

SEPULISHU CONGSHU

色谱技术丛书

亲和色谱方法及应用

于世林 编著



化学工业出版社

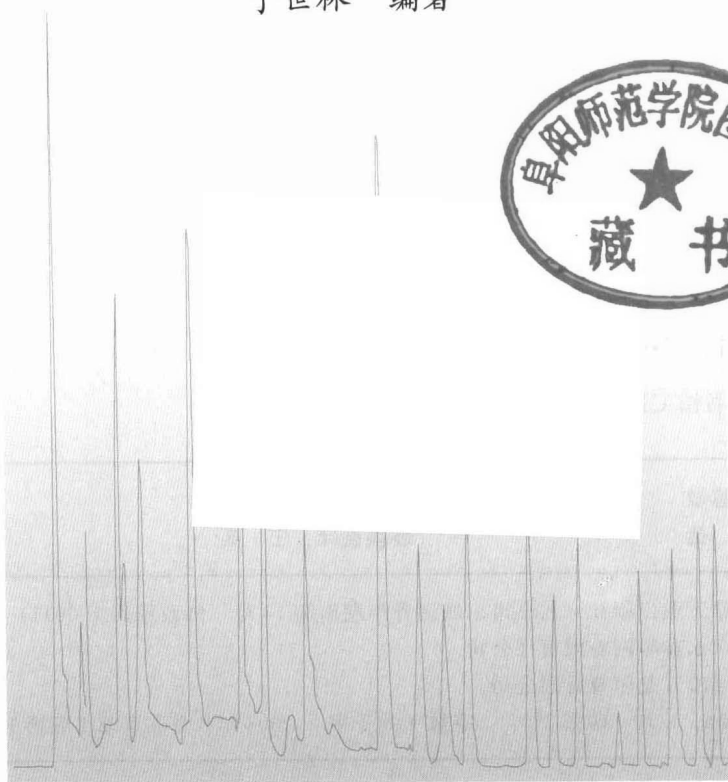
0657.7
1044
2

SEPU JISHU CONGSHU

色谱技术丛书

亲和色谱方法及应用

于世林 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书是《色谱技术丛书》中专门介绍亲和色谱方法的分册。书中对亲和色谱方法的特点、适用范围、亲和固定相的制备方法及实验技术作了较全面的介绍。由载体、间隔臂和配位体制作的亲和固定相可与生物分子生成具有“锁-匙”结构的络合物,其在生物化学、分子生物学和生物工程下游技术中获得广泛的应用。

本书适用于生物化学、分子生物学、药学、分析化学等专业师生选作教材或参考书,也可供从事制备液相色谱、生物制品或天然产物纯化、传感器制作、微流路芯片或生物芯片制作的工程技术人员作为学习参考材料。

图书在版编目(CIP)数据

亲和色谱方法及应用/于世林编著. —北京:化学工业出版社, 2008. 3

(色谱技术丛书)

ISBN 978-7-122-02273-8

I. 亲… II. 于… III. 亲和色谱 IV. 0657.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 027931 号

责任编辑:任惠敏

文字编辑:刘志茹

责任校对:郑捷

装帧设计:于兵

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市万龙印装有限公司

720mm×1000mm 1/16 印张21 $\frac{3}{4}$ 字数416千字 2008年8月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:45.00 元

版权所有 违者必究

色谱技术丛书 (第二版)

傅若农 主编

汪正范 刘虎威 副主编

各分册主要执笔者:

《色谱分析概论》	傅若农		
《色谱定性与定量》	汪正范		
《气相色谱检测方法》	吴烈钧		
《液相色谱检测方法》	云自厚	欧阳津	张晓彤
《气相色谱方法及应用》	刘虎威		
《高效液相色谱方法及应用》	于世林		
《平面色谱方法及应用》	何丽一		
《离子色谱方法及应用》	牟世芬	刘克纳	丁晓静
《毛细管电泳技术及应用》	陈义		
《色谱分析样品处理》	王立	汪正范	
《色谱联用技术》	汪正范	杨树民	吴侔天 岳卫华
《色谱柱技术》	刘国詮	余兆楼	
《色谱仪器维护与故障排除》	吴方迪		
《制备色谱技术及应用》	袁黎明		
《亲和色谱方法及应用》	于世林		
《裂解气相色谱方法及应用》	金熹高		
《色谱手性分离技术及应用》	邓玉林		
《气相色谱在石油化工中的应用》	杨海鹰		
《色谱在环境分析中的应用》	江桂斌	牟世芬	
《色谱在食品安全分析中的应用》	王绪卿	吴永宁	
《色谱在生命科学中的应用》	廖杰	钱小红	
《色谱在药物分析中的应用》	田颂九		
《色谱在无机材料分析中的应用》	胡净宇		

序

《色谱技术丛书》第一版是从2000年初开始出版的。由于这是一套较全面地介绍当代色谱技术的丛书，取材新颖，内容丰富，所以从一出版就受到了读者的普遍欢迎和肯定，同时也被众多的技术培训班选作教材，致使每一分册的发行量都突破了万册。但是，随着科学技术的突飞猛进和国家经济建设的快速发展，色谱作为主要的分离分析技术，需求与应用越来越广泛，从事色谱分析工作的人员也越来越多，年轻的和刚刚从事色谱分析的人员急需普及和提高色谱分析的理论和技术。再者，色谱技术本身也在不断的发展，新技术不断出现，有必要向广大读者尽早介绍这些知识。此次，化学工业出版社与丛书主编、作者合作，适时地将这套丛书重新修订，再版面世，是对普及并推动色谱技术发展的又一贡献。

在经历了近五个年头的实践检验后，这套丛书的第二版除了对第一版原有的13个分册分别进行了修改和充实，增加了新的内容，包括新近发展的仪器、技术、方法与应用等的介绍，提高了丛书的质量；同时还进一步完善了整个丛书体系，增加了一些新的书目，特别是有关应用的书目，形成一套更完整的色谱技术丛书，以进一步满足广大读者的需求。增加的10本新的书目为：邓玉林等的《色谱手性分离技术及应用》，江桂斌、牟世芬等的《色谱在环境分析中的应用》，金熹高的《裂解气相色谱方法及应用》，廖杰、钱小红等的《色谱在生命科学中的应用》，田颂九等的《色谱在药物分析中的应用》，王绪卿、吴永宁等的《色谱在食品安全分析中的应用》，杨海鹰的《气相色谱在石油化工中的应用》，袁黎明的《制备色谱技术及应用》，于世林的《亲和色谱方法及应用》及胡净宇的《色谱在无机材料分析中的应用》。同第一版一样，这些分册的作者也都是长期在各自工作中

具有丰富经验的色谱专家。还应提出的是，此书也再次得到安捷伦科技有限公司的热情赞助。相信第二版《色谱技术丛书》会同第一版一样受到读者们的欢迎，特再为此序。

周同惠

2004年10月22日

第一版序

色谱作为一种分离技术与方法,自本世纪初发表第一篇论文算起,已有100年的历史,虽然在前30多年间这种方法未受到应有的重视,但自40年代以后,逐渐得到发展,而且其势头越来越猛,从技术到理论,到各种分离模式,以及在各个科学领域内的应用,得到了突飞猛进的发展,现在已经成为分析化学学科中的一个重要分支。同时为许多重要学科的发展作出了极大的贡献。在人类进入21世纪之际,人们面临着在信息科学、生命科学、材料科学、环境科学等领域的快速发展的挑战,在这些领域人才的需求成为国家高度发展的至关重要的因素。而色谱技术是生命科学、材料科学、环境科学必不可少的手段和工具。根据最近的统计在全世界各类分析仪器中气相色谱仪和液相色谱仪的营销总额占25%~30%。2000年对各类分析仪器的需求量也以液相色谱仪最多。可以毫不夸张地说,如果没有色谱技术的应用,自然科学和生命科学能发展到今天的这个样子是很难想象的。

有关色谱的各种专著国内外已经出版了许多种,其中多是针对色谱专业人员而写的专著,而缺少一套系统的比较全面的介绍当代色谱技术的丛书,供广大的工厂企业中从事色谱分析的初中级技术人员和科研院所的科技人员,大专院校的研究生,甚至管理人员及有关领导学习参考的书籍。为此化学工业出版社提议,由北京理化分析测试学会组织编写了这套‘简明扼要,深入浅出,通俗易懂,新颖实用’的色谱技术丛书。这套书以傅若农教授为主编,汪正范教授和刘虎威副教授作副主编。为联系方便,主要请在京的专家来编写,并自1998年初开始运作。从方便读者学习角度出发,将色谱技术的主要内容分为13册。分别为:傅若农之《色谱分析概论》,刘国詮、余兆楼等之《色谱柱技术》,陈义之《毛细管电泳技术及应用》,于世林之《高效液相色谱方法及应用》,刘虎威之《气相色谱

方法及应用》，云自厚、张晓彤之《液相色谱检测方法》，吴烈钧之《气相色谱检测方法》，汪正范之《色谱定性与定量》，汪正范等之《色谱联用技术》，牟世芬、刘克纳之《离子色谱方法及应用》，何丽一之《平面色谱方法及应用》，王立之《色谱分析样品处理》，吴方迪之《色谱仪器维护与故障排除》。这些编著者多是我国目前在教学与科研第一线为色谱科学努力奋进的中青年专家，在书中都反映了色谱领域的基本知识、基本方法和他们自己的宝贵经验以及有关领域的最新成果。这套丛书将给初学色谱的年轻科技工作者提供较完整的学习参考书，也为大中专学生提供一套有用的教学参考书。还应该提出的是，由于得到了安捷伦科技有限（原中国惠普）公司的赞助，这套书的出版才能顺利进行。值此书即将付梓之际，特书此以为序。

周同惠

1999年9月9日

前言

亲和色谱是液相色谱的一个分支，主要用于生物分子的分离、纯化和分析。

亲和色谱主要依据生成具有“锁-匙”结构特征的络合物，利用分子识别的特异功能，来实现生物分子的特效性分离。

本书试图对亲和色谱近 50 年的发展概况进行扼要的介绍，全书共分 13 章。

第一章亲和色谱法基础，介绍了亲和色谱方法的特点、亲和色谱的发展史和基本理论；重点阐述锁-匙络合物的化学平衡、亲和吸附等温线和吸附与解吸的动力学、质量平衡的数学模型。

第二章流动相，对亲和色谱中流动相的组成，Good's 缓冲物和洗脱方法做了较详细的介绍。

第三章和第四章对应固定相（一）和固定相（二），对构成亲和固定相的载体的组成、活化方法；间隔臂的构成及偶联方法；配位体的类型、键合容量及键合方式做了全面的介绍。

第五、第六、第七章对应生物特效配位体（一）、生物特效配位体（二）和生物特效配位体（三），重点介绍了生物特效配位体涉及的核酸、蛋白质、酶、维生素、辅酶、外源凝集素、糖、抗体和抗原、亲和素-生物素、激素、生物细胞、生物分子组合体和微生物等多种类型、性能各异的高特效性配位体。

第八章染料配位体，其作为具有组特效性的最重要的生物模拟配位体。

第九章定位金属离子配位体，其为另一类重要的生物模拟配位体。

第十章包含配合物配位体，为近年迅速发展的、对手性生物分子具有特效的分离能力，如 β -CD、冠醚、穴醚及杯芳烃。

第十一章电荷转移配位体，介绍了电子给予配位体、电子接受配位体和卟啉、酞菁衍生物配位体。

第十二章介绍了共价、分子印迹、疏水作用三类亲和配位体。

第十三章介绍了亲和色谱法的实验技术、方法进展及发展前景。

本书在固定相和配位体各章、节，较详细地介绍了载体活化、间隔臂偶联，配位体键合制备亲和固定相的具体操作方法、化学反应的基本过程、分析测定实例、重要的参考文献，以便于读者阅读借鉴。

为了同步反映液相色谱柱制备技术的快速发展，全书对多糖凝胶经典填充柱； SiO_2 和 $\text{P}(\text{S-DVB})$ 等聚合物微粒高效填充柱；配位体涂渍或表面薄层键合柱；由甲基丙烯酸酯共聚物或聚丙烯酰胺制作的整体填充柱和整体毛细管柱；开管毛细管微柱；微流路芯片制作等都做了较全面的介绍。

本书是在作者承担两项国家自然科学基金项目和参与一项北京市自然科学基金项目的科研工作基础上，通过阅读大量参考文献，和大量本科生、研究生参与科研实践，才完成本书的编写工作，在此向参与上述科研工作的本科生和研究生致以诚挚的感谢。

本书完稿过程中责任编辑对章、节的分割提出中肯的意见，并做了大量编辑工作，特此致谢。

最后感谢本丛书主编傅若农教授的耐心审阅和提出的宝贵修改意见，特此致谢。

鉴于作者水平，对本书不妥之处，欢迎读者指教。

于世林 2007 年 9 月

于北京化工大学

目 录

第一章 亲和色谱法基础	1
第一节 概述	1
一、锁匙结构络合物的形成	1
二、亲和色谱和液相色谱	2
三、高效液相亲和色谱	3
四、亲和色谱方法的分类	4
五、亲和色谱发展史	4
第二节 亲和色谱法的基本理论	7
一、锁匙结构亲和吸附络合物的化学平衡	8
二、亲和吸附等温线、吸附速度和吸附动力学方程式	11
三、亲和键合动力学	14
四、亲和色谱的质量平衡数学模型	15
五、“分裂峰”效应的研究	19
参考文献	23
第二章 流动相	25
第一节 影响亲和色谱洗脱的各种因素	25
一、锁匙络合物的离解常数	25
二、配位体的浓度	26
三、空间阻碍作用	27
四、亲和固定相的吸附容量	28
五、平衡时间	29
六、温度效应	30
第二节 缓冲溶液流动相的组成	30
一、常用的酸、碱缓冲溶液	30
二、用于生物化学研究的氢离子缓冲物	32
第三节 洗脱方法	41
一、非选择性洗脱法	41
二、特效性洗脱法（或称生物选择性洗脱法）	42
三、特殊洗脱方法	43
参考文献	44
第三章 固定相（一）	45
第一节 亲和色谱固定相的制备方法	45
一、亲和色谱固定相的组成	45

二、固定化反应及其特点	46
三、在固定化反应中使用的分析技术	46
第二节 载体材料的分类及特性	49
一、描述载体材料的基本特性参数	50
二、无机氧化物载体材料	51
三、聚合物载体材料	54
四、无机氧化物、聚合物载体的性能比较	61
五、复合物载体材料	63
六、磁性载体材料	66
参考文献	67
第四章 固定相 (二)	70
第一节 载体材料的活化	70
一、无机氧化物的偶联反应	70
二、天然有机高聚物的活化反应	75
三、合成有机聚合物的功能化反应	81
第二节 间隔臂	86
一、间隔臂在亲和和色谱固定相中的特殊作用	86
二、疏水性直链型间隔臂	91
三、亲水性直链型间隔臂	94
四、星形辐射-树枝状间隔臂	95
第三节 配位体	97
一、配位体的类型	97
二、配位体的键合量	99
三、配位体的键合方式	100
参考文献	102
第五章 生物特效配位体 (一)	104
第一节 核碱、核苷、核苷酸、寡聚核苷酸、核酸 (RNA、DNA)	104
一、核碱	104
二、核苷	108
三、核苷酸	108
四、寡聚核苷酸、核酸及其碎片	111
第二节 氨基酸、肽、酶和蛋白质	121
一、氨基酸	121
二、肽	123
三、酶和蛋白质	127
参考文献	138
第六章 生物特效配位体 (二)	140
第一节 维生素及辅酶	140

第二节 外源凝集素	144
一、豆类外源凝集素-琼脂糖, SiO_2 亲和固定相	145
二、蓖麻凝集素-琼脂糖亲和固定相	146
三、三重外源凝集素-琼脂糖亲和固定相	147
四、在微流路芯片上豌豆凝集素 (PSA)-P(GMA-EDMA) 共聚物整体亲和柱的制备	149
第三节 糖类	150
一、肝素-琼脂糖, SiO_2 亲和固定相	150
二、甘露聚糖-P (GMA-EDMA) 共聚物整体毛细管亲和柱的制备	151
第四节 抗原和抗体	153
一、抗原及其性质	153
二、抗体及其性质	154
三、抗体与抗原相互作用的特点	155
四、免疫亲和色谱固定相的制备	156
参考文献	162
第七章 生物特效配位体 (三)	165
第一节 亲和素-生物素	165
一、亲和素和链亲和素的重要性质	165
二、亲和素-生物素技术	166
三、生物素酰化衍生物 (或结合体) 的生成	167
四、亲和素-固相载体共轭探针的形成	167
五、亲和素-生物素技术在亲和色谱的应用	170
第二节 激素	175
一、胰岛素-琼脂糖亲和固定相	175
二、促肾上腺皮质激素-琼脂糖亲和固定相	177
三、雌二醇-琼脂糖亲和固定相	177
四、皮质醇-琼脂糖亲和固定相	178
第三节 生物细胞、生物分子组合体和微生物	178
一、生物细胞和生物分子组合体	179
二、微生物细胞	181
参考文献	182
第八章 染料配位体	184
第一节 三嗪活性染料的性质	184
一、三嗪染料的组成	184
二、三嗪染料对生物分子的特效亲和作用	186
第二节 染料配位亲和固定相的制备及分析应用	187
一、多糖基体亲和固定相	187
二、全多孔 (或非多孔) 硅胶基体亲和固定相	192

三、聚合物基体亲和固定相·····	195
四、Cibacron Blue F3G-A 开管毛细管亲和柱 ·····	202
参考文献 ·····	202
第九章 定位金属离子配位体 ·····	204
第一节 概述 ·····	204
一、定位金属离子的特性·····	204
二、螯合官能团或螯合剂的特性·····	205
三、蛋白质的吸附和解吸·····	206
四、IMAC 方法的特点 ·····	207
第二节 IMAC 固定相的制备方法以及在生物分子分离、纯化中的应用 ·····	207
一、亚氨基二乙酸 (IDA) ·····	207
二、次氨基三乙酸 (氨三乙酸, NTA) ·····	221
三、亚氨基二乙醛肟 (IDAO) ·····	221
四、乙二胺 (ED) ·····	222
五、三(羧甲基)乙二胺 (TED) ·····	223
六、乙二胺- N,N' -二乙酸 (EDDA) ·····	224
七、丙二胺四乙酸 (PDTA) ·····	225
八、8-羟基喹啉 ·····	225
参考文献 ·····	228
第十章 包合配合物配位体 ·····	230
第一节 β -环糊精 ·····	230
一、 β -环糊精的特性 ·····	230
二、 β -CD 包合固定相的制备以及在生物分子分离、纯化中的应用 ·····	232
第二节 冠醚和穴醚 ·····	242
一、冠醚和穴醚的特性·····	242
二、冠醚包合固定相的制备·····	243
第三节 杯芳烃 ·····	245
一、杯芳烃的特性·····	246
二、杯芳烃包合固定相的制备·····	247
参考文献 ·····	252
第十一章 电荷转移配位体 ·····	254
第一节 电子给予-接受络合物 ·····	254
一、电子给予-接受络合物的特性 ·····	254
二、芳烃、多环芳烃配位体电荷转移亲和固定相·····	255
第二节 电子给予配位体电荷转移固定相 ·····	256
一、苯基烯丙基醚-硅胶电荷转移固定相 ·····	256
二、2-氯喹啉 (CQZ)-硅胶电荷转移固定相 ·····	256
三、8-羟基喹啉 (8-HQ)-硅胶电荷转移固定相 ·····	256

四、吡啶黄素-葡聚糖电荷转移固定相	258
第三节 电子接受配位体电荷转移固定相	258
一、二硝基苯(DNP)-葡聚糖(硅胶)电荷转移固定相	258
二、五氯硫基酚(PCP)-葡聚糖电荷转移固定相	260
三、4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺(ANA)-葡聚糖电荷转移固定相	260
四、2,3-二氰基-5,6-二氯代苯醌(DCBQ)-葡聚糖电荷转移固定相	261
五、四氯邻苯二甲酰亚胺(TCPI)-硅胶电荷转移固定相	261
六、二硝基苯-甘氨酸(DNP-Gly)-P(S-DVB)或PMA电荷转移固定相	261
第四节 卟啉配位体电荷转移固定相	263
一、卟啉及其衍生物	263
二、卟啉电荷转移固定相的制备及分析应用	264
第五节 酞菁配位体电荷转移固定相	271
一、酞菁及其衍生物	271
二、四磺酸化铜酞菁-硅胶固定相	272
三、其他金属离子酞菁衍生物的应用	274
参考文献	275
第十二章 共价、分子印迹和疏水作用配位体	277
第一节 共价配位体	277
一、常用的共价配位体	277
二、共价配位体亲和固定相的制备	277
第二节 分子印迹(模板)配位体	285
一、分子印迹聚合物的特性	285
二、共价键合分子印迹聚合物	287
三、非共价键合分子印迹聚合物	289
四、苯丙氨酰苯胺-P[AA(或MAA)-EDMA]共聚物分子印迹整体柱	292
五、表面涂渍分子印迹聚合物的固定相	293
第三节 疏水作用配位体	298
一、疏水作用原理	298
二、疏水作用亲和固定相的制备	302
参考文献	305
第十三章 亲和色谱法实验技术及其进展	307
第一节 亲和色谱法实验技术	307
一、亲和色谱固定相的制备技术	307
二、亲和色谱分析操作技术	309
三、生物样品的保存和制备	313
第二节 亲和色谱方法的进展	314
一、亲和色谱分离材料的设计	315

二、新型高选择性药物的研制.....	319
三、亲和色谱的发展前景.....	320
参考文献	323
附录	325
I 活化和偶联配位体到 HPLAC 载体的反应条件	325
II 亲和色谱固定相制备中常用的偶联剂、活化剂.....	327

第一章 亲和色谱法基础

第一节 概 述

亲和色谱 (affinity chromatography, AC) 是利用生物分子, 特别是生物大分子与亲和色谱固定相表面配位体之间, 存在的生物学和生物化学过程的特效性亲和吸附作用, 来进行选择性分离生物分子的分离方法。

生物大分子 (肽、蛋白质、核酸等) 的一个共同特性, 是它们具有以特有的高效方式去识别或键合到其他分子上的能力, 这就使得所有的生物大分子, 可借助亲和作用过程来进行分离和纯化。

亲和色谱的固定相可与生物分子产生可逆的生物特异性的亲和吸附作用, 经过选择性或特效性洗脱, 可实现对不同分子量的生物活性分子的分离和分析。

至今, 亲和色谱已在生物化学、分子生物学、基因组学、蛋白质组学、生物工程、临床医学、新型高效药物研究中, 成为常规的分离、分析和制备的有效工具, 并且在生物大分子的结构、功能研究中, 成为一种普遍采用的方法。

一、锁匙结构络合物的形成

亲和色谱固定相上键合的配位体与被分离的生物活性目标分子之间的相互作用, 可用锁匙结构络合物 (lock-and-key structural complex) 的形成来表示, 如图 1-1 所示。

生物活性目标分子与配位体之间存在着特效的、可逆性的相互作用, 这种相互作用的差异, 才使不同种类的生物分子获得分离, 它涉及分子间相互作用的范德华力、疏水作用力、静电吸引力、络合作用力以及空间位阻效应等多种因素。

亲和色谱法的突出特点是对天然生物活性物质进行高特效性的分离和纯化, 具有高的浓缩效应, 可从大量样品基体中分离、纯化出所希望获取的少量生物活性物质。这种特效性的产生, 是由于在亲和固定相基体上, 键合连接了带有