酸度为pH 6.4,于415nm处检测,检测器灵敏度为0.00125AUFS,流速为1.0mL/min,手动进样20 $\mu$ L。

## 3 结果与讨论

### 3.1 吸收光谱

TPPS<sub>4</sub>及其锌、铜配合物的吸收光谱见图1。其最大吸收波长分别为414nm, 421nm和413nm。为便于测定,选择415nm作为共同检测波长。

### 3.2 柱前衍生条件试验

**3.2.1 试剂用量的影响** 试剂用量大于1.0mL,反应趋于完全,本文选择试剂用量为1.5mL。

**3.2.2 反应时间的影响** 沸水浴加热30min以上, Zn(Ⅰ), Cu(Ⅰ)与TPPS<sub>4</sub>反应趋于稳定,本文选择加热时间45min,配合物形成后很稳定,放置两天,峰面积不变。

**3.2.3 衍生反应的酸度** Zn(Ⅰ), Cu(Ⅰ)与TPPS<sub>4</sub>反应较易进行,在较低pH值下,水浴加热30min以上,反应趋于完全<sup>[1-3]</sup>,本文控制反应的酸度为pH 4.4。

\* 省自然科学基金资助课题, \*\* 联系人  
本文收稿日期:1993年9月2日,修回日期:1993年11月3日

3.3 色谱分离条件试验

3.3.1 流动相中乙腈含量的影响 各组分的分离情况随乙腈含量而变化,保留值变化较大,选择乙腈含量为24%(V/V),各组分完全分离,且峰形很好。

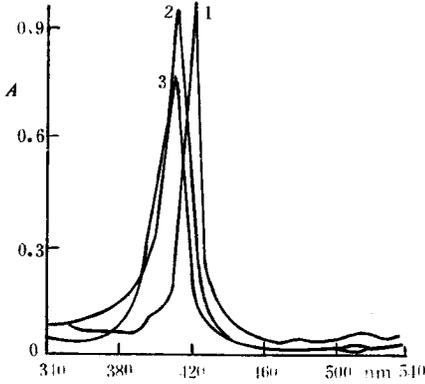


图1 TPPS<sub>4</sub>及其配合物的吸收光谱

1. ZnTPPS<sub>4</sub>, 2. TPPS<sub>4</sub>, 3. CuTPPS<sub>4</sub>,均以水为参比。

3.3.2 流动相对离子浓度的影响 各组分的保留时间随对离子(TEA·I)浓度增加而增加,且呈线性关系,TEA·I浓度越大,各组分的峰形越好,分离度越大。选择含TEA·I浓度为50mmol/L。见图

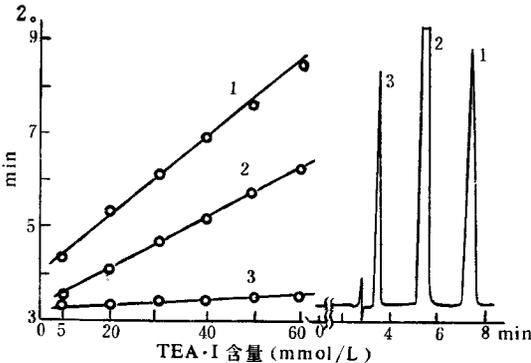


图2 TEA·I含量的影响 图3 TPPS<sub>4</sub>及其配合物色谱图

1. Cu, 2. TPPS<sub>4</sub>, 3. Zn。

3.3.3 流动相酸度的影响 酸度影响试剂的存在形式,从而影响配合物的稳定性,并影响中性离子对形成的平衡移动:  $MTPP(SO_3H)_4 + 4TEA^+ \rightleftharpoons [MTPP(SO_3)_4]^{4-} \cdot 4TEA^+ + 4H^+$  实验表明 pH<5 时,各组分保留时间增加,峰形变差,随 pH 提高,保留时间降低,峰形变好,选择流动相 pH 6.4,分离效果令人满意。

3.3.4 流动相缓冲液浓度的影响 试验表明,当乙酸-乙酸钠缓冲溶液控制在 10mmol/L 时,各组分的

分离效果最好。

3.3.5 TPPS<sub>4</sub>及其配合物的色谱分离图 在本文选择的色谱分离条件下,各组分在 8min 内出峰完毕,且峰形好,峰面积有很高的重现性,见图 3。

3.4 干扰离子的影响

经试验,能与 TPPS<sub>4</sub> 反应的金属离子,如 Co(I), Mn(I), Ni(I), Cd(I), Pb(I), Fe(I), Fe(II), Hg(I) 等在本文选择的条件下不干扰锌、铜的测定。Pd(I) 与 TPPS<sub>4</sub> 生成稳定的配合物,其色谱峰与 TPPS<sub>4</sub> 的峰重叠,因一般试样中 Pd(II) 含量甚微,故不考虑其干扰。常见阴离子,如 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 等也不干扰测定。

3.5 工作曲线

用峰面积定量法绘制工作曲线,线性很好,均通过原点。回归方程如下

$$Zn \quad A = 0.0599 + 1.42C \quad \gamma = 0.9995$$

$$Cu \quad A = 0.0945 + 3.64C \quad \gamma = 0.9993$$

其中 A 为峰面积, C 为浓度(μg/mL)

3.6 样品测定

称取花生样品 4.000g, 按文献<sup>[5]</sup> 消化处理, 定容至 100mL。取 5 份试液按柱前衍生方法进行衍生, 再按色谱分离条件进行分析。利用线性回归曲线换算每克花生样品锌、铜含量。锌、铜标准偏差分别为 ±0.53, ±0.16, 变异系数分别为 1.4%, 1.1%。样品分析的平均结果和回收率试验见表 1。

表 1 花生样品中 Zn, Cu 的分析结果

测定元素	样品含量(μg/g)	试样加入量(μg)	标准加入量(μg)	测定总量(μg)	回收率(%)
Zn	38.75	1.55	0.5	2.03	96
		1.55	1.0	2.54	99
Cu	15.00	0.60	0.5	1.10	100
		0.60	1.0	1.62	102

参 考 文 献

- 1 陈炳荣. 分析化学, 1983, 11(6): 459
- 2 陈炳荣, 熊采华. 分析化学, 1985, 13(9): 695
- 3 石井 一, 佐藤胜彦, 高英 昌. 分析化学(日), 1980, 29: 276
- 4 Fleischer E B, Plamer J M, Srivastava T S *et al.* J Am Chem Soc, 1971, 93(13): 3162
- 5 刘福玲, 戴行均. 食品物理与化学分析方法. 北京: 轻工业出版社, 1987: 274

# 甲酸-异丙醇体系分离蛋白质时甲酸的作用研究

郭立安

(第四军医大学唐都医院生物技术研究中心 西安 710038)

**摘要** 本文在反相高效液相色谱上,用甲酸-异丙醇体系作流动相,研究了甲酸浓度变化对蛋白质分离的影响。结果表明当甲酸浓度增加时,蛋白质的保留时间减小和计量置换模型  $Z$  值的降低反映了甲酸在这个体系中具有洗脱剂的作用。甲酸使蛋白质在流动相中的溶解度增大,具有离子对试剂的作用。在这个体系中甲酸还具有破坏蛋白质结构的功能。

**关键词** 高效液相色谱,蛋白质

## 1 前言

甲酸-异丙醇体系在反相高效液相色谱的流动相中是一种洗脱能力较强的体系,它已成功地用于肽和蛋白质的分离<sup>[1~3]</sup>。然而,甲酸在这个体系中的作用还没有进行充分的研究。本文通过对甲酸在蛋白质分离过程的作用探讨,为蛋白质在多元体系的液相色谱流动相中保留机理的研究提供理论依据。

## 2 材料和方法

### 2.1 实验设备

Backman 公司生产的 334 型梯度洗脱高效液相色谱仪 1 台,反相  $C_{18}$  4.6mm i. d.  $\times$  100mm 柱一根,柱填料孔径为 30nm。

### 2.2 试剂

细胞色素 c(Cyt-c, 马心 III 型),  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶原-A( $\alpha$ -Cty-A, 牛胰腺 I 型)为 Sigma 公司产品,核糖核酸酶(RNase)、胰岛素(Ins)、溶菌酶(Lys)为上海生物化学研究所生产。肌红蛋白(Myo, 马心) Sigma 公司产品。异丙醇和甲酸(88%)为 AR 级,西安化学试剂厂生产。水为二次蒸馏水。

### 2.3 方法

贮备液 A 和 B 之间不同溶液的浓度以及梯度分离过程由仪器控制系统控制。每改变一次流动相用 20 倍柱体积的流动相平衡。在所有测定中,洗脱液流速为 1mL/min,测定波长为 280nm,柱温为 30 $^{\circ}$ C。贮备液 B 为甲酸-异丙醇-水溶液,A 为甲酸水溶液。A 和 B 两液中甲酸浓度相同。(接下页)

\* 本文收稿日期:1993 年 9 月 28 日,修回日期:1993 年 12 月 13 日

(接上页)

## Simultaneous Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Zn(II) and Cu(II) with Meso-Tetra-(4-Sulfophenyl) Porphyrin by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography

Lei Chenghong, Tang Fulong, Tang Miaorong and Chen Xiuhua

(Department of Chemistry, Hangzhou University, Hangzhou, 310028)

Only by heating at pH 4.4 chelating reaction of meso-tetra(4-sulfophenyl) porphyrin (TPPS<sub>4</sub>) with Zn(II) and Cu(II) can be completed. ZnTPPS<sub>4</sub>, TPPS<sub>4</sub> and CuTPPS<sub>4</sub> were separated within 8 min on an ODS column and eluted with acetonitrile-water (24 : 76, V/V) containing 50 mmol/L tetraethylammonium iodide and 10 mmol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 6.4), and detected at 415 nm. The detection limits were 0.1 and 0.09 ( $\times 10^{-9}$ g/mL) for Zn and Cu respectively. This method can be used for the determination of trace Zn and Cu in the peanut sample.

**Key words** reversed-phase high performance liquid chromatography, ion-pair separation, pre-column derivatization, zinc, copper, peanut