

甾体激素的聚酰胺薄层层析*

余运初

(江西中医学院生理教研组)

早在1961年,就有人将聚酰胺用作薄层层析的吸附剂。至今已发展为一种被广泛应用的新的层析技术。

我们自1965年开始,曾用尼龙(Nylon-6)薄层层离甾体激素,获得满意结果。应用简单的溶剂系统,即可分离各种肾上腺皮质激素(皮质素、皮质醇、醛固酮、皮质酮及脱氧皮质酮),雄激素,及雌激素。尼龙薄板的制备简便,层析分辨力强,分离迅速。用于纸上层析检出甾体激素的反应试剂亦可用于尼龙薄层。在紫外灯下可直接洗出照片图谱。应用尼龙薄层层析,曾对某些生物组织或体液中的甾体激素进行了分析检定,亦获得有意义的结果。

实验材料和方法

实验材料

1. 尼龙-6 所用国产尼龙-6为上海第九化纤厂生产的锦纶丝废料,分子量16,000以上。荷兰产尼龙-6由南昌洪都袜厂提供,分子量20,000左右。

2. 甲酸 含量不低于85%, A. R或C. P。

3. 片基 采用5×20厘米及10×20厘米玻璃板,也可用涤纶片基(上海感光胶片厂)。

4. 展开溶剂 甲醇、苯、石油醚、丙酮、氯仿均为A. R,上海试剂总厂供应。

5. 显色反应试剂 四氮唑蓝及间位二硝基苯为德国进口。三氯化铁、铁氰化钾,氢氧化钠为上海产。

6. 激素标准品 皮质酮(N. V. Organon-oss, Holdand, 17721); 醛固酮(Koch Light, 6606-02); 皮质素(上海通用制药厂, 660160); 皮质醇(上海第九制药厂, 711001); 脱氧皮质酮(华

联制药厂, 6405-15); 去氢表雄酮(上海通用药厂, 640560); 丙酸睾丸素(N. V. Organon-oss, Holdand); 雌二醇-17 β (Roussel Uclaf, 5B-1789); 雌酮(Roussel Uclaf, 4B-2337); 雌三醇(N. V. Organon-oss, Holdand, 11966)。

尼龙薄板的制备

称取定量尼龙丝,按每克尼龙加入甲酸4.5毫升。在室温下不断摇动,使其充分溶解(约需10分钟左右)。再加入70%乙醇(0.5毫升/每克尼龙),并用玻棒搅拌10—20分钟,呈均匀乳白色混悬液即可。用大号注射器吸取已溶解的尼龙溶液,加到水平放置的玻板(或涤纶片基)上,用小玻棒搅动使其均匀铺满整个玻片。每12毫升溶液(约含尼龙2克)可铺10×20厘米之玻板一块。干后厚度约0.5毫米。

膜铺好后,必须在水蒸汽饱和的条件下,使甲酸缓缓蒸发,才能形成匀质的薄膜。为此,特制一长40厘米、宽25厘米、高5厘米玻璃槽(图1)。其内放一块水平玻璃,通过调节槽架脚的螺旋,用水准仪校准其水平位置。待涂层

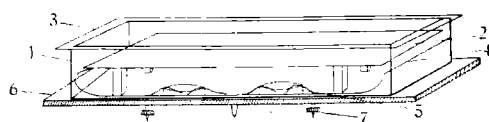


图1 制板用的特制玻璃槽

1. 玻璃槽 2. 水平玻板 3. 盖 4. 湿滤纸 5. 玻璃皿, 内盛水 6. 木架 7. 活动螺旋脚

的片基放在此水平玻板上。槽内底层铺以湿润滤纸,膜铺好后,加盖密封,使充满水蒸汽,静置过夜。第二天取出制好的尼龙薄板,放入一玻璃

* 本文承程治平教授指导。部分工作曾在哈尔滨医科大学生理教研组进行。

缸内，流水下漂洗 2—3 小时。室温下风干，再置 90—100℃下，烘 1 小时。放入干燥器中保存备用。

层析操作

标准品以无水甲醇溶解(500 微克/毫升)，以微量吸管吸取 100 微升，将吸管水平放置。再以毛细玻管由吸管吸取，逐次点在尼龙薄膜上，每 2 微升相当一微克。点子直径小于 2 毫米。原点距薄板一端 2 厘米。

将已点好样品的薄板放入玻璃层析槽内，层析槽呈 45° 倾斜，点有样品的一端朝上。加入相应溶剂系统 15 毫升(所用溶剂系统见下)，盖上磨口玻盖，在室温下置 30 分钟，使达饱和。然后将层析槽位置颠倒过来，薄板下端即浸入展开剂中，一般浸入 0.5 厘米。溶剂上升 10 厘米约需 20—40 分钟。展开后，取出薄板，风干，即可显色。

甾体激素的检出

经层析后，采用下列显色法以检出所分离的甾体激素。

1. 四氮唑蓝还原反应——用于肾上腺皮质激素

9.8 毫升 10% NaOH 水溶液与 0.2 毫升 0.5% 四氮唑蓝乙醇溶液在临用前混合均匀。将待显色的薄板稍倾斜放置，将配好的显色剂倾倒在薄板的上端，待其流布整个板面，室温下放置 10—15 分钟，皮质激素斑点呈蓝色反应。再

将薄板放入流水中漂洗 5—10 分钟以除去空白背景上的多余显色剂。室温下风干，可长期保存。灵敏度≥0.2 微克/厘米²。

2. 碱性荧光试剂

将氢氧化钠溶于 60% 甲醇使成 10% 溶液。均匀涂布在薄层表面，在 70—90℃ 下烘干。在紫外灯下皮质甾体呈明亮的橘黄色斑点(敏感度≥0.5—1 微克/厘米²)。数日后荧光消失但可再重复处理。这一反应主要特异地对 α 、 β -不饱和酮基的甾体(Δ^4 —3 酮)起反应。

3. M-二硝基苯反应——用于雄激素

按 B. P. Lisboa (1964) 法稍加改进。取 2% M-二硝基苯乙醇溶液与 2.5N 氢氧化钾水溶液按 1:10 混合，立即均匀涂布于薄层板上。80℃ 下加热 3—5 分钟。在流水中洗去多余试剂。雄甾酮呈紫色斑点。数小时后颜色逐渐消退。

4. 铁氰化钾——三氯化铁试剂

取 0.6% 铁氰化钾水溶液与 0.9% 三氯化铁水溶液，在临用前等量混合，涂于薄层板上。室温下数分钟后，酚类固醇(雌激素)呈蓝-绿色反应。流水中洗去多余试剂，可保持数日。

实 验 结 果

肾上腺皮质激素的层离

应用不同溶剂系统对五种皮质激素分离结果如(表 1, 图 2)。并曾检出自大鼠肾上腺静脉血浆中之皮质酮(图 3)。

表 1 五种皮质激素的聚酰胺薄层层析结果

溶剂系统	材 料	R _f 值				
		F	E	Ald	B	DOC
氯仿/水/甲醇 (9)(0.1)(1)	国产尼龙-6	0.73	0.80	0.81	0.81	0.80
苯/甲醇/水 (10)(5)(5)	同 上	0.25	0.46	0.55	0.60	0.95
苯/甲醇/水 (9)(1)(1)	同 上	0.08	0.21	0.32	0.52	0.90
苯/甲醇/水 (9)(1)(1)	荷兰产尼龙-6	0.04	0.11	0.18	0.32	0.86
苯/甲醇/氯仿/水 (9)(1)(1.5)(0.5)	同 上	0.10	0.22	0.35	0.51	0.92

F-皮质醇 E-皮质素 Ald-醛固酮 B-皮质酮 DOC-脱氧皮质酮。

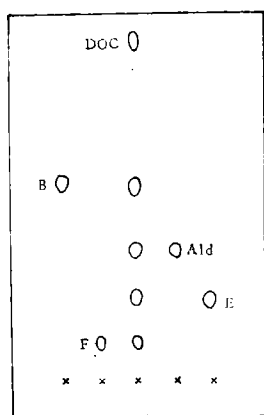


图 2 五种皮质激素的层离图谱

溶剂: 苯: 甲醇: 氯仿: 水 室温: 32°C
(9) (1) (1.5) (0.5)

饱和: 30' 展开 21'/10cm

雌激素的层离

以苯/丙酮/甲醇 (8.5:1.5:0.5) 作展开剂, 对雌三醇、雌二醇、雌酮在尼龙薄板上进行分离, 相应的 R_f 值为 0.165, 0.5, 及 0.825 (见图 4)。

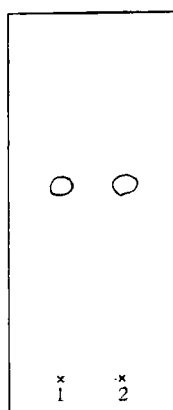


图 3 大白鼠肾上腺静脉血
中皮质酮之层析检定

1. 标准皮质酮 (2 微克);
2. 0.5 毫升大白鼠肾上腺静脉血浆之氯仿提取物展开溶剂同图 2

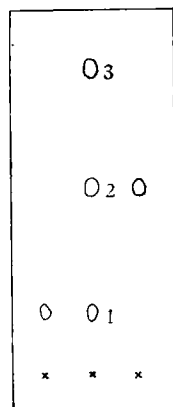


图 4 雌激素层离图谱

溶剂: 苯/丙酮/甲醇,
(8.5)(1.5)(0.5)

室温: 21°, 饱和: 30', 展开, 30'/11.5 厘米, 1——雌三醇, 2——雌二醇, 3——雌酮

雄激素的层离

对丙酸睾酮、去氢表雄酮以尼龙薄层进行层析分离, 亦获得良好分离效果 (表 2 图 5)。

表 2 雄激素的聚酰胺薄层层析

溶剂系统	材 料	R_f 值	
		丙 睾	去氢表雄酮
苯/甲醇/水 (9)(1)(0.5)	荷兰产 尼龙-6	前缘	6.3
石油醚/苯/甲醇 (9) (1)(0.5)	同 上	6.25	原点
石油醚/苯/甲醇 (8)(1.5)(0.5)	同 上	7.3	2.5

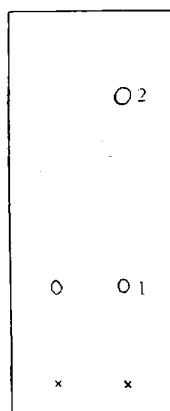


图 5 雄激素的层离图谱

溶剂: 石油醚/苯/甲醇,
(8)(1.5)(0.5)

室温: 32°C, 饱和: 30', 展开 21/10 厘米, 1——去氢表雄酮, 2——丙睾

讨 论

聚酰胺薄层层析现今已用于分离多种化合物, 都取得满意的效果。但未见用于分离甾体激素的报道。我们选用普通的溶剂系统, 在尼龙薄膜上分离各种甾体激素, 包括 C_{18} 系的雌激素, C_{19} 系的雄激素及 C_{21} 系的肾上腺皮质激素, 均获得满意的结果。甾体激素在尼龙薄膜上的层析行为, 主要取决于化合物的吸附性和溶剂的极性。聚酰胺的吸附作用, 是由于其酰基与某些化合物之间形成氢键。雌激素类含有酚羟基, 其吸附性较强, 因此, 采用极性较大的溶剂作为展开剂, 根据其羟基的数目, 雌三醇 > 雌二醇 > 雌酮, 其相应 R_f 值为 0.165、0.5 及 0.825。雄激素的吸附性最小, 故采用极性小的溶剂 (石油醚/苯/甲醇) 作为展开剂。对于肾上腺皮质激素, 根据其极性的大小和羟基的数目, 其吸附

性大小顺序是皮质醇>皮质素>醛固酮>皮质酮>脱氧皮质酮,相应 R_f 值见表1。在实际工作中,按以上规律选择溶剂即可预期地改变 R_f 值。

聚酰胺的吸附力,与其分子量大小有关。我们所用荷兰产尼龙-6,分子量(20,000)比上海化纤九厂的尼龙-6(16,000)稍大,它对皮质激素的吸附力也较强。用相同的溶剂展开,以荷兰产尼龙-6作薄层,皮质激素的 R_f 值相应较小(见表1)。

尼龙薄层层析后,甾体激素的检出可采用纸层析所用的显色反应试剂。对皮质激素可用

四氮唑兰或碱荧光试剂,对雌激素可用三氯化铁-铁氰化钾试剂,均很方便。对雄激素我们利用间位二硝基苯反应试剂,按B. P. Lisboa(1964)加以改进,以氢氧化钾水溶液代替氢氧化钾甲醇溶液,并将间二硝基苯的用量减少至1/10,亦取得满意效果。但是,各种强酸性反应试剂(如硫酸、磷酸)不能用于尼龙薄膜。

尼龙薄层具有一定程度的坚韧性,可用铅笔在上面写字或作标记。可从玻璃板上揭下保存。亦可任意裁剪,便于作光密度测定或紫外光吸收测定。

[本文于1978年10月11日收到]

微生物培养液中有有机酸纸谱法的改进

齐义鹏 刘淑华

(中国科学院成都生物研究所)

现有的有机酸层析法对测定微生物培养液中的乳酸不适用。我们经过改进,提出了预处理样品的指示层析、薰蒸显色法,用以测定两株啤酒病源菌培养液中的乳酸,取得较好效果。两株病源菌(P_1 , P_2)均由重庆啤酒厂的病酒样品中分离得到;属乳酸菌科,片球菌属(*Pediococcus*)。

方法与结果

一、微生物培养液层析中的问题

我们首先采用一般层析法以两种溶剂试验:(1)乙醇:浓氨水(比重0.88):水=80:4:16(V/V);(2)正丁醇:甲酸:水=4:15:1(V/V)。样品为啤酒病源菌 P_1 、 P_2 的葡萄糖酵母膏培养液。层析后,分别用0.1%的溴酚蓝绿和0.1%的溴酚蓝喷雾显色。标准酸(2.0%乳酸)出现黄色斑点,样品不显色。将溴酚蓝溶液分别调到pH6.8和8—9^[1],显色结果,酸性指示剂喷雾出现花斑,碱性指示剂仍只有标准酸的斑点,样品在原点未移动或移动很少(表2)。

二、微生物培养液纸层析的改进

1. 进行预处理:

(1)取 P_1 、 P_2 的啤酒病源菌培养液2.0毫升,加5.0%三氯醋酸(TCA)8.0毫升,90℃加热15分钟,离心2,000rpm 10分钟。

(2)取上清液5.0毫升,加2.0%硫酸铜1.0毫升和碳酸钙1.0克,静置30分钟以上,并经常振荡,离心2,000 r. p. m. 15分钟,收集上清液,过夜后,次日再过滤,用滤液作层析样品。

将2.0%乳酸加入啤酒中,按上述操作同样处理,作为对照。

2. 指示层析: 溶剂用乙醇:水:浓氨水(比重0.88)=35:13:2(V/V),加入百里酚蓝0.03%(V/V)^[2],用Whatman 1号滤纸点样0.01毫升,饱和后,进行单向上行一次或二次层析4小时,在层析过程中,滤纸被溶剂染成蓝色,样品为黄色斑点,随溶剂前沿移动,与标准酸相似,可以直接观察斑点移动和整个层析情况。滤纸取出凉干后,变成黄色,斑点消失。

3. 薰蒸显色: 凉干滤纸,在浓盐酸蒸汽显色缸中,密闭薰蒸1分钟,滤纸背景立即变成均匀而美丽的玫瑰红色,衬托出一个清晰的黄色斑点。取出凉干后,计算 R_f 值。