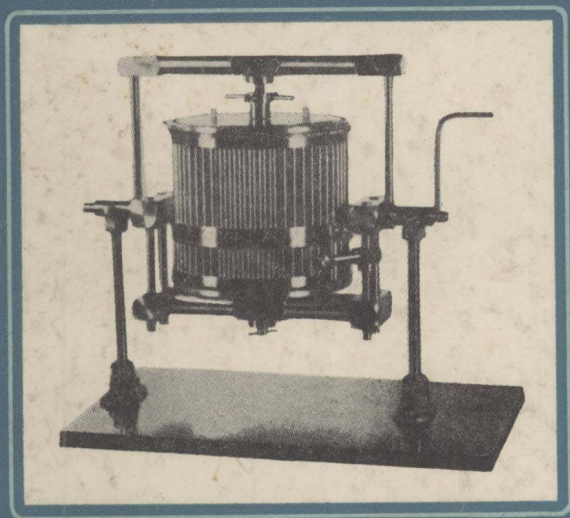


仪器分析

及其在生理科学中的应用

第 二 册



科学出版社

仪 器 分 析

及其在生理科学中的应用

(原名: 仪器分析及生物化学实验法)

第 二 册

刘培楠 梁植权 宋振玉 重 編
梁晓天 周同惠 金大勋

科 学 出 版 社

1 9 6 5

内 容 简 介

本书是《仪器分析及生物化学实验法》的增订再版,介绍一些常用实验方法的使用原则。对第一版各章都进行了补充、修改或重写并新增了十七章,第一版为一册,再版分册出版。第二册介绍色层分离法、离子交换法等九种实验仪器的构造和实验方法的原理。可供生物化学、生理、生物物理、免疫、遗传、实验生物学等研究及教学人员参考。

仪器分析及其在生理科学中的应用

(原名:仪器分析及生物化学实验法)

第 二 册

刘 培 楠 等 重 编

*

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街 117 号

北京市书刊出版业营业许可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1957 年 10 月第 一 版 开本:850×1168 1/32

1965 年 8 月第 二 版 印张:10 7/8

1965 年 8 月第六次印刷 插页:3

精装:0,001—1,500 字数:291,000

平装:6,712—8,211

统一书号:13031·2162

本社书号:3294·13-10

定价:[科六] 精装本 2.20 元
平装本 1.70 元

第二冊目錄

11. 色层分离法	周同惠(1)
12. 离子交換法	周同惠(40)
13. 紙上色层法	任梅軒 周光宇(88)
14. 薄层层离法	章育中(120)
15. 气体色层法	周同惠(161)
16. 反流分布法	宋振玉(209)
17. 超微量定量分析	施履吉(228)
18. 組織培养法	呂家鴻(254)
19. 微生物分析法	楊光圻(287)
索引	(341)

11. 色 层 分 离 法

周 同 惠

前言

色层分离法的定义与分类

一、定义

二、分类

吸附层离法

一、概论

二、前缘分析法

三、取代扩展法

四、洗脱法

五、吸附剂

(一) 要求

(二) 类别

(三) 选择

(四) 处理

(五) 标化

(六) 回收

六、溶剂与洗脱剂

分配层离法

一、概论

二、分配系数与比移值

三、支持剂

四、固定相液体

五、流动相与溶剂

设备与操作

一、仪器

二、操作

(一) 层离柱的填装

(二) 加样与洗脱

(三) 流出液的处理

色层分离法的应用

一、将混合物分离为单个组分

二、化合物之精制提纯

三、物质纯度的检查

四、自稀溶液中吸取浓缩某些微量成分

五、定性试验

六、定量分析

七、一些物理化学常数的测定

八、分子结构的测定

其他有关方法

一、泡沫层离法

二、沉淀层离法与络合物层离法

三、凝胶过滤法

参考文献

前 言

色层分离法这个名称是由“Chromatography”一詞翻譯而来的。在我国,这个方法的命名尚未得到統一,有人叫它做“色层分析法”,有人用“色譜法”,簡称时也有“色层法”、“层析法”等等的名

称。因为它本身所包括的主要是分离过程,而没有分析的意义,所以我们认为还是用“色层分离法”更比较恰当一些,简称时则用“层离法”或“色层法”,本文内就采用这个名称。

早在 1903 年,俄国植物学家 Илбер 就研究了許多种吸附剂与溶剂的关系,并且比较了吸附柱与分批吸附的效率。当时他用一个以菊根粉做的吸附柱来研究一些植物的提取物,用石油醚来冲洗这个吸附柱时,植物提取物就分离成为許多颜色带层,排列在柱上,并随着冲洗液以不同速度向下移动。由于这些黄色、绿色色带的分离、显层,他就给这种方法起了“色层分离法”的名称;由二个希腊字 Chroma (色彩) 与 Graphos (写录) 而成。所得到的分离后的这种色柱,就叫做色层谱或色谱图,可简称为色谱。

这个方法虽然在这么早以前就有了开端,但是多年没有什么发展,直到 1931 年 Kuhn 与 Lederer 用氧化铝柱分离了胡萝卜素的两种同分异构体以后,才又受人注意而被采用,由于这个方法特有的优点,很多人进行了研究,试用了許多种化合物、溶剂与吸附剂。最初只用它来分离有色物质,以后又逐渐发展,没有颜色的物质也可用同样方法得到分离,应用范围因之更加广泛。这时的作全是使用吸附剂的“吸附层离法”,是应用各种物质被吸附的强弱不同而达到分离的。到 1941 年 Martin 与 Synge 发明了利用物质在二种不相混溶的溶剂中的分配系数的不同来做分离的“分配层离法”。三年之后,Consden、Gordon 与 Martin 又发明了以纸来代替层离柱,因而又开展了“纸层离法”,应用越来越广,需用的样品量也越来越少,定性定量全可在一张滤纸上进行,用来做混合物的分离与鉴定非常方便,做微量化学、生物化学方面的研究也几乎非此不可。与此同时,层离法也被应用到离子交换方面,名为离子交换层离法,在許多分离工作中也取得了突出成就。1952 年开始出现了以气体为洗脱剂的“气体色层分离法”,在层离的工作上又开展了一个新的广阔的天地,几年的功夫就成为很广泛应用的工具与研究对象。最近几年也看到另一种有较久历史的色层分离方法又重新被人们发展与应用起来,并被名为薄层层离。这許

多层离方法进展全很迅速，到现在每一个方法都已成为独立性的学間，差不多任何有机或无机化合物的混合物都可用这些之中的一个方法来分离成单一组分，又因为操作簡便，大多不需很复杂的设备，或者可以做成自动化装置，所以色层分离法就成为实验室中所最常用的分离与分析的方法，对许多学科的贡献都是很大的。

色层分离法的定义与分类

一、定义

文献上对色层分离法的定义并不很统一，说法略有出入，根据这个方法所包含的内容与特点，用下列词句做为此法的定义可能比较恰当些：

“色层分离法为一种物理的分离方法，利用混合物中各组分的物理化学性质的差别，使各组分以不同程度分布在二个相中，其中一个相为固定的，另一个相则流过此固定相，并使各组分以不同速度移动，从而达到分离”。

二、分类

色层分离法有许多种类，在前面已大略提到，按照上述定义，可根据所用的二个相的性质与操作形式，分类如下：

固 定 相	流 动 相	操 作 方 式	名 称
固体 { 吸附剂 离子交换剂	液 体	柱 型	{ 吸附层离法 离子交换层离法
固体	液 体	薄 层	吸附薄层层离法
液体	液 体	柱 型	分配层离法
液体	液 体	薄 层	分配薄层层离法
液体	液 体	纸	纸层离法
固体	气 体	柱 型	气体吸附层离法
液体	气 体	柱 型	气体分配层离法

为便于区别,有时也叫吸附层离法为“液-固层离法”,分配层离法为“液-液层离法”,而气体吸附层离法与气体分配层离法则分别叫做“气-固层离法”与“气-液层离法”。本章只对柱型操作的“液-固”与“液-液”层离法进行讨论,其他如纸层离、离子交换、薄层与气体等层离方法在以后也都有专章论述。

吸附层离法

一、概论

某些固体物质,如氧化铝、活性炭等,具有吸附性能,可将一些物质自溶液中吸附到它的表面上。吸附力的强弱,亦即吸附的牢固与否,除去吸附剂本身的性质之外,并与被吸附之物质有关。吸附层离法即系利用吸附剂对不同物质的不同吸附力而达到分离的。例如图 1 这种装置,用一根玻璃柱管,下端用棉花或玻璃毛塞住,管内放入一些吸附剂粉末,用一种溶剂润湿后,即成为一个吸附柱,如(1)。然后在柱顶部加入要分离的样品溶液,如(2)。假设样品内含二种成分 A 与 B ,则二者都被吸附剂吸留在柱的上端,形成一个色圈,如(3),图中的虚线是溶液中溶剂前缘到达的地方。样品溶液全部流入吸附剂柱中之后,接着就加入纯的溶剂冲洗, A 与 B 也就随着溶剂的向下流动而移动,最后得到分离,如(4)与(5)。加入的溶剂就叫“洗脱剂”或“显层剂”,冲洗过程叫“洗脱”、“冲洗”、“扩展”或“显层”,管下流出的液体叫“流出液”或“洗脱液”。 A 与 B 所显出的色圈叫做“色带”或“色区”。

在显层过程,加入溶剂来冲洗,管内就连续不断地发生溶解、吸附、再溶解、再吸附的现象。例如被吸附的 A 的粒子被溶剂溶解出来(解吸作用),随溶剂向下移动,但又遇到新的吸附剂颗粒,又把 A 自溶液中吸附提出,后面继续流下的新溶剂又再使 A 溶解而向下移动,这样经过一段时间以后, A 就会向下移动一定距离,这个距离的长短与溶剂及吸附剂二者对 A 的溶解力与吸附力有关。

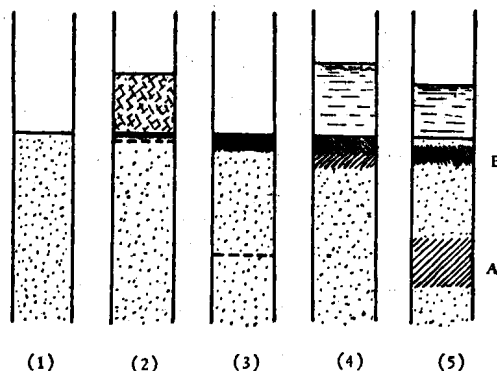


图1 二元混合物之柱层离

按照同样道理, B 也向下移动, 由于溶剂与吸附剂二者对 A 与 B 的溶解力与吸附力不完全相同, A 与 B 移动的距离也就不会相同, 被吸附比较弱的 (图中 A) 也就是比较容易溶出的, 移动的距离也就大些。经过适当的时间与移动后, A 与 B 就可完全分开, 形成二个环带。每一环带内是一种纯的物质, 如果 A 与 B 有颜色, 就可清楚地看到色层。在早期的工作中, 在分成色带以后, 就设法将吸附剂的柱自管中顶出来, 按照色带的位置, 用刀切割开, 然后将这些色带分别处理, 进行下一步的研究, 如用溶剂溶出后, 可进行分析、检定、测定性质与结构、等等。如果样品没有颜色, 也可设法观察或使之显出颜色, 如在紫外光下看荧光位置, 或沿着吸附剂的一侧涂上可与组分反应生成有色物质的试剂等。但是这样的方法, 应用上仍不免要受到许多限制, 以后就有人提出用溶剂继续洗脱, 到组分全部由柱中洗出为止, 这就是“洗脱法”。也有人提出用观察流出液的折光率的变化来确定流出的组分的情况, 并提出了“前缘分析法”与“取代扩展法”(或名“置换显层法”), 这些方法大大地扩大了吸附层离法的实用价值, 任何物质, 不论有无颜色, 都可用层离法来研究了。下面分别对这几种基本操作方法加以说明。

二、前缘分析法 (Frontal Analysis)

这个方法为瑞典的 Tiselius, Claesson 等人所发明, 或称“迎

头法”，特点是自开始就繼續不断地向吸附柱中加入原来的样品溶液，中途并不改換其他溶剂，而連續觀察流出液的性質。他們利用溶液折光率的变化記錄出溶液中組分的浓度，得到連續的曲綫图形。如果溶液中只有单一組分，則得到图 2。溶液开始流經吸附

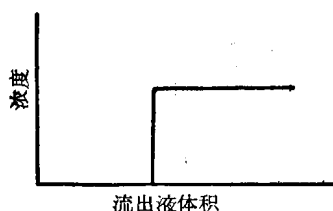


图 2 一种組分的前緣分析

剂时，物質全被吸附，因此流出液为純溶剂，不含溶質，当通过一定体积的溶液之后，吸附剂已达飽和状态，不再能吸附，因此样品开始出現在流出液內，折光率改变，图中出現一个“阶沿”，以后再流出的液体即为原来样品溶液，浓度不再变化，因此就平了下來。自

开始加入样品到有样品組分流出柱外这一段时间內流出的液体体积，是这个組分的“保留容积” (Retention volume)，以 V_R 表示。这个体积內还包含有柱管本身內未通入样品溶液前原来含有的溶剂的量，如将此体积自 V_R 中減去即得“校正的保留容积” V_R^0 ， V_R^0 除以吸附剂的重量所得的数值为“比保留容积”， V'_R ，是用单位重量吸附剂时的保留容积。比保留容积乘上样品溶液的浓度 C ，就得到单位重量吸附剂所吸附的組分量 a ，以公式表示为：

$$a = V'_R C = f(C)$$

可以根据这个公式，用不同浓度的溶液，在相同条件下，通过吸附柱，求出相应的 V'_R 与 a ，然后用 a 与 C 做图，即得到这种組分的“吸附等温綫”，表示組分浓度与被吸附的量之間的关系。吸附等温綫有三种形状(图 3)，一般說来，以图中之(2)型最为普通，此时 V'_R 随溶液浓度之增加而逐漸減小，(3)型比較少見， V'_R 反随浓度之增加而增加，綫性关系的图也还是不多的，此时 V'_R 与浓度无关，图 3 中之(2)、(3)，当浓度很低时也都有近似直綫部分。

表示吸附等温綫的公式也有下列几种：

1. 綫性等温綫
$$a = k \cdot C$$

2. Langmuir 等温綫
$$a = \frac{kC}{1 + l \cdot C}$$

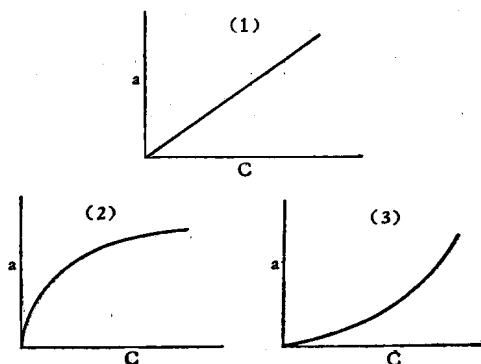


图3 吸附等温线
a: 吸附量, C: 溶液浓度

3. Freundlich 等温线 $a = k \cdot C^n$

式中 k 、 l 与 n 均为常数。为确定所研究的体系遵循那一种等温线,可再仿照图3,将 a 对 C 作图,并再将 C/a 对 $1/C$ 作图, $\log a$ 对 $\log C$ 作图。如 $a-C$ 图为直线,即为图3中之(1),为线性等温线;如 $C/a-1/C$ 图为直线,则遵循 Langmuir 等温线,直线之斜率为 l/k ,与 C/a 轴的交点即为 $1/k$;遵循 Freundlich 等温线公式时, $\log a-\log C$ 作图为直线关系,斜率为 n ,与 $\log a$ 轴相交的值为 $\log k$ 。这样就得到表示吸附等温线的公式了。

当样品溶液中含有二种以上的组分时,按照同法操作,所得到的浓度对流出液体体积的作图就如图4那样,由几个阶沿组成,有几种组分就出现几个阶。开始时与图2相仿,组分全被吸附,流出液只为溶剂,当 $(V_R)_A$ 体积的溶液流过后,吸附剂对被吸附较弱的物质 A 已达饱和状态,因此 A 流出柱外,出现第一个阶,到 $(V_R)_B$ 的溶液流过时,吸附剂对 B 也达饱和,于是 B 也流出,出现第二个阶,最后到 $(V_R)_C$ 流过后,吸附剂对所有

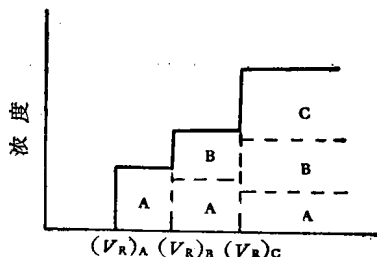


图4 前缘分析图

三个组分全都饱和，流出液与加入的样品溶液相同，出现第三个阶，以后就不再变化。第一个阶内只含组分 A ，第二个阶内含有 A 与 B ，第三个阶内则含 A 、 B 、 C 三者。

从阶的高度(即组分的浓度)看来，则第一阶内只有组分 A ，它的浓度比原溶液中的浓度要高些，因为在通过吸附柱时， A 被吸附较弱，它被第二个组分 B 所排挤取代，所以在这一段内浓度较高。在第二阶内， A 与 B 同时出现， B 的存在影响了 A 的浓度，二者要争夺吸附剂表面，因此 A 的浓度比第一阶内的低些，但由于 C 的取代顶替，这一段内 A 与 B 的浓度仍比原溶液内的浓度要高些。在第三阶内，三种组分同时出现，流出液即为样品溶液， A 、 B 、 C 各自的高度与原样品液中的浓度相同， A 与 B 的高度比在第二阶内又再低一些，是受 C 存在的影响。

由于这个方法的性质，可以看出它不是一个分离混合物的方法，因为只能得到较纯的组分 A ，以后流出的溶液就全是混合物了。但是可以用它来做为分析方法，根据每个阶的高度、各个保留容积、与已知的每个组分的吸附等温线公式，Claesson 推导出一个循环公式，可用来从前一阶内某一组分的浓度计算出下一阶内此组分的浓度。假设组分遵循 Langmuir 等温线，则二相邻阶中组分 i 的浓度之间的关系如下式：

$$C_{i,m+1} = C_{i,m} \frac{1 - \frac{k_i}{k_m} \frac{(V_R^0)_m}{(V_R^0)_{m+1}}}{1 - \frac{k_i}{k_{m+1}}}$$

式中的下角 m 表示第 m 个阶内的情况。

如果混合液中有二种组分，则第一组分的浓度为：

$$C_{1,2} = C_{1,1} \frac{1 - \frac{V_1}{V_2}}{1 - \frac{k_1}{k_2}}$$

由此可求出第二组分的浓度为：

$$C_{2,2} = (C_{2,2} + C_{1,2}) - C_{1,2}$$

式中 $C_{1,1}$ 与 $(C_{2,2} + C_{1,2})$ 分别为第一阶与第二阶的高度 (图 5)。

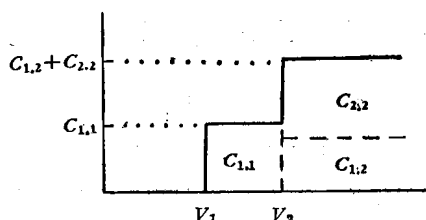


图 5 二组分的前缘分析

如系三元混合物，则可自下列式子解出各个组分的浓度 (图 6)。

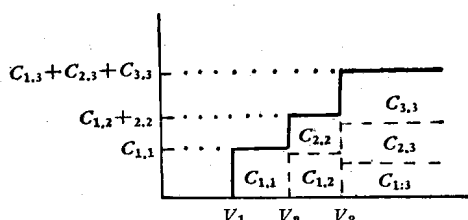


图 6 三组分的前缘分析

$$C_{1,2} = C_{1,1} \frac{1 - V_1/V_2}{1 - k_1/k_2}$$

$$C_{1,3} = C_{1,2} \frac{1 - k_1 V_2/k_2 V_3}{1 - k_1/k_3}$$

$$C_{2,3} = C_{2,2} \frac{1 - V_2/V_3}{1 - k_2/k_3}$$

$$C_{2,2} = (C_{2,2} + C_{1,2}) - C_{1,2}$$

$$C_{3,3} = (C_{3,3} + C_{2,3} + C_{1,3}) - (C_{2,3} + C_{1,3})$$

再复杂的混合物也可按类似方法求出结果，Claesson 曾分析脂肪酸同系物的混合物，试验结果与原来含量相符。Tiselius 也曾发表许多脂肪酸、氨基酸、肽类与糖类的比保留容积，其他化合物如蛋白质、醚类、有机硫化物、醇类等也都被研究过。此法的优点是可应用于分子复杂的化合物的分析，这些物质常是很难分离或难以洗脱的，用此方法可以直接计算含量。缺点是做为分析方法时，要事先对等温线有所了解，并且常需要较精密的仪器，同时图

形有时也不够好,影响结果,再者用这个方法得不到分离与纯品,这些就使得此法的应用受到了限制,不太容易推广。

三、取代扩展法 (Displacement development)

这个方法也叫置换显层法,可简称为“取代法”、“置换法”或“顶替法”,也是由 Tiselius 等人所首创的。方法为在柱的顶端加入小量的样品溶液,然后用一种溶液为扩展剂,这种溶液中含有一种比已被吸附的物质的吸附力全强的物质,名为“取代剂”或“顶替剂”。这样在冲洗过程,就连续发生置换作用,扩展剂中的取代剂因为被吸附力强,就取代了其他组分,而把它们向下顶替。在此同时,样品中的几种组分也因为各自的被吸附力不同,有强有弱,在向下移动时,也一个顶替一个,被吸附牢些的顶被吸附弱些的,这样经过一段距离之后,就按照吸附的强弱,形成许多色带,这些色带紧紧相连,但每一色带中是一种纯的组分,顺序自柱中流出,被吸附最弱的最先出来,最后流出的就是取代剂本身。按照前缘分析法那样,观察浓度与流出液体积的变化,也得到一个含有许多阶沿的图,外表与前缘分析法相似,但每一阶内所含的成分二法不同,前缘分析法除第一阶外,其他各阶内都是几种组分的混合物,而取代法每个阶内只有一种成分(图7)。

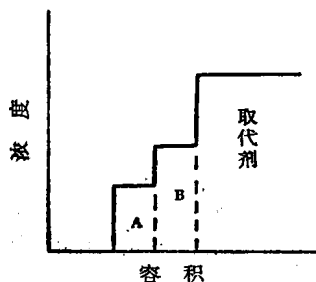


图7 取代扩展

图8中给出取代剂与各个组分的吸附等温线。可以看出,取代剂的吸附等温线必需高于所有组分的吸附等温线,才能将它们全部顶出,否则如果某一组分的等温线反比取代剂的吸附等温线高,那么这种组分就不会被顶替出来。

各组分向下移动时的浓度与取代剂的性质有关。因为到达稳定状态之后,大家向下移动的速度是相同的,都等于取代剂的移动速度,而取代剂在柱管内向下移动的速度取决于它被吸附的情况,亦即取

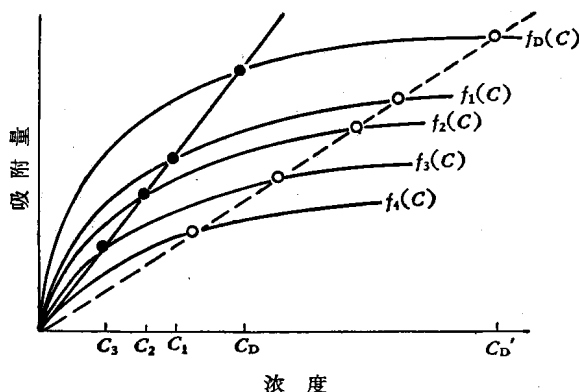


图 8 取代剂与各组分的吸附等温线

决于它的比保留容积 $(V'_R)_D$ 。根据定义：

$$a = V'_R C = f(C)$$

$$V'_R = a/C = f(C)/C$$

既然各組分的移动速度相同，就都应该符合这个关系，即：

$$f_1(C)/C_1 = f_2(C)/C_2 = f_3(C)/C_3 = f_D(C)/C_D = (V'_R)_D$$

式中下角 1、2、3 表示組分数，D 表示取代剂。因此每一組分的浓度应该合乎上式的要求，亦即流出組分的浓度取决于取代剂的浓度。对一种吸附剂，在一給定的取代剂的浓度，每一組分以一特定的浓度流出柱外，此浓度为此組分的特性，与原始浓度无关，因此可以做为鉴定之用。每一阶的寬度又与組分的量成比例，因此可以用校正法求出寬度与含量的关系，或者也可由吸附等温綫求出組分流出时的浓度，再由流出体积计算含量，从而用做定量分析。

Tiselius 給出了一个用图解方法求各組分流出时的浓度的方法（图 8），自原点画一直綫，使与取代剂的吸附等温綫在所用的取代剂的浓度那一点处相交。这条綫的公式应为： $a = (V'_R)_D \cdot C_D = f_D(C)$ ，在这条綫上的任一点都符合 $(V'_R)_D = f_D(C)/C_D$ 这样一个关系，因此这条綫与組分 1、2、3 的吸附等温綫 $f_1(C)$ 、 $f_2(C)$ 、 $f_3(C)$ 相交点所指出的浓度，就分别为这些組分自柱中流出

时所应有的浓度。

还应指出,如果这条线与组分的吸附等温线不相交,如图 8 中之 $f_4(C)$,那么这个组分由于被吸附得很弱,将不受取代剂的顶替,而是自由地流出柱外,单独形成一个峰,如同下面要谈到的洗脱法内所获得的组分峰一样(图 9, 1)。但如果增加取代剂的浓度到一定数值,使由原点做的直线可与 $f_4(C)$ 等温线相交(图 8 中虚线),那么又得到正常的取代扩展的图形了(图 9, 2)。

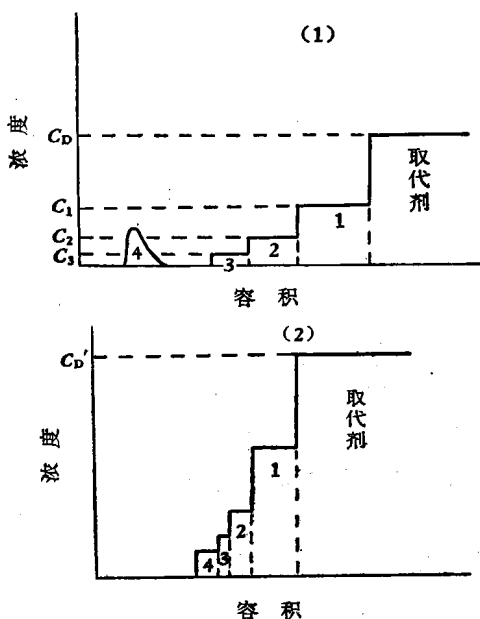


图 9 取代扩展图与取代剂浓度的关系

这个方法可用来做定性定量分析,已如前述。许多物质,如脂肪酸、糖类、饱和烃类、卤代烷、含汞有机物、酯类、不饱和酸、肽类等的分离与定量都被研究过。优点是可以同时得到分析与分离,缺点是各个色带间不一定会象图中所画的那么界限分明,因此分离得不一定完全理想,会引入误差。为便于定量分离,可以加入一种吸附力在二相邻组分之间的物质,以把这二组分隔开,将来可再设法将此加入物质除去而得到二组分较好的分离。这种方法叫做

“载体取代法”，加入的物质就叫做“载体”（Carrier），如分析氨基酸时可选择适当的醇类加入，做为载体，有助于氨基酸的較好的分离。

四、洗脫法（Elution）

这是現在最常用的方法。装好吸附柱后在柱頂端加入小量的样品溶液，随即繼續加入一种溶剂或几种溶剂的混合物来冲洗柱管，在冲洗过程，就会如概論中所說的，各組分因为吸附力不同而逐漸分离，并随溶剂向下移动，最后順序全部流出柱管。如仍照以前二节那样，設法記錄浓度随体积的变化，則会得到如图 10 的曲

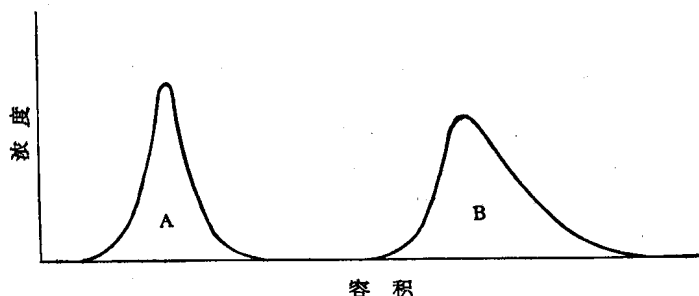


图 10 二元組分的洗脫曲线(液体层离譜)

綫，由一系列的峯所組成，每一个峯相应于一个組分，这样一个图就叫做“液体层离譜”（Liquid chromatogram）。最先出現的峯是吸附力最弱的，以后按照吸附力增加的次序順序流出。先出来的峯比較窄而高，后面流出的峯比較低寬。峯下的面积与含量成比例，因此可以設法測量而做定量分析。用这个方法时，組分的保留容积是由开始加入样品到峯頂出現时的流过体积，也可由此計算比保留容积。

这个方法的优点是在第二种組分出現之前与第一种組分已全部洗脫之后，通常都有一段空白，洗脫液不含任何組分，仅为純的溶剂，因此可以得到純的組分溶液。不象取代扩展法那样，組分彼此相連，而是各个組分可以清晰的分开。所以这种方法是現在做