

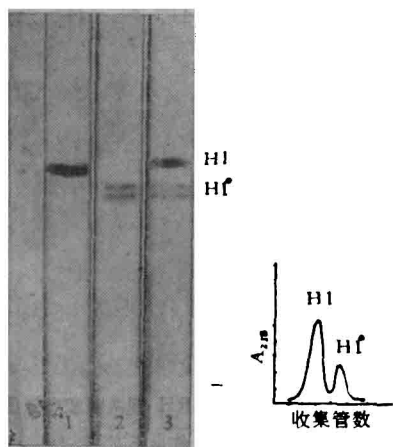


图3 通过 Bio-Gelp-100 分离 LRH 洗脱峰 (右下图) 和两峰的分析电泳图谱 (左图)

1. 第1峰 H1, 2. 第2峰 H1^f (两亚部未分开)
3. 排阻层析前的 LRH。

精确切带是指在染色带显现后,马上小心地以薄刀片从带的间隙将三个带分别切下。这在原则上可以完全分离任何两个在凝胶电泳中十分接近的蛋白质。也就是说,聚丙烯酰胺凝胶电泳的分辨力有多高,本制备电泳方法的分离能力就有多大。这在常用的制备电泳仪^[10]是难以做到的,因为它是边电泳边连续洗脱,这样,将电泳中紧密相邻的两条带完全分离显然是不可

能的。

分辨率高,简单和不需复杂的设备是本方法的优点;不足之处是由于染色显带等原因造成的回收率偏低些(40—50%)。但所得分离样品通常作为氨基酸分析和光谱分析是够用的。

参 考 文 献

- [1] Panyim, S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37, 1042, 1969.
- [2] Pieler, C. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 115, 329, 1981.
- [3] D'Anna, T. A. et al.: *Biochemistry*, 19, 4331, 1980.
- [4] Smith, B. T. et al.: *FEBS Letters*, 112, 42, 1980.
- [5] Pehrson, J. R. et al.: *Biochemistry* 20, 298, 1981.
- [6] Smith, B. J. et al.: *FEBS Letters*, 110, 20, 1980.
- [7] D'Anna, J. A. et al.: *Biochemistry*, 20, 4501, 1981.
- [8] Panyim, S. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 337, 1969.
- [9] Schleif, R. F. et al.: *Practical Methods in Molecular Biology*, 74, 1981, Springer-Verlag, New York.
- [10] Macpherson, A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 104, 574, 1965.

[本文于1983年3月16日收到]

高效液相层析 (HPLC) 用乙腈的纯化

俞鹤年 徐佐杰

(中国科学院上海生化所,上海)

近年来迅速发展起来的高效液相层析新技术,具有准确、快速、超微量等优点。乙腈作为流动相和其他优良的固定相(担体)一样对于提高和发挥高效液相层析效能起着关键性的作用。由于商品乙腈含杂质较多,限制了它的应用范围,文献资料介绍的近三十种纯化乙腈的方法^[1-3],除了经济、纯度及产率诸方面原因外,限于国内仪器和试剂条件,尚没有一种方法适

应我们制备 HPLC 规格的乙腈供使用。

本文全部采用国产试剂级乙腈作原料,经过活性炭和酸性氧化铝为主的吸附法可得气相色谱纯的产物。其紫外吸收透光率在200—300nm波长时与西德 E.Mecck. for Chromatography Lichrosolv[®] 产品相当。总产率约42—48%。用这种方法纯化的乙腈已成功地应用在实验室分离分析多种有机化合物。

表1 本法制备乙腈和西德 E.Merck 生产乙腈一些性能比较

项目 数值 名称	水份 (w)%	折光率	沸点 ℃	酸度 (ppm)	气相色谱分析					备注
					丙酮 (ppm)	丙烯醇	丙腈 (ppm)	噻唑基一	丙烯腈 (ppm)	
乙腈原料	0.3	1.3410	78℃	74	<50	≤1%	<1000	>1%	<100	<1ppm即 痕迹量
本法制备的乙腈	0.035	1.3410	81.6℃	19	<1	<1	<1	<1	<1	
西德 E.Merck 乙腈	0.030	1.3410	81.6℃	7.4	<1	<1	35	≈11 ppm	<1	

注 气相色谱分析使用 102G 型气相色谱仪,氢焰法检测, Celite 545 5m×φ3mm 层析柱,每次上柱 5μl。酸度测定使用氢氧化钾-酚酞滴定法。折光率测定用阿贝折光仪 ωZS-1740293。水份测定也用气相色谱分析 401 担体,热导法检测。

表2 各种方法纯化乙腈的透光率(T)吸收的比较

透光率(T) 波长 nm 方法	200 nm	210 nm	220 nm	230 nm	240 nm	250 nm	280 nm	300 nm	备 注
1.4% 茚三酮回流 1小时后,再分馏	0	0	0	73	92	91	—	98	
2. 经 P ₂ O ₅ (50:1) 回 流1小时后,再分馏	0	0	0	76	57	28	—	96	
3. 经 CaH ₂ 处理后 再分馏	0	0	0	16	78	84	—	98	
4. 经 NaOH 处理后 再分馏	0	0	0	64	63	25	—	94	
5.1 %H ₂ SO ₄ 回流1 小时,再分馏	0	0	0	8	74	85	—	95	
6. 发烟 H ₂ SO ₄ 1% 回流1小时,再分馏	0	0	0	15	83	79	—	37.7	
7. 正辛醇钠处理	0	0	0	0	48	49	79	—	
8. 2%Al ₂ O ₃ ,1.5 小 时回流后,分馏	0	0	0	21.5	78	85	93	—	
9. 溴水处理	0	0	0	0.5	25	42	—	68	
10. H ₂ SO ₄ -甲醇处 理	0	0	0	13.5	92	95	98	—	
11. 茚三酮-P ₂ O ₅ 处 理	0	0	0	61	82	78	—	95	
12. KMnO ₄ -甲醇处 理	0	2	15	72	97	93	—	97	本法第一步
13. 经酸性氧化铝层 析柱	0	0	20	80	92	100	—	95	本法第二步量少。
14. 经活性炭柱	44	59	80	85	90	93	—	98	本法第二步
15. 本法三步	53	76	88	93	96	98	—	100	
16. E.Merck 乙腈	50	70	80	90	—	95	97	98	商标上数据

一、实验部分

1. 纯化方法

一般纯化均在玻璃器皿中进行,管道和磨口阀避免油脂污染。最后一步需要无水操作,产品充氮气装试剂瓶密封。

1) 1500ml 乙腈(试剂级)加高锰酸钾(优级纯)15克,氢氧化钠(优级纯)15克,回流1小时后,再加甲醇150ml(分析纯)混合,用60厘米长的分馏柱分馏,回流比为20:1;温度由64℃升至81℃为止,取81—82℃馏出物。此馏出物在波长240nm以上的透光率(T)大于90%,其产率约为80—90%。

(2) 此乙腈馏出物依次通过二根120×2.5厘米(内径)玻璃层析柱,第一根柱内装有酸性氧化铝(上海五四农场化剂厂生产层析试剂,颗粒大小为200—300目,经重蒸水洗至流出液无紫外吸收,200℃烘干)。第二根柱内装活性

炭(上海活性炭厂出品,颗粒状和粉末状均可,也按上法同样处理)。本法第二步的产率为66%左右。主要部分流出物在波长200—300nm时的紫外杂质接近E.Merck的乙腈规格。(见表2)

(3) 主要部分流出物加入五氧化二磷(50:1V/W₀)或者使用4Å分子筛(上海分子筛厂出品,也按上法洗净,200℃烘干,100:1V/W₀),回流20分钟后,再分馏。三步总产率约为42—48%。

2. 纯度检验

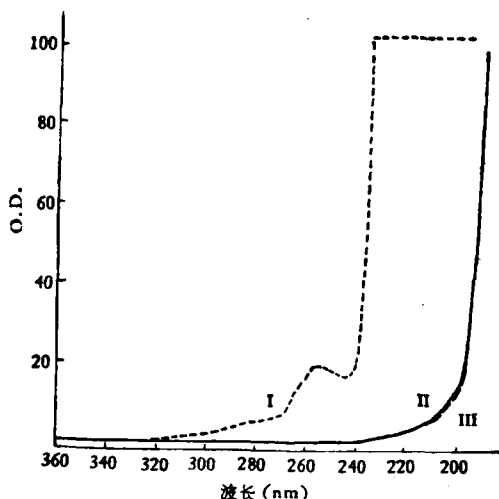


图2 乙腈吸收光谱图

仪器: 日立 200-10 双光路扫描分光光度计,扫描速度: 60nm/分,狭缝: 20nm 样品 I. 国产原料乙腈, II. 西德 E.Merck 乙腈 (HPLC 纯) III. 本法制备乙腈

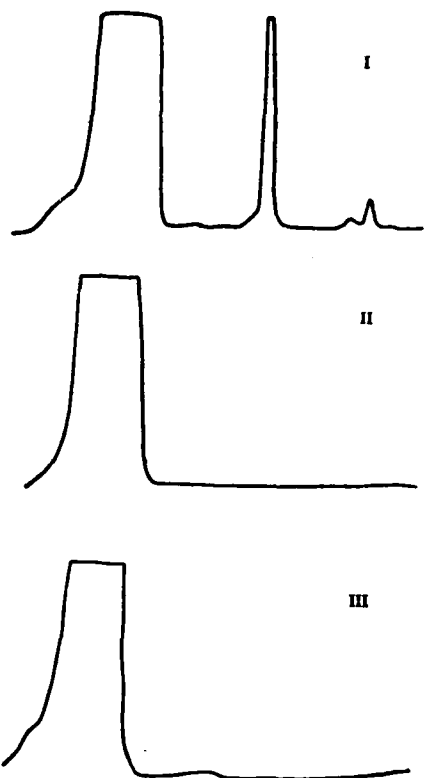


图1 乙腈气相色谱图

图注同表1注 I. 国产原料乙腈 II. 本法制备乙腈 III. 西德 E.Merck 乙腈 (HPLC 纯)

二、讨论

乙腈来源于大规模生产丙烯腈时的副产物。其中含有丙酮、丙腈、丙烯腈、丙烯醇、噁唑基衍生物和水。

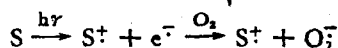
第一步,经 KMnO_4 - NaOH 氧化裂解反应,并用甲醇共沸,除了去掉氧化裂解所生成的醇和酸(在残液里),还可去掉丙酮,大部分丙烯腈和水等杂质。但是还有较多噁唑基衍生物、丙烯醇存在。

第二步使用的活性炭和酸性氧化铝,是多孔固体物质,比表面积很大(800—1000米²/克),又具有特殊孔穴及错综复杂通道,因而吸附
(下转第11页)

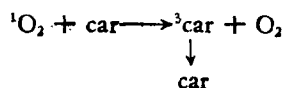
单线激发态氧

$^1\text{O}_2$ 通过光敏氧化作用表现出毒性。药品、化妆品、肥皂等引起的光敏反应,已成为一个重要的医学和社会经济问题。光敏化合物分内源和外源两大类。前者常为体内异常代谢物,例如卟啉类物质。后者广泛分布于煤焦油、沥青、石油及其衍生物,染料、色素、磺胺药,抗菌素,口服避孕药、灰黄霉素、防腐剂等中。光敏反应常导致膜损伤、突变,代谢紊乱、甚至死亡。

除了光敏物质和光参与光敏作用外,还有一个因素,那就是不可缺少的氧。它通过两种途径参与反应^[12]。一是光敏物质(S)受光照射后,排斥出一个电子(e^-),这个电子随后被氧俘获,形成超氧阴离子(O_2^-)。



X射线和 γ 射线通过物质的电离产生的 e^- ,被 O_2 捕获形成 O_2^- 。另一途径是光敏物质受光激发而处于三线态(S^*),它与氧作用形成单线激发态氧($^1\text{O}_2$), $S \xrightarrow{h\nu} S^* \xrightarrow{\text{O}_2} ^1\text{O}_2$, $^1\text{O}_2$ 可进一步与溶液中各种受体发生反应,而光敏物质本身不变。胡萝卜素(car)是 $^1\text{O}_2$ 的极有效猝灭剂^[12],是体内外光敏反应的重要防护剂。



其它如含镍络合物、聚甲炔染料,维生素E等酚类化合物都是 $^1\text{O}_2$ 的猝灭剂。

有一种患卟啉紫质沉着症患者,在受光照

(上接第72页)

活性很高。

尤其是活性炭化学结构上,除了有K、Zn、Ca、Na等金属元素外,还含有不同的基团,如: $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}$ 、 OH^- 、 $-\text{COOH}^-$ 及 $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 等。而且活性炭原料在热解、炭化、活化过程中,原来的有机物产生的氧原子和炭原子以共价键结合形成稳定的表面化合物。这些特点促使有共轭单位紫外吸收杂质的吸附剂去除。如:噻唑基衍生物、丙烯醇。该方法本身又不会引进其他杂质。产生干扰。

后,产生水肿和红血球过多症,这是由于皮肤中光敏物质卟啉过多所致,大量口服 β -胡萝卜素可以治愈^[13]。多环芳烃既是致癌剂,又是强光敏物质,它与光构成联合作用,加强癌的诱发,称光致癌反应, $^1\text{O}_2$ 参与这种反应^[14]。另一方面,人们又利用 $^1\text{O}_2$ 的毒性来治疗疾病,例如,癌细胞摄取血卟啉的量比正常细胞大得多,有人利用血卟啉衍生物,再加光照,选择性地杀死癌细胞^[15]。单纯疱疹患者,用中性红及光照产生 $^1\text{O}_2$ 以杀死其病毒^[16]。

参 考 文 献

- [1] Antonini, E. et al.: *Nature*, **228**, 936, 1970.
- [2] Britton, L. et al.: *J. Bacteriol.*, **134**, 229, 1978.
- [3] 莫 简:《解放军医学杂志》, **6**, 123, 1981.
- [4] Lesko, S. A. et al.: *Biochemistry*, **19**, 3023, 1980.
- [5] Slater, T. F.: *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*, **143**, Excerpta Medica Amsterdam, 1979.
- [6] 郑荣梁:《生物科学动态》, **9**, 36, 1964.
- [7] 郑荣梁:《生物化学与生物物理进展》, **3**, 17, 1983.
- [8] Fridovich, I.: *Science*, **201**, 875, 1978.
- [9] Hassan, H. M. et al.: *J. Bacteriol.*, **117**, 166, 1974.
- [10] Fernandez-Sauza, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 217, 1978.
- [11] 郑荣梁:《肿瘤防治研究》, **3**, 1983.
- [12] Foote, C. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6233, 1968.
- [13] Deleo, V. A. et al.: *Am. J. Med.*, **60**, 8, 1976.
- [14] Cavallieri, E. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **14**, 641, 1971.
- [15] Diamond, I. et al.: *Lancet*, **2**, 1175, 1972.
- [16] Felber, T. D. et al.: *J. Am. Med. Ass.*, **223**, 289, 289, 1973.

[本文于1983年2月10日收到]

第三步使用五氧化二磷或分子筛去掉水份,效率较高操作方便。

目前参考本法纯化乙腈的新工艺已提交浙江黄岩化学实验厂,进行批量生产。

本工作曾得到本所陈志民同志帮助和支持,周元聪同志审阅全文,庄熙孟同志拍摄照片,特此致谢。浙江黄岩化学实验厂刘万章、叶锡刚参加部分工作。

参 考 文 献

- [1] Herbert, Kiese: *Anal. Chem.*, **52**, 2230, 1980.
- [2] Carlsen, L.: *Anal. Chem.*, **51**, 1593, 1979.
- [3] Farcier, G. A. *Anal. Chem.*, **37**, 1447, 1965.

[本文于1982年10月7日收到]