

仪器分析及生物化学实验法

中国医学科学院編輯

科学出版社

仪器分析及生物化学实验法

中国医学科学院編輯

科 学 出 版 社

1957年10月

內 容 提 要

本書底稿是中国医学科学院在 1955 年年底所办的系統演講講義。內容是介紹給研究工作人員一些常用實驗方法的使用原則，同时介紹了各种實驗儀器的構造和實驗方法的原理，另外还介紹了同位素法、微生物測定法、組織培養法等。

仪器分析及生物化学实验法

(演講集)

中国医学科学院編輯

*

科学出版社出版 (北京朝陽門大街 117 号)

北京市书刊出版业营业許可証出字第 061 号

中国科学院印刷厂印刷 新华书店总經售

*

1957 年 10 月第 一 版

书号 0923 印张 11 7/16

1960 年 1 月第四次印刷

开本 850×1168 1/32

(京) 4,162—5,661

字数: 303,000

定价: (10) 2.10 元

序 言

本書的底稿是中国医学科学院在 1955 年年底所办的系統演講講義。办这个系統演講的目的主要的为了介紹給研究工作人員一些常用實驗方法的使用原則。当时在中国医学科学院里不同單位的研究工作中都在使用着不同的仪器分析方法和生物化学試驗方法，但是这些仪器的構造和實驗方法的原理对于大多数人是生疏的，因此在使用时遇到了困难，很难克服，对于这些仪器的使用範圍也不了解。另外有些試驗方法，如同位素法、微生物測定法、組織培养法等，在文献上时常遇到，但是在学校里沒有学过，就无法体会所閱讀的文章的意义。为了提高学习和工作的效率起見，我們請了一些有經驗科学家給这些年青的研究人員作一次比較有系統的講演。

講題的挑选主要是应用最广，但是在一般化学課程里所沒有的項目。有的試驗方法虽然重要，但应用不广的，如超速离心法、X-光分析法等，或者是在一般化学課程已經講过的，如 pH 測定法等都沒有包括在內，有些方法現在虽然应用的不广，但是有很大发展前途，如紅外線測量法、組織培养法等，也利用这次机会給了适当的介紹。由于同位素的应用是在我国即將广泛展开的工作，因此介紹的比較更詳細些。

在介紹每一个方法时，我們請求講者用簡單的敘述將原理講清楚；說明在使用某一种方法时所当注意的条件、可能遇到的困难及克服的方法以及使用的範圍和其发展趋势。

每一个方法的講演者都是对于所講的题目有多年的工作經驗的科学家，同时他們也了解本院听講人的需要和理解的程度。他

們都很熱心地將自己的經驗介紹出來使听講的人在一个比較短的時間學習了每一種方法的基本知識。他們這樣的勞動得到很大的收穫，在北京許多的高等院校和其他學術研究及技術機構也都有人來听講，並且听講的人數越來越多，外埠又有很多機構向我們要演講講義，以致講義的需要遠遠地超過所預備的。我們感謝科學出版社給予協助，將這分講義出版以滿足各方面的需要。

在演講時因為時間的關係，講義的內容也就不免多少受了一些限制，現在為了出版，我們又請每位演講的科學家將原稿加以適當的修改和補充，但仍不超過原來介紹內容的範圍，否則每一章都很容易擴大到一本專著。

為了讀者在深入研究某一個方法或者某一方法的某一點起見，在每講後面著者都例舉一些比較重要的參考文獻。

這本書是由許多著者分別寫的，在寫的格式和其詳細程度是不可能一致的。由於各章沒有連續性，因此在講的時候也沒有強使其一致。

在這本書每一講的內容里，各位著者都強調良好的儀器和試驗方法對於科學研究工作起了很大的推動效用，但是這些並不是獲得研究成果的主要因素，更主要的是科學家的思考能力。沒有思考能力，即或是有了最新式的儀器，掌握一切技術操作，仍是不會有什麼研究成績的。相反地沒有良好的儀器設備，也可以進行研究工作，只是效率比較低些，工作範圍可能受些限制。實際上科學儀器和試驗方法也是科學家開動腦筋創造出來的；在本書里可以看出有些作者在器材供應困難情形下，自己成功地設計了一些儀器和試驗方法。

在籌辦這個報告的時候，我們得到中國醫學科學院沈其震和白希清兩位院長大力的支持和給予指導，講演의諸位科學家熱情地準備資料和編寫講義，陳志遠和郭兆同兩位同志耐心地校對講義。願借此向他們致謝。

編者 楊恩孚 1956年12月

目 录

序言.....	楊恩孚 (i)
层离法.....	周同惠 (1)
紙型层离法.....	周光宇 (21)
反流分布法.....	宋振玉 (42)
离子交換法.....	周同惠 (58)
电泳法.....	梁植权 (78)
极譜分析.....	周同惠 (105)
光譜光度分析法.....	金大勛 (133)
紅外光譜.....	梁曉天 (157)
同位素法.....	王世真 (174)
Warburg氏压力計法.....	刘培楠 (243)
超微量定量分析.....	施履吉 (267)
微生物分析法.....	楊光圻 (283)
組織培养法.....	呂家鴻 (326)

层 离 法

周 同 惠

引言

原理及分类

一. 吸附层离法

(一)洗脱法

(二)前向分析法

(三)置换显层法

二. 分配层离法

(一)原理

(二) R 值

三. 泡沫层离法

设备及操作

一. 层离柱的装备及操作

二. 吸附剂, 溶剂及洗脱剂

三. 分配层离柱的操作

层离法的应用

一. 吸附层离法

二. 分配层离法

三. 对于有机及无机化合物的应用

参考文献

层离法已往叫做色层分离, 或色谱分离。后面这两个名称是由外文翻译来的, 由名称就可想到许多有颜色的物质一层的分离排列着。事实上这个方法也就是这样的被发明的。经过以后的发展, 没有颜色的物质也可以用同样的方法分离, 我们没有必要将错译错, 因此简单地用“层离”这个名词反而恰当。

在 1903 年苏联的植物学家 Цвет 研究了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, 用挥发油来冲洗这个吸附柱时, 植物提取物就分离成为许多带颜色的层圈来, 排列在柱上, 随着冲洗液渐渐的向下移动。由于这些黄色、绿色色圈的分离显层, 他就给这种方法起了色层分离的名称; 由二个希腊字 Chroma (色彩) + Graphos (图谱) 而成。所得到的分离后的这种色柱, 就叫做色层谱。

这个工作虽然在这么早以前就有了开端，可是多年没有什么发展，直到 1931 年才再受人注意而采用，以后大家发现这个方法有它特有的优点，纷纷的做起研究来，试用了许许多多化合物，溶剂及吸附剂等。这时的工作全是研究吸附分离法，是应用各种物质被吸附性的强弱不同的道理来使它们分离的。到了 1941 年 Martin 及 Synge 又发明了利用物质在二种不相混合的溶剂中的分配系数的不同来做分离的“分配层离法”(partition chromatography)。三年之后 Consden, Gordon 及 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，需用的样品重量也越来越少，定性定量全可在一张滤纸上举行，用来做混合物的分离和鉴定非常方便，做微量化学、生物化学方面的研究也几乎非此不可。近年来又出了一种用离子交换树脂的层离法，这些方法的进展全很迅速广泛，到现在每一部门差不多全都成了独立性的学问；许多有机及无机化合物全可利用这些之中的一个方法来分开。又因为所需用的仪器简单，药品也不复杂，操作简便，也就成为实验室中所常用的分离和分析的方法；对化学的贡献实在是很大的。

原理及分类

一. 吸附层离法

某些物质例如氧化铝、矽藻土等具有吸附性质，吸附力的强弱又随着被吸附的物质而变，吸附分离法就是利用这种吸附力强弱的差别而达到分离的方法。假设有一种装置如图 1 中①，一根玻璃管，下端放些棉花或玻璃毛，管中放些氧化铝的粉末，这样就成了一个吸附柱。再把一个含有二种不同物质 A 及 B 的溶液倒入管内，然后用原溶液所用的溶剂来“冲洗”(elute) 或“显层”(develop)，也就是让溶剂慢慢的流下，二种物质就随着溶剂的流动而逐渐分开。在最初溶液才倒在吸附柱内的时候，A 与 B 全被氧化铝吸附

在柱上层, 如图中②, 点线是溶液中溶剂达到的地方。在加入溶剂来冲洗时, 管中就要連續不断的發生溶解, 吸附, 再溶解, 再吸附的現象。例如被吸附的 *A* 粒子被溶剂溶解出来 (解吸作用, desorption), 就随着向下面流动, 但又遇到新的氧化铝颗粒, 又把 *A* 由溶剂中提出吸附着, 后面繼續流下的新溶剂又再把 *A* 溶解而向下移动, 又再被吸附, 就这样的经过一个時間之后, *A* 就会向下移动一个距离。按照同样的原理, *B* 也向下移动。在經過这許多洗脫和再吸附的作用时, 就由于被吸附性的强弱不同而逐渐发生分离; 吸附性弱的 (图中 *A*) 就比較容易被溶剂溶出, 又因它再被吸附的力量比較弱, 在柱中移动的距离就大些。经过适当距离及時間后, *A* 与 *B* 就可完全分开, 如图中③、④, 成为两个环帶, 每一环帶內是一种純的物質。如果 *A* 与 *B* 有顏色, 就会很清楚的看出色层。在最初的研究中, 就这样把吸附柱取出, 用刀按着色层来分段切开, 再用溶剂提取, 就可做分析了。

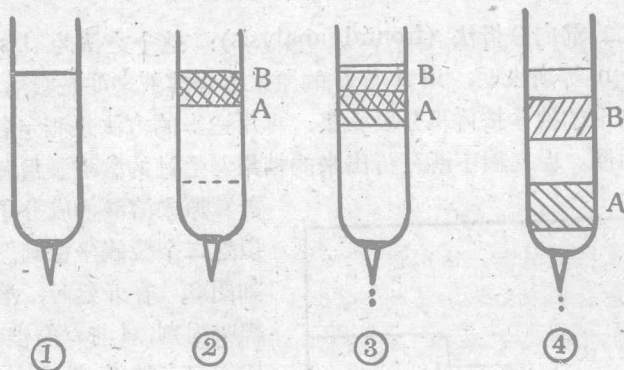


图 1 二元混合物之吸附层离法

后来为了簡便手續, 并且便利于研究沒有顏色的物質, 就設法用溶剂把被吸附的物質由吸附柱上給冲洗出来, 这样的方法有下列几种:

(一)洗脱法 (elution): 这个方法是照上面所说的样子, 继续不停的用纯溶剂来冲洗吸附管, 直到所有被吸附的物质全被洗脱出来为止, 这是层离中常用的一个方法。在洗脱过程中, 吸附力弱的先被冲出, 然后再是吸附性较强的, 一层层的下去, 这样所收集的各种溶液总称为一个“液体层离谱”(liquid chromatogram)。以浓度与洗脱容积坐标画图如图 2。这个方法的优点是在第二种物质流出之前及第一种已全被冲出之后, 通常都有一段空白, 所得的洗脱液为纯溶剂, 因此可以用不同的容器来收集冲洗液, 而得到纯 A 与纯 B 的溶液, 用来做分离与分析的方法全很适宜的, 是现在最常用的方法。



图 2 液体层离谱

(二)前向分析法 (frontal analysis): 这个方法为 Tiselius, Claesson 等所发明, 用 A 与 B 的原来混合溶液来冲洗吸附柱; 自柱中流下的液体按体积分段收集, 再用适当的方法来测定各段溶液的浓度。由连续不断分析出来的结果与通过的溶液数量就可以

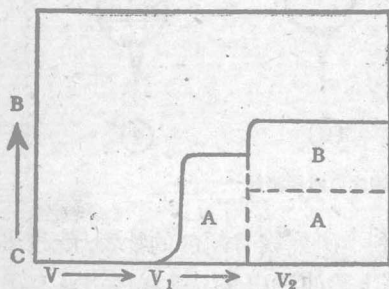


图 3 前向分析法

计算原来溶液的成分了。当以这二个数值坐标画图时就如图 3。在开始时, 溶液流经吸附剂, A 与 B 全被吸附, 所以只有纯溶剂自柱中流出, 不含任何溶质。当 V_1 容积的溶液流过吸附柱后, 吸附剂对吸附力较弱的物质 A 已达饱和状态, 因此 A 就开

始流出柱外,在洗脱液中的浓度增高,并保持一定,直到 V_2 容积的溶液流过,这时吸附剂对 A 与吸附性强的物质 B 全已达饱和状态,因此 B 也开始流出,而以后收集的洗脱液中的成分就与原来溶液的成分完全一样了。在每个成分离开吸附管之前所得洗脱液的容量就叫做该成分的“保留容积”(retention volume),如 V_1 是 A 的保留容积, V_2 是 B 的保留容积。保留容积被吸附剂的重量除,就得到“相对保留容积”。由相对保留容积,洗脱液中浓度的改变及预先测得的该物质的“吸附等温线”(adsorption isotherm) 就可以求出原液的浓度和研究原溶液的混合吸附情况了。计算方法及细则讨论可参照参考文献第 1 及 20 项,不再赘。Claesson 曾分析脂肪酸的混合物,试验结果按此法计算出的样品浓度与原来含量相符。Tiselius 也曾发表许多脂肪酸、氨基酸、肽及糖类的相对保留容积;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到分子复杂的化合物,这些物质常是很难分离的,别的方法不能得到圆满结果,用前向分析法有时会容易些。

(三)置换显层法 (displacement development): 这个方法应用另外一种溶液来作洗脱剂,这溶液内含有一种吸附力较已被吸附物质的吸附力强的物质。这样在冲洗时,它就置换原来被吸附的物质,使之向下移动,依着吸附力强弱的不同,一个代替一个,就把溶液中的混合物分离成为单纯状态,自吸附柱中流出。到最后所有未知物全流出后,再出来的溶液就是洗脱剂本身了。照上面以浓度与容积坐

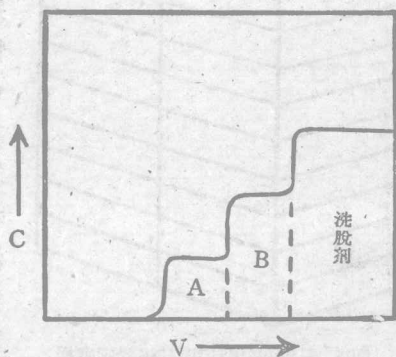


图 4 置换显层法

标画图, 如图 4 所示。

在洗脱剂的浓度保持一定时, 每一曲线的高度依物质之成分而不同, 因此可做定性之用。而每个曲线的宽度又与物质的浓度成正比, 可做定量之用。所以置换显层法是吸附分析中相当好的一个方法。许多物质如脂肪酸、糖类、液体饱和烃、卤化烷、含汞有机物、酯类、不饱和酸、肽等的分离及定量都被研究过, 气体的混合物也可与固体一样的被分离成为个别成分。

二. 分配层离法

(一) 原理

分配层离法是利用分配系数的不同而完成分离手续, 相当于一种连续性的溶剂抽提方法。在实行溶剂抽提时, 加入一种不与原来溶液相混合的溶剂, 振荡之后溶质就分配在这两种溶剂之中; 达到平衡时, 二个溶剂中单位体积内所溶解的物质的浓度比例是一定的, 这个比例就叫做分配系数。分配系数随溶质及所用的溶

剂而不同, 利用几种物质的不同分配系数就可以用溶剂抽提法将他们分开, 这种用溶剂与溶剂互相抽提的方法现在也经过多人研究进展成为一种独立性的技术, 叫做“反流抽提法”(counter-current extraction), 不在此次讨论之内。可是如果我们把其中一个溶剂设法固定在吸附柱上, 再照上面说的方法用另外一种溶剂来冲洗, 所得的结果将是一样的, 并且效率也要更好些。这样的分离不经过吸附程序, 仅由溶剂的抽

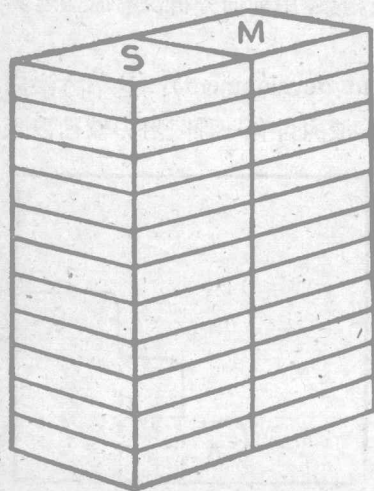


图 5 假想的分配层离柱中的固定相与流动相排列情形

提而完成,所以叫做“分配层离法”。在实用时,仍可采用层离管,管内放进一些固体做为基底物质。这个物质应该能够吸着某种溶剂,使它停留在柱中,不会流出,这个溶剂就叫做“固定相”(stationary phase),基底物质叫做“支持剂”。另外加入不与固定相混合的溶剂来做洗脱剂,又叫做“流动相”(mobile phase)。流动相流经支持剂时;就与固定相发生接触,如有混合物存在时,二相之间就起抽提作用,而能分离。其经过可以下列假想实验说明:假

A		B	
S	M	S	M
1/2	1/2	1/4	3/4

分配一次之后

1/4	1/4	1/16	3/16
1/4	1/4	3/16	9/16

分配二次之后

1/8	1/8	1/64	3/64
2/8	2/8	6/64	18/64
1/8	1/8	9/64	27/64

分配三次之后

图 6 二种物质在固定相与流动相中的分布情形

定图 5 中的二堆在左方的为固定相, 右方为流动相, 二相互相接触而不混合。并再假定每个柱子由若干的小层堆积而成, 溶质可在二相之中交通但并没有在本相中上下移动的可能。这样在 M 柱上加上一层含有 A 与 B 的溶液时, 整个 M 柱就向下移动一层, A 与 B 就与 S 柱第一层接触而按照分配系数分配在 M 与 S 的最高层之间。如果 A 与 B 的浓度全是一, 同时 A 在 S 与 M 之间的分配系数是 $\frac{1}{1}$, B 的是 $\frac{1}{3}$, 那么现在 A 的浓度就是 $\frac{1}{2}$ 在 S 内, $\frac{1}{2}$ 在 M 内, B 的浓度是 $\frac{1}{4}$ 在 S , $\frac{3}{4}$ 在 M 内。这仅仅是第一层内的事, 底下各层不含溶质。假如在 M 柱内再加上一层溶剂, 整个相柱又再向下移动一层, 经过分配作用后, 上面二层内就全有了 A 与 B 。 A 的浓度在两个柱内的两层全是 $\frac{1}{4}$, B 的浓度就不同了: $\frac{1}{16}$ 在 S 第一层, $\frac{3}{16}$ 在 S 第二层, $\frac{3}{16}$ 在 M 第一层, $\frac{9}{16}$ 在 M 第二层内。再在 M 柱上加一层溶剂, M 柱又向下移动一层, 再行分配而上三层内全有了溶质, 分配情形如图 6 所示; 如此继续下去, 加入过七层溶剂之后, 也就是提取 7 次之后, 溶质在 M 与 S 之间的分配情形如表 1:

表 1 提取 7 次后 A 与 B 在固定相与流动相中的分布

层数	S 中		M 中	
	$A \times 2^7$	$B \times 4^7$	$A \times 2^7$	$B \times 4^7$
1	1	1	1	3
2	6	18	6	54
3	15	135	15	405
4	20	540	20	1620
5	15	1215	15	3645
6	6	1458	6	4374
7	1	729	1	2187

可以看出, *A* 与 *B* 最濃的部分已經分开, 經過更多次的分配提取之后, 溶質之分配情形將如图 7。

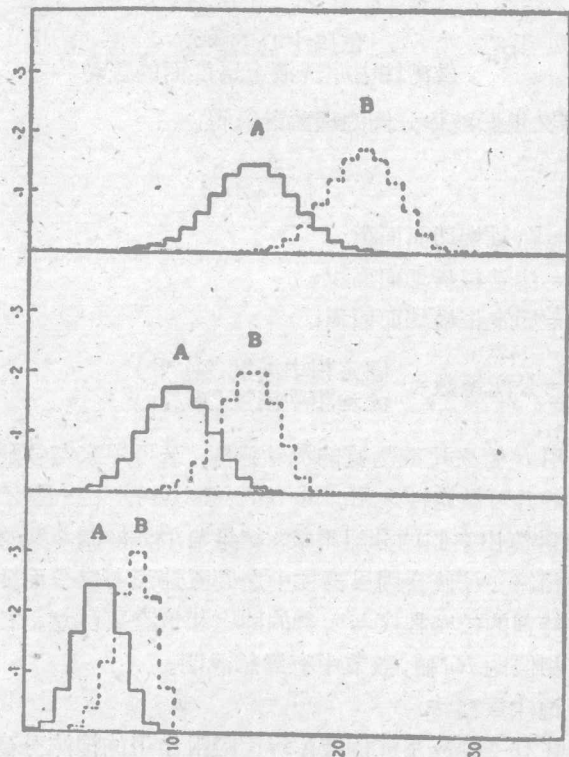


图 7 *A* 与 *B* 随提取次数之增加而逐渐分离的代表图

如此繼續下去, 經過若干次之后, *A* 与 *B* 就可完全分开。在实用时, 溶剂的加入是連續不断的而不是象上面例子那样的一层一层的向下移动。Martin 与 Syngé 在他們的最初实验中, 利用矽膠为支持剂, 与水混合后放入层离柱中, 用含 1% 丁醇的氯仿做为流动相来洗脱, 得以分开一些乙酰氨基酸的混合物。其后許多物質被用来做过試驗, 范围也就越来越广了。

(二) R 值

在层离法中，一般常用“ R ”值来代表某种物质的移动速率，其定义如下：

$$R = \frac{\text{色层中心的移动}}{\text{层离柱中冲洗液上层液面的移动}}$$

Martin 等又根据液体分馏的理论计算得：

$$R = \frac{A}{A_L + \alpha A_S}$$

式中 A = 色层横切面面积；

A_L = 流动相横切面面积；

A_S = 固定相横切面面积；

$$\alpha = \text{分配系数} = \frac{\text{固定相中浓度(克/升)}}{\text{流动相中浓度(克/升)}}$$

这样可以用 R 值来比较物质的流动速率，又可用来与分配系数互相换算，并且可做定性之用。Martin 与 Synge 由一些乙酰氨基酸的 R 值计算出它们的分配系数，结果与用分液漏斗实验所得的数值完全相符。 R 值会因层离柱中之装置情形与成分而变，因此对柱中支持剂的松密程度与所含的固定相量全要注意。在纸层离法中也有相似的 R_F 值，该节中有详细说明。

三. 泡沫层离法

此外还有一种应用气体液体界面吸附作用的泡沫分离法。这个方法是将气体通到一个溶液之中使产生泡沫，泡沫部分就会吸附溶质，与固体吸附剂的作用相似，因此也就可以用以做分离之用了。一般是将要分离的溶液放入层离柱中，从柱的下面通入许多小气泡使溶液生出泡沫，也可能得到与色层分离法相似的泡沫层，也可分别收集各个泡沫层而完成分离。此法曾被用来做为分离细菌的方法，叫做“微浮选法”(micro-flotation)。不过这方面的工作还很少，许多地方还需要有特别的研究和改善。

設備及操作

一. 层离柱的装备及操作

层离法中所用的仪器基本上非常简单，主要的就是一个层离柱，柱的大小依所要分析的物質多少而定，小的不过几个厘米高，大的可以用到生产方面，制备純的物質，可以到达千百升的容积。层离柱長度与寬度的比以在 3:1 到 10:1 之間为宜。柱的下端放一层脫脂棉，玻璃毛，素燒板，或玻璃沙板来支持吸附剂或固体支持剂，簡單裝置如图 8。流动的速度可以减压或加压的方法来

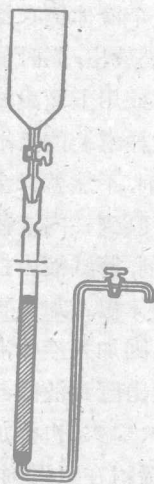


图 8 层离柱



图 9 减压装置

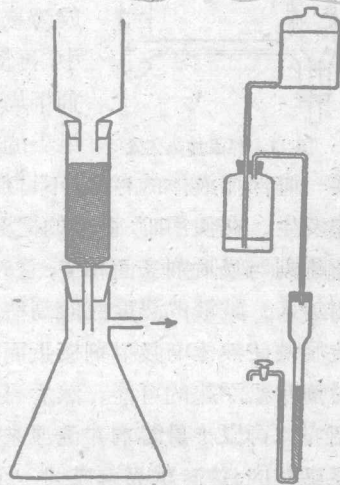


图 10 加压装置

调节，如图 9 及图 10 所示。减压时可將柱的下端經由吸濾瓶連到抽气水泵上，加压时就把柱的上端連到另外一个容器上，再設法加压力到这容器中，如用压缩气体或液体置換方法使容器中气体向层离柱方向移动而加压。在普通操作上，大多是不必需以这种方法来調节流速的。此外如需在較高的溫度进行层离时，可以应用如图 11 的裝置，在层离柱外加上一个有热水或其他液体循环的