

色层分析法译文集

(及其在农业科学上的应用)

上海科学技术情报研究所

色层分析法译文集

上海科学技术情报研究所出版

新华书店上海发行所发行

上海市印刷四厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 3 字数: 73,000

1976年3月第1版 1976年3月第1次印刷

印数: 1—5,700

代号: 151634·278 定价: 0.40 元

(只限国内发行)

出 版 说 明

鉴于近年来色层分析法不断发展，其应用范围也逐渐扩大到农业科学，特自日本期刊选译了本译文集中的第一篇，介绍各种层析法在分析植物成分上的应用，另自美国刊物摘译了有关气相层析法用来检定土壤、水、植物组织中的有机氯和有机磷杀虫剂成分的方法和应注意事项，合刊成集。

目 录

色层分析法及其在农业科学上的应用.....	(1)
一、绪言.....	(1)
二、色层分析的原理.....	(1)
三、色层分析法样品的制备.....	(1)
四、纸层析法.....	(4)
五、薄层层析法.....	(14)
六、柱层析法.....	(17)
七、气相层析法.....	(27)
气相层析法及其在农药残留物测定上的应用	(37)
一、气相层析法概述.....	(37)
二、气相层析法在有机氯杀虫剂测定上的应用.....	(38)
三、气相层析法在有机磷杀虫剂测定上的应用.....	(42)

色层分析法及其在农业科学上的应用

一、绪 言

色层分析法最初仅用于植物色素的研究。后来由于人们创造发明了多种吸附剂以及新的原理和装置，发展了化学的和物理的检测方法，它就不仅被用于有色物质，也被广泛地用于许多其他物质。1942年，人们创出分配层析法及从之简化而成的纸层析法，1952年，创出气相层析法，1958年创出薄层层析法，接二连三，发展出许多方法。

用色层分析法分析植物成分的过程，必须经过(1)制备样品，(2)进行层析和(3)对分离出的物质进行检查、定量和鉴定等三个阶段。本文在第二节略述色层分析法的原理和种类，第三节叙述样品的制备，第四节以下则以作者们在实验室做过的一些实例为中心，就各种色层分析法的原理和分析操作依次叙述。

二、色层分析法的原理

色层分析法就其层析机制而言，可分以下三类：

(1)利用不同物质被吸附剂吸附强弱的不同而进行的色层分析法叫做吸附层析法。

(2)利用物质在两种溶剂之间的分配系数不同，使一种溶剂保持在担体上并将要分离的物质吸附其上（即所谓固定相溶液，在纸层析法的场合，滤纸是担体，水就是这种溶剂），使另一种溶剂移动而进行分离（在气相层析法中是用气体），这种色层分析法叫做分配层析法。

(3)利用离子交换树脂对不同物质的吸附性不同，以不同浓度的盐类把被吸附的样品洗脱和分离的方法，叫做离子交换层析法。

对于上述各种方法的理论，这里一概从略，只须指出：在实际分析上，三者之间互有联系，而且可以认为：任何一种方法都象图1那样，是利用固定相(广义的)对物质的吸附性及该物质逐渐脱吸附(解吸)而被移动相洗脱，来做到分离的。实际使用的色层分析法，其主要的分离机制可简括为图1。

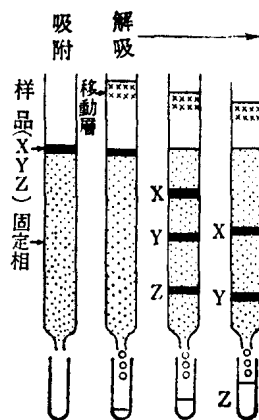


图1 色层分析法的原理

三、色层分析法样品的制备

1. 一般注意事项

作者们在分析光合作用中间产物时，把同化了 $^{14}\text{CO}_2$ 的绿藻的80%乙醇提取液直接用

色层分析法分析，这是因为用 ^{14}C 为检查线索，灵敏度高，点样时在滤纸上的样品量少些也行了；但在一般情况下，必须把抽提出的物质先分离成若干部分，并把会对色层分析发生不良影响的共存物从要分析的物质中除去。以下所说便是制备样品时抽提和分离操作所必须遵守的原则和一些实例。

表 1 色层分析法的种类

	分析原理	固定相	固定相溶剂	流动相
纸层析法	分配型	滤纸	主要是水	主要是有机溶剂
薄层层析法	分配型	硅胶，氧化铝等	主要是水	主要是有机溶剂
气相层析法	分配型	硅藻土等	主要是水	N_2 , H 气体
离子交换法	离子交换型	离子交换树脂	—	主要是盐类溶剂
吸附柱层析法	吸附型	淀粉等	—	主要是有机溶剂
分配柱层析法	分配型	硅胶，纤维素等	—	有机溶剂等

1) 在仅以定性和定量分析为目的时，用于色层分析的样品量越少则分离得越好，共存物也就越少，因此，在检查方法所能容许的范围内，应尽量减少样品量。样品量既少，也就不须分离，在柱层析的场合，柱的容量也可以小些，种种操作都变得简单。

2) 做色层分析时，能够吸附的物质质量很少，所以用于抽提和分离的试剂必须是以后能够除去而不致成为共存物大量残留下来的。应当尽可能使用有机溶剂(乙醇、丙酮等)、挥发性物质(甲酸、氨水、盐酸、碳酸铵)和容易去除的物质(用过氯酸-氢氧化钾中和，使成沉淀而除去；或用三氯醋酸-乙醚抽提、或用醋酸丁酯抽提来除去)。最好是利用离子交换树脂、吸附剂等。

3) 从植物体抽提物质必须完全提尽，这是不用说的。为能保证如此，对于所用溶剂不能把要抽提的物质抽提干净(草酸作为钙盐而存在，所以与其他有机酸不同，用 80% 乙醇是抽提不出的)，以及要反复抽提多少次才能定量地提出，都该深入研讨。为使抽提效率高，必须把试验材料尽量研碎，尤其是水稻等的硬组织，与其用均匀器，不如用研钵把它同石英砂一起磨碎，更好些。

4) 在抽提和分离的过程中，要注意不使目的物质分解。为此，在处理不稳定的化合物(核武酸、磷酸酯等)时，要尽量在低温下操作。植物在采取了样品后，要尽快停止酶作用。不能立即抽提时，最好把它冰冻保存在 -20°C 的冰箱里。另外，为了停止酶作用，即使用煮沸了的 80% 乙醇，也不易使磷酸酶失去活性，所以在处理磷酸酯的场合要注意。Bielecki 说：使用乙醇：氯仿：2M 甲酸(12：5：3)的混合物，即使在低温下也能使磷酸酶失去活性，所以他提倡这样使用。

5) 分离要尽量选用只会分离出目的物质而回收率又高的方法。选择分离方法时也要考虑到色层分析法所用样品溶液的容积必须很小。

2. 分离为阳离子、阴离子和中性成分

使用离子交换树脂以使植物体中的有机成分分离为阳离子、阴离子和中性成分，同时除去无机盐类。

(1) 抽提

根据下述离子交换树脂的容量, 用鲜重约 10 克以内的 80% 乙醇提取液, 或把它在 40°C 下减压浓缩至干, 以水抽提, 用其提取液。要预先明确乙醇提取液的 pH 值是在 5.0 以上。pH 低时, 谷氨酸、门冬氨酸等会生成酯, 以致提出后不能长久放置。在 0.5M 过氯酸提取液里加入浓 KOH 以使 pH 恰为 7, 在 0°C 放置一小时后, 用离心机除去 KClO_3 而用其上层清液, 这样做也是可以的。这在想要分析用 80% 乙醇不容易抽提的成份(草酸等)时, 是比较适用的。

(2) 分离

在图 2 所示两根柱管内分别装进离子交换树脂 Amberlite IR-120 和 IR-4B 各约 15 毫升, 分别以 1N HCl 和 2N NaOH 100~200 毫升冲洗, 使成 H^+ 型和 OH^- 型, 然后用水充分洗涤柱管, 直至洗液成为中性。树脂的量应参酌样品的量, 特别应参酌其所含盐类的量, 适当增减。先使提取液流过阳离子交换树脂柱(流速为 1 毫升/分钟), 流出后, 再使它流过阴离子交换树脂柱。把已流过两根柱的流出液(中性部分)收集起来。柱用 100 毫升以上的水洗涤后加入中性部分。IR-120 柱管用 2M NH_4OH 100 毫升冲洗(阳离子部分), IR-4B 柱管用 2M 碳酸铵 100 毫升冲洗(阴离子部分)(流速: 1 毫升/分钟)。各部分都在 40°C 以下经过减压浓缩而制成供试样品。阴离子部分最后加热到 60°C 而将残余的碳酸铵除去。

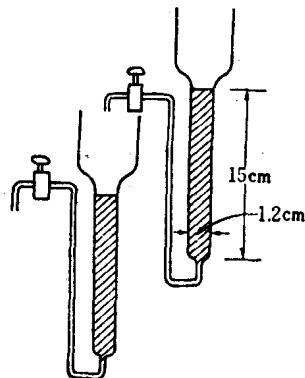


图 2 分离用的柱

(3) 讨论

这种阳离子部分含有氨基酸, 氨基酸的回收率将近 100%*, Na^+ 、 Mg^{++} 等无机阳离子则不会被洗脱。半胱氨酸和氨基乙磺酸不会进入这一部分。胺在这种条件下不会被洗脱, 要用 6N HCl 才能把它洗脱。把 80% 乙醇提取液就这样加入柱管, 则谷氨酸的回收率低。(这大概是由于 H^+ 型树脂会产生出乙醇和酯。而且谷氨酸也会因为 H^+ 型树脂而生成吡咯烷酮羧酸 [Pyrrolidone carboxylic acid] 因此, 这些操作都以尽量在低温下进行为宜)。对于只有氨基酸的部分, 同时并用 NH_4^+ 型和 H^+ 型的阳离子交换树脂的 Thompson 法也是合适的。阴离子部分含有磷酸酯和有机磷, 这些是能完全从柱管洗脱出来的。中性部分主要含糖, 在 80% 乙醇提取液的情况, 会有色素以及蛋白质、类脂物等混入其中。用同化了 $^{14}\text{CO}_2$ 的植物叶, 在对它的提取液做实验时, 如果同化时间短, 则用此法可得 90~100% 的回收率, 如果同化时间长, 则回收率略低。看来这是因为 ^{14}C 会进入类脂物和蛋白质, 而这些东西会沉积于树脂上。

3. 核甙酸的分离

(1) 抽提

以下操作应尽量在低温下进行。采取乳熟期水稻籽粒 1 公斤为试验材料, 立刻把它同 3 升的 0.5 M HClO_4 液和石英砂一起研碎。用离心机把提取液和残渣分开, 残渣再用 0.2 M

*据 Aronoff 说: 组氨酸、精氨酸和赖氨酸的回收率为约 60%。

HClO₄反复抽提两三次。合并其提取液，测定 260m μ 时的消光度。

(2) 分离

在照上法获得的乳白色提取液里加入 50 克活性碳 (NoritSX-30)，搅拌 1 小时。取出一部分提取液，除去活性碳后，测定其 E₂₆₀ 值，等到即使加入活性碳，上层清液的 E₂₆₀ 值也不减少时，把活性碳滤出，用冷水充分洗涤，直到不呈酸性反应时，把 10% 吡啶和 60% 乙醇水溶液加入活性碳，充分搅拌以取得洗出液。以同样溶剂反复洗涤三、四次后，把洗出液在 40°C 以下减压浓缩、干燥并溶解于 100 毫升的水中。这样获得的液体会在波长 260 毫米处有吸收峰出现，但仍含有色素，所以要用 0.05 M HCl 使其 pH 值为 1.5，并用图 3 所示索氏 (Soxhlet) 抽提器把这试验材料一面用冰冰冷，一面用醚抽提。抽提 3~4 小时后，以 0.1M NH₄OH 使之中和，充分通气，以去掉醚。

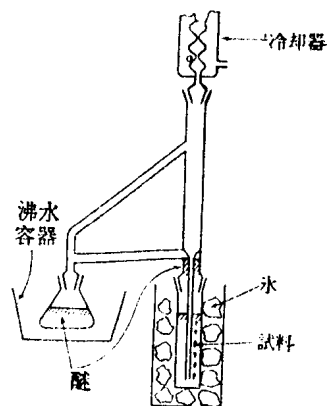


图 3 索氏抽提器

(3) 讨论

把各阶段的 E₂₆₀ 值 (260 毫微米时的消光度 $\times$ 容积 [毫升]) 列成表 2。这样分离出的部分依然含有核甙酸等。可是这些物质在用阴离子交换树脂做层分析时不会被吸附，所以能被除去 (表 2 中 (3) 与 (4) 之差即是被除去部分)。为从活性碳洗脱，最好用上述吡啶-乙醇系溶剂，几乎能洗脱 100%。吡啶在紫外区域能够吸收，所以在作定性检查时，含有 1% NH₄OH 的 60% 乙醇就显得洗脱的力量太弱了，用 85% 的比较方便。

表 2 水稻乳熟期籽粒中核甙酸的分离

	E ₂₆₀ /公斤鲜重
(1) HClO ₄ 提取液总量	39,400
(2) 活性碳吸附部分	36,120
(3) 自活性碳洗脱部分	20,900
(4) Dowex-1 (注) 吸附部分	10,400

(注) 美国道化学公司制售的强碱性阴离子交换剂——译者

四、纸 层 析 法

纸层析法是分配型色层分析法之一，简易而有重现性，用途很广，在植物营养学方面也被作为一项重要的分析研究手段。本文限于篇幅，以作者们的实验例为叙述中心，其余请读者参阅专书。再则，纸层析法用于氨基酸分析时最多 (目前虽有氨基酸自动分析机，但因价昂，还不普及)，所以下面 1, 2 两节叙述一般事项时，主要以氨基酸为例。

1. 装置和一般方法

(1) 装置和展开法

纸层析法是在密闭容器中使溶剂在滤纸上渗透的一种方法，只要能做到这一点，任何现成的器具都可作为这种装置使用。但是市上也有各种专用装置出售，其概略如图4所示。

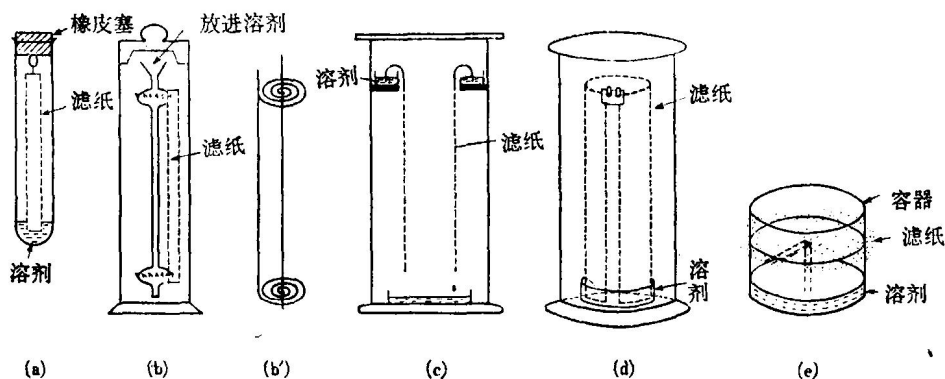


图4 展开装置

展开法因使溶剂在滤纸上渗透的方法不同而有上升法和下降法二种。上升法简单，但渗透速度慢。从点样处起，渗透距离只要达到20~25厘米左右，上升法就适用。如果超过这一距离，就得用下降法。下降法的渗透距离可达40厘米左右。用上升法时，如果滤纸是长方形的，可用图4中的(a)和(b)；倘若是用正方形滤纸做双向展开，可用(d)或用具备(b')的(b)容器。作者用的是(d)。下降法用(c)就行了。

纸层析法有所谓单向展开法和双向展开法两种。单向法是用一类溶剂把物质分离，例如：要探知在光合初期 ^{14}C 会被哪一种氨基酸摄取，就可如图5所示，把几种氨基酸分离清楚。双向展开法是用一大张正方形滤纸，先用一类溶剂做单向展开，等溶剂干了后，再沿着与这

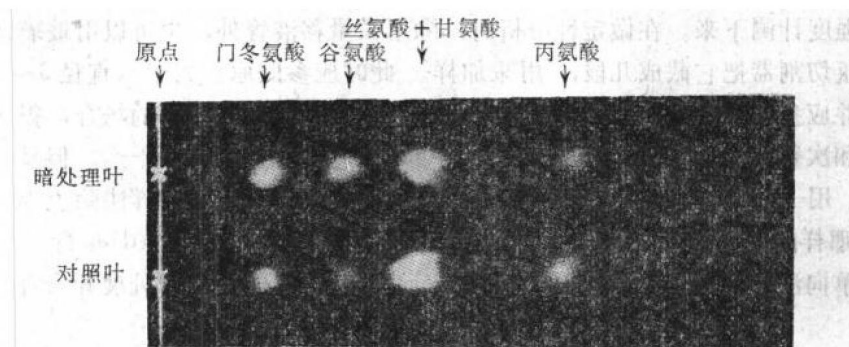


图5 茶叶的各种氨基酸所摄取的 ^{14}C
用单向纸层析法分离氨基酸的一个实例
(展开剂：苯酚-水(8:2, NH_4OH))

次展开成直角的方向另做一次展开。用单向法不易分离的物质，例如氨基酸类，用双向法就能分离。装置只要有(d)就够了(参阅图4)。另有分次展开法，即用相同的溶剂或不同的溶剂在同一方向上反复展开多次的一种方法(参阅本章第5节第(2)项)。使用圆形滤纸，从滤纸中心点作放射状展开的圆形层析法如图4(e)所示，能在较短时间内作大量分离，所以是个有效方法。有用电动机进行这种展开的装置。

(2) 滤纸

层析法用的滤纸，在日本出售的有东洋滤纸第2、3、5、50、51、51A、52、131等号。据说51A号特别优良，与Whatman 1号滤纸差不多，可用于定量分析。有时由于特殊目的，必须进行预处理，除去杂质，但第50、51、51A、52等号无此必要。在用正方形滤纸时，须注意滤纸的纹路，因为顺着纹路同与纹路成直角时，溶剂的渗透速度不同。滤纸也有正反面，加样时应以加在正面为原则。

(3) 加样

加样于滤纸，即所谓点样，应如图6所示，先用铅笔在离开滤纸一端3~5厘米处轻轻地划一直线，作为原点。样品的添加以用微量移液管为便利。采用0.005毫升的移液管，每次

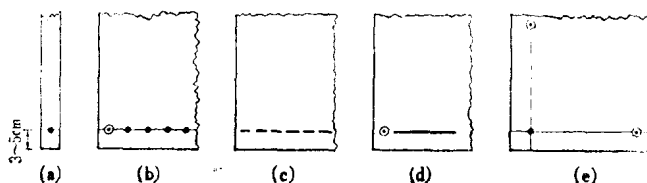


图6 在滤纸上加样的方法

加样0.002~0.005毫升。在做单向展开时，量可以少些，做双向时就得加足到0.005毫升。要决定各个成份的所加的量，是困难的。加样前可在另外一张滤纸上作一预试验，点不同的量使之显色，挑选能显色的最低量作为准则，单向法的加样量应五倍于此，双向法应十倍于此。量的多少也与样品的精制程度有关，精制程度高的，加样量比上述多些时也能充分分离。最适当的量该是10~30微克。目的在于分离放射性物质时，得考虑到能够充分测定放射性以酌定加样量。在此场合，于点样和晾干后，得用盖革-弥勒计数器(GM-Counter)把原点的放射性强度计测下来。在做定性分析时，除用微量移液管外，也可以用玻璃管制成毛细管，并用安瓿切割器把它截成几段，用来加样。此时应参照原点大小(直径3~10毫米)决定加样量，并应参照加样目的和样品精制程度。在以定量分析为目的的场合，得注意微量移液管的误差和次数误差。在须点样多次时，也可用空气干燥器使样品干燥，但最初时总以自然晾干为宜。用干燥器时，也不可使它过分接近样品，造成高温。加样法除上述点样法外，象图6(c)那样的短线加样法也是可以的，在要大量分离物质时，用(d)也行。同时展开标准物质时，单向法以从(b)的⊙符号处展开，双向法以从(e)的⊙符号处展开为宜(参阅图6)。

(4) 展开剂

用于展开的溶剂通常叫做展开剂。展开剂应根据要分析的物质来选择，现有多种，可参阅专书。这里只介绍分离有机物用的代表性展开剂。

a. 酚-水 以分液漏斗使酚为水所饱和而用其酚层，或把酚和水按8:2之比混合使用。通常酚是晶体，非使它溶解不可，因此，应按重量比混合。在分析氨基酸的场合，加氨则可使碱性氨基酸的 R_f 值提高，所以用酚-水展开氨基酸时，经常加氨。

b. 正丁醇-醋酸-水 这是很常用的展开剂。在用于氨基酸的双向层析时，可按4:1:1和4:1:2的比例混合，或按4:1:5的比例在分液漏斗内充分振摇混合，静置后分为二

层，用其上层。这种展开剂只要放置一周，就会酯化， R_f 值会有变动，所以每次使用时必须重新制备。

c. 可力丁-水 这种展开剂具有优良的分离能力，但不易得到纯品，有臭气，有毒，所以只在特殊场合使用。制法与 a 同。

d. 吡啶-正丁醇-水 按 3:4:7 的容量比混合，取用分液漏斗中的上层。

(5) 展开和展开条件

在把展开剂放进装置之前，先把装置安放在水平地方。确定密封状态良好，没有展开剂自滤纸表面蒸发，然后放进展开剂。让装置内部为展开剂的蒸汽饱和约 1 小时，这就行了。展开条件，特别是温度，一般在室温下也是可以的，但总以恒温为宜。图 7 所示是温度的影响。渗透速度一开头很快，以后就逐渐变慢。通常是要展开到 30~35 厘米时所需时间为 10~20 小时。

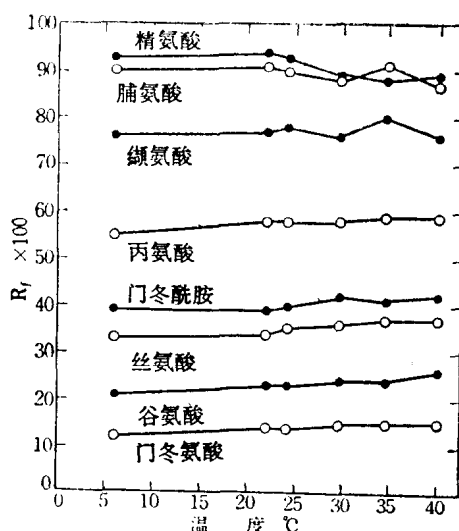


图 7 温度对 R_f 值的影响

(展开剂: 酚)

(6) 滤纸的干燥

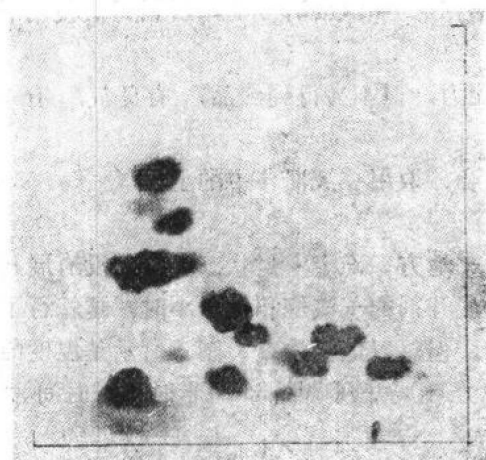
通常情况下，在室内干燥也可以了，但苯酚等物在冬季非常难干。可力丁等也有害。在随即要做双向展开时，如不充分干燥，则展开剂的前缘不明确。在要做放射自显影的场合，干燥得不够时，X-射线软片上会发生斑点。

2. 检出和定量

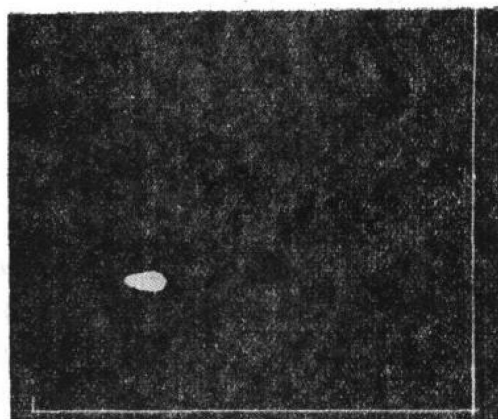
检出和定量方法大致分为化学的、物理的和生物的几种，择要叙述如下：

(1) 用显色剂检出

这是一种化学方法。在检出氨基酸的场合，茚三酮是代表性的显色剂。把茚三酮溶解于水饱和的正丁醇中，制成 0.1~0.25% 溶液。用这溶液喷雾，10 分钟后，使滤纸充分渗透，然后在 90~100 $^{\circ}\text{C}$ 下加热几分钟，就显出颜色了。这种显色，是因显色剂与在 α 位上具有游离氨基的氨基酸、肽、蛋白质等反应而显出一系列紫色（也含蓝黄色）。这种颜色如图 8B 所示，在显色后 36 小时开始褪色。最近，也用二甲基阿脲 (dimethylalloxan) 为显色剂，它的



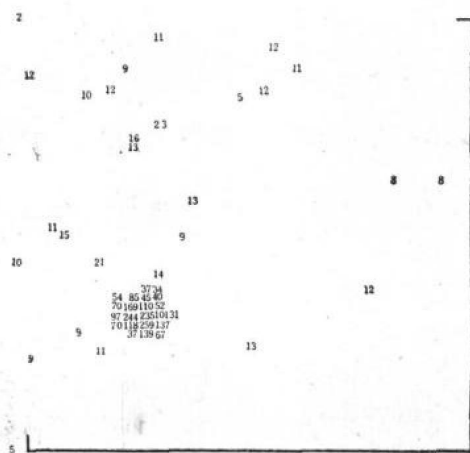
A



C



B



D

图 8 A, B: 茶幼苗中的氨基酸的纸层析谱

(展开剂: (I) 酚-水-氨(80:20:0.25), (II) 正丁醇-醋酸-水(4:1:1))

1—门冬氨酸; 2—谷氨酸; 3—氨基己二酸; 4—丝氨酸; 5—门冬酰胺; 6—甘氨酸; 7—苏氨酸; 8—谷酰胺; 9—丙氨酸; 10—酪氨酸+β-丙氨酸; 11—γ-氨基丁酸; 12—精氨酸等; 13—谷氨酸 γ-甲酰胺; 14—脯氨酸; 15—茶胺; 16—缬氨酸; 17—苯基丙氨酸; 18—白氨酸+异白氨酸

C, D: ^{14}C -甲胺进入谷氨酸 γ-甲酰胺的情况

(C: 放射自显影, 原点 4600cpm(盖革-弥勒计数器)曝光时间 6 天。

D: 用双向纸上层析扫描器对滤纸上放射性进行的测定)

灵敏度同茚三酮相等或稍差, 但在纸上的稳定性比茚三酮好得多, 呈桃红色。在检出脯氨酸和羟基脯氨酸时用靛红、检出精氨酸时用 α-萘酚和次氯盐酸等。也有把几种东西配合使用的, 都请参阅专书。

(2) 用紫外线检出

这是一种物理方法, 用紫外光对荧光性物质进行检出, 常用于检出核酸等物。用于检测氨基酸时, 有菲力普氏法及菲力普氏改良法(较原法灵敏度高)。这就是在展开后把滤纸在 110~120°C 下干燥 10~15 分钟(但不要烘焦), 并用紫外线测定器进行紫外线检出, 如在

3650Å 处观察, 可以看出萤光点。含有 ^{14}C 的氨基酸的检出在定量时, 由于用茚三酮显色后, α 位上的 ^{14}C 会脱去羧基, 因而不能测定, 所以用紫外线检出特别相宜。但灵敏度低。如用 0.01% sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate 的甲醇溶液处理滤纸, 则灵敏度提高十倍。

(3) 用肉眼定性和以光密度计定量

预先对标准氨基酸进行展开, 以其样品斑点的大小和颜色的深浅为比较基准。要检出的样品经过显色后, 对肉眼看上去尽管色浅而能清楚看出的斑点, 以一个 + 号为标记, 随着颜色的加深和点面积的加大, 标记渐可增至四个 + 号, 这样就可以 + 号的多少来对不同的样品进行比较。为了在显色后的滤纸上进行定量, 有专用的光密度计。也有测定斑点面积来定量的方法。

(4) 放射自显影的制作方法

这也是一种物理方法, 是将含有放射性同位素的化合物展开, 并对其放射性进行定性、定量的一种方法。首先把纸层析谱与 X-射线软片合并在一起进行曝光。此时须使滤纸干透, 然后把它放进放射自显影干板匣内, 在暗室中曝光。X-射线软片没有正反面之分。曝光时间应如本章第 1 节第 (3) 项所述, 参照原点的放射性强度来决定。作者根据经验所获得的放射性强度与曝光时间的关系如图 9 所示。但是, 这种关系因原子核种类不同而异, 因单向或双向展开而异, 也因含有放射性的物质是一个或多个而异。 ^{14}C 的曝光时间即使长些, 也不大会产生成晕现象。

检定 ^3H 时, 由于 ^3H 的 β -射线能量较弱, 滤纸表面上的放射性是在 1/40 左右, 所以作成放射自显影时, 曝光时间必须很长。但如把它浸在液体闪烁性萤光体中进行曝光, 则曝光时间可以缩短很多。本来需要一个月以上时间的, 只要两天就获得同样程度的感光。操作方法是在防蚀铝制的浅盆内铺上玻璃板, 把纸层析谱铺在玻璃板上, 在盆内放进液体闪烁性萤光体(联三苯 3 克, POPOP 0.1 克/升甲苯), 深可浸没盆内各物, 然后把 X-射线软片放在滤纸上, 彼此严密接触, 再用玻璃板压在上面。曝光 48 小时(再长也无更大效果)后, 把 X-射线软片先用水洗, 随即以通常方法显象和定影。实例如图 10 所示。

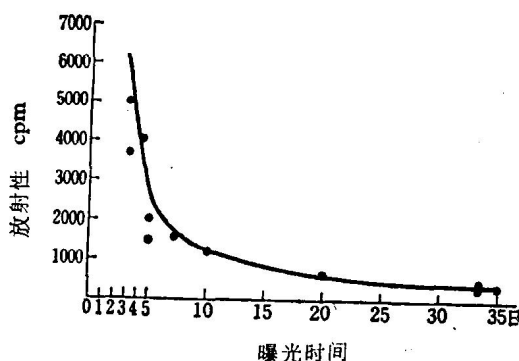


图 9 原点的放射性强度与曝光时间的关系 (^{14}C 化合物)

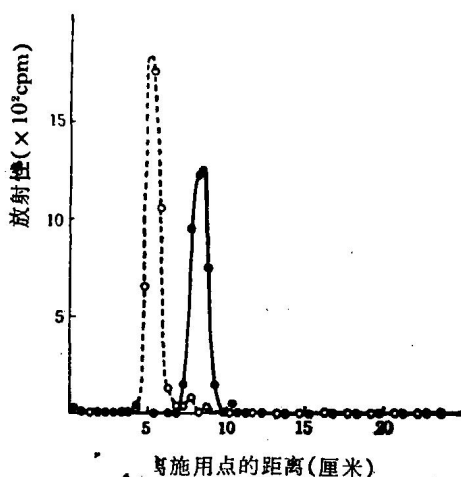


图 10 用气体接触法加标记的肌醇 il-H^3 在纸层析谱上的分布 (用放射自显影指示)

...○...及(1): 用丁醇-醋酸-水 (4:1:5 上层)
...○...及(2): 用丙醇-醋酸-水 (7:1:2)
均进行三次展开

(5) 利用放射自显影做定量

这种方法是把预先用同位素作好标记的检出对象物质同时点样, 展开后取得其放射自显影, 察知其存在处所。抽提后加以定量。放射性物质本身的定量分析, 是用放射自显影以侦知该物质的处所, 并用下文第(6)项所述各种测定器测定(参照图 8C)。

(6) 用放射性测定器进行定量

a. 盖革-弥勒计数器 把从第(5)项所述放射自显影取得的样点或用非利普法检测出的样点, 如图 11(d)所示, 用铅笔在滤纸背面把它的轮廓描出来。在废弃的 X-射线软片上, 照(a)和(b)那样, 剪成两个孔, 比盖革-弥勒计数器窗面积略微小些。然后在这上面从事测定, 并把这两处的放射性的合计数作为样点的值。做完这一步后, 用茚三酮等在滤纸正面喷雾, 使之显色, 便能对放射性和样点进行对比观察。原点与滤纸上的放射性比(回收率)为约 70~80%。

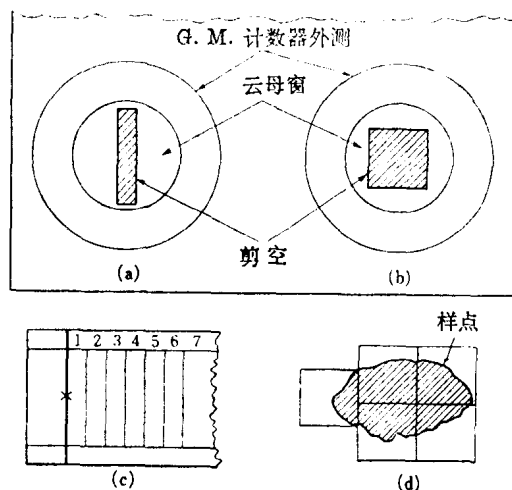


图 11 用盖革-弥勒计数器的测定法

b. 流动气体计数管 这和 a 不同, 是将样点那一部分剪通而后测定。并如图 12 所示, 把单向展开后的滤纸切成许多 5 毫米的小块, 依次测定。

c. 单向纸层析扫描器 (paper chromatography scanner) 这是自动测定单向纸层析谱上放射性分布的一种仪器, 是 4π 流动气体计数管式。滤纸移动速度和记录纸的速度是同步的, 所以测定后即可通过显色等以与样点对比。图 13 所示便是一个例子。在此场合, 原点的出发点以及前缘都看不出来, 所以在测定前, 要在原点前和前缘后略微添加 1000cpm 左右的 ^{14}C 物质, 作为标记。

d. 双向纸层析扫描器 这是从滤纸正反两面检出双向纸层析谱, 并在同样大小的纸上记录出计数值的一种仪器。如果事前设定自然计数值, 则仅记录在此以上的计数值。如果预先设定适当的计数值, 则超过此值的计数值都被记录成红字。把这些数值累计, 就能表示这种物质的放射性。图 8D 便是一个例子。这是能在测定后通过显色等方法进行对比、并能定量分析放射自显影的一种仪器。

e. 液体闪烁计数器 这种方法是把样品溶解在甲苯或二甲苯里, 加入 PPO (聚氧化丙

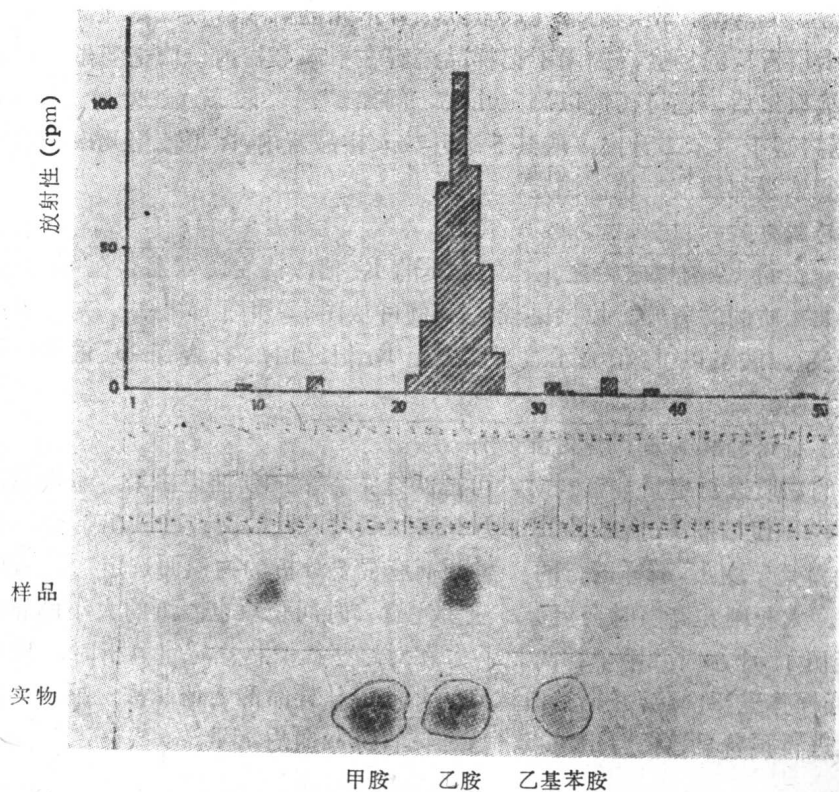


图 12 茶叶组织均浆中自氨基丙酸-2- ^{14}C 生成的乙胺- ^{14}C
流动气体计数管的测定例(展开剂: 正丁醇-醋酸-水(4:1:5, 上层))

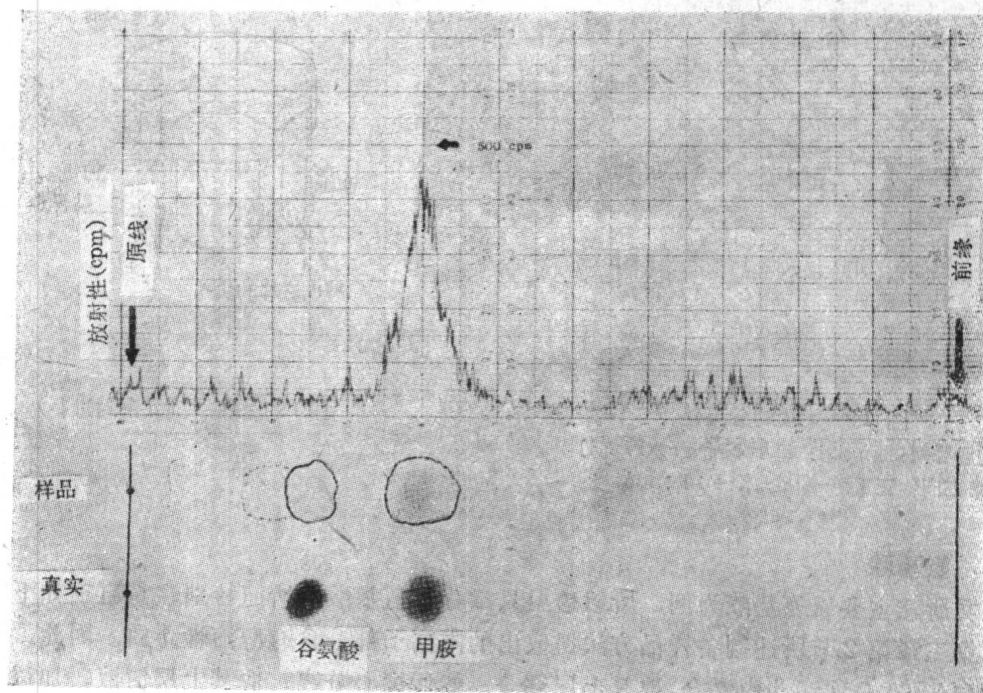


图 13 谷氨酸 γ -甲酰胺的水解物的纸层析谱
纸层析扫描器的一个实例(展开剂: 丁醇-醋酸-水(4:1:5, 上层))

烯)、POPOP等荧光物质,使放射能变成荧光,并用光电倍增器接受荧光,以从事计数的一种方法。在用纸层析法的场合,如果不把样品溶解在甲苯等物内,而把滤纸放进样品瓶内来测定,则把滤纸取出后,还可再用以测定几次。例如:氨基酸就能这样。把PPO 4克和POPOP 0.1克溶解于甲苯1升内,取其5毫升放入样品瓶内,即可使用几次,溶剂会渗透滤纸,所以不把滤纸全部浸渍,也能测定。

(7)物质的断定

通常是用物质的 R_f 值以求得之。已知物质的 R_f 值,请参阅专书。在 R_f 值变动很大的场合,可把标准物质同时展开,以供比较。其例可从图12和图13得知。对于 R_f 值的变动,糖类以 R_g 值表示,胺类以 R_s 值表示。为供测定 R_f 值之用,有装有刻度的橡皮比例尺和三角尺,用起来方便。

(8)从纸层析谱抽提物质并作定量分析

对要分析的物质进行定量和鉴别时,可把滤纸上各个成分抽提出来。举例以言,作者为要单独提取茶胺,便如图14所示,用菲力普法从两向展开的交点确认出茶胺,把它剪下来进行抽提。抽提是象图15那样进行的。展开剂应视要分析的物质而选定。洗脱时间太短则物质会有残剩,太长则在高温时会生霉,应予以注意。时间长短也因纸的大小而异。作者所分析的茶胺,经历了24小时几乎全部洗脱了。在对这些提取物作定量分析时,应以滤纸片作为空白,用同样操作进行洗脱,并把空白试验的测定值从样品测定值减去。抽提后即行定量,或在层析谱上进行预备显色,剪下斑点,放进试管洗脱而后定量。

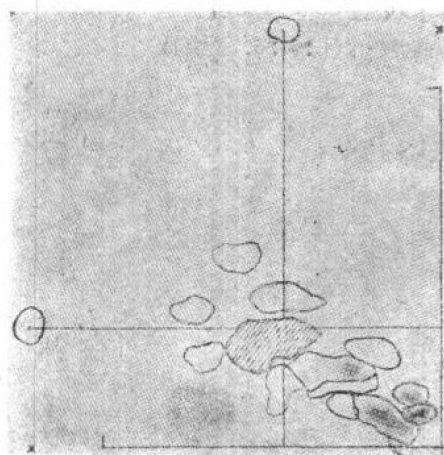


图14 茶胺的分离法

(展开剂:第一向:二甲基吡啶-水(7:3))

第二向:正丁醇-醋酸-水(4:1:1))

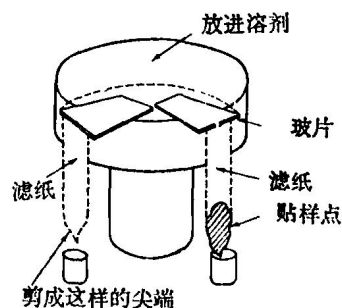


图15 洗脱装置(密封进行)

3. 氨基酸

上文所述主要以氨基酸为例,所以这里只举分离氨基酸时所应特别注意事项如下。

用第三章第2节所述制备样品方法提取出的阳离子部分含有醇溶性蛋白。因此,加入三倍量的氯仿,在分液漏斗内混合,取其上层部分。然后离心分离,取其上层清液,加以浓缩。展开时须注意样品和展开剂会产生缩合。用苯酚展开甘氨酸- ^{14}C ,就会生成酚与甲醛和甘氨酸

酸的缩合物。要防止测定 ^{14}C 时的这种困难, 把酚在有 Al 和 NaHCO_3 存在的条件下预先重新蒸馏, 或把滤纸预先用草酸洗涤, 可有相当效果。另外, 用酚这种没有缓冲作用的溶剂来展开谷氨酸和门冬氨酸等双羧酸的氨基酸时, 有时会出现两个斑点。

4. 胺类

植物界存在着挥发性胺类, 这已有人报导过, 并已有把纸层析法用来分离和确定这些胺类。用盐酸把 80% 乙醇的 pH 值调节到 2~3, 用它提取出样品。把提取物进行水蒸汽蒸馏, 或用微量扩散法等使它被吸收于 0.01~0.1N 的盐酸中, 再用碱性干燥器使它干燥, 即可用为样品。

(1) 滤纸

如果直接使用普通滤纸, 伯胺会产生两个斑点, 或使 R_f 值发生相当程度的变动。在此情况下, 可把滤纸浸入 0.15M 的醋酸钠液 (作者用 0.2%), 待它干后使用。实验例如图 12 和图 13 所示。仲胺和叔胺所用滤纸可不处理。

(2) 展开剂

可用丁醇-醋酸-水 (50 : 1 : 49) (40 : 10 : 50)。在区别脂族一元胺和环状胺、二元胺、乙醇胺时, 以用可力啉-水 (50 : 50) 为适当。

(3) 显色剂

对伯胺和仲胺, 可用茛三酮为显色剂, 仲胺也可用亚硝基铁氰化钠 (Nitroprusside- Na)。叔胺不能用茛三酮显色, 可用碘蒸汽处理。这就是把碘放在蒸汽筒内, 使在 20°C 为蒸汽所饱和, 并在筒内悬挂滤纸 10 小时。这时, 伯胺和仲胺也能同样起反应, 但灵敏度远比用茛三酮差。各种胺都在略呈褐色的滤纸上产生深褐色的斑点。把这滤纸重新干燥, 放置一昼夜, 则碘升华而斑点仍旧变成白色, 此后用茛三酮使之显色, 便可把它检查出来 (伯胺和仲胺)。检出灵敏度, 伯胺是 0.6 微克, 仲胺是 2 微克, 叔胺是 3 微克。胺的 R_f 值请参考 E. S. Kamienski 的论述 (载《Planta》, 50, 291, 1957 年)。

5. 糖类

照上文第三章第 2 节所述方法取得中性部分, 以之为样品。

(1) 展开剂

常用正丁醇-醋酸-水 (40 : 10 : 50 或 60 : 15 : 25) 的上层液等。此外也用正丁醇-吡啶-水 (30 : 20 : 15)。

(2) 展开法

糖, 特别是低糖类, 其 R_f 值彼此接近, 所以用通常展开方法难以分离, 要用分次展开法, 就是在进行一次展开后, 把滤纸晾干, 再在相同方向上作第二次、第三次展开。三次展开, 则如图 16 所示, 分离得很清晰。另外, 把种种溶剂互相组合, 用双向法展开, 也是可以的。

(3) 显色剂

苯胺邻苯二甲酸是常用的。这就是把

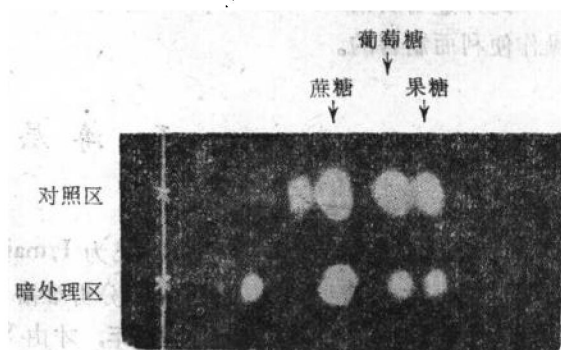


图 16 茶叶糖类吸取的 ^{14}C 糖类的纸层析谱 (三次展开) 的放射自显影