

金属卟啉类化合物开管毛细管柱的制备与评价

卢小泉^{*1} 张强¹ 贾正平² 王荣²

¹(西北师范大学化工学院, 兰州 730070) ²(兰州军区兰州总医院, 兰州 730050)

摘要 以锌卟啉、铁卟啉、镍卟啉制备了毛细管电色谱开管柱,以 L 精氨酸、D, L 酪氨酸对其进行了评价,金属卟啉能很好地结合在毛细管内壁,柱效最高达 5.3×10^4 理论塔板数/m,保留时间的 RSD 小于 3%,在所选条件下,用制得的毛细管柱分离了 L 精氨酸、D, L 酪氨酸、L 天门冬酰胺、L 天冬氨酸和 D, L 胱氨酸,结果令人满意。

关键词 开管柱毛细管电色谱, 锌卟啉, 铁卟啉, 镍卟啉, 氨基酸

1 引言

开管柱毛细管电色谱 (open tubular capillary electrophoresis chromatography, OTCEC) 是近年来发展起来的一种新型微柱分离方法。它是在毛细管内壁涂渍或键合一种固定相,使之具有毛细管电泳的高效性和液相色谱的高选择性的特点。开管柱于 1958 年由 Golay^[1] 将其应用于气相色谱,后于 1969 年 Knox 等^[2] 将其引入到液相色谱; Tsuda 等^[3] 于 1982 年首次将开管柱与毛细管电泳相结合,但未应用于实际分析。Preffer 等^[4] 在毛细管管壁键合了聚苯乙烯和苯基甲基硅酮,在流动相中加入离子对试剂,分离了具有相似电泳淌度的物质。Narang 等^[5] 用制得的毛细管电色谱柱基线分离了 6 种苯的氟化物。Hisch 等^[6] 使制备的毛细管内表面形成具有季铵基团的硅膜。文献 [7, 8] 以大环多胺、2, 6-二丁基-环糊精为固定相研究了制备开管毛细管,并对苯胺类化合物、布洛芬等进行了分离。陆豪杰等^[9] 研制了以衍生化聚硅氧烷为固定相的开管毛细管电色谱 (OTCEC) 柱。

卟啉具有独特的结构与性能,近年来在生物化学、医药化学、分析化学与光学催化等各个领域,卟啉化学的研究有了多方面的发展,卟啉的共同结构为卟吩核,能与多种金属形成络合物。Charvatova 等^[10] 用铈卟啉修饰毛细管内壁,分离了多种氨基酸与肽,取得了较好的效果。本研究用锌卟啉、铁卟啉、镍卟啉制备了毛细管电色谱开管柱,以 L 精氨酸、D, L 酪氨酸、L 天门冬酰胺、L 天冬氨酸、D, L 胱氨酸混合体系对其进行了评价。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

P/ACE5000 型毛细管电泳仪 (美国 Beckman 公司); 固定波长紫外检测器,融硅石英毛细管 (37 cm \times 50 μ m i d, 河北永年光纤厂); 0.45 μ m 纤维酯膜过滤器 (上海医药工业研究院); 锌卟啉、铁卟啉、镍卟啉 (本实验室合成,提纯后使用), L 精氨酸、D, L 酪氨酸、L 天门冬酰胺、L 天冬氨酸、D, L 胱氨酸购自上海化学试剂采购供应站试剂厂; 甲醇、氢氧化钠和磷酸盐等均为分析纯,水为二次蒸馏水。

2.2 开管柱的制备

按文献 [11] 合成锌卟啉、铁卟啉、镍卟啉,用二氯甲烷配制成 2.5×10^{-3} mol/L 的溶液。

将毛细管用水冲洗 20 min,再用 2.5×10^{-2} mol/L NaOH 冲洗 20 min,再用水冲洗 20 min,然后分别用甲醇、二氯甲烷冲洗 20 min,通空气干燥 40 min,最后用金属卟啉的二氯甲烷液冲洗 20 min,然后取出毛细管柱,置于烘箱中,在 66 $^{\circ}$ C 下干燥 3 h。毛细管使用之前,分别用水、缓冲溶液冲洗 15 min 后,在所选分离电压下平衡至基线稳定。

2.3 实验方法

2004-06-10 收稿; 2005-02-12 接受

本文系国家自然科学基金 (20275031, 20335030)、教育部高校青年教师奖励计划、西北师大科技创新工程 (KJXC-GC-01) 资助项目

缓冲液为 2.0×10^{-2} mol/L 磷酸二氢钠溶液,用磷酸调至 pH 值为 2.25,在紫外 200 nm 处进行检测,分离温度为 25℃,压力进样为 6 s,分离电压为 18 kV,缓冲液使用前均用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,并用超声波脱气,两次分析之间分别用 2.5×10^{-2} mol/L NaOH、水和缓冲液各冲洗毛细管 5 min。

3 结果与讨论

3.1 柱的评价

3.1.1 柱的内表面观察 去除毛细管内表面的硅胶涂层,放在 15 倍的光学显微镜下观察,空管柱的内表面非常光滑,透光性较强,管腔清晰;而用金属卟啉修饰的毛细管柱管腔明显变暗,详见图 1。

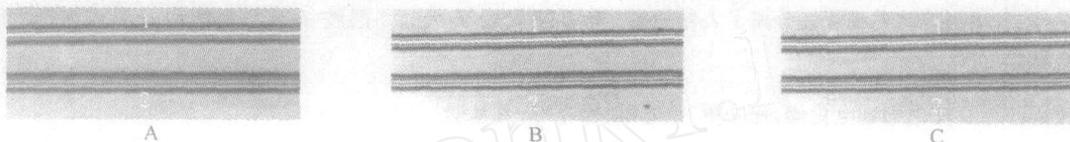


图 1 空白毛细管柱及锌卟啉、铁卟啉、镍卟啉修饰的毛细管柱在光学显微镜下的观察图

Fig 1 The picture of blank silica capillary column, Zn tetraphenylporphyrin (TPP) capillary column, FeTPP capillary column and NiTPP capillary column in microscope

A. 锌卟啉修饰毛细管柱 (ZnTPP capillary column); B. 铁卟啉修饰毛细管柱 (FeTPP capillary column); C. 镍卟啉修饰毛细管柱 (NiTPP capillary column); 1. 空白毛细管柱 (blank silica capillary column), 2. 修饰后的毛细管柱 (modified capillary column)。

3.1.2 焦耳热效应 焦耳热效应可产生温度梯度,从而引起流速梯度,导致谱带变宽,在 OTCEC 中,为获得较高的柱效,一般采用内径较细的毛细管柱。为了便于制备与检测,实验采用内径为 $50 \mu\text{m}$ 的毛细管柱,柱长 37 cm,流动相为磷酸盐缓冲液。图 2 表明,在 8 ~ 18 kV 内,镍卟啉、铁卟啉与锌卟啉修饰的毛细管柱电压与电渗流有良好的线性关系。线性关系式分别为 $y = -2.6857 + 3.5143x$, $y = -4.5619 + 3.1714x$, $y = -12.0476 + 3.7857x$,相关系数分别为 0.9980, 0.9991, 0.9962,说明在此范围内,焦耳热效应可以忽略。但随着进样次数的增加,电渗流的值有减少现象。

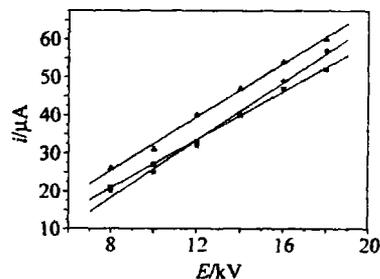


图 2 电渗流与电压的关系

Fig 2 Relation of electroosmotic flow and voltage

(○) tetraphenylporphyrin Nickel (NiTPP);
(□) tetraphenylporphyrin ferrum (FeTPP);
(△) tetraphenylporphyrin Zine (ZnTPP)。

3.2 开管柱的保留值、峰面积和柱效及其重现性

OTCEC 中没有填料与塞子,因而没有涡流扩散,可以获得比填充毛细管电色谱 (PCCEC) 更高的柱效,实验选用 pH 2.25 的流动相,以 L 精氨酸、D, L 酪氨酸评价 3 种开管柱的性能,其迁移时间 t_R ,峰面积 S 与柱效 N 的平均值与重现性见表 1,柱效的计算以理论塔板数 $N = 5.54 (t_R / W_{0.5})^2$ 计算。从表中数据可看出,连续运行 3 次,迁移时间 t_R 的 RSD 均小于 3%, t_R 没有明显的下降,说明固定相损失很少,可以在 pH 2.25 的条件下运行。

表 1 修饰柱的保留时间、峰面积和柱效及其重现性 ($n=3$)

Table 1 The reproducibility of migration time, peak area and column efficiency ($n=3$)

化合物 Compound	迁移时间 t_R (min) Migration time	RSD (%)	峰面积 Speak area	RSD (%)	柱效 Column efficiency	RSD (%)	
镍卟啉 (NiTPP)	L 精氨酸 L-Arginine	4.27	0.44	44897.33	11.99	24733	11.64
	D, L 酪氨酸 D, L-Tyrosine	18.63	1.20	32568.12	11.26	27961	3.25
铁卟啉 (FeTPP)	L 精氨酸 L-Arginine	4.54	0.81	45230.67	14.51	22188	12.56
	D, L 酪氨酸 D, L-Tyrosine	18.53	2.96	33387.67	11.22	18915	9.76
锌卟啉 (ZnTPP)	L 精氨酸 L-Arginine	3.85	0.50	43524.67	8.17	28644	6.62
	D, L 酪氨酸 D, L-Tyrosine	9.03	0.59	36173.33	1.21	53011	3.63

3.3 在 5 种氨基酸分离中的应用

用所制备的卟啉修饰柱分离了 *L* 精氨酸、*D, L* 酪氨酸、*L* 天门冬酰胺、*L* 天冬氨酸和 *D, L* 胱氨酸 (如图 3 所示)。从图 3 可看出,铁卟啉与镍卟啉可明显提高 5 种氨基酸的分离效果。

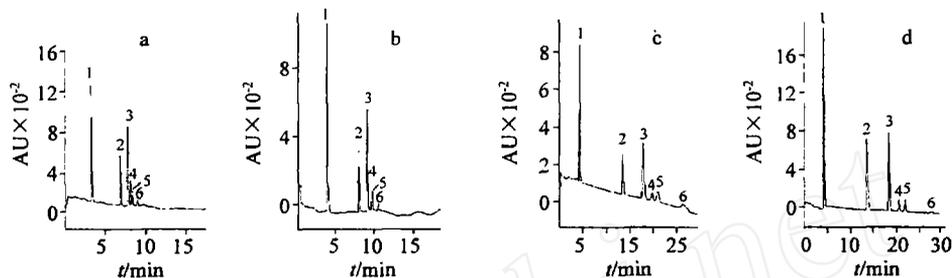


图 3 *L* 精氨酸、*D, L* 酪氨酸、*L* 天门冬酰胺、*L* 天冬氨酸、*D, L* 胱氨酸在空白毛细管柱及锌卟啉、铁卟啉、镍卟啉修饰的毛细管柱的分离图谱

Fig 3 Electropherograms of the separation of *D, L*-Arginine, *L*-Tyrosine, *L*-asparagines, *L*-asparagic acid and *D, L*-cystine in blank silica capillary column, ZnTPP capillary column, FeTPP capillary column and NiTPP capillary column

a 空白毛细管柱 (blank silica capillary column); b 锌卟啉修饰毛细管柱 (ZnTPP capillary column); c 铁卟啉修饰毛细管柱 (FeTPP capillary column); d 镍卟啉修饰毛细管柱 (NiTPP capillary column)。1. *L* 精氨酸 (*L*-arginine); 2. *L* 天门冬酰胺 (*L*-asparagines); 3. *D, L* 酪氨酸 (*D, L*-tyrosine); 4, 5. *D, L* 胱氨酸 (*D, L*-cystine); 6. *L* 天冬氨酸 (*L*-asparagic acid)。缓冲液 (running buffer): 2.0×10^{-2} mol/L NaH_2PO_4 (pH = 2.25)₄; *T*: 25 °C; 压力进样 (press injection): 6 s; 分离电压 (separation voltage): 18 kV。

3.4 对溶质间分离因子的影响

在 pH = 2.25 的流动相条件下,观察了 4 种柱子对 *L* 精氨酸、*L* 天门冬酰胺、*D, L* 酪氨酸间分离因子的影响 (= 后洗脱成分的保留时间 / 先洗脱成分的保留时间)。表 2 列出了在此条件下 3 个 值的比较,对于空管柱,分离度仅由电渗流来决定,而对于 3 种金属卟啉修饰柱的分离因子,不仅与电渗流有关,还与卟啉与毛细管壁的键合反应有关,因为如果分离因子仅仅由于电渗流不同,在给定的分离条件下,每一对溶质的 值在 4 根柱子上应该是相同的。

表 2 不同的柱子间物质的分离因子

Table 2 The separation factor of different columns

分离因子 Separation factor	空毛细管 Blank silica capillary column	锌卟啉修饰 ZnTPP capillary column	镍卟啉修饰 NiTPP capillary column	铁卟啉修饰 FeTPP capillary column
	2.40	2.35	4.37	4.08
	1.85	2.08	3.22	3.08
	1.11	1.13	1.36	1.33

4 结 论

采用金属卟啉涂布在毛细管内壁,以 *L* 精氨酸、*D, L* 酪氨酸对 3 种开管柱的评价表明,在 pH = 2.25 的磷酸缓冲液中,在适当的运行次数下,固定相的损失很少,但随着运行次数的增加,电渗流值减少;修饰柱对 5 种氨基酸的分离表明,金属卟啉修饰的毛细管柱同空管柱相比有明显不同的保留特性。另外在毛细管柱内表面涂渍不同的金属卟啉,其分离能力也不同。

References

- Golay M J E. *Gas Chromatography*. New York Academic Press, 1958: 1 ~ 13
- Knox J H, Gibert M T. *J. Chromatogr.*, 1969, 186: 614 ~ 621
- Tsuda T, Nomua K, Nakagawa G. *J. Chromatogr.*, 1982, 248(2): 241 ~ 250
- Preffer W D, Yeung E S. *J. Chromatogr.*, 1991, 557(1-2): 125 ~ 132

- 5 Narang P, Colon L A. *J. Chromatogr A*, **1997**, 773: 65 ~ 72
- 6 Hiseh Y C, Lin Y H, Yang J S, Wei G T. *J. Chromatogr A*, **2002**, 952: 255 ~ 274
- 7 Wang Y C, Zeng Z R, Guan N, Cheng J K. *Electrophoresis*, **2001**, 22: 2167 ~ 2172
- 8 Zeng Zhaonui(曾昭睿), Xie Chuanhui(谢传辉), Wang Yuanchao(王园朝), Guan Na(管娜). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2001**, 22(7): 1108 ~ 1110
- 9 Lu Haojie(陆豪杰), Ou Qingyu(欧庆瑜). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*, **2002**, 23(1): 30 ~ 33
- 10 Charvatova J, Deyl Z, Kasicka V, Kral V. *J. Chromatogr A*, **2003**, 990 (1-2): 159 ~ 167
- 11 Yang Biao(杨彪), Liu Yun(刘云), Xiao Debao(肖德宝). *Fine Chemical(精细化工)*, **1998**, (15): 52 ~ 55

Preparation and Evaluation of Metal Tetraphenylporphyrin for Open Tubular Capillary Electrochromatography

Lu Xiaoquan^{*1}, Zhang Qiang¹, Jia Zhengping², Wang Rong²

¹ (Department of Chemistry, Northwest Normal University, Lanzhou 730070)

² (Lanzhou General Hospital of the People's Liberation Army, Lanzhou 730050)

Abstract A series of novel open-tubular capillary electrochromatographic column were prepared by coating with tetraphenylporphyrin zinc, tetraphenylporphyrin iron and tetraphenylporphyrin nickel respectively and evaluated by mixtures containing *L*-arginine and *D, L*-tyrosine. The results showed that the metal tetraphenylporphyrin was well bonded inner wall of capillary. The efficiency reached up to 5.3×10^4 . The relative standard deviation (RSD) of migration time was less than 3%. Under the optimum conditions, *L*-arginine, *L*-asparagines, *D, L*-tyrosine, *D, L*-cystine and *L*-asparagic acid were separated successfully.

Keywords Open-tubular capillary electrochromatography, tetraphenylporphyrin zinc, tetraphenylporphyrin iron, tetraphenylporphyrin nickel, amino acid

(Received 10 June 2004; accepted 12 February 2005)

《化学修饰电极》修订版问世

《化学修饰电极》一书于 1995 年出版以来,受到相关领域广大读者的欢迎。随着 21 世纪科技的迅猛发展,如超分子化学、分子自组装和纳米诸多新技术等引入化学修饰电极领域,极大地推进其研究迈向更高水平,紧密与仿生、微型化相联,其研究和应用意义重大。结合国际上的发展趋势和电分析化学国家重点实验室的研究实践,出版了《化学修饰电极》修订版。

《化学修饰电极》修订版增加了“分子自组有序膜”一章,重点论述了分子自组装的基本原理和实验方法,不同基底电极上单层膜、多层膜、双层磷脂膜以及纳米有序膜的制备、表征及应用。该书反映了化学修饰电极领域的研究前沿,具创新性和代表性。

《化学修饰电极》修订版作为《中国科学院研究生教学丛书》,可供从事分析化学、物理化学、电分析化学及相关边缘学科工作者研究和教学参考。

《化学修饰电极》修订版于 2003 年 2 月由科学出版社(北京市东黄城根北街 16 号 邮编 100717)出版,共一百万字,订价 62 元。