

高等农学院校交流讲义

同位素应用方法

(农业生物物理专业适用)

吉林农业大学

1961年6月

序

《同位素应用方法》这本书的基础，是吉林农业大学农业生物物理专业内部使用的讲义。本不拟对外交流。但受农业部暨全国农业生物物理专业教材会议的委托，不容推辞，乃大胆承担，不揣愚陋，修纂成册，暂充教材。

编写在这本书中的基本内容包括：农业生物学中使用示踪原子法的一般方法原则；放射化学分析法；生物生理化学中应用同位素的实验技术及示踪原子法在农学研究中的应用等部分。

根据编者对同位素在生物学和农业上应用方法的体会，主观上试图就上述内容的基本原理、方法技术原则、注意事项及应用途径等给予比较全面的介绍。但是，限于编者知识水平，缺乏经验，再兼时间极为仓促，原意并未完全体现。看来，本书在水平上未必反映了同位素在生物学及农业中应用的最新技术方法，在资料运用上恐有断章取意，在内容上尚嫌支离破碎，在篇幅上也显得有些臃肿。因此，可以肯定的说，质量是不高的，谬误不妥之处是不会少的。然而付稿期限已逾，再无能予以修改和寻求知名人士的指导。不尽之处，文责自负，并且只能待日后有暇再对其修正、充实完善了。

编者殷切的等待着阅读这本书的同志提出宝贵的批评和指正。

吴殿武1961年6月识于长春

目 录

引 言	1
第一章 在农业生物学中应用示踪原子法的 基本依据和特点	3
1. 应用示踪原子法的基本依据	3
2. 示踪原子法的优缺点	4
3. 示踪实验的设计和应注意的事项	5
4. 示踪原子法的应用范围	20
第二章 对生物学实验中使用的放射性制剂的考查、 计算与操作	22
1. 放射性制剂说明书的考查	22
2. 放射性衰变的校正方法	23
3. 开瓶、稀释与分装	30
4. 放射性制剂的放射化学检查	38
5. 实验所需制剂放射性强度的计算	40
6. 放射性示踪实验的工作布置	46
第三章 放射性测量样品的制备	58
1. 样品的收集、称量和干燥	58
2. 灰化	59
3. 测量样品的制备	61
4. 几种常用放射性同位素的样品制备	70
第四章 生物试验样品放射性的测量方法	84
1. 对测量条件的一般要求	84
2. 样品的相对放射性测量	85
3. 样品的绝对放射性测量	88
4. 测量结果精确度的评定和低剂量测量方法	109
第五章 放射线自显影法	119
1. 一般原理和有关的物理原则	119
2. 取得放射线自显影的方法	123

3. 感光片的冲洗 (显影和定影)	131
4. 洗好的底片的观察和解释	133
第六章 稳定性同位素	145
1. 稳定性同位素示踪的方法原理	145
2. 稳定性同位素的分析法	147
3. 稳定性同位素示踪物的样品准备	155
第七章 同位素标记化合物的制备	162
1. 制备标记化合物的一般原则	162
2. 示踪化合物化学合成的基本原则和实例	164
3. 示踪化合物生物合成的基本原则和实例	178
第八章 放射化学分析法	186
1. 载体的使用	186
2. 萃取法	197
3. 离子交换法	212
4. 放射性滴定法	229
5. 放射性沉淀法及其他指示剂法	243
6. 放射化学中的超微量工作方法	246
第九章 在生物化学研究中应用示踪原子法的实验技术	250
1. 放射性纸层析法	250
2. 测定标记位置的方法原则	271
3. 同位素稀释法	275
4. 研究物质的渗透与转移	292
5. 研究新陈代谢过程的动力学	301
6. 研究前身与产物的关系	318
第十章 示踪原子法在农学研究中的应用	325
1. 在光合作用研究中的应用	325
2. 在农业化学与土壤学研究中的应用	349
3. 在植物有性过程与无性杂交方面的应用	361
附表	366

引 言

《人类的智慧发现了自然界中许多奇妙的东西,并且将会发现更多奇妙的东西,从而增加着人类控制自然的力量》(列宁)。发现释放和实际应用原子核能,就是伟大列宁所预言的这种奇妙的东西。在和平事业中利用原子能,给科学技术的发展开辟了一条崭新的研究途径。在自然科学最重要的学科之一——生物科学领域也是如此。原子核技术使人们有可能获得大量的放射性同位素和稳定性同位素。利用这些同位素作为指示剂,可以建立精细而准确的方法——示踪原子法,用以迅速、简单、精确地表征出生物体在生长发育过程中各种生命物质的吸收排泄、循环分布、渗透转移及更新和周转。示踪原子法揭开了许多时候科学家无法侦察的那些“自然之谜”,有力地推进了生物科学的发展。现在它已被广泛而有成效地应用在生物化学、生理学、农业生物学及其他生物科学的领域中,并且取得了卓著的成绩和正在蓬勃的发展。如果说显微镜技术的发明指示了生物体微观结构的秘密的话,那么同位素示踪法就能使人们洞悉动物、植物和微生物有机体内新陈代谢变化机制的内幕,真实地指示出生命活动内在的复杂规律。

现代生物科学面临着这样的任务:第一、深入地研究有机体的各种物理、物理化学和生理生化过程的规律。地球上生命的起源和发展,有机体建造和功能的复杂性与多样性以及生物的适应性和敏感性,这些自然现象一向是引起人们注意的。如果能够真实地获得由外界进入有机体的物质及其再释放给外界时所经受的那些复杂转化的顺序性,及能量传递的规律性,那么实现自觉地控制生物生命活动的方向和生命模拟这个伟大理想就将成为可能;第二,研究外界的各种物理因素与化学因素对有机体影响的机理。有机体的生活必然会不断地受着周围环境各种物理因素(光、声、电、热、电离辐射等)和化学因素(化学药物、生物生长刺激剂等)的影响。因此全面地研究这些因素对有机体的作用,明确其影响生命活动的过程,特别是明确这些因素影响生命的最主要特征之一——新陈代谢的过程,不但能防止这些因素对生命的损害,同时还可以有意识地来利用这些因素,以满足人民的需要。这些任务的完成,就是说,对于生命本质的揭露,各种复杂生命现象的探索,生物生长发育的控制,农业生产的提高,生产技术的革新,优良品种的培育与鉴定等等,都有待于示踪原子法这个现代的重要研究工具去做积极的支援。晚近同位素在生物科学及农业实践研究中,所获得的大量资料,充分地证明,它在解决上述问题时,确有着独特的功用。

现代生物科学主要的和极其进步的倾向就是最广泛地运用新的物理学和化学的研究

方法，迅速地深入到生命过程的实质。如果说目前物理学和化学给生物学注入新的力量，那末将来生物学就会给物理学和化学以新的思想，并且这个时期已经来临了。所以、农业生物物理科学工作者和农学工作者，熟悉示踪原子法的基本原理，并熟练地掌握这种方法的具体操作技术和它在生物科学与农学研究中的应用途径等，就成为十分迫切的问题。方法问题决不可轻视。因为在任一实验研究领域内，要成功地应用同位素，在很大程度上，决定于研究者善于采用和所进行试验的特定条件相适应的操作方法，分析方法和测定方法。

关于在生物学与农学中应用同位素最常遵循的若干基本原则和方法技术的介绍，就是“同位素应用方法”这门课程所负的任务。

原子能的和平应用，它好象原始人在山洞中，第一次燃烧起的熊熊火炬一样，照亮了人类向自然进军的大道。1958年6月13日第一把原子能火焰已在我們祖国点燃，我国第一个原子反应堆开始运转了。三年来，我国原子能科学事业在党的亲切关怀和坚强的领导下，在总路线、大跃进、人民公社三面红旗的光辉照耀下，和其他革命事业一样，有了长足的发展，取得了巨大的成就。我国已能成批地生产若干种同位素，并且已经应用于工业、农业、医学及科学技术的研究与实际工作当中，初步取得了不少的成就。我国原子能和平利用已经有了一个良好的开端，同时在我们面前又展示了灿烂美好的前景。但是为了“使原子能在我国的建设事业中得到普遍的利用，还须要付出巨大的努力。然而，我们决心要攀上世界科学技术的高峰，就没有什么困难，可以阻挡我们前进。只要我们继续破除迷信、解放思想，只要我们艰苦、踏实、努力工作，原子能科学技术就一定会在一个不长的时间里，高速度地发展起来”。(1958年9月28日、人民日报)。

这是一个光荣而伟大的历史任务，我们每一个农业生物物理科学工作者，都应当在党的领导下，发愤图强、埋头苦干、自力更生、艰苦奋斗、为这一豪迈目标的实现。付出最大的力量。

第一章 在农业生物学中应用示踪原子法的基本依据和特点

§ 1、应用示踪原子法的基本依据

遍布于自然界中的同位素现象是示踪原子法（或称同位素指示剂法）的基础。从现代观点来看，可以把每一化学元素看做是同位素的总合体（同位素组）。同一元素的不同同位素，其核的组成是不一样的。正如大家所知道的，在同一种元素的所有同位素的原子核中，质子的数量都完全相同，但是中子的数量却各不相同。原子核在质量上的差异也就决定了各种同位素在性质上的差异。和原子核的质量与构造有关的，是元素的这样一些属性：如原子量，放射性、伦琴射线谱等。但是，也有许多其他的属性（如化学性质和大部分物理性质）却只和元素的最外层的电子层有关，这些性质通常称为元素的外围性质。

为了讨论方便，下面将某一元素在自然界中存在量最多的原子称为普通原子。相应的稀有而原子质量数高于普通原子的同位素称为稳定性同位素，那些与其原子序数相同而核处于不稳定状态的同位素称为放射性同位素。

因为一个元素的同位素具有完全一样数目的电子，所以它们依赖于核外电子数目的外围性质差不多是相同的。换言之，就是稳定性同位素或放射性同位素和普通原子在化学性质上具有着一致性。用合成的方法使被研究的物质分子内，含有稳定性同位素或放射性同位素，作为标记，再将此标记物引入有机体内，则这些标记物中的同位素将和相应的普通原子一样，在生物机体的运输，转移过程中遵循着同一途径。在酶促进的合成与分解，和其他生物化学转变中，在废物的形成与排泄中，一般而论，同位素和普通原子的遭遇也是相同的。因而我们可以说，生命细胞不能区别同一元素的各个同位素，而是一视同仁的对待它们，于是应用同位素研究生命上的各种现象与过程时，就不致引起异常的生理情况，这是同位素所以能应用于生物科学研究中的第一个基本依据。

然而放射性同位素或稳定性同位素和普通原子在物理性质上却有不同，它们是一些容易辩认的原子。从它们的运动和变化，人们可以探索那些不易辩认的物质的运动和变化的规律。放射性同位素可用以示踪，是基于它们经常地自发地放射射线的特性，而放射射线常常是很容易被电子学探测仪器所追踪发现，从而显示了它们的位置和数量。浓集而稀有的稳定性同位素，则是由于它的原子的质量特征而被用以示踪的。我们可以用光谱分析和质谱学分析等方法发现和测定各稳定性同位素的存在与含量。总之，放射性同位素的放射

性和稳定性同位素的高质量特征，好象为自己(或它所标记的物质)作了鲜明而不可磨灭的记号，表征出自己(或其标记物质)的行径，因而人们常统称它们为示踪原子(或称标记原子)，它们是可被测量的。示踪原子的可测量性是其生物学中应用的另一个基本依据。

§ 2、示踪原子法的优缺点

示踪原子法具有很大的通用范围。它在现代生物学研究方法中有着特殊的作用。这一方法的特点是有高度的灵敏性，特异性和精确性。

1. 示踪原子法的灵敏度很高。因为极微量的放射性物质和稳定性同位素可以相当准确的被测定。最精确的化学分析是很少能测量到 10^{-10} 克的，但能被检查出来的放射性物质可少至 10^{-14} — 10^{-18} 克。例如，一微居里(μc)的放射性磷(P^{32})相当于 6×10^{10} 个磷-32原子，它们的重量只是 3.5×10^{-12} 克左右。一般的探测仪器均能定量地准确测定 10^{-3} 微居里(μc)或更少的放射性。显而易见，示踪原子法比常用的化学分析法具有更高的灵敏度。例如高度稀释溶液的物理化学性质，示踪量元素及一些激素在代谢过程和身体组织中的作用等研究，非用示踪原子法是无从获得正确结果的。

2. 示踪原子法合乎生理条件。在过去研究糖代谢或蛋白质代谢的方法往往动用急性手术，将动物的肝脏或胰腺切除，或注射根皮苷、四氧嘧啶等毒性物质，然后进行实验，并且常需使用远较生理剂量为大的药剂量。无疑，这都是不符合正常的生理条件的。而应用示踪原子法即允许在自然情况下对动植物的完正活体做生理状况的研究。同时放射性物质的用量也可以少到生理剂量，即接近于正常进食量，并且在必要时，还可以使用示踪剂量，即少于正常进食量或正常体内存在量的剂量。这种示踪剂量(若干微居里)对于放射性测量仪器的定量分析已经足够，但是在重量上实际极小，对于生物体内原有元素在数量上的增添是微不足道的，从而就不致扰乱或破坏生物体内生理过程的平衡状态。这样就避免了在使用大剂量代谢物做实验时，常常取得不够符合客观真实现象的错误认识。

3. 示踪原子法可以分辨原有分子和实验中新加入的分子。例如倘使不用具有放射性同位素标记的葡萄糖，让动物服进葡萄糖之后，就无法分清那些分子是体内原有的血糖以及那些是刚刚加入的。再如，唯有把标记 P^{32} 的磷肥施予植物，人们才能区别植物体内的磷那些是来自于肥料和那些是来自于土壤。

4. 示踪原子法能使实验操作手续简化。用此法时常常不必经过提取或提纯的手续，即可测定组织内的标记物质，从而可以减省许多繁杂的分离分析工作。尤其在生物学实验中，某些体内的生理变化，常常只需要从体外来测定放射性的变化就够了，这将大大地简化了实验手续，而使研究工作得以迅速进行。例如，利用 P^{32} 就可使我们极其简便而顺利地测定磷在各种不同条件下进行植物体内的速度与分布状况。血流速度的测定，甲状腺吸碘进程的研究等均是如此。如果没有示踪原子的帮助，这些工作的进行将

是十分繁杂而准确程度也难以使人置信。

5. 示踪原子法能够揭示其他方法所不能发现的事实，从而得出新的正确的结论。在这方面可以举出许多例子。如光合作用机制的新成就；植物根系碳素营养事实的确立；植物体内矿物质的贮积是离子的吸收和排除这两个相反过程同时而有节奏的进行的事实等等都是运用示踪原子而获得的概念。尤其令人赞美的成就之一，就是揭露了化学上对称的檸檬酸分子原来在空间位置上并不对称，酶能够精确地区别两种不对称的檸檬酸分子。这个结论对檸檬酸在三羧酸循环中的位置的确定是有很大贡献的。

示踪原子法的应用虽有上述这许多的优点，但在使用上还受到一定的限制。例如，稳定性同位素的质量鉴别作用；个别元素（如氟、硅等）找不到合适的同位素；放射性同位素对实验生物本身的放射性效应；操作上需要特殊的训练；测量仪器尚未发展到尽善尽美的地步及需要严格的安全防护措施等。这些是值得每一个从事示踪工作的人员，给以严格的对待。

总的说来，应当认为示踪原子法的优点是主要的，而其限制和缺点是较少的，而且大多数是可以克服的。

§ 3. 示踪实验的设计和注意事项

在不少情况下，示踪原子法是一种仅有的研究方法。但有时它只是许多研究方法之一，因此，拟在生物科学研究工作中采用示踪原子法时，首先要考虑到如下的前提：所提出的研究课题，用其他方法难以获得圆满可靠的解决，或用其他方法只能解决某一部分，或疑似其他方法所得到的结果，或者用示踪原子法可以大大缩减试验研究过程与工作时间简化实验手续提高工作效率的情况下，可以使用示踪原子法。这时，也唯有这时才能充分发挥示踪原子法的优越性，也才是有意义的。

使用同位素做示踪实验的各个领域，在方法途径上各具特点不尽相同。但是，也还有其共同的程序，预先应妥为设计：

1. 根据实验的任务与性质，选择和准备适合的同位素或其标记化合物；
 2. 计算实验需要的示踪制剂的用量；
 3. 拟定实验布置的方法（将示踪物质引入供试的客体，饲养和照管已获得示踪物质——尤其是放射性物质的生物）；
 4. 准备对实验客体进行追踪测量所需要做的化学操作（示踪产物的提取、分离、精制及鉴定）；
 5. 样品的制备与放射性强度的测量或者稳定性同位素浓度的决定；
 6. 测量结果的统计学加工及示踪物分布平衡的确立。
- 必须指示，唯有精确周密的考虑了放射性同位素与稳定性同位素所有的化学、物理

与生物的特性的条件下，使用示踪原子的試驗才能給出有价值的結果并做出相应的解释与推論。因此，在設計示踪实验时，如下的事項应給予充分的注意。

1. 放射性同位素与稳定性同位素的选择。

在附表 1 与附表 2 中所列的常用的放射性同位素和稳定性同位素，都可用以作示踪剂。然而，稳定性同位素在使用方面一般說不如放射性同位素方便。在測量方面，放射性同位素的灵敏度高，而稳定性同位素充其量只能冲稀一万倍，否則不易測定。測样制备方面，含有放射性同位素的物质也較容易操作。为了測定稳定性同位素，必須将含有此种同位素的物质定量提出，并高度純化，这种精制的样品还不能直接用于同位素測定；惟有气体或挥发性的液体才适合于装到普通的质谱仪內，以进行同位素的分析。从測量仪器来看，測定稳定性同位素所需的质谱仪是相当复杂的仪器，操作质谱仪的技术比起測量放射性的計数器要难得多，除非很有經驗，便易产生錯誤。在某些生物研究中放射性同位素无須經過提取样品的手續，便可在完正的机体或組織內检查出来；未經任何处理的含有放射性的血液，尿液、植物滴泌物，即可以直接用来計数；用放射綫自显影法可以測定放射性物质的分布情况与定位。在这几点上稳定性同位素是不能起作用的。虽然如此，有些实验研究工作，应用稳定性同位素却显得十分必要。首先，稳定性同位素不損害生物組織，除了 H^2 以外，稳定性同位素一般对研究对象不起病理作用。而放射性同位素具有放射损伤生物的可能性。所以在研究对于放射性特別敏感的系统，則以应用稳定性同位素为宜。例如，在某些有关遗传的实验中或在以迅速分裂的細胞为研究对象时，尽可能避免使用放射性同位素。其次，稳定性同位素最明显的优点即其稳定性。当我们計劃进行一个长時間的实验，或为了实验的需要正在进行一个比較复杂的有机合成的时候，若所用的同位素是属于稳定性同位素的話，那是值得庆幸的事。再次，对生物有机体有重要意义的元素中，氧和氮目前尚缺乏适用的放射性同位素， O^{15} 的半衰期只有1.97分鐘，而 N^{15} 的半衰期也只有10.1分鐘。因此，唯有可用者只有稳定性同位素 O^{18} 及 N^{15} 。总之，在一般情况下，为方便計，尽可能优先采用放射性同位素。如果将一个化合物进行双标記的时候，用时使用放射性和稳定性同位素，那将是最合适的。

2. 选择放射性同位素需注意半衰期，射綫类别与能量和放射性比强度。

如果一种放射性同位素半衰期太短，則在实验尚未終了以前就可能因自身迅速衰变的結果而失其示踪的性质。其用途将限于离同位素生产工厂較近之处进行过程時間較短的示踪实验。例如 C^{11} 的半衰期仅有20分鐘，如实验期为 $3\frac{1}{2}$ 小时，則在实验結束时，其放射性强度就可能降低了1000倍以上。象这样短半衰期的放射性同位素是不能用来作較长時間的实验的。相反的， C^{14} 的半衰期长达5700年，故用 C^{14} 进行实验，縱然实验期为数十年之久，其放射性强度的損失也不会显著。但用长半衰期的同位素，必須严密的注意其对人体的損害和安全防护。

必須知道所选择的放射性同位素的射綫类别与能量大小。一般用 α 放射性作示踪实验是比较少的, 較多的实验中是选择 β 和有时亦用 γ 放射性。采用 β 放射性的优点是由于它們較高的計数效率和易于防护。如果射綫必須穿过較厚的物质才能到达探测器, 則应用 γ 放射性就是必然的了。能量的大小对于采用怎样的制样方法和测量技术是有很大影响的, 也是检定其放射化学純的依据之一, 因此最常用放射性同位素的射綫类别和能量(Mev)数据应当記牢。

应用放射性同位素做示踪时, 应当注意到放射性比强度的問題。在示踪实验中, 放射性物质往往为同种普通物质所冲稀, 因此要求引入的示踪物质的原始放射性比强度(A), 必須經得起代謝变化过程中可能有的稀释。而稀释后的測样在減去自然本底之后的計数率至少要与本底数(B)相等。这个关系可用下式表示:

$$\frac{ACK}{D} \geq B \dots\dots\dots (1-1)$$

这里C是原始放射性物质的用量, K是計数效率, D是冲稀倍数。譬如, 原始食盐溶液的放射性比强度为1微居里/分·毫升, (即 $1 \times 3.7 \times 10^4 \times 60$ 次衰变/分·毫升), 用量为10毫升, 計数效率为5%, 本底为20脉冲/分, 則可导出冲稀倍数D的最大值为50000, 如果冲稀倍数高于此值, 則原始溶液的放射性比强度和用量即嫌不足, 而应做相应提高。但由于生产上的原因, 放射性效应及安全防护等因素, A与C值又不能过高, 而是有一定限制的。

3. 示踪物质必須全部处于同一化学和物理状态。

如果示踪物质以两种或两种以上的不同的化学形式存在, 并且它們在实验中的化学历程机构也不一致, 即其中有相当的一部分并未起到示踪作用, 这样将会引起很大的誤差, 甚至会导致錯誤的結論。

又如早已証明, 許多示踪物质在高度稀释的或无载体的溶液中, 常会形成放射性胶体: Ba、Be、Bi、Cs、La、Ph、Mg、Nb、Pu、Po、Pa、Sc、Lh、Sn、Ti、Y和Zr。

以下的因素能够影响放射性胶体的形成: (1)放射性元素在实验条件下是否可能形成微溶性化合物。由于水解或与溶液中某种离子形成微溶性化合物, 則有助于胶体的形成, 相反地, 如在溶液中存在有能形成可溶性絡合物的物质时, 則阻碍胶体的形成。(2)溶液中其它悬浮粒子(杂质)的存在。胶体的形成是由于放射性物质在尘埃或氧化矽上的吸附, 因此它們在溶液中的存在量将十分显著地影响放射性胶体的形成。(3)溶液中电解质的类型和浓度对胶体形成的影响。

放射性胶体的性质有: (1)在渗析或超过滤时不能透过半透膜; (2)扩散速度比离子的为低; (3)在电解质的影响下能够凝聚; (4)能进行电泳; (5)在加速力作用下(重力离心力)能够沉降; (6)胶粒可用自显影相片考察之; (7)反常地难沉积于較活泼的金属上; (8)离子交换反常地降低; (9)同位素交换反常地降低。可見放射性胶体

与真溶液在理化性质方面有着多么显著的差别。它们在生物体中的作用上的差别也就不言而喻了，因此常由于放射性胶体不起示踪作用而引起很大的误差。

道布逊(Dobson E. L.)等人证明了锆的放射性胶体在动物器官中的分布，完全取决于微粒的数量。放射性胶体在网状组织，尤其是在骨髓中，脾和肝脏中的局限性，被利用于治疗的目的，使相应的器官接受射线照射。在其他方面，应用这类放射性制剂于生理学尤其是新陈代谢过程的时候，由于这种不稳定的物理状态的存在，能使实验工作遇到很大的困难。

关于放射性胶体形成，在放射性制剂的保藏方面，亦应予以严密的注意。

4. 示踪制剂的化学效应问题。

被放射性制剂引起的化学效应，常与该元素的化合物性质有关。可能的化学沾污是由于在生产放射性同位素时采用了不纯的靶子物。被照射的原始母化合物的微小杂质的存在，都会使示踪实验的结果发生这样和那样的问题。例如，格拉海姆(Graham A. F.)等人为获得标记病毒将 P^{32} 制剂注入鸡卵内时，曾提高了鸡胚胎的死亡率，究其原因是在核反应制备 P^{32} 时夹有有毒的混合物。有时，放射性磷酸盐制剂的毒性是由于混有偏磷酸(HPO_3)所造成的。另外在使用 P^{32} 制品时，常可能有各种特性不同的磷酸盐，诸如呈弱酸性反应的磷酸一盐(NaH_2PO_4 、 $Ca(H_2PO_4)_2$)；呈弱碱性反应的磷酸二盐(Na_2HPO_4 、 Ca_2HPO_4)；以及呈强碱性反应的磷酸三盐(Na_3HPO_4 、 $Ca_3(PO_4)_2$)。无疑，如果这样混杂比较严重时，必须将直接歪曲示踪实验的结果。

往试验客体引入示踪物的绝对数量亦应做精细的考虑。这个数量依赖于所用制剂的比放射性强度，也依赖于它在研究对象中选择积累的程度和客体对其敏感性状况。由于上述原因及每个试验任务的不同，引入制剂数量也有变化。一般使用下列标准：示踪剂量——向研究系统引入元素量比其正常含量或正常需要量少；生理剂

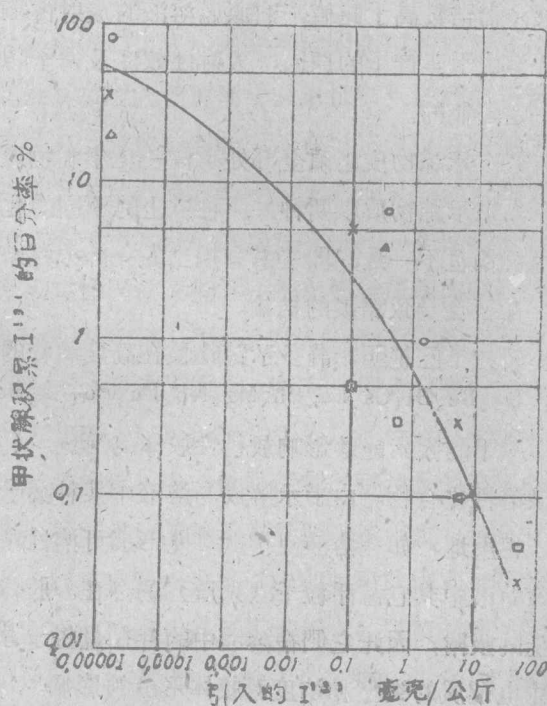


图1. 甲状腺中碘的积累与引入碘的数量之相关性

- 白鼠 (按 Чайков 的文献),
- △ 人 (按 Гамильтона 和 Солея 的文献),
- 兔 (按 Герца 的文献),
- × 白鼠 (按 Ле-Блонда 的文献)。

量——所引入元素量的多少恰与该系统正常需要量相适应；药剂量——引入元素量显著的超过一般用量。如果使用示踪量或生理剂量对客体的正常生理过程来说，用量并不大，因而也不致产生异常作用。如果采用超过组织需要的药剂量则往往得到不符合客观现实的错误认识。向动物引入碘的数量对其在甲状腺中积累的百分率的影响是这方面的典型例证（图1）。从图中明显的看出，甲状腺中碘的积累率是随着引入剂量的增加而减少。实验证明，如给大鼠注射1毫克碘，1小时内甲状腺只能固定其中的5—10%，这种碘在甲状腺中停留不过几个小时，因为它不能转变为有机碘化合物。当只注入1微克以下的生理剂量时，在几分钟之内甲状腺切后的放射线自显影便可显示放射性碘的存在，大部分碘在1小时内浓集，而在8—12小时过程中所有的放射性碘几乎定量地固定于甲状腺中，转变为有机化合物。这种不同结论的出现就是由于所用剂量的差异所致。

因此在示踪实验时，对所用制剂的化学纯的考查及用量的酌定是十分必要的。

5. 示踪剂必须具有高度的放射化学纯度。

使用的放射性物质最好是不含任何放射性杂质。假如忽视了杂质的存在，就很难得到正确的结果。例如凯恩斯(Keynes)用 K^{42} 研究甲状腺神经内钾离子与外界的更换的实验中，其结果就和罗圣堡(Rothenberg)的不一致，究其原因，是由于他们都不能肯定 K^{42} 内有无 Na^{24} 的掺杂，因此，谁是是非也就无法断定。

影响制剂放射化学纯的原因之一，是无关元素的掺杂。如果靶子原料预先没有经过适当的工艺准备，那么在原子轰击时就可能出现几种型式的核反应，从而也就会有或多或少的放射性杂质。各种元素原子在放射性制剂中的分配，并不是与其在原料中的含量按比例的存在，因为各个元素原子的形成有其自己的特殊有效性。象在钾中含有10%的钠，在进行核反应后得到的污染物竟达13%。再如，在 $CaCO_3$ 中含有少到0.01%的磷酸钙，在获得的 Ca^{45} 中，放射性磷酸盐的污染达5%，这就会因为 P^{32} 在计数时的较高敏感性而对结果引起复杂化。

对所使用的放射性同位素的生长与衰变的相互关系的特点，必须给以特别的注意。由母体衰变而来的核（子体）有的是稳定的，有的是不稳定而继续衰变。如果子体是放射性的则母体与子体之间在放射性对比方面可有下面三种情况。（1）长期的平衡：当母体的半衰期十分长，而子体的半衰期相当短时，则子体的生长到了一定时期后将达到一个饱和值。此时子体的原子数和母体的原子数成一个固定的比。子体的衰变率等于母体的衰变率。当时间大于子体的半衰期6—10倍以后，总放射性强度即接近于饱和值——平衡点，即等于母体衰变率的两倍。（2）暂时的平衡：当母体的半衰期并不甚长，但仍比子体的半衰期长时，子体的原子数在时间相当久之后将和母体的原子数成一固定的比，建立了暂时的平衡，而放射性的总强度将依照母体的半衰期衰减。（3）子体半衰期

比母体半衰期长，这时子体的原子数不会和母体的原子数达到平衡，即二者之间的比不可能恒定。在时间比较长久之后，总的放射性强度依照子体的半衰期而减弱。(2)与(3)两项中，总放射性强度达到最高峰所需时间将因不同同位素而变化。

很显然，当使用这类放射性同位素进行示踪测量计算时，必须密切的考虑母体与子体之间的对比关系及总放射性变化的规律和其达到最高峰所需的时间等特点。我们可用 $Sr^{90}(t_{1/2}=20\text{年})-Y^{90}(t_{1/2}=60\text{小时})$ 为例来说明这一点。

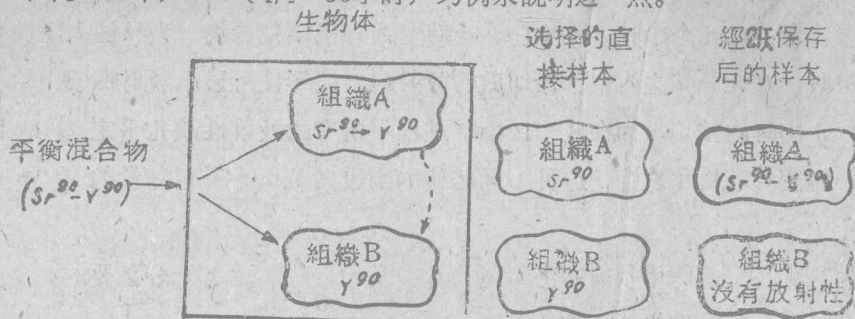
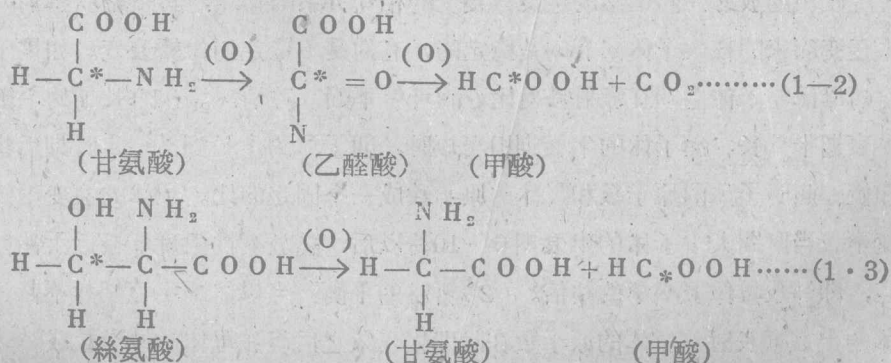


图2. 保存阶段对样品选择时机与放射性检查的影响

如图所示，将平衡混合物引入生物体，而且推测 Sr^{90} 进入A组织， Y^{90} 进入B组织。已积累在A组织中的 Sr^{90} 可产生 Y^{90} ，而 Y^{90} 能够或者留在A组织中，或者不断的从A向B组织中转入。经选择加工的样品A，已再不可能借助于衰变而使 Y^{90} 的数量继续减弱，所以经过21天的保存之后，重新建立了平衡，并将借助于 Y^{90} 的测定来确立存在于样品A中的 Sr^{90} 的数量。同法，如样品B经选择之后被保留21天，则曾被 Y^{90} 引起的放射性应当消失，并且测量表明，在该样品中也不含有 Sr^{90} 的沉积物。换言之，如果子体寿命较短的平衡混合物被引入到体内，而从体内选择的样品又经保存一个时期——相当于最终子体半衰期的6—10倍的时间，那么对这种最终物质所做放射性测量将能用来直接计算原始母体在样品中的数量。必须指出，在达到平衡之前所做的任何测量都不能说明示踪物质的真实状况。

6. 所研究的化合物的标记应当放在适当与稳定的位置。

譬如已知甘氨酸和丝氨酸在体内都可以变成甲酸，其反应式如下：



由上式可见，甲酸上的C*系来自甘氨酸的α碳原子和丝氨酸的β碳原子。在实验

中，如果标记恰放在上式带有星号的碳上，就可得到标记的甲酸，倘若起始原料是用羧基上标记的甘氨酸和丝氨酸，便无从用测定同位素的方法查出甲酸的生成。因此，在制备试验用的标记化合物时，必须考虑和鉴定标记位置是否适当，是否适应于工作之需。

除了进行交换反应研究外，标记应当放在化合物内稳定位置，处在不稳定位置的同位素，会在实验过程从化合物中脱落，从而失去标记的意义。以放射性氯标记的芥子气 $S(CH_2Cl)_2$ 为例，这化合物遇到蛋白质时即与氨基起反应而释放出氯化氢，标记脱落了，于是标记的分布情况对于芥子气在体内的转移就不能供给什么有用的材料。位于 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $=NH$ 等极性基中的氢原子都不稳定，在水溶液中很快的与水的氢原子起交换反应。苯环上与羧基处于邻位或对位的氢原子及位于羧基 α 位置的氢原子（如丙酮）也都是不稳定的。但是其他连接于碳原子上的氢一般都是十分稳定，即使在高溫以强酸强碱处理，亦不能脱落。其他如以 S^{35} 标记的氨基酸和直接连于碳上的氮都不易发生交换作用，而碘在酸性溶液中会与二碘酪氨酸发生交换反应，但在硷性反应中此作用即不显著。

仔细的工作者，在进行示踪实验前，总是先确定所使用的化合物是否会起简单的交换作用。例如，将标记以 P^{32} 的磷酸钠和非活性的磷酸甘油，磷酸己糖，卵磷脂、核蛋白或核酸混在一起若干时间，再用氧化镁混合剂沉淀磷酸盐。结果是放射性均在沉淀中，自滤液中分出的有机化合物并未发现任何放射性，因此证明这些有机磷化物中的磷是稳定的。当然，仅仅证明在试管中不起简单交换反应还不够，“标记”在体内的脱落也同样会模糊试验的结果。有人制得放射性的磷酸胆硷，给实验动物注射，目的在于观察它会不会直接结合到组织磷脂分子中去，以便决定其是不是磷脂合成的中间产物。可是一切磷脂在进入细胞之前都受到水解，这可能是由于细胞膜表面上一些磷酸酶的作用，由于这个缘故，所引入的放射性的分布情况与普通无机磷酸盐完全无异。这样，原来分子的命运就没有可能追踪出来。因此，对示踪物质的标记位置，必须加以注意研究。

7. 关于同位素交换反应问题。

两种（或更多）分子内的同一种元素同位素的原子相互交换位置的化学反应，叫做同位素交换反应。門捷列夫早已指出“在化学状态不变的情况下，已经存在着两个同样

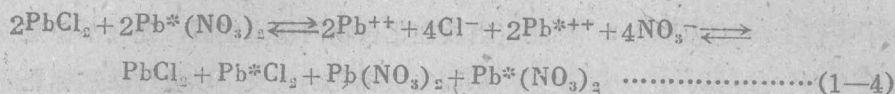
分子的同样原子间的交换（如 $AB \rightleftharpoons AB$ ），象二个不同分子的不同原子间的情形一样。”

并且指出这正是动力学的化学平衡概念的必然结果。天然与人工放射性同位素的发现证实了这一论点。

下面我们举出几种同位素交换反应的例子。

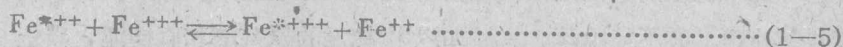
（1）解离引起的交换反应：系指在同位素交换反应中，一个或两个参加反应物质进行可逆的解离。如铅在氧化物和硝酸盐内的同位素交换就是一个例子。

在放射性同位素 Pb^{210} 标记了的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中加入没有放射性的 PbCl_2 ，加热混合物。一直到 PbCl_2 沉淀完全溶解，在溶液冷却以后，就得到带有放射性的 PbCl_2 晶体。这是由于水溶液中铅的化合物解离的结果：



(2) 电子跃迁的交换反应：在同位素交换反应中，物质同位素成分的改变，是借助于电子的转移。如铁在 FeCl_2 和 FeCl_3 间的同位素交换，就是两个不同价的铁之间的电子交换。

在有放射性同位素 Fe^{59} 的 FeCl_2 的盐酸溶液中，加入 FeCl_3 ，经过几分钟后，用异丙醚萃取 FeCl_3 ，对 FeCl_3 放射性测量中指出， FeCl_3 含有放射性，这是由于 FeCl_2 和 FeCl_3 间十分迅速地进行铁的同位素交换，其交换过程如下：



(3) 原子过渡的交换反应，在这种同位素交换反应中，物质同位素成分的改变，是由于同位素原子自一个化合物转移到另一个化合物中而实现的。例如：

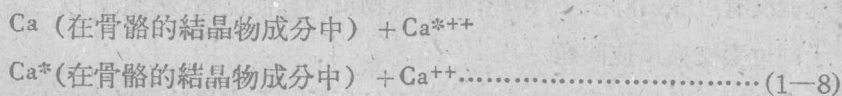


(4) 化学机制的交换反应：同位素交换反应是由于化学反应所造成的，如借助于放射性 N^{15} 研究氮在 NO_2 和 NO_3 间的交换，发现其交换的原因，是由于 N_2O_5 变为 NO_2 和 NO_3 的可逆热分解的原故：



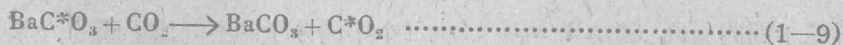
NO_3 和具有其他同位素成分的 N^{15}O_2 相作用，而使 N_2O_5 也变成放射性的了。

(5) 固体与液体间的交换反应：血液与骨髓间的相同离子的交换，就是这方面的好例子。



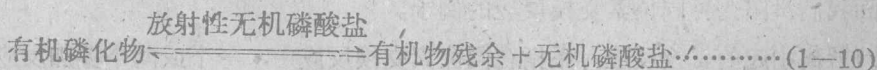
详细的叙述写在后面。

(6) 固体与气体间的交换反应：例如：



C^{14} 的原料 BaCO_3 ，其放射性常常因与空气中的 CO_2 交换而遭到显著的损失。这种反应也常会给予碳酸钡形计量放射性的试验结果带来失真的情况。

(7) 分解反应的可逆反应：例如：



如果某种物质发生分解，那么很可能同时由分解产物进行相反的反应又重新形成该

物质，虽然这个过程不太明显，但也能致使研究物质上呈现有标记的分子。当然这不是标记原子参加该物质的新陈代谢的证明。

在同位素交换反应的帮助下，成功的获得了许多关于反应速度、化合能、分子的改组和分子结构等有价值的资料。然而，对于我们来说，特别值得注意的是类似反应的存在，在不同程度上使得利用示踪原子的研究难于进行的问题。当着应用放射性同位素研究中间产物代谢，求得关于新陈代谢生物合成的过程时，如果放射性同位素能参予该代谢过程并与代谢物发生简单同位素交换，则这样的试验结果将是一钱不值，因为这里不可能得到任何关于物质合成的证明。

但是，在许多情况下还可以进行专门的研究来确定这样的同位素交换是否存在。为了这个目的，可将反应物与生成物在排除生物合成的可能性的情况下进行试验。例如大家知道的，动物有机组织能够将无机磷酸盐转变成磷酸酯。显然，这不是交换过程：因为实验观察证明：（1）如果将磷酸钠盐同磷酸酯溶液一起摇晃，无机磷酸盐与磷酸酯中的磷，未曾产生互换现象；（2）肝的匀浆没有能力以无机的 P^{32} 构成放射性的磷酸酯；（3）呼吸的毒素如氰化物和一氧化碳都防害着标记磷酸酯的形成。

前人曾经明确的证明了， C^{14} 参与磷酸甘油酸的羧基团的羧化作用是在光合作用的第一阶段固定 CO_2 的时候实现的。但是，还要证明这个参与过程不是制约于简单的交换反应。法基尔(Fager E. W.)等人比较了 CO_2 的总化合动力学和 CO_2 参与磷酸甘油酸的动力学之后，作了一个推论：即标记磷酸甘油酸的形成只是光合作用本身提供的，而不是简单的交换反应。

瓦尔(Wahl A. C.)和包耐尔(Bonner N. A.)做了很多同位素交换反应，特别是在生物体中。曾经证明，存在于溶液里的无机磷酸盐离子和一磷酸已糖、甘油磷酸酯、卵磷脂、核蛋白、核酸及焦磷酸盐之间，不进行同位素交换。也未曾发现胱氨酸、硫羟酸与硫脲之间的硫原子，从一方面和相应的 H_2S 、 S^{--} 与 SH^- 另一方面有交换现象。如前已述，位于 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $=NH$ 等极性基中的氢原子都是不稳定的。

在动物实验中，用示踪钙的研究证明：血液里的离子与骨组织中的离子实现着交换。试验证明，在骨中能进行交换的钙离子有10—20%（这一交换强度的范围系依动物的年龄和从不同部位的骨取样而异）。十分明显。活体中(in vivo)血液与骨组织中存在的离子之间，确实进行着这种交换。血液中钙的消失曲线证明这种交换反应在数量方面是很快。这个十分迅速的交换反应的结果。使被引入到血中的 Ca^{45} 离子几乎全数的转入到骨中。这时，假设在骨中有交换能力的钙的浓度稍微超过血浆中钙的正常浓度的100倍，且当骨组织与血液之间的放射性达平衡时，存在如下的关系。

$$\frac{\text{骨组织的放射性}}{100} = \frac{\text{血液的放射性}}{1} \dots\dots\dots (1-11)$$

从这里知道：当血液里呈现放射性后不久，在骨中 Ca^{45} 的浓度的极限量相当于血浆