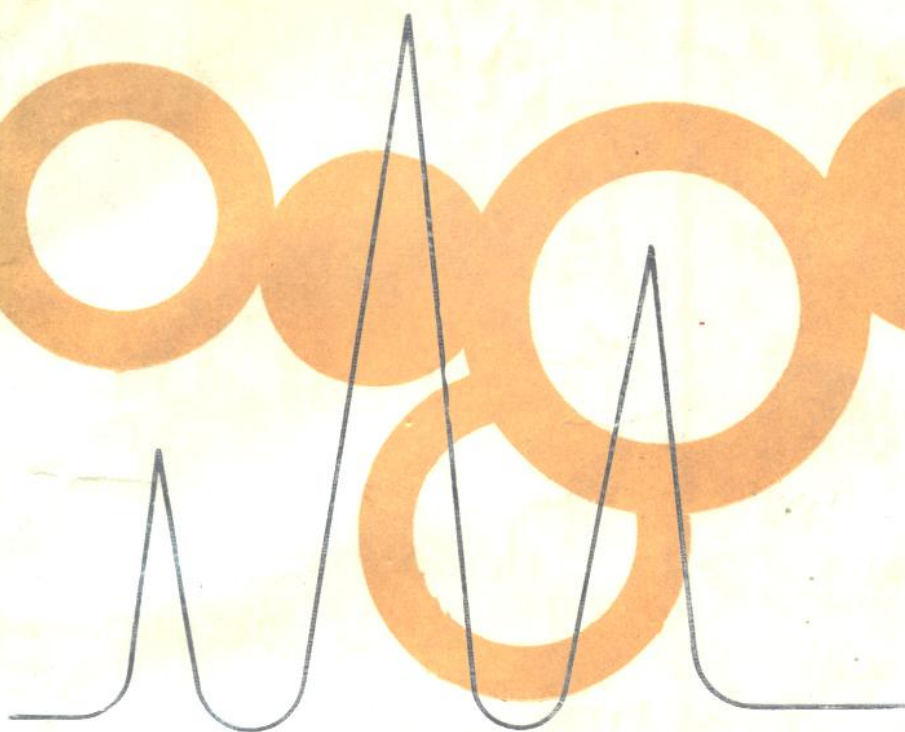




生物大分子的液相色谱 分离和制备

师治贤 王俊德 编著

科学出版社

生物大分子的液相色谱 分离和制备

师治贤 王俊德 编著

KG 10/01



科学出版社

1992

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书较为系统而详细地论述了生物大分子的液相色谱分离和制备,内容包括顶替色谱、离子交换色谱、体积排阻色谱、反相色谱、疏水作用色谱、亲和色谱、制备色谱的分离和设计及其典型应用。本书既包括了近年来生物大分子的液相色谱分离和制备的发展,也包括了作者在这一领域内的研究成果。

本书可供从事化学、化工、生物、医学、药学和生物工程方面工作的研究人员和生产技术人员参考,也可作为高等学校本科生、研究生和教师的参考书。

生物大分子的液相色谱 分离和制备

师治贤 王俊德 编著

责任编辑 杨淑兰

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100707

北京市怀柔县黄坎印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1992年7月第一版 开本: 850×1168 1/32

1992年7月第一次印刷 印张: 7 1/4

印数: 1—2 400 字数: 260 000

ISBN 7-03-003041-9/O·562

定价: 8.90 元

前 言

色谱是迄今人类掌握的对复杂混合物分离效率最高的一种方法。在蛋白质(包括酶)、核酸和糖等与生命科学密切相关的生物大分子的分离上,高效液相色谱是特别受宠的一项技术。在这个领域内,在未来的数年中,唯一能与高效液相色谱相竞争的高效分离方法可能只有高效毛细管电泳,这也是近年来电泳引起人们极大兴趣的一个重要原因。然而,后者的处理量很小,如果以获取足够量纯物质为目的(如结构鉴定,生物活性试验,乃至药物制剂等)的分离过程而论,仍然应当首选液相色谱。

液相色谱与生物大分子能喜结良缘,是与液相色谱提供了十分温和的分离环境密切相关的。液相色谱分离一般在室温下进行,所用流动相为液体,如有机溶剂、水和与生理液相仿的各种缓冲液等;固定相的表面经过各种化学修饰,为在不同模式下分离的生物大分子提供“软接触”的相互作用面。这些对保持某些生物分子的“活性”是十分重要的。多孔填料的孔体积经过精心设计和控制,可以适应于分子量从几千到上百万的大小不同的分子的分离,这样就扩大了液相色谱处理的样品范围。所以高效液相色谱不仅作为一个高效、灵敏、快速的分析方法活跃在分析化学领域,而且也作为一种高效、理想的制备分离方法出现在化学和生物化学家的实验室或工厂里。

近年来,我们用高效液相色谱法对生物大分子进行了研究,深深体会到这是一个很有意义的题目,还有许多研究工作需要做。但另一方面,又感到尚缺乏一本较系统的中文专著,于是产生了要写一本书的念头。在这些年收集资料、积累知识和研究工作经验的基础上,这本书的构思形成了。在书中,我们没有花很大的篇幅去讨论各种理论模型,而是把重点放在各种分离模式和操

作参数的选择等技术问题上，并配合一些典型的应用实例，尽量把最基本和最新的知识介绍给读者。我们认为，液相色谱用于生物大分子的分离和制备这个新题目，目前虽有一些理论模型可供选择，但更多的还是靠经验，只有总结实践经验，才能不断提高。本书如能对读者起到抛砖引玉的作用，我们也就很满意了。

本书在编写过程中得到中国科学院西北高原生物研究所和大连化学物理研究所领导和有关部门的关心与支持，得到作者实验室同事们的积极配合，张乐洋教授审阅了全文，并提出许多宝贵意见。对此，作者表示由衷的谢意。我们还十分感谢科学出版社的大力支持和帮助，由于他们的协作，才使得本书能早日与读者见面。

作者对俞惟乐教授和陈耀祖教授的热忱指导，对在美国密苏里哥伦比亚大学和普度大学进修和工作期间得到 C.W.Gehrke 教授和 F.E.Regnier 教授的帮助和指导，表示感谢。

面对目前这样一个蓬勃发展的学科领域，我们深感自己的学识不足，对于书中的缺点和错误，诚请读者批评指正。

作者

1991 年 12 月

目 录

第一章 绪论	1
1.1 生物大分子液相色谱分离和制备的发展方向	2
1.2 分离介质的发展	3
1.3 分离模式的考虑	5
1.3.1 体积排阻色谱	5
1.3.2 离子交换色谱	6
1.3.3 反相色谱	7
1.3.4 疏水作用色谱	7
1.3.5 亲合色谱	8
1.4 分离规模的扩大	8
第二章 高效液相制备色谱的分离设计	12
2.1 制备色谱分离的一般考虑	13
2.1.1 制备色谱运行的模式	14
2.1.2 切割收集技术	14
2.1.3 微量组分的制备	16
2.1.4 实验条件的一般选择	17
2.2 制备色谱模型的讨论	18
2.3 实验条件的选择与产量	20
2.3.1 柱体积与填料	20
2.3.2 流动相的选择	24
2.3.3 样品的溶解度	26
2.3.4 样品量	28
2.3.5 样品纯度的确定	29
2.3.6 最佳制备量	29
2.4 制备色谱仪	31
2.4.1 泵系统	32

2.4.2 检测系统.....	32
2.4.3 进样系统.....	33
2.4.4 样品的收集.....	34
第三章 制备柱及相关技术	35
3.1 制备规模	35
3.1.1 在分析柱上的制备.....	35
3.1.2 小规模制备.....	35
3.1.3 大规模制备.....	36
3.2 制备柱的装填技术	36
3.3 径向流动色谱	38
3.3.1 径向流动色谱设计的原理.....	39
3.3.2 径向流动和轴向流动的比较.....	39
3.4 柱容量及其影响因素.....	40
3.5 制备所得生物大分子纯度的评价	44
第四章 顶替色谱	46
4.1 顶替色谱的原理	46
4.2 顶替色谱的特性	47
4.2.1 操作线.....	47
4.2.2 溶质的流速.....	48
4.2.3 总效率.....	49
4.3 顶替色谱实验条件	51
4.3.1 顶替剂及其选择.....	51
4.3.2 流动相的选择及影响.....	52
4.3.3 填料及其影响.....	53
4.3.4 柱直径及其影响.....	54
4.4 溶质-溶质顶替色谱	55
4.4.1 实验设计.....	55
4.4.2 操作参数.....	56
4.4.3 多次顶替.....	59
第五章 体积排阻色谱	61
5.1 体积排阻色谱理论	61

5.1.1	保留模型	61
5.1.2	保留机理	62
5.2	体积排阻色谱理论模型	64
5.2.1	硬球体溶质模型	64
5.2.2	刚性分子溶质模型	65
5.2.3	任意平面孔模型-刚性溶质	65
5.2.4	任意弯曲溶质模型	65
5.3	体积排阻色谱填料	66
5.3.1	有机填料	66
5.3.2	无机填料	66
5.3.3	适合生物大分子分离的填料	68
5.4	体积排阻色谱参数的讨论	68
5.4.1	峰容量	68
5.4.2	聚合物在体积排阻色谱上的分离	69
5.4.3	分子量的准确测定	70
5.5	体积排阻色谱操作条件	71
5.5.1	填料	72
5.5.2	柱长	72
5.5.3	洗脱液	72
5.5.4	流速	73
5.5.5	样品容量	74
5.5.6	蛋白质在变性洗脱条件下的分离	74
5.6	蛋白质在体积排阻色谱上的保留行为	75
5.6.1	蛋白质的分离	76
5.6.2	蛋白质的分子量与容量因子(k')	76
5.6.3	分配系数(K_d)	77
5.6.4	pH 不同时的分配系数与离子强度	77
5.6.5	在一定 pH 条件下蛋白质的分离度和离子强度	78
5.6.6	离子强度恒定时 pH 对分配系数的影响	79
第六章	离子交换色谱	82
6.1	填料	82
6.1.1	有机树脂填料	83

6.1.2	无机-有机复合填料	84
6.1.3	表面改性的无机填料及合成方法	84
6.2	参数讨论	87
6.2.1	孔径的影响	87
6.2.2	柱长的影响	88
6.2.3	流速的影响	89
6.2.4	pH 的影响	89
6.2.5	离子强度的影响	93
6.3	保留模型	94
6.4	离子交换色谱分离和纯化蛋白质	96
6.4.1	大豆中混合蛋白质的分离和纯化	97
6.4.2	细胞色素 C ₅₅₃ 的分离和纯化	99
6.4.3	β -半乳糖苷酶和磷酸酶的分离和纯化	99
6.4.4	牛血清蛋白 (OVA) 和大豆蛋白 (STI) 混合物的纯化	102
第七章	反相液相色谱	104
7.1	溶质保留机理	104
7.2	填料及一般合成方法	106
7.2.1	填料概述	106
7.2.2	填料合成的一般方法	108
7.3	分离和制备色谱的选择	110
7.3.1	柱容量与分离度	110
7.3.2	色谱柱的柱效率与蛋白质的分离度	112
7.3.3	流动相的选择	112
7.3.4	柱温的影响	113
7.3.5	流速的影响	116
7.4	蛋白质在柱上的回收率	117
7.4.1	上柱量与回收率的关系	117
7.4.2	洗脱系统与回收率的关系	119
第八章	高效疏水作用色谱	121
8.1	高效疏水作用色谱的原理	121
8.2	高效疏水作用色谱填料	123
8.2.1	基质	124

第一章 绪 论

蛋白质和核酸等物质是生命科学中一类重要的复杂的生物大分子 (biopolymer, biomacromolecule) . 它不仅存在于生物体内, 而且随着生物技术 (biotechnology) 的迅速发展, 越来越多地在体外通过各种工程的途径被人工制造出来, 造福于人类. 无论在揭示生命奥秘的生化、生理、医学诸领域, 还是在求得人类生存和发展的保健、农业、食品和环境等方面都有十分重要的意义. 以蛋白质为例, 虽然它们的水解产物都不过是仅约 20 几种氨基酸的小分子, 但在人体中的蛋白质分子总计却有 10 万余种, 并且极少与其他生物体内的相同. 生物大分子的复杂性不仅表现在本身的结构 (组成、序列、构象) 上, 而且还表现在这些物质所处的环境往往是各种各样大小分子的混杂体. 所以生物大分子的分离和纯化是广大生物学、化学和医学工作者十分关心并长期研究开拓的课题. 因为只有获得一定质和量的纯品, 才能满足结构、物性测定, 活性、毒理实验, 乃至治疗、培育等大规模应用的要求. 生物大分子的另一个重要特点是它们的热稳定性普遍都很差, 有严格的构象, 在脱离了它们已习惯的生理液条件下, 大都有失活变性的可能, 它们对环境的 pH 值、有机溶剂、某些无机载体和金属很敏感. 另一方面, 色谱被认为是迄今人类已掌握的对复杂混合物分离能力最强的手段. 特别是在液相色谱的条件下, 大都在室温下操作, 所用流动相可以是与生理液相似的具有一定 pH 值、含盐的缓冲水溶液, 有时也使用某些能与水互溶的有机溶剂. 所用填料的表面经过了各种相应的化学修饰和覆盖, 这样就为生物大分子的分离提供了温和的条件和“软接触”的表面, 有利于保持它们原有的构象和生理活性. 所以用液相色谱作为生物大分子的分离纯化手段被认为是具有广阔前景的.

1.1 生物大分子液相色谱分离

和制备的发展方向

色谱起源于1906年俄国生物化学家茨维特的工作,当时是以液体作流动相,在碳酸钙柱上分离植物色素。后来几十年间发展缓慢。60年代后期液相色谱获得了复苏,同时吸取了气相色谱理论和实践的丰富营养,并利用分离介质化学、机械、电子、光学和计算机技术方面的成果,建立了现代高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 方法。起初,这个方法和气相色谱一样,主要也是作为一种分析手段,但近10年来,随着制药工业、合成化学和生物技术领域新要求的提出,以获取纯样(产)品为目的的制备液相色谱蓬勃发展,成了液相色谱的一个重要应用方面。以在国际市场上提供HPLC仪器的主要生产厂家、Millipore/Waters 公司为例,他们提供的数据表明,在分析型HPLC仪器方面每年的销售量一直是以一位百分数增长,但现在制备型HPLC仪器却以40—50%的速度递增。规模有大有小,例如微量制备是为提取纳摩尔的蛋白质和多肽用于微序分析,制备量正越来越少;一般实验室规模的制备色谱柱直径不超过2厘米,而且常常可以在4.6和5毫米内径的分析柱上进行制备分离;克级规模的制备色谱柱内径一般在5厘米左右,而工业上大规模的制备色谱内径达50厘米,可以获得千克级的产品。然而任何大规模的制备分离都是以小规模制备和一般分析分离为先导,摸索条件,优化处理,逐步放大。生物大分子的分离与纯化也不例外。

在生物技术制取蛋白质的多级纯化过程中,液相色谱被指定为一个“必需步骤”(compulsory step),这表明操作条件温和、又具有分子水平分离能力的液相色谱为开创现代生物大分子化学树立了一个里程碑。某些基因工程产品,例如干扰素的售价高达

1000 万元/克，生产成本的 80% 花在难度大、费用高的分离与纯化上。世界上发达国家都十分重视生物技术的研究与开发，因而对生物技术下游产品的分离与纯化予以高强度投资。我国对生物技术也十分重视，从“七五”计划开始，生物技术被列为国家高技术项目，重点支持。一些用于分离与纯化下游产品的介质材料、器件、方法和生物制品相继研究开发出来，有的已初见成效。

生物大分子的分离与纯化早已引起国际学术界的极大兴趣。据统计，目前关于蛋白质的 HPLC 分离的论文每年约有 4 000 篇。人们寄希望于用 HPLC 方法分析、制备、纯化和大规模提取感兴趣的蛋白质。一年一度的“国际蛋白质、肽和核酸的高效液相色谱学术报告会”（1990 年是第 10 届）专门讨论与本书相应的内容。一年一度的“国际柱液相色谱学术报告会”（1990 年是第 14 届），“国际制备色谱学术报告会”（1990 年是第 7 届）和 1988 年才召开了第 2 届的“国际制备和大规模液相色谱学术报告会”，都以相当大的比重讨论这个课题。此外，还有许多双边、多边的地区性国际学术会议讨论这一题目。在国内，两年一次的“全国色谱学术报告会”和“全国生物医药液相色谱报告会”，内容也是讨论生物大分子的液相色谱分离与纯化。可见这个题目无论是在国际上还是在国内正方兴未艾。

1.2 分离介质的发展

目前，在高效液相色谱中，盛行的分离介质（或称填料、固定相）主要是孔径为 6—10 纳米的多孔硅胶微粒及其键合相、高分子微球、少量氧化铝基质填料和多孔碳填料。当用于生物大分子分离时，首先遇到的问题就是孔径太小，大分子进不去，达不到分离的目的。像蛋白质、酶和核酸等生物大分子，分子量一般在 1—100 万之间，病毒和质粒的分子量可达上千万。这些庞大的分子在液体中的扩散系数在 10^{-10} — 10^{-11} 米²/秒范围，比普通分子小 1—2 个数量级。按照色谱动力学理论，当粒径和孔径之比

大于 0.2 时，溶质分子的扩散便受到限制，因而不能完全接近固定相表面。随着填料化学的发展，目前已有许多孔径在 30 纳米以上的微粒分离介质能够满足大部分常见生物大分子分离时的要求，有满意的回收率。此外，50, 100，甚至 400 纳米孔径的微粒硅胶，400 纳米孔径的离子交换树脂已有商品供应，这就为具有更大分子量的病毒、质粒和某些核酸大分子的分离提供了可能。当然随着孔径的增大，微粒填料的孔隙度增加，机械强度变差。例如，高孔隙度的特大孔硅胶，就不能承受 40 兆帕以上的高压。为了克服由于孔径扩大带来的麻烦，这几年又出现了 1—3 微米直径的无孔填料（硅胶的和有机聚合物的），能够在数分钟内快速分离蛋白质，在分离速度上类似于高效液相色谱初期的薄壳型填料。

仅仅扩大填料的孔径还没有完全解决问题。随着人们对填料表面化学、蛋白质与固定相表面的相互作用、蛋白质的构象与流动相环境关系的深入研究，认为只有那些充分暴露在生物大分子表面上，又有与固定相表面相适应的间隔的功能团才能发生溶质-硅胶表面之间的相互作用。这种作用应通过非共价键的形式，只产生较小的吸附自由能，即应是一种“软”的可逆吸附过程。希望固定相表面应当是亲水的、均匀的，而且有与大分子溶质相似的功能团结构。表面上过多的疏水基团和电荷密度（如硅胶基质上的残余硅醇基）会引起蛋白质的不可逆吸附，甚至变性。根据这些观点，用于生物大分子分离的大孔硅胶经改性后的表面或者是低疏水性的短链烃基（ C_3, C_4 ，苯基等），或者是环氧基、二醇基、氨基或多胺基等亲水表面，而且从这些活性基团出发，还可以接上离子交换基团和亲和配基，进一步扩展其性能。近几年出现了一些在硅胶表面键合一层聚合物（如聚乙烯亚胺）或包覆一层交联的聚乙二醇的填料，改进了生物大分子与固定相表面的相互作用，这类材料值得进一步发展。

至于分离介质种类的选择，看法是一致的。长期用于生物大分子分离的多糖类凝胶（Sephadex 和 Agarose 系列）与蛋白质有

很好的生物适应性，所得产品有很高的活性回收率，但因是软质胶，只能在低压下使用，对目前人们更感兴趣的快速或中、高压蛋白质色谱意义不大。硅胶的机械强度是理想的，柱效率也高，孔径和形状容易人为控制，仍是目前生物大分子分离介质的一个主要发展方向。但硅胶只能在 pH2—7.5 的范围内稳定。酸度过高，表面键合相易脱落；碱性过大，硅胶本身不稳定。即使表面包覆了一层聚合物，OH⁻离子也可以扩散到聚合物层里边，侵蚀硅胶。生物化学家还常常使用 NaOH 或 6 摩尔/升的尿素溶液清除柱上被强烈吸附的蛋白质等污染物。因而，研究更好的覆盖方法，寻找更好的无机载体是十分有意义的。Unger 曾经预言，未来的高压液相色谱分离介质很可能是无机填料表面包覆了一层有机聚合物的复合体。合成高分子微粒填料（典型的是聚甲基丙烯酸和聚苯乙烯）有良好的化学稳定性，适用于 pH0—14 的范围，但耐压性和柱效率不如硅胶。尽管如此，这种类型的填料在生物大分子分离中的地位愈来愈高。它们的亲水性减少了与蛋白质之间发生非特殊相互作用的机会，这一特点显著优于硅胶。在本书的附录中，我们列出了用于液相色谱分离与纯化生物大分子的分离介质，以供参考。

1.3 分离模式的考虑

在生物技术领域，色谱常被用来从复杂的，有时甚至认为是很脏的原料（例如发酵液）中提取所需要的蛋白质或多肽，这些原料一般经过简单的分离或膜过滤，然后直接引入色谱柱。考虑到固定相和流动相的各种可能的变化，有人认为这些色谱方法的数目有四五十种。但从色谱分离的基本原理上分类，至少有以下几种分离模式在生物大分子的分离和纯化过程中常被采用。

1.3.1 体积排阻色谱

体积排阻色谱（size exclusion chromatography, SEC）是

一种纯粹按照溶质分子在流动相溶剂中的体积大小分离的色谱法。填料具有一定范围的孔尺寸,大分子进不去而先流出色谱柱,小分子后流出。在用水系统作为流动相的情况下,又称为凝胶过滤色谱(GFC)。用于生物大分子分离的传统SEC填料主要是多糖聚合物软胶,只能在低压下作慢速分离用。目前在很大程度上被微粒型交联的亲水凝胶(如交联琼脂糖 Superose 6 和 12),乙烯共聚物(如 TSK-Gel PW)和亲水性键合硅胶(如 Zorbax GF 250 和 450)所取代。随所用填料的孔径大小不同,SEC 能分离的分子量级分范围在 1 万到 200 万之间。对于分析分离或实验室小规模制备,平均粒度在 3—13 微米的规格较适用,有良好的柱效率和分离能力。但对大规模的制备分离和纯化,因要考虑成本和渗透性,可以采用较粗的粒度。体积排阻色谱一般用作原料液的初分离,获取几个分子量级分,供进一步分离纯化使用。

1.3.2 离子交换色谱

蛋白质的离子交换色谱(ion exchange chromatography, IEC)分离已被生物化学家使用许多年了,但至今仍是很受欢迎的一种方法。其原因在于 IEC 的介质材料,以及含盐的缓冲流动相系统都十分类似于蛋白质稳定存在的生理液条件,有利于增加活性回收率。生物大分子和离子交换剂之间相互作用主要是静电作用,导致介质表面的可交换离子与带相同电荷的蛋白质分子发生交换。蛋白质分子表面上的大多数可解离部位并未同填料表面进行离子交换,而是通过盐桥联系在一起。那些没有交换的剩余部位将继续同填料表面发生多重的相互作用。所用的介质其基体主要是亲水共聚物,如苯乙烯-二乙烯基苯共聚物和大孔硅胶。孔径在 3—40 纳米之间。最近 Regnier 等人用多缩甘油醚交联的聚乙烯胺(PEI)包覆微粒硅胶,进一步制成强阴离子交换剂和阳离子交换剂,在蛋白质分离上有一定特色。用于生物大分子分离的商品离子交换剂,以一价离子测定的交换容量差别都不大,故一般更愿意用“蛋白质结合量”来表征。另外,羟

基磷灰石也是一种受到重视并广泛应用的生物大分子分离用的离子交换介质。

1.3.3 反相色谱

反相色谱 (reversed phase chromatography, RPC) 是基于溶质、极性流动相和非极性固定相表面间的疏水效应建立的一种色谱模式。任何一种有机分子的结构中都有非极性的疏水部分, 这部分越大, 一般保留值越高。在高效液相色谱中这是应用面最广的一种分离模式。在生物大分子的反相液相色谱条件下, 流动相多采用酸性的、低离子强度的水溶液, 并加一定比例的能与水互溶的异丙醇、乙腈或甲醇等有机改性剂。大量使用的填料为孔径在 30 纳米以上的硅胶烷基键合相, 除此之外, 也有少量高聚物微球。实验表明, 烷基链长对蛋白质的反相保留没有显著的影响, 但在蛋白质的活性回收上短链烃基 (如 C_4 , C_8 , 苯基) 和长链烷基 (如 C_{18} , C_{22}) 反相填料是有区别的。表现在烷基链越长, 固定相的疏水性越强, 因而为使蛋白质较快洗脱下来, 需要增加流动相的有机成分。过强的疏水性和过多的有机溶剂会导致蛋白质的不可逆吸附和生物活性的损失。总起来说, 在烷基键合硅胶上的反相色谱, 由于其柱效高、分离度好、保留机制清楚, 是蛋白质的分离、分析、纯化和结构阐明广泛使用的一种方法。近年来在农业和食品科学领域又有一些新的应用。

1.3.4 疏水作用色谱

疏水作用色谱 (hydrophobic interaction chromatography, HIC) 的原理与反相色谱相同, 区别在于 HIC 填料表面疏水性没有 RPC 强。所用填料同样分有机聚合物 (交联琼脂糖 Superose 12, TSK-PW, 乙烯聚合物等) 和大孔硅胶键合相两类。疏水配基一般是低密度分布在填料表面上的苯基、戊基、丁基、丙基、羟丙基、甲基或乙基, 也有的是在硅胶表面键合聚乙二醇。流动相一般为 pH6—8 的盐水溶液 [如 $(NH_4)_2SO_4$]。作降浓梯度

淋洗，在高盐浓度条件下，蛋白质与固定相疏水缔合，浓度降低时，疏水作用减弱，逐步被洗脱下来。和普通反相液相色谱相比，这种表面带低密度疏水基团的填料对蛋白质的回收率高，蛋白质变性可能性小。由于流动相中不使用有机溶剂，也有利于蛋白质保持固有的活性。

1.3.5 亲合色谱

亲合色谱 (affinity chromatography) 是利用生物大分子和固定相表面存在某种特异性吸附而进行选择分离的一种生物大分子分离方法。通常是在载体 (无机或有机填料) 表面先键合一种具有一般反应性能的所谓间隔臂 (如环氧、联氨等)，随后再连接上配基 (如酶、抗原或激素等)。这种固载化的配基将只能和与其有生物特性吸附的生物大分子相互作用而被保留，没有这种作用的分子不被保留而先流出色谱柱。此后改变流动相条件 (如 pH 值或组成)，将保留在柱上的大分子以纯品形态洗脱下来。例如，若在间隔臂链段上分别反应上抗原、蛋白质 A 或磷脂酰胆碱，便可分离和回收到相应的抗体、免疫球蛋白或膜蛋白。亲和色谱选择性强、纯化效率高，实际上也可以认为是一种选择性过滤，往往可以一步法获得纯品。

生物来源的原料液和生物大分子下游产品常常需要多步纯化才能达到要求，采用的策略随分离对象而异。但就以上介绍的这 5 种最基本的分离模式而论，体积排阻、离子交换和疏水作用色谱一般安排在反相色谱或亲合色谱之前，是显而易见的。

1.4 分离规模的扩大

随着液相色谱分离制备规模的扩大，除了被分离生物大分子的纯度和活性之外，产率 (或产量) 和成本也是必须考虑的两个主要指标。

在线性色谱条件下，分离度 (R)、柱效率 (N)、容量因子 (k')