

第一章 生化实验基本技术

第一节 分光光度法

一、紫外及可见分光光度法

在分光光度计中，将不同波长的光连续地照射到一定浓度的样品溶液时，便可得出与不同波长相对应的吸收强度。如以波长 (λ) 为横坐标，吸收强度 (A) 为纵坐标，就可绘出该物质的吸收光谱曲线。利用该曲线进行物质定性、定量的分析方法，称为分光光度法，也称吸收光谱法。用紫外光源测定无色物质的方法，称为紫外分光光度法；用可见光源测定有色物质的方法，称为可见分光光度法。它们与比色法一样，都以 Beer-Lambert 定律为基础。

近年来，紫外及可见分光光度分析已得到广泛的应用，它不仅可以用于物质的鉴定及结构分析，而且还可以用于某些物质含量的测定。

(一) 分子光谱分析概念

分子中的运动有多种形式，除电子的运动以外，还有组成分子的各原子间的振动以及分子整体的转动。分子中这三种不同运动状态都对应有一定的能级，即分子的电子能级、振动能级和转动能级。分子的某一种运动状态从一个能级转移到另一个能级，称为跃迁。例如某些电子吸收了外来辐射的能量，就从一个能量较低的能级跃迁到另一个能量较高的能级，每一跃迁都对应着吸收一定能量（即一定的波长）的辐射。

分子的转动是分子环绕通过它的重心的轴转动时所具有的动能，分子发生转动能级跃迁时，将在电磁辐射的微波区（即远红外区）产生吸收光谱。振动能是分子由于振动而具有的位能和动能之和，分子振动跃迁引起的吸收，将发生在电磁辐射的中红外区域。电子能是分子和原子中电子的位能和动能所具有的能量，当分子发生电子运动能级跃迁时，所引起的吸收则发生在电磁辐射的紫外及可见光区。

利用分子光谱对物质进行定性和定量分析的方法，称为分子光谱分析。分子光谱分析可分为吸收光谱（如红外、紫外及可见吸收光谱）、发射光谱（如荧光光谱）和散射光谱（如喇曼光谱）三种基本类型。在一般情况下，分子处于基态，当光与物质相互作用时，分子吸收光能，从低能级跃迁到高能级，产生吸收光谱；反之，若分子从高能级回复到低能级，则释放出光能，形成发射光谱。当光被物质散射时，分子内能级的跃迁改变散射光频率，而产生散射光谱。物质对辐射能的吸收或发射是由物质本性所提供的最重要的标志图，因此可以从中获得定性和定量的数据。

(二) 紫外-可见吸收光谱的电子跃迁和吸收带

紫外-可见吸收光谱属于电子光谱，是分子的外层电子或价电子的跃迁得到的光谱。紫外光区是波长在 $10\sim 400\text{ nm}$ 的光波区，可见光区是波长在 $400\sim 800\text{ nm}$ 的光波区。

当分子吸收一定能量的辐射时，就发生相应的能级间的电子跃迁。有机化合物在紫外-可

见光区内电子跃迁的方式通常有四种类型：

(1) $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁 这是分子中成键 σ 轨道上的电子吸收辐射后，被激发到相应的反键 σ^* 轨道上。引起 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁所需要的能量很大，它们的吸收波长小于 150 nm。

(2) $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁 这类跃迁可由在 150~250 nm 区域内的辐射引起，其大多数吸收峰出现在 < 200 nm 区域内。 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁所需能量一般比 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁小。

(3) $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁 发生此类跃迁所需能量较小，吸收波长大多在紫外区。不饱和烃、共轭烯烃及芳香烃均可发生这类跃迁。

(4) $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁 分子中含有孤对电子的原子和 π 键同时存在时，会发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁。此类跃迁所需能量小，吸收波长 > 200 nm。

有些化合物的分子中含有一个或几个 $>C=C<$ ， $>C=O$ ， $-COOH$ ， $-NO_2$ 等基团，它们可产生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 或 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁，得到紫外或可见吸收光谱。因此将这类对紫外或可见光有吸收作用的不饱和键或基团称为生色团。

此外，还有电荷转移跃迁和 $d \rightarrow d$ 跃迁，后者产生的吸收光谱又称为配位体场吸收谱，其吸收峰一般在可见光区。

分子中电子跃迁形成的紫外-可见光吸收光谱主要可分为以下四种类型：

(1) K 吸收带 由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收谱带，摩尔吸光系数可达 10000，吸收谱带较强。共轭烯烃及取代芳香族化合物可产生这种谱带。

(2) R 吸收带 由 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁形成的吸收谱带，由于摩尔吸光系数很小，吸收带较弱，易被强吸收带掩盖，并易受溶剂极性的影响而发生偏移。

(3) B 吸收带 它是芳香族化合物及杂环芳香族化合物的特征谱带。

(4) E 吸收带 它是芳香族化合物的特征性谱带之一，吸收强度大，摩尔吸光系数为 2000~14000，吸收波长偏向紫外的低波长部分，有的则在真空紫外区（远紫外区）。

结构类型不同，分子的紫外吸收谱带的种类也不同，有的分子可有几种吸收谱带。

(三) 紫外-可见吸收光谱与分子结构的关系

如前所述，化合物的紫外吸收光谱与电子跃迁有关。化合键吸收某一波长的紫外光取决于基态跃迁到激发态之间的能量差 (ΔE)，只有当某一波长的能量与化合键的 ΔE 相当时，才能被吸收。因此，紫外光的吸收与化合键的类型有关，不同结构的化合物呈现不同的紫外-可见吸收光谱特征。

(1) 饱和烃 饱和碳氢化合物仅含有 σ 电子的单键，故只能发生 $\sigma \rightarrow \sigma^*$ 跃迁，该跃迁位于真空紫外区的短波长处。当饱和碳氢化合物中的氢被氧、氮、卤素、硫等取代时，由于这类原子中有 n 电子，故可产生 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁，与相应的饱和化合物相比，吸收峰在较长波长处。

(2) 不饱和脂肪烃 仅含有一个重键的简单不饱和脂肪族化合物，如乙烯和乙炔，存在 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁，最大吸收波长在 170 nm，摩尔吸光系数大约为 10000。

对含有两个或两个以上双键者，其吸收光谱有三种情况：①两个双键被两个或两个以上单键隔开，吸收光谱的 $\lambda_{\max}$ 与只含一个双键的 $\lambda_{\max}$ 相同，但强度增大 1 倍；②两个双键直接相连的化合物，如丙二烯，其 $\lambda_{\max}$ 移到 225 nm 附近，摩尔吸光系数约为 500；③含共轭双键者，其吸收光谱会发生波长红移，波长红移随着共轭体系的加长而显著，摩尔吸光系数也随之增加。

(3) 芳香族化合物 苯的紫外光谱因有 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁，所以出现三个吸收峰，它们分别是由苯环内的双键上的 π 电子被激发和苯环的共轭双键引起的。在苯环上引入一个取代基，会使苯的由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收带发生移动。苯的多取代物的吸收光谱可随取代基性质的不同而

不同。

(4) 杂环芳香族化合物 如呋喃、噻吩及吡咯等是只含一个杂原子(O、S、N)的五元环化合物,它们都有两个 $\text{>C}=\text{C}<$ 键和杂原子上的孤对电子,故既有 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁又有 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收谱带。六元杂环芳香族化合物如吡啶,其分子结构中有一个 N 原子,该原子上有孤对电子,因而也有 $\pi \rightarrow \pi^*$ 及 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁,紫外吸收光谱与苯相类似。

(5) 羰基化合物 如饱和醛、酮类化合物,它们的羰基含有一对 σ 电子、一对 π 电子和两对非键 n 电子,因此可呈现三个吸收谱带,即由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收峰,在 150 nm 附近; $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁引起的吸收峰,在 190 nm 附近; $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收峰,在 270~300 nm 的范围内。又如 α,β -不饱和醛、酮、酸、酯类化合物,它们含有与羰基共轭的不饱和碳碳键,故同时存在由 $\pi \rightarrow \pi^*$ 及 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收光谱。

(6) 含氮化合物 含有 $-\text{N}=\text{N}-$ 键的直链化合物产生的低强度的吸收带,位于近紫外区和可见光区。含有氮氧多重键的基团(硝基、亚硝基、硝酸根及亚硝酸根),在近紫外区都会呈现由 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁引起的吸收谱带。

(7) 配位化合物 它们的紫外-可见吸收光谱类似于有机化合物,一般有两种:一种是由电荷转移跃迁引起的,另一种是由 d 电子受配位体的影响发生在 d 轨道的跃迁所产生的。

(四) 紫外-可见吸收光谱的定性分析

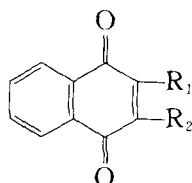
应用紫外-可见吸收光谱对物质进行定性分析的依据是光谱上的一些特征性吸收,如最大吸收波长、吸光系数、吸收峰数目、吸收强度及峰型等,依此可以推断化合物的结构、分子骨架,判别异构体等。但应考虑到,物质的紫外-可见吸收光谱基本上是分子中生色团及助色团的特性,不是整个分子的特性,因此要完全决定物质的分子结构,不能单纯依赖紫外-可见光谱分析,还必须与其他手段,如红外光谱、质谱等相配合,才能得出正确的结论。

若是同种化合物,则它们的紫外-可见吸收光谱的特征应该是完全一致的,特别是最大吸收波长和吸光系数是鉴定物质的常用物理常数。

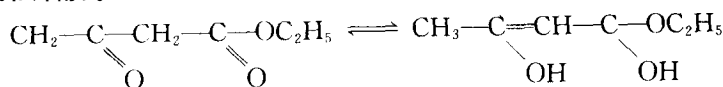
利用紫外-可见吸收光谱分析推断化合物分子结构,一般应用在以下几方面:

(1) 初步推断化合物的结构 某一化合物如果在 200~400 nm 区间无吸收峰,说明它不存在共轭双键体系。如果在 270~350 nm 区间出现很弱的吸收峰($\epsilon=10\sim100$),并且在 200 nm 以上无其他吸收峰,表示该化合物含有带孤对电子的未共轭的生色团。有多个吸收峰,且在可见光区出现吸收峰,则该化合物结构中具有长链共轭体系或稠环芳香族生色团。如果有波长较长的吸收峰,且 ϵ 为 10000~20000 时,化合物含有 α,β -不饱和酮或共轭烯烃结构。若波长吸收峰在 250 nm 以上,且 ϵ 为 1000~10000 时,表示该化合物具有芳香结构。

(2) 推断化合物的分子结构骨架 推断未知化合物分子结构骨架的基本依据是,结构不完全相同但具有相同生色团的两种化合物,其紫外吸收光谱应该相同。例如某一未知物的紫外吸收光谱 λ_{max} 如下: 249 nm ($\lg \epsilon$ 为 4.28), 260 nm ($\lg \epsilon$ 为 4.26), 325 nm ($\lg \epsilon$ 为 3.28)。经与文献资料比较,发现该未知物的吸收光谱与 2,3-二烷基-1,4-萘醌的紫外吸收光谱相近,依此可推断该未知化合物的骨架为:



(3)鉴别化合物异构体 有机化合物由于基团之间的排列不同或空间位置不同,可出现多种异构体现象。不同的异构体,紫外吸收光谱也不同。例如,乙酰乙酸乙酯存在两种互变异构体,即酮式和烯醇式:



酮式异构体的 $\lambda_{\max}$ 位于 204 nm, $\epsilon_{\max}$ 为 16; 烯醇式异构体的 $\lambda_{\max}$ 位于 245 nm, $\epsilon_{\max}$ 为 18000。通过紫外吸收光谱分析,即可将两种异构体鉴别开来。

(五)紫外-可见吸收光谱的定量分析

紫外-可见分光光度法进行定量分析不仅可以测定常量组分,而且也可以测定超微量组分,即可以测定单组分化合物的含量,也可以对多组分混合物同时进行测定。它和比色法一样,定量分析的依据是 Beer-Lambert 定律,物质的吸光度 (A) 和它的浓度 (C) 呈线性关系:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot L$$

由于比色皿中液层厚度 (L) 是不变的,因此只要选择适宜的波长,测定溶液的吸光度 (A),就可求出溶液浓度和物质的含量。

1. 单组分定量分析

常用的单组分定量分析方法有绝对法、标准对照法、标准曲线法、吸光系数法及标准加入法。下面介绍三种方法:

(1)吸光系数法 先测出标准品和样品在 $\lambda_{\max}$ 下的 A 值,根据公式 $A = \epsilon \cdot C \cdot L$ 求出吸光系数,或从有关手册上查出 ϵ 值,再按下式计算百分含量:

$$\text{样品含量}/\% = \frac{[E_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_{\max}}^{\text{样}}}{[E_{1\text{cm}}^{1\%}]_{\lambda_{\max}}^{\text{标}}} \times 100\%$$

应用本法的一个优点是即使没有标准样品也能进行定量测定,缺点是文献所载的吸光系数常有差异,结果影响定量的准确性。

吸光系数(或称吸收系数、消光系数)是反映物质对光吸收强度的一个物理常数,吸光系数大,表示该物质对光吸收强度大;反之则小。吸光系数通常采用两种方法表示:①摩尔吸光系数(ϵ),是指在 1 L 溶液中含有 1 mol 溶质,且液层厚度为 1 cm 时,在 $\lambda_{\max}$ 和一定条件下测得的吸光度(A);②百分吸光系数 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$),是指在 100 mL 溶液中含有 1 g 溶质,且液层厚度为 1 cm 时,在 $\lambda_{\max}$ 和一定条件下测得的吸光度。 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 与 ϵ 之间可按下式换算:

$$\epsilon = E_{1\text{cm}}^{1\%} \times \text{相对分子质量} / 10$$

有些物质的 ϵ 值很大,为表示方便,常用 $\lg \epsilon$ 表示之。

(2)标准对照法 在相同条件下,配制标准品溶液和样品溶液,在 $\lambda_{\max}$ 处分别测得 $A_{\text{标}}$ 及 $A_{\text{样}}$,然后根据下式计算出样品浓度:

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times C_{\text{标}}$$

因为所测的是同一物质,且用同一波长,故 ϵ 值相等,亦即吸光度与浓度成正比。

(3)标准曲线法 将标准品配制一系列适当浓度的溶液,在 $\lambda_{\max}$ 处测定,得出一系列与不同浓度相对应的 A 值。将 C 作横坐标, A 作纵坐标,绘制成标准曲线。再以同样条件测得样品的 A 值,从标准曲线中找出相对应的浓度。

2. 多组分定量分析

解决多组分混合物中各组分测定的基础是吸光度的加合性。对于一个含有多种吸光组分

的溶液，在某一测定波长下，其总吸光度应为各个组分的吸光度之和。这样即使各个组分的吸收光谱互相重叠，只要服从 Beer-Lambert 定律，也可测定混合物中各个组分的浓度。

(六) 紫外-可见吸收光谱分析应注意的问题

为了保证紫外-可见吸收光谱分析结果的准确性，在具体分析操作时，除了对仪器的重要性能指标，如波长的准确度、吸光度的精度以及吸收池的光学性能等进行检查或校正外，尚须考虑以下诸方面的问题：

1. 样品处理

分析样品都是溶解在一定的溶剂中进行定性或定量分析测定的，所以要求选用的溶剂应对样品有高的溶解性，在紫外波长区没有吸收，溶剂与样品不应发生化学反应或相互作用。在可见光区最常用的溶剂是水，在紫外光区最常用的是环己烷、95% 乙醇及 1,4-二氧六环，这些溶剂在 210~220 nm 以上波长区无吸收作用。

2. 分析条件的选择

(1) 测量波长 一般选择最强吸收带的最大吸收波长 (λ_{max}) 为测量波长。当最强吸收带的 λ_{max} 受到共存杂质干扰，待测组分的浓度太高或吸收峰过于尖锐而测量波长难以重复时，则往往选用灵敏度稍低的不受干扰的次强峰。

(2) 狭缝宽度 狭缝宽度过大，在一定范围内会使灵敏度下降，校正曲线的线性关系不佳。狭缝宽度太小，则入射光强度太弱。一般以不减少吸光度的最大狭缝宽度为宜。

(3) 吸光度范围 吸光度在 0.2~0.8 之间时，测量精确度最好。被测量样品溶液浓度过大时，应作适当稀释，再进行吸光度测定。

3. 影响吸收光谱分析的因素

供紫外-可见吸收光谱分析的样品都溶解在某一种溶剂中，以溶液状态进行，溶液的物理化学性质会对吸收光谱产生明显的影响。首先是溶剂化可限制分析物质的自由转动，溶剂的强极性又可限制分子的振动，从而影响该物质的吸收光谱的性质。有些物质在酸、碱性溶液中有不同的解离特性，甚至发生结构的改变，因此，改变样品溶液的 pH 值将直接影响它们的吸收光谱。被测物质在浓度太大时，可因发生分子间的缔合而引起吸收光谱的变化，所以控制分析样品的浓度范围是十分必要的。如前所述，供紫外-可见吸收光谱分析的合适浓度，其吸光度应在 0.2~0.8 之间。

二、荧光光谱分析法

当紫外光照射某一物质时，该物质会在极短的时间内，发射出较照射光波长为长的光。而当紫外光停止照射时，这种光也随之很快消失，这种光称为荧光。荧光是一种光致发光现象。如前所述，分子吸收了某一波长区的辐射能后，它的电子可跃迁至激发态，然后以热能形式将这一部分能量释放出来，本身又恢复到基态。如果吸收辐射能后处于电子激发态的分子以发射辐射的方式释放这一部分能量，即为光致发光。再发射的波长与分子所吸收的波长可以相同，也可以不同。物质所吸收光的波长和发射的荧光波长与物质分子结构有密切关系。同一种分子结构的物质，用同一波长的激发光照射，可发射相同波长的荧光，但其所发射的荧光强度随着该物质浓度的增大而增强。利用这些性质对物质进行定性和定量分析的方法，称为荧光光谱分析法，也称荧光分光光度法。这种方法具较高的选择性及灵敏度，试样量少，操作简便，且能提供比较多的物理参数，现已成为生化分析和研究的常用手段。

(一) 荧光的产生及其与分子结构的关系

1. 荧光的产生

当光进入某种物质后，可以有两种情况：一种是进入物质后，能量几乎不被吸收；另一种是能量被全部或部分吸收。在后一种情况，在吸收光的过程中，光能被转移给分子。根据量子理论，分子从光波中吸收能量是以不连续的、整份单位的形式发生，这些不连续的微小能量单位被称为光量子。这也就是说，频率 ν 的单色光的能量必定是 $h\nu$ 的整数倍。每个光量子的能量

$$E = h\nu = hc/\lambda = hc\omega$$

这里， h 为普朗克常数， $6.63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ； ω 为波数，即 1 cm 长度中电磁波的数目。从公式可见，能量 E 与 λ 成反比。

每个分子具有一系列分立的能级，处于基态的分子吸收了相应频率的能量后，可以从低能级跃迁到高能级。被吸收的光量子的能量正好等于两个能级之差。

根据玻尔兹曼分布，分子在室温时基本上处于电子的基态。吸收了紫外-可见光后，基态电子只能跃迁到单线激发态的各个不同的振动能级。跃迁后能量较大的激发态分子，在很短时间内 (10^{-15} s)，由于分子间的碰撞或分子与晶格间的相互作用，以热能形式或内转换方式消耗部分能量，从较高振动能级回到最低振动能级。如果这时分子不通过热能或内转换形式来消耗能量，回到基态，而是通过发射出相应的光量子来释放能量，回到基态的各个不同振动能级时，就发射荧光。由于在发射荧光前已有一部分能量消耗，所以发射荧光能量要比吸收紫外光的能量小，也就是荧光的特征波长比吸收的特征波长要长。

2. 荧光与分子结构的关系

在许多有机物和无机物中，只有小部分物质会发生强的荧光，它们的激发光谱、发射光谱及荧光强度与它们的结构有密切的关系。强荧光物质在分子结构上往往具备如下特征：

(1) 具有大的共轭 π 键结构 荧光物质的分子都含有共轭双键 (π 键) 体系。共轭体系越大，离域 π 电子越容易激发，越容易产生荧光。大部分荧光物质都具有芳香环或杂环。芳香环越大，其荧光峰越移向长波长方向，且荧光强度往往也较强。

具有相同共轭环数的芳香族化合物，线性环结构者的荧光波长比非线性者长。例如蒽（线性环结构）的荧光峰位于 400 nm，菲（非线性环结构）的荧光峰位于 350 nm。

(2) 具有刚性平面结构 荧光量子产率高的荧光物质，其分子多为平面构型，并具有一定刚性。例如蔡和维生素 A 都有 5 个共轭 π 键，前者为平面结构，后者为非刚性结构，因而蔡的荧光强度为维生素 A 的 5 倍。

(3) 具有最低的单线电子激发态 S_1 为 π, π_1^* 型 属于这一类者多为不含杂原子 (N, O, S 等) 的有机荧光物质，其特点是：最低单线电子激发态 S_1 为 π, π_1^* 型，即 $\pi \rightarrow \pi_1^*$ 跃迁。它属于电子自旋允许的跃迁，摩尔吸光系数大约为 10^4 ，比 $n \rightarrow \pi_1^*$ 或 $n \rightarrow \sigma_1^*$ 型跃迁大 100 倍以上，荧光强度大。

(4) 取代基团为给电子取代基 芳香烃及杂环化合物的荧光光谱和荧光量子产率常随取代基团的变化而变化。若取代基为给电子取代基，则荧光强度增加。属于这一类基团的有 $-\text{NH}_2$ ， $-\text{NHR}$ ， $-\text{NR}_2$ ， $-\text{OH}$ ， $-\text{OR}$ ， $-\text{CN}$ 。含这类基团的荧光物质，其激发态常用环外的羟基或氨基上的 n 电子激发转移到环上而产生，由于它们的 n 电子的电子云几乎与芳香环上的 π 轨道成平行，因此实际上它们共享了共轭 π 电子结构，同时扩大了它们的共轭双键体系。所以这类化合物的吸收光谱与发射光谱的波长都比未被取代的化合物的波长长，荧光量子产率也随之提高。

(二) 荧光分光光度计简介

荧光分析是从入射光的直角方向、黑背景下检测样品的发光信号，这与紫外分光光度法从入射光方向、在亮背景下检测光吸收信号相比，具有更高的灵敏度。此外荧光分析在检测器前面是发射单色器，样品信号经过分光后可以除去样品以外的辐射，从而为方法的专一性提供了有利的条件。

用于测量荧光的仪器种类很多，如荧光分析灯、荧光光度计、荧光分光光度计及测量荧光偏振的装置等。其中实验室里较常用的是荧光分光光度计。

荧光分光光度计的结构包括五个基本部分：

(1) 激发光源 用来激发样品中荧光分子产生荧光。常用汞弧灯、氢弧灯及氙灯等，目前荧光分光光度计以用氙灯为多。

(2) 单色器 用来分离出所需要的单色光。仪器中具有两个单色器：一是激发单色器，用于选择激发光波长；二是发射单色器，用于选择发射到检测器上的荧光波长。

(3) 样品池 放置测试样品，都用石英制成。

(4) 检测器 作用是接收光信号，并将其转变成电信号。荧光强度通常都比较弱，因此要求检测器具有较高的灵敏度，常用光电倍增管作检测器。

(5) 记录显示系统 检测器出来的电信号经过放大器放大后，由记录仪记录下来，并可数字显示和打印。

(三) 荧光分析法

荧光分析方法根据不同的目的性，有多种分析方法，诸如同步荧光测定、三维荧光光谱技术、导数荧光测定、时间分辨荧光测定、相分辨荧光测定、荧光偏振测定、低温荧光测定、荧光免疫检测等等，各种不同的分析方法在仪器配置上常需要增添相应的配件。这些方法在此不作详细叙述，只讨论常规的荧光分析法。

1. 直接测定法和间接测定法

利用荧光分析法对被分析物质进行浓度测定，最简单的便是直接测定法。某些物质只要本身能发荧光，只须将含这类物质的样品作适当的前处理或分离除去干扰物质，即可通过测量它的荧光强度来测定其浓度。

有许多物质，它们本身不能发荧光，或者荧光量子产率很低仅能显现非常微弱的荧光，无法直接测定，这时可采用间接测定方法。

间接测定法有以下几种：

(1) 化学转化法 通过化学反应将非荧光物质转变为适合于测定的荧光物质。例如金属离子与螯合剂反应生成具有荧光的螯合物。有机化合物可通过光化学反应、降解、氧化还原、偶联、缩合或酶促反应，使它们转化为荧光物质。

(2) 荧光淬灭法 这种方法是利用本身不发荧光的被分析物质所具有使某种荧光化合物的荧光淬灭的能力，通过测量荧光化合物荧光强度的下降，间接地测定该物质的浓度。

(3) 敏化发光法 对于很低浓度的分析物质，如果采用一般的荧光测定方法，其荧光信号太弱而无法检测。在此种情况下，可使用一种物质（敏化剂）以吸收激发光，然后将激发光能传递给发荧光的分析物质，从而提高被分析物质测定的灵敏度。

上述三种方法均为相对测定方法，在实验时需采用某种标准进行比较。

2. 多组分混合物定量法

在荧光分析中，由于每种荧光化合物具有各自的荧光激发光谱和发射光谱，因而在测定时相应地有激发波长和发射波长两种参数可供选择，这在混合物的测定方面比分光光度法具有

更有利的条件。

当混合物中各个组分的荧光峰相距很远，彼此干扰很小时，可分别在不同的发射波长测定各组分的荧光强度。倘若混合物中各组分的荧光峰很靠近，彼此严重重叠，但它们的激发光谱却有显著的差别，这时可选择不同的激发波长进行测定。

在选择激发波长及发射波长之后，仍无法达到混合物中各组分的分别测定时，则可利用荧光强度的加和性质，在适宜的荧光波长处，测混合物的荧光强度，再根据被测组分各自在该波长下的最大荧光强度，仿照分光光度法列出联立方程式，求得各组分的含量。

第二节 层析法

层析法(chromatography)亦称色谱法、色层法，基本原理是使用混合物中各组分在两相(固定相和流动相)间进行分配。当流动相携带混合物经过固定相时，即与固定相相互作用，由于各组分的分子结构和性质不同，这种作用的程度就有差异(即不同组分具有不同的分配系数)，于是在不同推动力作用下，不同组分在固定相中的滞留时间就有长短之分，从而以先后不同的次序从装填有固定相的柱子中流出，使各组分达到彼此分离的目的。层析法的种类很多，如按两相物理状态，可分为气相层析、液相层析及超临界流体层析；按分离原理，可分吸附层析、分配层析、离子交换层析、排阻层析、亲和层析等；按层析过程及动力学过程，可分洗提层析、置换层析及前沿层析；按固定相的形态，分为柱层析和平板层析；此外还有其他多种层析类型。

一、纸层析法

纸层析法(paper chromatography)是分配层析技术的一种，是利用各物质不同的分配系数，使混合物随流动相通过固定相时而予以分离的方法。

分配系数是指一种溶质在两种互不相溶的溶剂中的溶解达到平衡时，该溶质在两相溶液中所具浓度的比例。不同物质因其结构和性质不同而有不同的浓度比，即有不同的分配系数。在等温等压条件下，分配系数(K)用下式表示：

$$K = K_2/K_1$$

式中， K_1 是物质在流动相中的浓度； K_2 是物质在固定相中的浓度。

现在应用的分配层析技术，大多数是以一种多孔物质固着一种极性溶剂，此极性溶剂在层析过程中始终固定在多孔支持物上，称为固定相。另有一种与固定相互不相溶的非极性溶剂流过固定相，此流动溶剂称流动相。如果含有多种物质的混合物存在于两相之间，各物质将随着流动相的移动进行连续的、动态的分配，因各物质的分配系数不同，移动速率不同，结果达到彼此分离。分配层析中应用最广泛的是以滤纸为多孔支持物的纸上分配层析。它设备简单、价廉、所需样品少、分辨率能达到一般要求标准，因而较广泛地被采用。

(一)基本原理

纸上层析是以滤纸作为支持物的分配层析。滤纸纤维与水有较强的亲和力，能吸收 22% 左右的水，其中 6%~7% 的水是以氢键形式与纤维素的羟基结合。由于滤纸纤维与有机溶剂亲和力很弱，故而在纸层析时，以滤纸纤维及其结合的水作为固定相，以有机溶剂作为流动相。纸层析对混合物进行分离时，发生两种作用：第一种是溶质在结合于纤维上的水与流过滤纸的有机相之间进行分配(即液-液分配)；第二种是滤纸纤维对溶质的吸附及溶质溶解于流动相的

不同分配比进行分配（即固-液分配）。虽然混合物的彼此分离是这两种因素共同作用的结果，但主要决定于液-液分配作用。

在实际操作时，点样后的滤纸一端浸没于流动相液面之下，由于毛细管作用，有机相即流动相开始从滤纸的一端向另一端渗透扩展。当有机相沿滤纸流经点样处时，样品中的溶质就按各自的分配系数在有机相与附着于滤纸上的水相之间进行分配。一部分溶质离开原点随有机相移动，进入无溶质区，此时又重新进行分配；一部分溶质从有机相移入水相。在有机相不断流动的情况下，溶质就不断地进行分配，沿着有机相流动的方向移动。因样品中各种不同的溶质组分有不同的分配系数，移动速率也不相同，从而使样品中各种溶质组分得到分离和纯化。

通过纸层析被分离的各种溶质组分在滤纸上移动的速率通常用 R_f 表示：

$$R_f = \text{组分移动的距离} / \text{溶剂前沿移动的距离}$$

$$= \text{原点至组分斑点中心的距离} / \text{原点至溶剂前沿的距离}。$$

在滤纸、溶剂、温度等各项实验条件恒定的情况下，各物质的 R_f 值是不变的，它不随溶剂移动距离的改变而变化。 R_f 与分配系数 K 的关系：

$$R_f = 1 / (1 + \alpha K)。$$

α 是由滤纸性质决定的一个常数。由此可见， K 值愈大，溶质分配于固定相的趋势愈大，而 R_f 值愈小；反之， K 值愈小，则分配于流动相的趋势愈大， R_f 值愈大。 R_f 值是定性分析的重要指标。

在样品所含溶质较多或某些组分在单相纸层析中的 R_f 比较接近，不易明显分离时，可采用双相纸层析法。该法是将滤纸在某一特殊的溶剂系统中按一个方向展层以后，即予以干燥，再转向 90° ，在另一溶剂系统中进行展层，待溶剂到达所要求的距离后，取出滤纸，干燥显色，从而获得双相层析谱。应用这种方法，如果溶质在第一种溶剂中不能完全分开，而经过第二种溶剂的层析能得以完全分开，大大地提高了分离效果。纸层析还可以与区带电泳法结合，能获得更有效的分离效果，这种方法称为指纹谱法。

（二）实验器材

1. 滤纸

层析用滤纸的质量好坏将直接影响物质的分离效果，一种适用于层析法分离的滤纸必须达到如下要求：除了应质地均一，厚薄适当，纤维密度适中，具有一定的机械强度，还应具有一定的纯度， Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子含量要少，灰分在 0.01% 以下。我国常用的有国产新华层析滤纸 1、2、3 号，英国产 Whatman 1、2、3 号，美国产 Schleicher & Schüll (s.s) 589、595 号。

杂质含量较高的滤纸必要时需进行预处理，用 $0.01 \sim 0.4 \text{ mol/L HCl}$ 、8-羟基喹啉水溶液或加铜沉淀剂处理，可除去滤纸中某些金属离子。如果作氨基酸分析，滤纸上含有微量与茚三酮反应的物质，可用 0.5 mol/L NaNO_2 和 0.5 mol/L HCl 混合液洗涤，再用水冲洗至中性。

2. 展开装置

展开是指溶剂与点样点的滤纸接触后，由于毛细管作用，沿一定方向在滤纸上移动，同时带动溶质组份向前移动的过程。这种展开过程必须在一个被溶剂蒸汽所饱和的密闭容器中进行，防止渗析在滤纸中的溶剂挥发。容器的大小和形状依滤纸而定，最简单的是用直立的试管，大的可用玻璃标本缸。在容器底部放置适当高度的溶剂，点样后的滤纸垂直悬挂于上方或卷成圆筒状直立于溶剂中。

纸层析展开的方式依据被分离物质的种类多少、分配系数及其他分析要求，有上行及下行式展开、双向展开、环行展开等多种，较常用的是上下行展开和双向展开。其中下行展开装置比

较复杂,要求在容器的上端安置一个盛展开剂的槽,滤纸的点样端整齐地浸没于槽的展开剂中,由于毛细管作用外加重力的影响,展开剂沿着滤纸由上向下缓慢移动。这种方式一般适用于长的或大张滤纸,分离 R_f 值小而且较为接近的各种物质。

3. 展开剂

选择合适的展开剂是决定分离成败的关键。由于不同样品的组成不同,所以没有共同的规律可循,一般使用的溶剂有正丁醇、酚、三甲基吡啶、二甲基吡啶、苯甲醇等。对展开剂的选择要考虑以下几方面:

(1)同一物质在不同的溶剂中 R_f 值不同,选择溶剂时应考虑被分离物质在该溶剂系统中 R_f 值需在 0.05~0.85 之间,两个被分离物质的 R_f 值相差最好大于 0.05。

(2)溶剂系统与被分离物质之间,以及多元溶剂系统中各组分之间,都不应起化学反应。

(3)溶剂系统中含水量对 R_f 值影响很大,故要严格注意控制温度,使含水量恒定。

(4)展开溶剂都应事先处理才能应用,处理方法因溶剂性质的不同而异,常用的处理方法有酸碱反复抽提、水洗涤、干燥剂干燥、重蒸精制等。

(5)一般亲水性物质或极性较大的物质采用与水不互溶的有机溶剂加水混合作展开剂。中等极性物质采用疏水性有机溶剂与亲水性有机溶剂(甲醇、甲酰胺等)混合液作展开剂。对于有些疏水性物质或低极性物质(如高级脂肪酸)则可采用反相层析加以分离。

(三)操作要点

1 样品预处理

为了对被分析的样品达到满意的分离效果,在上样展开前一般都要进行预处理。预处理包括:

(1)尽可能地纯化,除去对纸层析分离起干扰的物质,例如样品中的蛋白质,可用三氯醋酸溶液去除。

(2)去盐 常用离子交换树脂脱盐,如氨基酸、核苷酸类样品可用弱阴性和弱阳性树脂将带有阴、阳离子的盐分除去。

(3)浓缩 对欲分离物质含量过低的样品要进行浓缩,热不稳定的物质的浓缩要在低温、低压下进行,最常用的方法是低温减压干燥或浓缩,经浓缩或冷冻干燥后的样品再溶解于特定的溶剂中。宜选用使被分离物质的溶解性较好而干扰物质的溶解度较小且又易于挥发的溶剂。

2. 点样

点样是将经处理后的样品点加在层析滤纸的特定部位,这是一项需十分仔细的操作步骤,点样的好坏会直接影响分离效果。点样可用玻璃毛细管,如作定量测定,应使用微量移液管或微量注射器,市售血球计数管经加工磨尖头部并标定体积后使用也甚理想。点样量一般在 2~20 μL 之间,要控制样品斑点的直径在 5 mm 左右。如一次点样量不够,可待斑点干燥后(或以冷风吹干)再重复点样。在同一张滤纸上作多个样品分析时,样品点彼此距离应间隔 2~3 cm。点样的位置,上行展开法一般点样在离滤纸下端 4~5 cm 处,下行展开法在离上端 6~8 cm 处。如作双相纸层析分离,点样处应位于距滤纸右侧边 5 cm 与距底边 5 cm 直线的交点,一张滤纸只能点加一个样品。

3. 展开

待滤纸上的样品溶液干燥后,将滤纸悬挂在展开装置内,避免与展开剂接触,密闭展开容器,使滤纸在充满展开剂的蒸汽中平衡半小时至一小时。平衡后,将滤纸点样端浸没于溶剂中,要求点样位置高出溶剂液面 3~4 cm。比较理想的,最好在容器盖上连接一个长柄漏斗,待平

衡后自外加入溶剂至所需高度。这样操作可不必打开容器盖,以保持容器中展开剂蒸汽的饱和状态。

溶剂展开的距离一般视被分离溶质的 R_f 值而定。各溶质的 R_f 值相差很大的样品,展开距离可较短; R_f 值相差较小的样品要求较大的展开距离。但是考虑到由于展开距离太大(尤其是上行法),溶剂移动速率愈来愈慢,而且斑点扩散也趋严重,反而影响分离效果,因此在实际操作时,溶剂展开的距离,上行法一般有 15~20 cm,下行法有 30~40 cm 就足够了。

对于各溶质的 R_f 值非常接近的样品,为了获得较满意的分离效果,可以采用连续展开法。如用上行法,则把滤纸上端折转,夹于脱脂棉花中,使上升的溶剂不断地被棉花吸收;如用下行法,则把滤纸的下端剪成锯齿状,溶剂达到顶端后便可以从下垂的锯齿尖端滴下,进行连续展开。但用此种方法已无法确定溶剂展开的前缘,展开所需时间可选用一个 R_f 较大的有色参比标准物作示踪剂。

4. 显色

展开完毕,取出滤纸,随即用铅笔标记溶剂移动的前沿位置,悬挂在空气中晾干或热风吹干。多数样品纸层析展开后,分离斑点是无色的,需依据各溶质的理化性质,运用不同方法加以显色,如茚三酮溶液可与氨基酸反应显示紫色,硝酸银溶液可显示还原性糖。在操作时一般将显色剂喷洒到展开后的滤纸上,分离斑点立即显现。配制显色剂的溶剂最好使用与水不相溶的、挥发性较大的溶剂,尽量减少显色剂中的含水量,以免斑点扩散。

有些样品如许多有机药物或其代谢物,层析后一般不用显色剂喷雾显色,只要在暗处放置于紫外分析仪下,在斑点处即显现不同颜色的荧光,用铅笔圈出斑点,测定 R_f 值。标记放射性同位素的物质,可利用其对照相底片感光的特性作放射自显影,或将层析谱剪成小片作脉冲计数。一些抗菌素及维生素等对某些细菌生长具有抑制或促进作用,则可将滤纸剪成小片,作细菌培养来确定斑点位置,描绘出层析谱。

5. 测量 R_f 值

判断层析谱中各斑点的性质,最简单的办法是测定 R_f 值,因为在相同的实验条件下,同一种物质具有相同的 R_f 值,并不受展开剂移动距离长短的影响。双相层析谱的斑点 R_f 值分别等于各向展开剂的单向层析谱相应的 R_f 值。

在已知样品中各溶质的情况下,可同时进行标准物层析分离,通过 R_f 值及层析谱斑点位置的比较,更精确地确定样品中相应物质的性质。

一般来说,在同一层析谱上,一种物质只出现一种斑点,在少数情况下,由于物质在色谱分析过程中出现变化(如半胱氨酸很容易氧化成半胱磺酸),也可能出现一个以上的斑点。有些物质在某一溶剂系统中的 R_f 值非常接近,在层析时可出现在同一斑点中,因此不能简单地认为一个斑点就是一种物质。遇到这种情况时,如要把同一斑点中的物质加以分离,可改变层析条件,尤其是展开剂,或采用其他层析法进一步予以鉴定。

在连续展开时,因没有溶剂前缘可循,无法计算 R_f 值,此时可计算相对比移值 (R_g)。其计算方法如下:

$$R_g = \text{原点至物质斑点的距离} / \text{原点至参比物质斑点的距离}。$$

6. 定量分析

常用的定量方法有三种:

(1)剪洗法 显色后将分离的斑点剪下,以适当的溶剂洗脱,比色定量,该法的误差一般在 $\pm 5\%$ 左右。

(2) 光密度扫描 将滤纸条置于光密度计中直接扫描, 描绘出色谱曲线图, 根据积分计数或测量曲线面积求出物质的含量, 一般误差在 $\pm 5\% \sim \pm 10\%$ 。

(3) 直接测量斑点面积 此法影响因素很多, 每次斑点的形状不易控制一致, 重复性差。

7. 影响 R_f 值的因素

R_f 值是纸层析定性分析的重要测量指标, 每一种物质在恒定的实验条件下, R_f 值是一个常数。如果实验条件改变, 即使是微小的改变, R_f 值就发生变异。这些实验条件或影响 R_f 值的因素除滤纸及展开剂的性质外, 还有如下几方面:

(1) 被分离物质的分子结构和极性 纸层析分离的固定相实际上是水, 流动相为非极性溶剂, 在水与有机溶剂两相之间决定物质分配系数的主要因素是物质极性大小, 分配系数的改变即反映出 R_f 值的变化。例如酸性和碱性氨基酸的极性较强于中性氨基酸, 后者在水中的溶解度(分配)较小, R_f 值就较大。如果分子中极性基团数目不变而延长非极性结构碳链, 则降低了整个分子的极性, R_f 值随之增大。因此, 在纸层析分离时, 如知道被分离物质的分子结构, 就能大致预测各物质的 R_f 值的大小。

(2) 酸碱度 溶剂、滤纸及样品的 pH 均能影响 R_f 值。溶剂系统的 pH 既能影响溶质的解离状态, 又能影响流动相本身的含水量, 溶剂酸碱度大, 吸水量多, 则使极性物质的 R_f 值增大, 反之则降低。

(3) 温度 温度不仅影响物质在两相间的分配系数, 而且影响溶剂相的组成及纤维素的水合作用。因此要获得准确的 R_f 值, 层析过程必须在恒温条件下进行。

(4) 展开方式 R_f 值可因展开方式不同而有所差异, 其中下行法的 R_f 值较大, 上行法较小。环形展开时, 由于溶剂是从中心向四周扩散, 内圈较外圈小, 限制了溶剂的流动, 故 R_f 值也较大。

二、薄层层析法

薄层层析(thin-layer chromatography)是以涂布于支持板上的支持物作为固定相, 以合适的溶剂为流动相, 对混合样品进行分离、鉴定和定量的一种层析分离技术。这是一种快速分离诸如脂肪酸、类固醇、氨基酸、核苷酸、生物碱及其他多种物质的特别有效的层析方法, 从 50 年代发展起来至今, 仍被广泛采用。

(一) 基本原理

薄层层析的原理与纸层析、柱层析比较接近, 把支持物均匀涂布于支持板(常用玻璃板, 也可用涤纶布等)上形成薄层, 然后按纸层析法操作进行展开。薄层层析可根据作为固定相的支持物不同, 分为薄层吸附层析(吸附剂)、薄层分配层析(纤维素)、薄层离子交换层析(离子交换剂)、薄层凝胶层析(分子筛凝胶)等。一般实验中应用较多的是以吸附剂为固定相的薄层吸附层析。

吸附是表面的一个重要性质。任何两个相都可以形成表面, 吸附就是其中一个相的物质或溶解于其中的溶质在此表面上的密集现象。在固体与气体之间、固体与液体之间、吸附液体与气体之间的表面上, 都可能发生吸附现象。

物质分子之所以能在固体表面停留, 这是因为固体表面的分子(离子或原子)和固体内部分子所受的吸引力不相等。在固体内部, 分子之间相互作用的力是对称的, 其力场互相抵消。而处于固体表面的分子所受的力是不对称的, 向内的一面受到固体内部分子的作用力大, 而表面层所受的作用力小, 因而气体或溶质分子在运动中遇到固体表面时受到这种剩余力的影响, 就

会被吸引而停留下来。吸附过程是可逆的，被吸附物在一定条件下可以解吸出来。在单位时间内被吸附于吸附剂的某一表面积上的分子和同一单位时间内离开此表面的分子之间可以建立动态平衡，称为吸附平衡。吸附层析过程就是不断地产生平衡与不平衡、吸附与解吸的动态平衡过程。

例如用硅胶和氧化铝作支持剂，其主要原理是吸附力与分配系数的不同，使混合物得以分离。当溶剂沿着吸附剂移动时，带着样品中的各组分一起移动，同时发生连续吸附与解吸作用以及反复分配作用。由于各组分在溶剂中的溶解度不同，以及吸附剂对它们的吸附能力的差异，最终将混合物分离成一系列斑点。如作为标准的化合物在层析薄板上一起展开，则可以根据这些已知化合物的 R_f 值对各斑点的组分进行鉴定，同时也可以进一步采用某些方法加以定量。

薄层层析与纸层析相比，有更多的优点：它保持了操作方便、设备简单、显色容易等特点，同时展开速率快，一般仅需 15~20 分钟；混合物易分离，分辨力一般比纸层析高 10~100 倍，它既适用于只有 0.01 μg 的样品分离，又能分离大于 500 mg 的样品作制备用，而且还可以使用如浓硫酸、浓盐酸之类的腐蚀性显色剂。薄层层析的缺点是对生物高分子的分离效果不甚理想。

（二）固定相支持剂的选择和处理

在薄层层析时，对支持剂的选择主要考虑两方面：一是支持剂的性质与适用范围；二是支持剂的颗粒大小。一般来说，所选吸附剂应具有最大的比表面积和足够的吸附能力，它对欲分离的不同物质应有不同的吸附能力，即有足够的分辨力；所选吸附剂与溶剂及样品组分不会发生化学反应。吸附力的强弱规律可概括如下：吸附力与两相间界面张力的降低成正比，某物质自溶液中被吸附的程度与其在溶剂中的溶解度成反比。极性吸附剂易吸附极性物质，非极性吸附剂易吸附非极性物质。同族化合物的吸附程度有一定的变化方向，例如，同系物极性递减，而被非极性表面吸附的能力将递增。

1. 支持物的性质与适用范围

用于薄层层析的支持剂基本特性和适用范围在许多书本中已有详细介绍，这些支持剂较常用的是硅胶、氧化铝、硅藻土、纤维素、聚酰胺及 DEAE-纤维素。

（1）硅胶 硅胶是应用最广泛的一种极性吸附剂。它的主要优点是化学惰性，具有较大的吸附量，易制备成不同类型、孔径、表面积的多孔性硅胶，一般以 $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 通式表示。

硅胶的吸附活性取决于含水量，吸附层析一般采用含水量为 10%~12% 的硅胶，含水量小于 1% 的活性最高，而大于 20% 时，吸附活性最低。用加热脱水法可使硅胶活化。降低吸附活性的硅胶能显著改善分离性能，增加样品的负载量。

硅胶适用于分离酸性和中性物质，碱性物质能与硅胶作用，因此如用中性溶剂展开，碱性物质有时留在原点不动，或者斑点拖尾，而不能很好地分离。为了使某一类化合物得到满意的分离，可改变硅胶酸碱性。例如，可用稀酸或稀碱液（0.1~0.5 mol/L）或一定 pH 值的缓冲溶液代替水制备酸性、碱性或某一 pH 值的薄层；也可在硅胶中加入氧化铝（碱性）制成薄层；或在展开剂中加入少量的酸或碱进行展层。

使用硅胶和硅藻土时，通常要先加入粘合剂再在支持板上涂布。常用的粘合剂为煅石膏和淀粉，在硅胶、氧化铝和硅藻土中分别加入 5%~20% 石膏后，称为硅胶 G、氧化铝 G 和硅藻土 G。用煅石膏为粘合剂的薄层易从玻璃板上脱落，但具有耐腐蚀性试剂的优点。加淀粉制成的薄层，机械性能较好，但不宜用腐蚀性强的试剂。

(2) 氧化铝 氧化铝为微碱性吸附剂, 适用于亲脂性物质的分离制备, 氧化铝具有较高的吸附容量, 价格低廉, 分离效果好, 因此应用也较广泛。

在使用氧化铝作吸附层析时, 要注意选择适当活性及适当酸碱度的产品。氧化铝通常可按制备方法不同而分为碱性、中性和酸性三种。碱性氧化铝可应用于碳氢化合物的分离; 中性氧化铝适用于醛、酮、醌、某些苷类及酸碱溶液中不稳定的酯、内酯等化合物的分离; 酸性氧化铝适用于天然及合成的酸性色素以及醛、酸的分离。

(3) 聚酰胺 聚酰胺由己二酸与己二胺聚合而成, 也可用己内酰胺聚合而成, 因它们都含有大量酰胺基团, 故统称聚酰胺。

聚酰胺薄膜层析是 1966 年后发展起来的一种薄层层析方法, 用此方法分析氨基酸衍生物 DNP-氨基酸、PTH-氨基酸、DNS-氨基酸及 DABTH-氨基酸时, 具有灵敏度高、分辨力强、展层迅速和操作简便等优点。目前由国产原料制成的聚酰胺薄膜性能良好、效果满意, 已用于酚类、醌类、硝基化合物、氨基酸及其衍生物、核酸碱基、核苷、核苷酸、杂环化合物、合成染料、磺胺、抗菌素、环酮、杀虫剂及维生素 B 等 16 类化合物的分析。

(4) 硅藻土和纤维素 它们是中性的支持剂, 需在吸附水、缓冲溶液或甲酰胺等之后, 才能用于薄层层析。

2. 支持剂的颗粒大小

用作薄层层析固定相的支持剂颗粒, 要求大小适当、均匀。颗粒过大, 展开时溶剂推进速率太快, 分离效果不好; 颗粒太小, 展开太慢, 斑点拖尾不集中, 分离效果也差。颗粒大小固定在一定范围内并且薄层厚度均匀一致时, 每次得出的 R_f 值即可保持恒定。无机类支持剂的颗粒以 150~200 目(直径为 0.07~0.1 mm)、薄层厚度为 0.25~1 mm 较合适。有机吸附剂如纤维素等的颗粒为 70~140 目(直径 0.1~0.2 mm)、薄层厚度为 1~2 mm 最恰当。

(三) 薄层板制作

薄层板制作简称制板, 是指作为固定相的支持剂被均匀地涂布在玻板上, 形成一薄层。所用的玻板要求表面平滑、清洁。玻板的大小按需要选定, 常用的规格为 6 cm×20 cm、20 cm×20 cm 及 2.5 cm×7.5 cm。

1. 软板制作

软板也称干板, 是不加粘合剂, 将支持剂干粉直接均匀地铺在玻板上制成的。这种薄层板制作简单, 展开快, 但极易吹散。其具体制作方法如下:

(1) 选用直径约为 0.5 cm 的玻璃管一根, 根据薄层的厚度(一般为 0.4~1 mm)在其两端绕胶布数圈。

(2) 将支持物干粉倒在玻板上, 固定玻板一端以防玻璃推进时移动。

(3) 将玻璃管压在玻板上, 将支持剂干粉由一端推向另一端即成薄层。

2. 硬板制作

硬板或称湿板, 是将支持剂加粘合剂和水或其他液体后, 均匀地铺在玻璃板上, 再经烘干而成的薄层板。制作方法可用专门的薄层制板器, 也可用手工, 均能得到满意的效果。下面介绍三种手工涂布制板的方法:

(1) 玻棒涂布 将支持剂用水或适当溶剂调成胶浆, 倒在玻板上, 然后依软板制作相同方法, 用玻棒在玻板上将支持剂由一端向另一端推动, 即成薄层。

(2) 玻片涂布 在玻板两旁放置两块稍厚的玻板, 把支持剂胶浆倒在中间的玻板上, 然后用另一块玻片的边缘将胶浆刮向另一端, 即成一定厚度的薄层。干燥后用刀刮去薄板两侧的支

持剂。更换玻板两旁不同厚度的玻片，即可调节薄层的厚度。

(3) 倾斜涂布 将支持剂胶浆倒在玻片上，然后将玻板倾斜，使胶浆均匀涂布于玻板上。

上述任何一种方法将支持剂均匀涂布于玻板上后，静置片刻，待薄层表面无水渍后，置烘箱中，让温度升到 100°C ，持续 1 小时。关闭电源，待温度降至接近室温时，取出薄层板，放入干燥器备用。此步骤称为活化。

(四) 点样

薄层层析点样方法与纸层析基本相同，但另应注意以下几点：

(1) 样品最好用具有挥发性的有机溶剂（如乙醇、氯仿等）溶解，不应用水溶液，因水分子与吸附剂的相互作用力较弱，当它占据了吸附剂表面上的活性位置时，就使吸附剂的活性降低，而使斑点扩散。

(2) 点样量不宜太多，否则会降低 R_f 值，一般为几到几十 μg ，体积为 $1\sim 20\ \mu\text{L}$ 。

(3) 原点直径要控制在 $2\ \text{mm}$ 以内。欲达此目的，就须分次点样，边点样，边用冷、热风交替吹干。

(4) 薄层板在空气中不能放置太久，否则会因吸潮降低活性。

(五) 展层

1. 展开剂的选择

选择展开剂须视被分离物的极性与支持剂的性质而定。对初选展开剂合适与否的评价，要根据其分离有效成分的效果来确定。如果不合适，还需进行极性调整，直到达到对有效成分的完全分离为止。

如果薄层层析所用的支持剂是吸附剂，在同一吸附剂上，不同化合物的吸附性质有如下规律：①饱和碳氢化合物不易被吸附；②不饱和碳氢化合物易被吸附，分子中双键愈多，则吸附得愈紧密；③当碳氢化合物被一个功能基取代后，吸附性增大。吸附性按以下功能基依次递增： $-\text{CH}_3 < -\text{O}- < >\text{C}=\text{O} < -\text{NH}_2 < -\text{OH} < -\text{COOH}$ 。吸附性较大的化合物，一般需用极性较大的溶剂才能推动它。

选择展开剂的另一个依据是溶剂的极性大小。一般而论，在同一种支持剂上，凡溶剂的极性愈大，则对同一性质的化合物的洗脱能力也愈大，即在薄层上能把此化合物推进得愈远， R_f 值也愈大。如果用一种溶剂去展开某一成分，当发现它的 R_f 值太小时，可考虑换用一种极性较大的溶剂，或在原来的溶剂中加入一定量极性较大的溶剂进行展层。溶剂极性大小的次序是：石油醚 $<$ 二硫化碳 $<$ 四氯化碳 $<$ 三氯乙烯 $<$ 苯 $<$ 二氯甲烷 $<$ 氯仿 $<$ 乙醚 $<$ 乙酸乙酯 $<$ 乙酸甲酯 $<$ 丙酮 $<$ 正丙醇 $<$ 甲醇 $<$ 水。

2. 展层

展层装置种类较多，根据展层方式基本上可分上行、下行、连续及水平式四种。不加粘合剂的薄层只能作近水平式（板与水平成 $10^{\circ}\sim 20^{\circ}$ 角）的上行或下行展开。不论何种展层方式，展层容器必须关闭，并事先要使展开剂蒸气达到饱和。容器的体积大小要视薄层板的面积而定，因为大容器要达到溶剂蒸气饱和所需的时间比小的长。虽然薄层层析时，溶剂饱和度对分离效果的影响不如纸层析大，但影响仍然存在。根据实验证明，在不饱和的展层装置中，由于混合展开剂内含有几种挥发性试剂，致使薄层板边缘与中间的试剂比例不同，因此样品在边缘和中间展层的距离也不同，这种现象称为边缘效应，严重时会影响分离效果。

如同纸层析一样，薄层层析时为了获得更好的分离效果，也采用双向展层和分次展层。分次展层是先用一种溶剂展开至一定距离后，将薄层板取出，待溶剂挥发后再按同一方向用第二

利溶剂展开。

(六) 显色和定量

薄层层析法的显色和定量与纸层析法类似。薄层板展开完成后，从展开装置中取出，于室温或烘箱中干燥，然后根据被分离物质的种类和性质，选用相应的显色剂喷雾显色，或用紫外灯检测被分离的物质斑点，如同纸层析法一样，测量和计算各斑点的 R_f 值。

由于薄层层析与纸层析法有不同的特点，因此在分析定量时需注意以下几点：

(1) 在喷雾显色时，不加粘合剂的薄层要小心操作，以免吹散吸附剂。

(2) 薄层层析还可以用强腐蚀性显色剂，如硫酸、硝酸、铬酸或其他混合溶液。这些显色剂几乎可以使所有的有机化合物转变为碳，如果支持剂是无机吸附剂，薄层板经此类显色剂喷雾后，被分离的有机物斑点即显示黑色。此类显色剂不适用于定量测定或制备用的薄层上。

(3) 如果样品斑点本身在紫外光下不显荧光，可采用荧光薄层检测法，即在吸附剂中加入荧光物质，或在制备好的薄层上喷雾荧光物质，制成荧光薄层。这样在紫外光下薄层本身显示荧光，而样品斑点不显荧光。吸附剂中加入的荧光物质常用的有 1.5% 硅酸锌镉粉，或在薄层上喷雾 0.04% 荧光素钠、0.5% 硫酸奎宁醇溶液或 1% 磺基水杨酸的丙酮溶液。

(4) 由于薄层边缘含水量不一致，薄层的厚度、溶剂展开距离的增大，均会影响 R_f 值，因此在鉴定样品的某一成分时，应用已知标准样作对照。

(5) 定量时，可对斑点作光密度测定，也可将一个斑点显色，而将与其相同 R_f 值的另一未显色斑点从薄层板上连同吸附剂一起刮下，然后用适当的溶剂将被分离的物质从吸附剂上洗脱下来，进行定量测定。

(七) 薄层层析法的近代发展

薄层层析法由于其本身所具有的许多优点，几十年来，在混合物的分离、定性及定量分析中的应用相当普遍，并逐渐取代了纸层析分离技术。为了克服薄层层析法存在的某些不足，获得更有效的分离效果，在薄层制备、展开方式、分析鉴定手段以及相配套的仪器设备等方面近年来进行了许多革新，其中最根本的是支持剂的改进。以一种直径更小的支持剂颗粒替代常规的支持剂剂型所制备的薄层，比常规的薄层具有所需样品少、展开速率快、距离短、分辨力高等优点；而且此种新型的薄层具有较好的光学特性，更有利于对分离斑点进行光密度扫描。为了区别于常规的薄层层析分析法，通常将此种新方法称为高效薄层层析法 (high performance thin-layer chromatography, HPTLC)，也称现代薄层层析法 (modern TLC)。

在进行 HPTLC 时，为了保证恒定的吸附剂活性和薄层板的相对湿度，预制板可用固定相浸渍剂加以处理。经处理后的薄层板一般不再受外界湿度的影响。固定相浸渍剂分两类：① 亲水性固定相，多数用甲酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙二醇和不同相对分子质量的聚乙二醇或不同种类的盐溶液浸渍；② 亲脂性固定相，一般作反向层析用，多数用液体石蜡、十一烷、十四烷、矿物油、硅酮油或乙基油酸盐等浸渍。也有利用与浸渍剂形成络合物或加成物得以分离的，如经三硝基苯或苦味酸浸渍的，可利用络合反应分离多环化合物。用 NaHSO_3 浸渍，可与含有羰基化合物生成加成物而得以分离。

三、离子交换层析法

离子交换层析 (ion exchange chromatography) 是利用离子交换剂上的可交换离子与周围介质中被分离的各种离子间的亲和力不同，经过交换平衡达到分离的目的的一种柱层析法。该法可以同时分析多种离子化合物，具有灵敏度高，重复性、选择性好，分析速度快等优点，是当

前最常用的层析法之一。

(一)基本原理

离子交换层析对物质的分离通常是在一根充填有离子交换剂的玻璃管中进行的。离子交换剂为人工合成的多聚物，其上带有许多可电离基团，根据这些基团所带电荷不同，可分为阴离子交换剂和阳离子交换剂。含有欲被分离的离子的溶液通过离子交换柱时，各种离子即与离子交换剂上的荷电部位竞争性结合。任何离子通过柱时的移动速率决定于与离子交换剂的亲和力、电离程度和溶液中各种竞争性离子的性质和浓度。

离子交换剂是由基质、荷电基团和反离子构成，在水中呈不溶解状态，能释放出反离子。同时它与溶液中的其他离子或离子化合物相互结合，结合后不改变本身和被结合离子或离子化合物的理化性质。

离子交换剂与水溶液中离子或离子化合物所进行的离子交换反应是可逆的。假定以 RA 代表阳离子交换剂，在溶液中解离出来的阳离子 A^+ 与溶液中的阳离子 B^+ 可发生可逆的交换反应，反应式如下：



该反应能以极快的速率达到平衡，平衡的移动遵循质量作用定律。

离子交换剂对溶液中不同离子具有不同的结合力，结合力的大小取决于离子交换剂的选择性。离子交换剂的选择性可用其反应的平衡常数 K 表示：

$$K = [RB][A^+] / [RA][B^+]$$

如果反应溶液中 $[A^+]$ 等于 $[B^+]$ ，则 $K = [RB] / [RA]$ 。若 $K > 1$ ，即 $[RB] > [RA]$ ，表示离子交换剂对 B^+ 的结合力大于 A^+ ；若 $K = 1$ ，即 $[RB] = [RA]$ ，表示离子交换剂对 A^+ 和 B^+ 的结合力相同；若 $K < 1$ ，即 $[RB] < [RA]$ ，表示离子交换剂对 B^+ 的结合力小于 A^+ 。 K 值是反映离子交换剂对不同离子的结合力或选择性参数，故称 K 值为离子交换剂对 A^+ 和 B^+ 的选择系数。

溶液中的离子与交换剂上的离子进行交换，一般来说，电性越强，越易交换。对于阳离子树脂，在常温常压的稀溶液中，交换量随交换离子的电价增大而增大，如 $Na^+ < Ca^{2+} < Al^{3+} < Si^{4+}$ 。如原子价数相同，交换量则随交换离子的原子序数的增加而增大，如 $Li^+ < Na^+ < K^+ < Pb^{2+}$ 。在稀溶液中，强碱性树脂的各负电性基团的离子结合力次序是 $CH_3COO^- < F^- < OH^- < HCOO^- < Cl^- < SCN^- < Br^- < CrO_4^{2-} < NO_2^- < I^- < C_2O_4^{2-} < SO_4^{2-} < 柠檬酸根$ 。弱碱性阴离子交换树脂对各负电性基团结合力的次序为 $F^- < Cl^- < Br^- = I^- = CH_3COO^- < MoO_4^{2-} < PO_4^{3-} < AsO_4^{3-} < NO_3^- < 酒石酸根 < 柠檬酸根 < CrO_4^{2-} < SO_4^{2-} < OH^-$ 。

两性离子如蛋白质、核苷酸、氨基酸等与离子交换剂的结合力，主要决定于它们的理化性质和特定的条件下呈现的离子状态。当 $pH < pI$ 时，能被阳离子交换剂吸附；反之，当 $pH > pI$ 时，能被阴离子交换剂吸附。若在相同 pI 条件下，且 $pI > pH$ 时， pI 越高，碱性越强，就越容易被阳离子交换剂吸附。

离子交换层析就是利用离子交换剂的荷电基团，吸附溶液中相反电荷的离子或离子化合物，被吸附的物质随后为带同类型电荷的其他离子所置换而被洗脱。由于各种离子或离子化合物对交换剂的结合力不同，因而洗脱的速率有快有慢，形成了层析层。

(二)离子交换剂类型及选择

1. 离子交换剂的类型

根据离子交换剂中基质的组成及性质，可将其分成两大类：疏水性离子交换剂和亲水性离