维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1991年第16卷第3期

高效液相色谱，四苯基卟啉，镉，锌微量元素

196-200

meso-四苯基卟啉测定微量镉、锌、铅、铜的反相高效液相色谱法研究

中心实验室 邱宗荫
化学教研室 李惠芝

R 446.112

提 要 本文建立了以α、β、γ、δ-四苯基卟啉（TPP）为柱前衍生化试剂同时测定镉（Ⅱ）、锌（Ⅱ）、铅（Ⅱ）、铜（Ⅱ）的反相高效液相色谱法。方法简便、快速、分离效果好、精密度较高，R.S.D在1.9%—5.0%之间，回收率在95.7%—104.0%之间。最低检出量为11pg镉（Ⅱ）、0.33pg锌（Ⅱ）、414pg铅（Ⅱ）、63.5pg铜（Ⅱ）。本方法已试用于正常人全血中四种微量元素的测定，结果较为满意

关键词 α、β、γ、δ-四苯基卟啉；反相高效液相色谱法；镉；锌；铅；铜
中图分类号 R 446.112

生物及环境样品中多种微量金属元素的同时定量测定已成为人们日益关注的课题。其中，金属配合物高效液相色谱-光度分析在近十年内有了明显进展[1]。该方法利用选定的配合剂与样品中的微量金属离子反应，形成金属配合物（柱前衍生），再通过正相或反相柱分离后逐一检出。由于经过色谱分离过程，该法具有多种元素连续测定及检测灵敏度高等优点。

卟啉类试剂因其灵敏度很高，已在金属离子的光度分析中受到重视。近几年，这类试剂已开始用于金属离子的色谱分析中[2,3]。我们曾研究了α、β、γ、δ-四苯基卟啉(TPP)与镉（Ⅱ）、锌（Ⅱ）、铅（Ⅱ）、铜（Ⅱ）的配位反应条件。从结构上探讨了TPP及其金属配合物在反相HPLC中的保留规律[4]。在此基础上，本文建立了用TPP同时定量测定镉（Ⅱ）、锌（Ⅱ）、铅（Ⅱ）、铜（Ⅱ）的反相高效液相色谱法。该方法分离效果好，灵敏度高，简便易行，已试用于血中上述四种金属离子的测定。

实验部分

1. 仪器与试剂

PHS-2型酸度计；岛津LC-6A型液相色谱仪，配用SPD-6AV型紫外—可见检测器，C-R 3A型数据处理系统，色谱柱为Shim-Pack CLC-ODS柱(150mm×6.0mm)；MILLIPORE溶剂过滤系统；CQ 50型超声波振荡器。

TPP按参考文献[5]提示的方法自合成。

TPP溶液：用N，N-二甲基甲酰胺（DMF）配制，浓度为5.0×10^{-4}mol·l^{-1}，溶液可稳定四周。

金属离子溶液：准确称取一定量的纯锌粉（99.99%）、铜粉（99.98%），分别溶于少量硝酸（1+1）中，加热至近干。再加1:1盐酸溶解，蒸干，残渣用DMF溶解定容。再用DMF稀释成5.0×10^{-7} mol·l^{-1}的锌（Ⅱ）溶液和5.0×10^{-4}mol·l^{-1}的铜（Ⅱ）溶液。2.0×10^{-5}mol·l^{-1}的镉（Ⅱ）和2.0×10^{-4} mol·l^{-1}的铅（Ⅱ）溶液分别用其硝酸盐（A.R）以DMF配制而成。

硼砂—硼酸溶液：在0.8mol·l^{-1}硼酸溶液中加入一定体积的0.025mol·l^{-1}硼砂溶液，于酸度计上

维普资讯 http://www.cqvip.com

调至所需pH值。

1.0mol·l⁻¹吡啶溶液：重蒸吡啶加水配成。

DMF用前重蒸。实验中用水均经二次蒸馏。

流动相：甲醇(A.R)、氯仿(A.R)经溶剂系统抽滤后，用前再经超声波脱气处理。

2. 实验方法

金属离子与TPP反应，在经校正的10ml具塞试管中，分别加入镉(Ⅱ)、锌(Ⅱ)、铅(Ⅱ)、铜(Ⅱ)标准溶液，混合后依次加入0.15ml硼砂—硼酸溶液(pH4.8)、0.2ml吡啶溶液和1.5ml TPP溶液。混匀，在沸水浴中加热30分钟。取出，冷至室温，加DMF至5.0ml定容。

金属TPP配合物的色谱分离：采用反相色谱分离条件。固定相为ODS硅胶，粒径5μm。流动相为甲醇—氯仿(87:13, V/V%)，流速1.2ml/min。柱温：30℃。满标：0.16AUFS。进样10μl。检测波长为422nm。记录保留时间和峰面积。

结果与讨论

1. 金属离子与TPP的配位反应

卟啉类显色剂与金属离子配位的反应机理十分复杂，迄今尚未完全研究清楚。一般认为它们与金属离子的反应，主要是金属离子在适宜条件下进入大环的腔孔中与给电子N-原子配位，反应按下式进行：

$$M + H_2P \rightleftharpoons MP + 2H^+$$

H_2P：中性卟啉分子

不同金属离子与卟啉类化合物配位反应的条件，目前只能通过实验确定。根据前文[5]与本文的研究，金属离子与TPP配位反应的定量进行决定于反应介质、催化剂、TPP的用量以及加热时间等因素。

反应介质的种类、用量及pH值会显著影响配位反应。我们曾试验锌(Ⅱ)与TPP分别在醋酸钠-醋酸、Tris-盐酸、硼砂-盐酸和硼砂-硼酸四种介质溶液(pH值均为4.8)中进行配位反应。测得Zn TPP的峰面积($\times 10^{-6}$)分别为2.03、1.47、3.15和6.87。表明配位反应在硼砂-硼酸介质中进行较合适。其他金属离子的配位反应也定在该体系中进行。研究发现，各种金属离子与TPP配位时有其适宜的硼砂-硼酸溶液pH值范围，镉(Ⅱ)为pH 3.7—4.8，锌(Ⅱ)为pH 4.0—5.0，铅(Ⅱ)为pH 3.7—5.0，铜(Ⅱ)为pH 5.5—6.5。

混合离子同时进行配位反应的条件如"实验方法"所述。为照顾多数离子的配位反应，故该条件不完全是单独离子配位时的最佳条件。如反应体系中加入吡啶后铅的峰面积下降，但因吡啶有利于其他离子配位而被采用。介质溶液选用pH4.8时，铜配合物的峰面积有所减小，但其他组分配合物的峰面积最大。硼砂-硼酸溶液的用量为0.15ml时各组分的峰面积较大。加热30分钟可使各反应达到平衡。TPP的用量大于1.0ml时各配合物的峰面积最大且恒定。

2. 流动相的选择

考虑到TPP及金属TPP配合物的水溶性均较差，我们不用反相色谱中常用的甲醇-水，而是选用甲醇-氯仿体系作为流动相。氯仿是良好的质子给与体，对于卟啉类化合物的分离具有较强的选择性。从极性看，甲

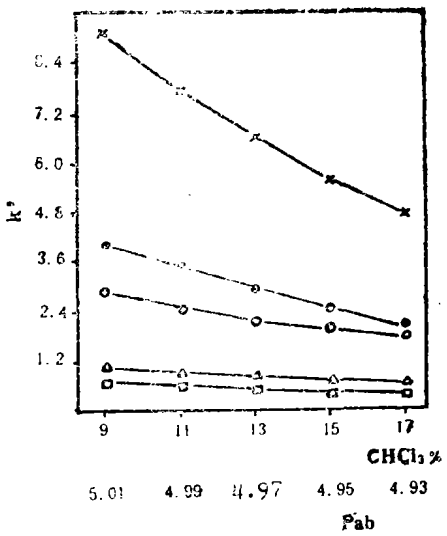


图1 k'与$\phi CHCl_3$的关系

图中：□Cd TPP；△Zn TPP；○Pb TPP；●TPP；×Cu TPP

维普资讯 http://www.cqvip.com

醇的溶剂极性参数P′为5.1，氯仿的溶剂极性参数P′为4.1[6]，二者极性参数之差△P′=1.0。显然，在反相色谱中，氯仿的洗脱能力远较甲醇强。因此，随着甲醇-氯仿体系中氯仿比例的增加，TPP及金属配合物的保留值明显减小。而随着氯仿比例的减小，组分的分离度增加（图1）。实验表明，氯仿比例在13—17%之间较为合适，其对应的流动相极性参数P'_{ab}为4.97—4.93。考虑到为保证组分的基线分离以利于定量测定，本文选用13%（V/V %）的氯仿，可使五种组分在25分钟内全部洗脱，如图2所示。

3. 测定波长的选择

我们曾测得镉(Ⅱ)、锌(Ⅱ)、铅(Ⅱ)、铜(Ⅱ)与TPP配合物的最大吸收波长分别为433、425、465和412nm[4]。为了照顾四种离子的检测灵敏度，检测波长选择在422nm。这一波长对于微量铅的检测不利，因此，若样品中铅含量很低，可在465nm处单独测定铅。

4. 工作曲线

在其他三种离子存在时，分别配制各离子一定浓度梯度的标准溶液。然后按“实验方法”进行，绘制峰面积对离子浓度的工作曲线。结果表明，四种离子的工作曲线皆呈良好的线性，具体数据如表1所列。

5. 重复性、回收率及最低检出量

固定离子浓度，进行五次平行测定，求出R.S.D；在已知浓度标准溶液中加入一定量离子进行测定，求算回收率；以S/N=2时，进样10μl中所含离子量为最低检出量。结果表明，方法的精密度及准确度均较好，在422nm检测时，除铅(Ⅱ)外，其余三种离

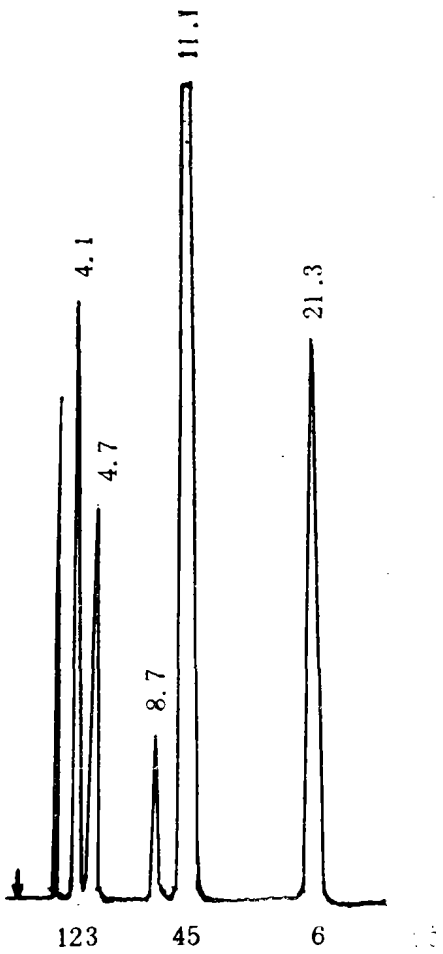


图2 TPP及其金属配合物的色谱图
1. 溶剂峰；2. Cd TPP；3. Zn TPP；4. Pb TPP；5. TPP；6. Cu TPP；Cd(Ⅱ)0.8μmol·l⁻¹，Zn(Ⅱ)0.2μmol·l⁻¹，Pb(Ⅱ)16.0μmol·l⁻¹，Cu(Ⅱ)8.0μmol·l⁻¹

表1 测定镉(Ⅱ)、锌(Ⅱ)、铅(Ⅱ)、铜(Ⅱ)的工作曲线

离子	线性方程（C：浓度μmol·l⁻¹；A：峰面积×10⁻⁴）	线性范围(μmol·l⁻¹)	相关系数
Cd(Ⅱ)	C=0.0908+0.1522A	0.1～24.0	0.9987
Zn(Ⅱ)	C=0.003636+0.01023A	0.02～10.0	0.9986
Pb(Ⅱ)	C=7.3419+6.2875A	1.0～50.0	0.9980
Cu(Ⅱ)	C=1.0887+0.3350A	1.0～48.0	0.9991

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 重复性、回收率及最低检出量

离子	重复性(n=5) 浓度 μmol·l⁻¹	R.S.D	回收率 含量 μmol·l⁻¹	加入量 μmol·l⁻¹	回收率 %	最低检出量 pg
Cd(Ⅱ)	0.8	2.1%	0.8	0.4	96.6 98.3 103.3	11
Zn(Ⅱ)	0.3	1.9%	0.3	0.1	96.0 101.8 104.0	0.33
Pb(Ⅱ)	16.0	5.0%	16.0	4.0	103.6 98.6 99.0	414
Cu(Ⅱ)	8.0	3.1%	8.0	4.0	95.7 96.3 100.3	63.5

表3 共存离子的影响

共存离子	允许量(nmol) Cd(4.0nmol)	Zn(1.5nmol)	Pb(80.0nmol)	Cu(40.0nmol)
Hg(Ⅱ)	40.0	40.0	100.0	120.0
Mn(Ⅱ)	40.0	40.0	100.0	140.0
Ni(Ⅱ)	50.0	20.0	200.0	80.0
Co(Ⅱ)	80.0	20.0	120.0	80.0
Cr(Ⅲ)	80.0	20.0	100.0	100.0
Al(Ⅲ)	74.0	740.0	185.0	740.0
Mg(Ⅱ)	8200.0	8200.0	2100.0	210.0
Fe(Ⅱ)	20.0	200.0	250.0	500.0
Fe(Ⅲ)	40.0	500.0	500.0	500.0
Ca(Ⅱ)	600.0	6000.0	6000.0	6000.0

子的最低检出量均达到pg水平。具体数据见表2。

6. 共存离子的影响

在4.0nmol Cd(Ⅱ)、0.15nmol Zn(Ⅱ)、80.0nmol Pb(Ⅱ)和40.0nmol Cu(Ⅱ)存在下，测定了10种共存离子的最大允许量。以测定结果的相对误差＜±5%时的离子量作为允许量，结果见表3。

7. 人全血中四种离子含量的测定

取全血1.0ml，加约0.5ml浓H_2SO_4，混匀，放置过夜。在电炉上小火蒸干后放入马福炉内加热。先在200℃碳化1.5小时，然后升温至350℃ 3小时，520℃ 5小时至完全灰化。冷后加少量0.1mol·l⁻¹ HCl溶解灰份，再微热将HCl蒸干。用少量水分次溶解残渣，洗入经校正的离心管中(总量5.0ml)。离心后取上清液进行分析。测锌时需适当稀释。为检验方法的可靠性，作样品分析时，用商业部食品检测科学研究所研制的猪肝标准物质同时平行测定，进行对照。血中锌、铅、铜等元素的测定结果如表4。镉因含量很低，未能检出。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表4 样品测定结果

样品号	锌(μmol·l⁻¹)	铅(μmol·l⁻¹)	铜(μmol·l⁻¹)
1	98.46	0.72	6.77
2	95.36	1.35	9.76
3	75.38	1.50	10.87
4	143.08	1.40	14.02
5	140.00	1.35	14.02

参 考 文 献

[1] 袁有宪. 分析化学, 1990, 18(1), 87

[2] 刘恒橡等. 理化检验(化学分册), 1986, 22(2), 118; 22(3), 184; 22(4), 251

[3] 斋藤紘一. 分析化学(日), 1986, 35(11), 895

[4] 曾少波. 重庆医科大学研究生学位论文, 1989

[5] 黄泽兴, 等, 分析化学, 1986, 14(12), 881

[6] 史 坚, 现代柱色谱分析, 上海科技文献出版社, 1988, 339

REVERSED PHASE HPLC FOR DETERMINATION OF TRACE AMOUNT OF CADMIUM(Ⅱ), ZINC(Ⅱ), LEAD(Ⅱ), COPPER(Ⅱ) WITH MESO-TETRA PHENYL PORPHYRIN

Qiu Zongyin, et al

Central Lab.

A new method for simultaneous determination of trace Cd(Ⅱ), Zn(Ⅱ), Pb(Ⅱ), and Cu(Ⅱ) has been developed. The method was based on the reversed phase HPLC of metal α、β、γ、δ-tetra phenyl porphyrin chelate. The relative standard deviations were 1.9%—5.0% and the recoveries were 95.7%–104.0%. The detection limits were 11 pg for Cd(Ⅱ), 0.33 pg for Zn(Ⅱ), 414 pg for Pb(Ⅱ) and 63.5 pg for Cu(Ⅱ) respectively. This method was simple and has been used for simultaneous determination of trace Cd, Zn, Pb and Cu in human blood

KEY WORDS α、β、γ、δ-tetraphenyl porphyrin; Reversed phase HPLC; Cadmium; Zinc; Lead; Copper

(收稿日期 1991-01-05)