

薄层层析用硅胶的试制

俞鹤年 唐月华 潘家秀

(中国科学院上海生物化学研究所)

硅胶薄层层析技术具有快速、灵敏、简便、价廉等优点,有机化学和生物化学等领域内应用尤为广泛。

目前所用的硅胶主要是 E. Merck 产品。以往国产硅胶质量多不能满足薄层层析的要求,即使质量较好的硅胶,以非水系统(如:二氯甲烷)分离 4 种染料和以含水系统分离氨基酸或多肽,往往不能两全其美。为此有必要对硅胶的制备条件作进一步的分析。

一、制备方法

硅胶是将硅酸钠(即水玻璃)与盐酸化合,再经过胶凝、老化、浸洗、干燥、活化等步骤制成。

硅酸钠(工业用)和盐酸(工业用)需经预处理,即:将 40Be' 硅酸钠用水稀释一倍(20Be'),在 50℃ 保温 12 小时左右,使大部分杂质沉下,用棉花或其它方法滤去。工业盐酸最好用重蒸法去 Fe^{3+} ,而后用自来水(能以离子交换水代替更好)稀释一倍。为便于比较,实验均在 20℃ 左右进行。

处理过的硅酸钠(20Be') 4 升与自来水 6 升混合,加稀盐酸,调至所需 pH。共制备 6 种硅胶, pH 分别是 1—2, 3, 4, 5, 6 和 7。由于市售硅酸钠碱度各批有差异,所用盐酸溶液的量各批也不尽相同。调 pH 至 3—4 约需 1,500—1,700 毫升。加盐酸过程中,往往在 pH 5—7 时出现大的凝结块,不易打碎,因此必须不断搅动,同时较快地把 pH 调到 5 以下。由于胶体内外的 OH^- 或 H^+ 的扩散和达到平衡需要一定时间,不宜急于用酸、碱多调 pH。

盐酸加毕,继续搅动,打碎大颗粒,使成粥

状。放置老化平衡 3—12 小时,此时出现离析水。在此过程中应检测和调整 pH,使保持在所需范围内。

平衡老化后的硅胶,装入布袋,用水冲洗、挤干;或用篮式离心机离心,去清液。以 0.1% 盐酸浸泡 10 分钟,自来水冲洗,去 Cl^- 。如此重复至上清液或离心液中 Cl^- 浓度与自来水中原来含有 Cl^- 浓度平衡为止。再以蒸馏水洗至硝酸银试剂检测不出 Cl^- 为止。挤干或离干,在搪瓷盘中铺开,100—110℃ 烘 12—24 小时,使成干胶。

分批将干胶在球磨机中研磨,每次 1 斤。半小时后,在摇床或振筛机中过筛,热筛效率较高。取 300—400 目的硅胶保存于密闭玻璃瓶中,以免吸水。

二、硅胶性质的鉴定和比较

1. 制板 用石膏作粘合剂,以增加硅胶板的强度。市售石膏杂质多,含水量不稳定,影响层析的展层速度、分离效果和机械强度,必须自行制备。方法基本按黄等*加以改进:将约 900 毫升 10% 硫酸溶液缓慢加于滤过的 10% CaCl_2 5,000 毫升中,边加边搅,至开始出现混浊,停止加酸。放置,混浊物逐渐增多,形成白色大颗粒结晶,沉下,上层液仍较混,然后,每隔 45 分钟,按同样方法加 10% 硫酸,总量为 4,600 毫升。全程约需 4 小时。放置过夜,布氏漏斗过滤,用蒸馏水洗至 AgNO_3 试剂检测无 Cl^- 。抽干,铺在大盘中,140℃ 烘 48 小时,密封保存。如果所制备的石膏在水中溶解度不好,

* 黄倩霞等:《化学通报》,1965 年,第 1 期,第 33 页。

继续烘,直至 0.5 克石膏在 70—80 毫升水中能基本溶解为止。在整个过程中,硫酸滴加速度必须缓慢,以便促使大结晶的形成,有利于洗涤和烘干。快速加 H_2SO_4 和慢速加 H_2SO_4 所制备的石膏性能比较见表 1。

表 1 用快速和慢速法加 H_2SO_4 所得石膏性能的比较

方式 名称	慢速(上述方法)	快 速
水中溶解度	好	差
比 重	小	大
结晶或沉淀	大、疏松、色白	小、紧密、色微白
过滤、洗涤	需 30 分钟	需数小时
干 燥	140℃, 48 小时	140℃290小时以上
层 析 分 离	斑点圆或椭圆	斑点扩散、拖尾

将 10 克硅胶和 1.5 克自制石膏在研钵中混合,用 1% 可溶性淀粉 36—52 毫升慢慢磨匀,至开始出现凝胶态时,铺板,在空气中干燥。使用前激活:以含水系统为展层剂时,60℃ 烘 90 分钟;用非水溶剂系统时,110℃ 烘 60—90 分钟。保存于密闭容器内。

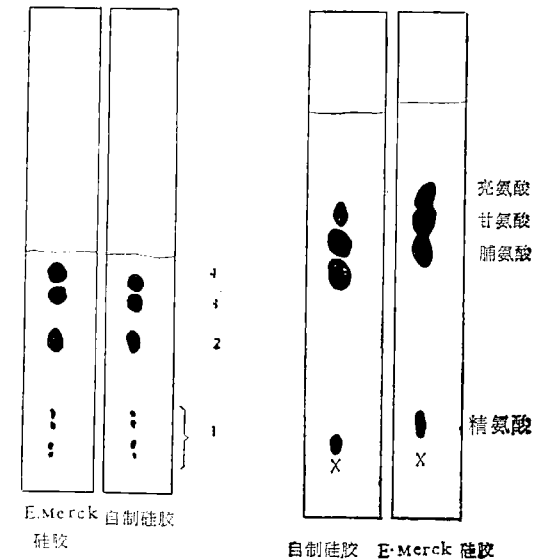


图 1 自制硅胶 pH3—4 和 E. Merck 硅胶 H 分离染料比较

1. 吡啶酚、
2. 苏丹红、
3. 苏丹黄、
4. 奶油黄

2. 层析 (a) 染料的分离: 用非水系统时,将吡啶酚、苏丹黄、苏丹红、奶油黄分别溶于正戊烷:苯 (4:1), 配成 20 毫克/50 毫升的溶液。取小量等体积混合,点样,层析 15—20 分钟。展层剂为: 二氯甲烷。结果见图 1。

(b) 氨基酸的分离: 用含水系统时将脯氨酸、甘氨酸、精氨酸、亮氨酸配成 0.01% 浓度的 50% 甲醇水溶液,取 5 微升点样。以甲醇: $H_2O = 6:4$ 展层 70 分钟左右,0.5% 茚三酮丙酮溶液显色,结果见图 2。

(c) 多肽的分离: 用含水系统。合成七肽粗制品经催化氢化去保护基,并溶于甲醇溶液,点样,在下列溶剂中展层 45 分钟,以 0.5% 茚三酮-丙酮溶液和氯气-淀粉-KI 法显色,结果见图 3。展层溶剂为异丙醇:醋酸丁酯:(10:4) 和吡啶:冰醋酸:水 (4:1:5) 按照 7:3(V/V) 混合。

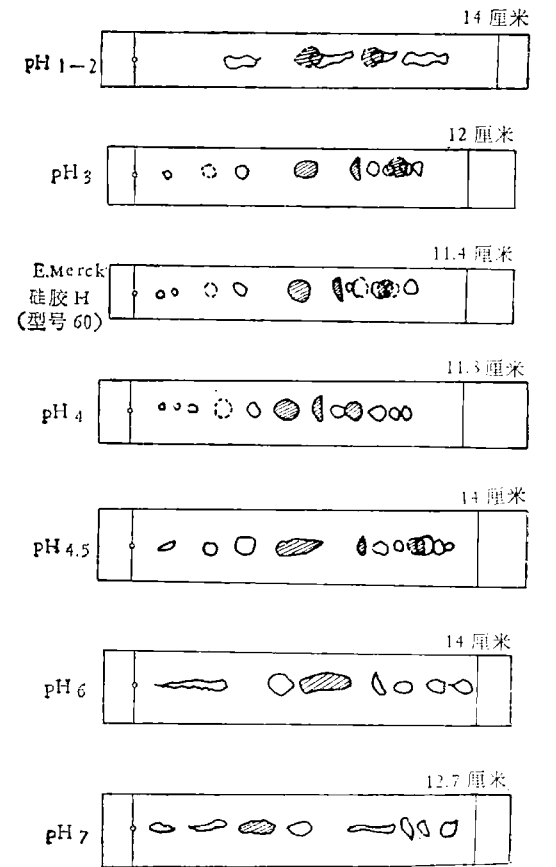
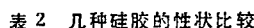
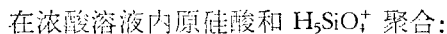


图 3 各种 pH 制备的硅胶对合成多肽的分离效果
●——茚三酮法显色, --——氯气-淀粉-KI 显色

$$\left[\begin{array}{ccccc} & & \text{H} & & \\ \text{HO} & \text{OH} & \text{O} & \text{OH} & \text{OH} \\ & \diagdown & & \diagup & \\ & \text{Si} & & \text{Si} & \\ & \diagup & & \diagdown & \\ \text{HO} & \text{OH} & \text{O} & \text{OH} & \text{OH} \\ & & \text{H} & & \end{array} \right]^+ \quad (2)$$

前一种聚合反应(1)中,产物的硅配位数为4,后者(2)产物的硅配位数为6。这二种配位数共同支配着胶粒的堆积方式。这是决定硅橡胶骨架特性(如: $-\text{SiOH}$ 基团的分配)及孔穴特性(如: 比表面、平均孔直径的大小)的主要因素之一。在浓酸溶液内形成细孔硅胶,在碱液或稀酸液内形成粗孔硅胶。在 $\text{pH}1.5-4.5$ 之间,二种聚合作用同时进行。 $\text{pH}3$ 时二个反应物浓度乘积之和 $-\log ([\text{H}_4\text{SiO}_4][\text{H}_3\text{SiO}_4^-] + [\text{H}_4\text{SiO}_4][\text{H}_5\text{SiO}_4^+])$ 达到最大值。此时 $[\text{H}_3\text{SiO}_4^-] = [\text{H}_5\text{SiO}_4^+]$ 二种聚合有同等重要性。

由此可以推测,在 pH3 附近所形成的硅胶介于典型的粗孔和细孔之间,我们以比表面积、平均孔直径、视比重等指标,证实了这种推测(表 2)。



硅 胶 性 状	典型细 孔硅胶	E. Merck 硅胶 H	自制硅胶 (pH3—4)	典型粗 孔硅胶
比表面积(米 ² /克)	770—830	381	406	330—350
平均孔直径(埃)	22—26	介于中间*	介于中间	100—150
视比重(克/升)	670	450	470	400—500

* 根据硅胶电泳照片计算结果, 生化所钱力, 上海计量局陆一宁担任电泳观察。特此致谢。

[本文于 1978 年 11 月 23 日收到]

赵云鹏 张淑秀*

线粒体内膜上的 ATP 酶是一个复杂的复合物,分子量为 360,000,含有 30% 磷脂。它受 Mg^{++} 离子激活,并对能量转移抑制剂(寡霉素,芸香霉素等)敏感,ATP 酶是线粒体能量转换

的主要装置。线粒体在呼吸过程中逐步释放的能量大部分都是由 ATP 酶转化成 ATP 的形式

* 科大吉永华同学参加部分工作。