

第一章 生物化学实验的基本要求

第一节 实验的准确性

生物化学实验是以活的生命体为对象，对生物体内存在的主要大分子物质，如糖、脂肪、蛋白质、核酸、酶等进行定性或定量的分析测定。定性分析是确定存在物质的种类，或粗略计算物质所占的比例；而定量分析则需要确定物质的精确含量。因此分析工作者要根据实验要求对实验结果进行分析和总结，要善于分析和判断结果的准确性，认真查找可能出现误差的原因，并进一步研究减少误差的办法，以不断提高所得结果的准确度。

一般在实验测量过程中都会有误差产生，但在懂得这些误差的可能来源的前提下，多数的误差是可以通过适当的处理来校正的。

产生误差的原因很多，一般根据误差的性质和来源可把误差分为两类，即系统误差和偶然误差。

一、系统误差

系统误差是指在测量过程中某些经常发生的原因所造成的误差。它对分析结果的影响比较稳定，常在重复实验时重复出现，使测定结果系统偏高或偏低。

1. 系统误差的来源

方法误差：如用滤纸称量易潮解的药品；做生物实验特别是酶的实验时没有考虑温度的影响等。

仪器误差：如量取液体时，按烧杯的指示线量取液体往往准确度降低，需要用量筒量取；在配置标准溶液时量筒同样不够精确，要选用等体积的容量瓶定容至刻度线；不同的天平其精度差别很大，如果需要称量 100 g 以上的物体，使用托盘天平即可，但如称量 1 g 的样品，选用扭力天平比较方便，称量 10 mg 以内的样品则必须使用感量为万分之一克的分析天平或电子天平称取。

试剂误差：如试剂不纯或蒸馏水不合格，引入微量元素或对测定有干扰的杂质，就会造成一定的误差。

操作误差：如在使用移液管量取液体时，由于每人的操作手法不同，可能会存在一定的操作误差。特别是在读数据时，目光是否平视，视线与液体弯月面是否相切，都可成为生化实验中造成较大误差的主要原因。

2. 系统误差的校正

仪器校正：在实验前对使用的砝码、容量皿或其他仪器进行校正，对 pH 计、电接点温度计等测量仪器进行标定，以减少误差。

空白试验：在任何测量实验中都应包括有对照的空白实验。用同体积的蒸馏水或样品中的缓冲液代替待测溶液，并严格按照待测液和标准液那样的方法处理，即得到所谓

的空白溶液。在最后计算时，应从实验测得的结果中扣除从空白溶液中得到的数值，即可得到比较准确的结果。

二、偶然误差

由于难以察觉的原因或由于个人一时辨别差异，或是某些不易控制的外界因素而引起的误差称为偶然误差。一般生物类实验的影响因素是多方面的。常常由于某些条件，如温度、光照、气流、反应时间、反应体系的微小变化都会引起较大的误差。特别是某些因素的作用机理目前仍不十分清楚，所以有些实验结果重现性较差。

偶然误差初看起来似乎没有规律性，但经过多次实验，便可发现偶然误差的分布有以下规律。一是正误差和负误差出现的几率相等；二是小误差出现的频率高，而大误差出现的频率较低。因此解决偶然误差主要可通过进行多次平行实验，然后取其平均值来弥补。测试的次数越多，偶然误差的几率就越小。

三、操作错误

除了上述两种误差外，往往还有由于操作不认真，观察不仔细，没有按操作规程去操作等引起的操作错误。这对于初做生物化学实验的工作者来说是经常发生的。如加错试剂、在配制标准溶液时固体溶质未被溶解就用容量瓶定容、在称量样品时未关升降钮就加砝码、在做电泳时点样端位置放错、在做抽滤实验时应留滤液却误留滤渣、在作图时坐标轴取反以及记录和计算上的错误等。这些失误会对分析结果产生极大的影响，致使整个实验失败。所以在实验中一定要避免操作错误，培养严谨和一丝不苟的科学实验作风，养成良好的实验习惯，减少失误的发生。

此外，在实际工作中要根据实验目的，设计好切实可行的实验方案，并根据实际需要的准确度来选择测试手段（仪器及方法），如在做定性实验时，称量及配置试剂可相对粗些，可选择台秤及量筒来称重、量取，而在做定量实验时，则必须使用分析天平及容量瓶来称量、定容，以确保实验数据真实可靠。

第二节 实验记录及报告

如前所述，由于生物化学实验的对象是生命体或是生物活性物质，在实验中很容易受外界环境条件的影响，而引起实验结果的差异。因此，在实验记录和写实验报告时，需要实验者做到仔细、认真、实事求是，只有这样才能获得真实可靠的实验结果。

一、实验记录

在实验课前应认真预习，初步了解实验目的、实验原理，对操作方法及步骤要做到心中有数。最好写一个预习提纲，将实验步骤简要的写出来。

在实验中要对观察到的结果及数据及时记录。记录时要准确、客观，切忌夹杂主观因素，例如在做一些颜色反应实验时，要根据实验中出现的真实颜色记录，真实的实验记录才是今后结果分析的可靠依据，因此切勿根据课本中已经了解的可能出现的现象做虚假记录。实验中配制溶液的过程、加样的体积、使用仪器的类型以及试剂的规格、浓度都应该记录清

楚，以便在总结实验时，查找实验失败的原因。另外，实验时的环境条件（如温度、湿度、光度等）及反应时间也要认真记录，详细的记录才能成为今后实验的参考数据。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验数据，写出实验报告。一份好的实验报告应包括以下内容。

1. 标题

标题应包括实验时间、实验地点、实验组号、实验者姓名、实验室条件（如温度、湿度）等。

2. 实验名称、实验目的

3. 实验原理

应简明扼要地阐述实验的理论指导，使未做过实验的人看后对该实验有一个初步的了解。

4. 材料和仪器

对实验材料要写明其来源及规格、浓度、配制方法和配制人。对实验仪器要写明其生产厂家、型号、生产序号等常用指标。

5. 操作方法

要描述自己的操作过程及方法，不能完全照抄实验指导书，可简明扼要地把实验步骤一步步写出，也可用工艺流程图或表格形式按照先后顺序表示。实验步骤一定要写得准确明白，以便他人能够重复验证。

6. 实验结果

将实验中的现象、数据进行整理、分析，得出相应的结论。在生物化学实验中最常用的多以图表法来表示实验结果，这样可使实验结果清楚了。特别在生化实验中通过对标准样品的一系列分析测定，制作图表或绘制标准曲线等，可为以后待测样品的分析提供方便的条件。如通过实验值在图表中直接查出结果。现将常用方法介绍如下。

列表法：通常将实验所得的各种数据列出表格。通常在表格的第一行和第一列标出数据的名称或单位，其余行列内只填数字。有的表格在中间或末端的一行内还要填上反应条件如“水浴中加热 5 min’等。

作图法：实验所得的一系列数据之间的关系及变化情况，常常可用图线表示，这样可直观地分析实验数据。图表法比较适用于实验数据较多的情况，但不易清楚地表示数据间的情况。如生化实验中用比色法测定未知样品浓度时，常常采用绘制已知标准样品浓度的工作曲线，然后在同样工作条件下测定未知样品，用所得的数据从标准工作曲线中查出未知样品的浓度。作图时，首先要在坐标纸上标出坐标轴，标明轴的名称和单位，然后在横轴和纵轴上——找出实验交叉点，用“×”或“·”标注上，再用直线或平滑线将各点连接起来。图线不一定经过所有实验数据点，但要求线必须尽量通过或靠近大多数数据点。个别偏离过大的点应舍弃，或重复试验进行校正。此外在图上还应标明标题，以防单纯看图的人对此图不知所云。

7. 讨论

讨论部分是对整个实验过程、实验结果的总结、分析。对得到的正常结果和出现的异

常现象以及教师提出的思考题的探讨、研究。也可对实验设计、实验方法提出合理的改进性意见，以便教师今后能更好地安排实验。

第三节 实验样品的制备

生物化学所用的材料通常由动物、植物和微生物提供，其中包括蛋白质、酶、核酸等高分子化合物。但由于得到的样品往往是多种物质的混合物，因此首先要对其进行处理。

动物的脏器

1 冰冻

刚宰杀牲畜的脏器要剥去脂肪和筋皮等结缔组织，若不马上进行抽提，应置 -10°C 冰箱短期保存，或 -70°C 低温冰箱储存。

2. 脱脂

脏器原料中常含有较多的脂肪，会严重影响纯化操作和制品的收率。一般脱脂的方法是人工剥去脂肪组织；浸泡在脂溶性有机溶剂（丙酮、乙醚）中；采用快速加热（ 50°C ）、快速冷却方法，使融化的油滴冷却凝成油块而被除去；也可利用索氏提取器使油脂与水溶液分离。

二、微生物

由于微生物细胞具有繁殖快，种类多，培养方便等优点，因此它已成为制备生物大分子物质的主要宿主。用培养一段时间后的微生物菌种，离心收集上清液，浓缩后即可制备胞外有效成分。若将菌体破碎后亦可提取胞内有效成分。如培养液不立即使用，可置 4°C 低温保存一周左右。

三、细胞

细胞是生物体结构的基本单位。细胞除具有细胞膜、细胞质、细胞核外，还有线粒体，质体等细胞器。通常人们提取的物质主要分布在细胞内，所以在提取这类物质时，首先必须破碎细胞。

破碎细胞的方法主要有以下几种。

1. 研磨法

将动植物组织剪碎，放入研钵中，加入一定量的缓冲液，用研杵用力挤压、研磨。为了提高研磨效果，可加少量石英砂或海砂来助研，直到把组织研成较细的浆液为止。此法作用温和，适用于植物和微生物细胞，适宜实验室操作。

2. 组织捣碎机法

该方法主要适用于破碎动物组织，作用比较剧烈。一般首先把组织切碎置于捣碎机中于 $8\,000\sim 10\,000\text{ r/min}$ 下处理 $30\sim 60\text{ s}$ ，即可将细胞完全破碎。但如提取酶液和核酸时，必须保持低温，并且捣碎时间不宜太长，以防有效成分变性。

3. 超声波法

超声波是频率高于 $2\,000\text{ Hz}$ 的波，由于其能量集中而强度大，振动剧烈，因而可破

坏细胞器。用该法处理微生物细胞较为有效。

4. 冻融法

将细胞置低温下冰冻一段时间，然后在室温下（或 40℃ 左右）迅速融化，如此反复冻融几次，细胞可形成冰粒或在增高剩余胞液盐浓度的同时，发生融胀、破溶。

5. 化学处理法

用脂溶性溶剂如丙酮、氯仿和甲苯等处理细胞时，可把细胞膜溶解，进而破坏整个细胞。

6. 酶法

溶菌酶具有降解细胞壁的功能，利用这一性能处理微生物细胞，可将细胞破碎。

第二章 常见的实验方法及基本原理

第一节 透 析

透析是一种膜分离方法。透析膜为半透膜，允许小分子物质透过，而截留蛋白质等大分子物质，因此，透析可用于蛋白质等生物大分子溶液的脱盐或缓冲液交换，是一种实验室分离纯化蛋白质等生物大分子的常用方法。

透析的一般操作过程见图 2-1。将待分离的样品放进用半透膜制成的透析袋中，透析袋的两端打上结，并浸没于水或低离子强度的缓冲液（透析液）中，轻轻搅拌。在此过程中，小分子溶质在浓度差的作用下从透析袋逐渐扩散进入外部的透析液，而外部透析液中的缓冲液组分也可扩散进入透析袋，从而达到除去样品中小分子溶质或样品缓冲液交换的目的。

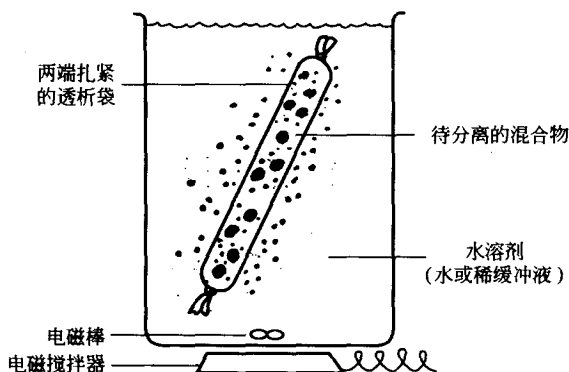


图 2-1 透析操作示意图

透析膜通常用玻璃纸、火棉胶、纤维素和聚丙烯腈等亲水性材料制成，具有一定的孔径，允许相对分子质量较小的物质通过，而截留相对分子质量较大的蛋白质和其他分子，将它们保留在膜内。透析膜的孔径通常用“截流相对分子质量”（或截留分子量）表示。“截流相对分子质量”是用假定的平均球蛋白的大小为基础标定的，是个标称量。如果待分离物质（如蛋白质）是线状的，那么即使其相对分子质量大于膜的截流相对分子质量，也可能透过透析膜。因此，在透析操作时最好选择截留相对分子质量远小于待保留物质相对分子质量的透析膜。

透析操作的一个重要指标是透析率，即小分子溶质的去除率。透析率取决于若干因素，如样品的浓度、溶质的相对分子质量、样品和透析液的体积、透析时间等。无机盐等小分子溶质的扩散系数大，透析速度快。较频繁地更换透析液，使样品与透析液间保持较大的浓度差，可提高透析速度，缩短透析时间。

在透析过程中，由于膜内外存在浓度差（渗透压），透析液中的水进入膜内，使样品体

积增大。因此初始样品量应装添至透析袋体积的一半，另一半是空的，并且不含空气。如果不留出样品体积膨胀所需要的空间，袋内压力就会不断升高，最终导致透析膜涨破或使膜孔变形，造成透析袋中的蛋白质等大分子物质流失。另外，透析操作的时间一般较长，最好在低温下进行，以防待分离的生物活性物质变性失活或发生微生物污染。透析速度是与温度相关的，因此为了加快透析的速度，可用磁力搅拌器搅拌并且频繁更换透析液。

第二节 沉 淀

沉淀是因环境的变化引起溶质的溶解度降低、生成固体凝聚物的现象。与结晶相比，沉淀是不定形的固体颗粒，构成成分复杂，除含有目标分子外，还夹杂共存的杂质、盐和溶剂。因此，沉淀法是一种初级分离技术。但多步沉淀操作也可制备高纯度的目标产品。

利用沉淀原理分离蛋白质是传统的分离技术之一，目前广泛应用于实验室和工业规模蛋白质等生物产物的回收、浓缩和纯化。本节根据蛋白质的特性及其沉淀原理简单介绍几种常见的沉淀方法。

一、蛋白质的特性

蛋白质是两性高分子电解质，主要由疏水性各不相同的 20 种氨基酸组成。在水溶液中，多肽链中的疏水性氨基酸残基具有向内部折叠的趋势，使亲水性氨基酸残基分布在蛋白质立体结构的外表面。即使如此，一般仍有部分疏水性氨基酸残基暴露在外表面，形成疏水区。疏水性氨基酸含量高的蛋白质的疏水区大，疏水性强。因此，蛋白质表面由不均匀分布的荷电基团形成的荷电区、亲水区和疏水区构成。

蛋白质的相对分子质量在 $6 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 之间，分子直径约 $1 \sim 30$ nm。因此，蛋白质的水溶液呈胶体性质，在蛋白质分子周围存在与蛋白质分子紧密或疏松结合的水化层，它是蛋白质形成稳定的胶体溶液，防止蛋白质凝聚和沉淀的屏障之一。

蛋白质沉淀的另一屏障是蛋白质分子间的静电排斥作用。偏离等电点的蛋白质的净电荷或正或负，成为带电粒子，在电解质溶液中吸引相反电荷的离子（简称反离子）。由于离子的热运动，该反离子层并非全部整齐地排列在一个面上，而是距表面由高到低有一定的浓度分布，形成分散双电层。当双电层的电位足够大时，静电排斥作用抵御分子间的相互吸引作用（分子间力），使蛋白质溶液处于稳定状态。

因此，可通过降低蛋白质周围的水化层和双电层厚度来降低蛋白质在溶液中的稳定性，实现蛋白质的沉淀。水化层厚度和电位与溶液性质（如电解质的种类、浓度、pH 值等）密切相关，所以，蛋白质的沉淀可采用恒温条件下添加各种不同试剂的方法，如加入无机盐的盐析法，加入酸碱调节溶液 pH 值的等电点沉淀法，加入水溶性有机溶剂的有机溶剂沉淀法等来实现。

二、常见的蛋白质沉淀方法

（一）盐析沉淀

1. 原理

在水溶液中，蛋白质的溶解度一般在生理离子强度范围内（ $0.15 \sim 0.2$ mol/kg）最

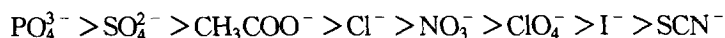
大，而低于或高于此范围时溶解度均降低。蛋白质在高离子强度的溶液中溶解度降低，发生沉淀的现象称为盐析。

目前电解质影响蛋白质溶解度的机理尚不十分清楚，存在不同的理论解释。但一般认为，向蛋白质的水溶液中逐渐加入电解质时，开始阶段蛋白质的活度系数降低，并且蛋白质吸附盐离子后，带电表层使蛋白质分子间相互排斥，但蛋白质分子与水分子间的相互作用却加强，因而使蛋白质的溶解度增大，出现盐溶现象。随着离子强度的增大，蛋白质表面的双电层厚度降低，静电排斥作用减弱；同时，由于盐离子的水化作用使蛋白质表面疏水区附近的水化层脱离蛋白质，暴露出疏水区域，从而增大了蛋白质表面疏水区之间的疏水相互作用，容易发生凝集，进而沉淀。所以，一般在蛋白质的溶解度与离子强度的关系曲线上存在最大值，该最大值在较低的离子强度下出现，在高于此离子强度的范围内，溶解度随离子强度的增大迅速降低。

2. 影响沉淀的主要因素

(1) 无机盐

在相同的离子强度下，不同种类的盐对蛋白质的盐析效果不同。离子半径小而带电荷较多的阴离子的盐析效果较好。例如，含高价阴离子的盐比低价盐的盐析效果好，即盐析常数大。常见阴离子的盐析作用顺序为：



阳离子的盐析作用的顺序为：



在选择盐析的无机盐时，除考虑上述各种离子的盐析效果外，对盐还有如下要求：

溶解度大，能配制高离子强度的盐溶液；

溶解度受温度影响较小；

盐溶液密度不高，以便蛋白质沉淀的沉降或离心分离。

硫酸铵价格便宜、溶解度大且受温度影响很小、具有稳定蛋白质（酶）的作用，因此是最普遍使用的盐析盐。但硫酸铵有如下缺点：硫酸铵为强酸弱碱盐，水解后使溶液 pH 值降低，在高 pH 值下释放氨；硫酸铵的腐蚀性强，后处理困难；残留在食品中的少量的硫酸铵可被人味觉感知，影响食品风味；临床医疗有毒性，因此在最终产品中必须完全除去。除硫酸铵外，硫酸钠和氯化钠也常用于盐析。硫酸钠在 40℃ 以下溶解度较低，主要用于热稳定性高的胞外蛋白质的盐析。

(2) 温度和 pH 值

除盐的种类外，盐析操作的温度和 pH 值是获得理想盐析沉淀分级的重要参数。一般物质的溶解度随温度的升高而增大，但在高离子强度溶液中，升高温度有利于某些蛋白质的失水，因而温度升高，蛋白质的溶解度下降。但是，必须指出，这种现象只在离子强度较高时才出现。在低离子强度溶液或纯水中，蛋白质的溶解度在一定温度范围内一般随温度升高而增大。

在 pH 值接近蛋白质等电点的溶液中蛋白质的溶解度最小，所以调节溶液 pH 值在等电点附近有利于提高盐析效果。

因此，蛋白质的盐析沉淀操作需选择合适的 pH 值和温度，使蛋白质的溶解度较小。同时，盐析操作条件要温和，不能引起目标蛋白质的变性。所以，盐析和后续的其他沉淀法一样，需在较低温度下进行，但不像有机溶剂沉淀法那样要求严格。

盐析法的具体操作参见第四章综合实验四。

（二）等电点沉淀

蛋白质在 pH 值为其等电点的溶液中净电荷为零，蛋白质之间静电排斥力最小，溶解度最低。利用蛋白质的这一性质进行沉淀分级的方法称为等电点沉淀法。

在上述的盐析沉淀中，一般也要结合等电点沉淀的原理，使盐析操作在等电点附近进行，降低蛋白质的溶解度。但是，利用中性盐进行盐析时，使蛋白质溶解度最低的溶液 pH 值一般略小于蛋白质的等电点。

等电点沉淀的操作条件是低离子强度； $\text{pH} \approx \text{pI}$ 。因此，等电点沉淀操作需在低离子强度下调整溶液 pH 值至等电点，或在等电点的 pH 值时利用透析等方法降低离子强度，使蛋白质沉淀。由于一般蛋白质的等电点多在偏酸性范围内，故等电点沉淀操作中，多通过加入无机酸（如盐酸、磷酸和硫酸等）调节 pH 值。

等电点沉淀法一般适用于疏水性较大的蛋白质（如酪蛋白），而对于亲水性很强的蛋白质（如明胶），由于在水中溶解度较大，在等电点的 pH 值下不易产生沉淀。所以，等电点沉淀法不如盐析沉淀法应用广泛。但该方法仍不失为有效的蛋白质初级分离手段。例如，从猪胰脏中提取胰蛋白酶原（ $\text{pI} = 8.9$ ）时，可先于 pH3.0 左右进行等电点沉淀，除去共存的许多酸性蛋白质（ $\text{pI} = 3.0$ ）。

与盐析法相比，等电点沉淀的优点是无需后继的脱盐操作。但是，如果沉淀操作的 pH 值过低，容易引起目标蛋白质的变性。

具体操作参见第三章实验十。

（三）有机溶剂沉淀

向蛋白质溶液中加入丙酮或乙醇等水溶性有机溶剂，水的活度降低。随着有机溶剂浓度的增大，水对蛋白质分子表面电荷基团或亲水基团的水化程度降低，溶液的介电常数下降，蛋白质分子间的静电引力增大，从而凝聚和沉淀。同等电点沉淀一样，有机溶剂沉淀也是利用同种分子间的相互作用。因此，在低离子强度和等电点附近，沉淀易于生成，或者说所需有机溶剂的量较少。一般来说，蛋白质的相对分子质量越大，有机溶剂沉淀越容易，所需加入的有机溶剂量也越少。

有机溶剂沉淀法的优点是有机溶剂密度较低，易于沉淀分离；与盐析法相比，沉淀产品不需脱盐处理。但该方法容易引起蛋白质变性，必须在低温下进行。另外，应用有机溶剂沉淀时，所选择的有机溶剂应为与水互溶、不与蛋白质发生作用的物质。常用的有丙酮和乙醇。

具体操作参见第三章实验十。

（四）热沉淀

在较高温度下，热稳定性差的蛋白质将发生变性沉淀。利用这一现象，可根据蛋白质间的热稳定性的差别进行蛋白质的热沉淀，分离纯化热稳定性高的目标产物。

必须指出，热沉淀是一种变性分离法，带有一定的冒险性，使用时需对目标产物和共存杂蛋白的热稳定性有充分的了解。

(五)其他沉淀

非离子型聚合物、聚电解质和某些高价金属离子也可作为蛋白质的沉淀剂。例如，非离子型聚合物聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）是蛋白质稳定剂，也可促进蛋白质的沉淀。其作用机理尚不清楚，其一认为与有机溶剂的作用相似，即降低蛋白质的水化度，增大蛋白质间的静电引力而使蛋白质沉淀；其二认为是 PEG 的空间排斥作用使蛋白质被迫挤靠在一起而引起沉淀。

聚电解质对蛋白质的沉淀作用机理与絮凝作用类似，是在蛋白质间起架桥作用。同时，聚电解质还兼有盐析和降低水化程度的作用。利用聚电解质的沉淀方法主要应用于酶和食用蛋白的回收，常用于回收食品蛋白的聚电解质有酸性多糖和羧甲基纤维素、海藻酸盐、果胶酸盐和卡拉胶等。

某些金属离子可与蛋白质分子上的某些残基发生相互作用而使蛋白质沉淀。例如， Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 能与羧基结合， Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 能与羧基、含氮化合物（如胺）以及杂环化合物结合。金属离子沉淀法的优点是可使浓度很低的蛋白质沉淀，沉淀产物中的重金属离子可用离子交换树脂或螯合剂除去。

第三节 层析

一、层析原理

层析法也叫色谱法（chromatography），是一种以两相间分配或吸附平衡为机理的物理化学分离和分析方法。层析系统包括两相，即固定相（固相或液相）和流动相（液相或气相）。当流动相流过加有样品的固定相时，由于样品中各组分在理化性质上的微小差别，所受固定相的阻滞作用和受流动相推动作用的影响各不相同，因而各组分在固定相与流动相之间的分配也不相同，从而使混合组分以不同速度移动而达到彼此分离的目的。与一般化学方法相比，层析法对于许多化学性质相同或相似，很难用萃取、蒸馏等技术分离的复杂混合物，以及相似化合物的异构体、同系物的分离有特效。层析法具有分离速度快、精确性高、适用范围广、设备简单、操作方便等特点，因此在生化、化工、医药卫生、食品、环境保护等领域得到了广泛的应用。

层析法从发明至今已有一个世纪的历史。1903 年俄国科学家 Tswett 首先使用层析法分离植物色素，他向填充碳酸钙的柱中加入植物色素的萃取液，接着用石油醚淋洗，发现柱内有数条相互分离的连续色带产生，于是将这种连续色带称为色层或色谱，用 chroma（色彩）和 graphs（图谱）构成色谱一词，层析法由此而得名，层析技术也逐渐被广泛应用于各种有机、无机化合物的分析与分离。层析法目前已发展成许多类型，随着计算机、光谱技术的广泛应用，层析使用的仪器也由最简单的自制组合装置发展成各种现代化、全自动并带数据处理系统的层析仪，并具有更高的灵敏度和精确性。由于层析技术可同时实现物质分离和分析，因此这种方法已成为纯化和鉴定化合物的一种重要手段。

层析法有若干种类，如气相色谱、液相色谱、柱状层析、开床式滤纸层析、薄层层析以及分配、吸附、离子交换、凝胶过滤层析等。各种层析的原理和特性见表 2-1。

表 2-1 各种层析法的原理和特性

名 称	原 理	床形式	固定相	流动相	载 体
吸附层析	疏水力和静电引力	柱状	固体	液体	硅胶、氧化铝、疏水性吸附剂
分配层析	溶解度	柱状	液体	液体	纤维素、硅藻土、硅胶
离子交换层析	离子间亲和力	柱状	固体	液体	交换树脂
亲和层析	亲和力	柱状	固体	液体	键合配基的葡聚糖和琼脂糖
凝胶层析	尺寸排阻效应	柱状	液体	液体	交联葡聚糖、交联琼脂糖
聚焦层析	电荷效应及离子间亲和力	柱状	固体	液体	多缓冲离子交换剂
高效液相层析	随固定相基质的变化而变化	柱状	固体	液体	吸附剂、离子交换剂、亲和吸附剂
气相层析	疏水力和静电引力	柱状	固体	气体	吸附剂或有机溶剂液膜
纸层析	溶解度	滤纸	液体	液体	滤纸

二、几种常见的层析法

(一) 吸附层析

待分离混合物中的溶质随流动相经过由吸附剂组成的固定相时，由于吸附剂对不同溶质的吸附力不同，混合物中的溶质在固定相上发生不同程度的吸附，使各溶质以不同的速度随流动相移动，从而达到分离的目的。在柱层析中，层析柱内装填适当的吸附剂，将混合物加到层析柱上端后以一定的流速通入适当的洗脱剂（流动相）。洗脱剂向下流动的过程中，混合物中的各个溶质由于在固定相上的吸附平衡行为不同，具有不同的移动速度，随着洗脱时间的推移而逐渐分开，最后以彼此分离的层析带出现在层析柱出口，通过检测器可检测到各层析带的浓度分布曲线（层析峰）。吸附作用小的物质移动速度快，洗脱时间短；吸附作用强的物质移动速度慢，洗脱时间长。吸附作用的强弱主要与吸附剂和被吸附物质的性质有关。在吸附层析中固定相主要是颗粒状的吸附剂，在吸附剂表面存在着许多随机分布的吸附位点，这些位点通过范德华力、静电引力、疏水作用和配位键等作用力与溶质分子结合。

吸附层析的关键是吸附剂（固定相）和洗脱剂（流动相）的选择。吸附剂应具有表面积大、颗粒均匀、吸附选择性好、稳定性高、成本低等性能。普通吸附剂根据吸附能力的强弱可分三类。

弱吸附剂：如蔗糖、淀粉等。

中等吸附剂：如碳酸钙、磷酸钙、熟石灰、硅胶等。

强吸附剂：如氧化铝、活性炭、硅藻土等。

根据相似相溶原理，极性强的吸附剂易吸附极性强的物质，非极性吸附剂易吸附非极性的物质。但为了便于解吸附，对于极性强的物质通常选用极性弱的吸附剂进行吸附。对于一定的待分离系统，需通过实验确定合适的吸附剂。

洗脱剂应具备粘度小、纯度高、不与吸附剂或吸附物起化学反应，易与目标分子分离等特点。洗脱剂的洗脱能力与介电常数有关，介电常数越大，其洗脱能力也越大。对于上述吸附剂，常用的洗脱剂介电常数的大小依次为：

乙烷 > 苯 > 乙醚 > 氯仿 > 乙酸乙酯 > 丙酮 > 乙醇 > 甲醇

除上述吸附剂外，蛋白质的吸附分离常用疏水性吸附剂和亲和吸附剂。

疏水性吸附表面键合有弱疏水性基团（例如，琼脂糖凝胶表面键合苯基、辛基和丁基等）。疏水性吸附层析是根据蛋白质与疏水性吸附剂之间的弱疏水性相互作用的差别进行蛋白质类生物大分子分离纯化的层析法。亲水性蛋白质表面均含有一定量的疏水性基团，疏水性氨基酸（如酪氨酸、苯丙氨酸等）含量较多的蛋白质疏水性基团多，疏水性也大。尽管在水溶液中蛋白质具有将疏水性基团折叠在分子内部而表面显露极性和电荷基团的作用，但总有一些疏水性基团或极性基团的疏水部位暴露在蛋白质表面。这部分表面疏水基团可与亲水性固定相表面偶联的短链烷基、苯基等弱疏水基发生疏水性相互作用，被疏水性吸附剂所吸附。根据蛋白质盐析沉淀原理，在离子强度较高的盐溶液中，蛋白质表面疏水部位的水化层被破坏，裸露出疏水部位，疏水性相互作用增大。所以，蛋白质在疏水性吸附剂上的吸附平衡系数随流动相盐浓度（离子强度）的提高而增大。因此，蛋白质的疏水性吸附需在高浓度盐溶液中进行，洗脱则主要采用线性（或逐次）降低流动相离子强度的梯度洗脱法。

亲和层析利用键合亲和配基的亲和吸附剂为固定相。常用的亲和配基有抗体、酶抑制剂和植物凝聚素等，它们可分别选择性吸附该抗体的抗原、酶和糖蛋白。亲和吸附具有高度的选择性，因此，亲和层析是一种分辨率最好的吸附层析法。亲和层析一般采用线性梯度洗脱或逐次洗脱法，洗脱剂需根据具体的亲和吸附系统（配基和蛋白质）来确定。

（二）分配层析

分配层析是以惰性支持物如滤纸、纤维素、硅胶等材料结合的液体为固定相，以沿着支持物移动的有机溶剂为流动相构成的层析系统。分配层析根据溶质在不同溶剂系统中分配系数的不同而使物质分离的一种方法。分配系数是指一种溶质在两种互不相溶的溶剂系统中达到分配平衡时，该溶质在两相（固定相和流动相）中的浓度比，用 K 表示：

$$K = \frac{\text{物质在固定相中的浓度}}{\text{物质在流动相中的浓度}} \quad (2.1)$$

在分配层析中应用最广泛的是纸上分配层析，下面对纸层析做简单介绍。

1944 年，生物化学家以滤纸为惰性支持物，以茚三酮为显色剂，建立了微量而简便的分离蛋白质水解液中氨基酸的方法。后来发现糖类、核苷酸、甾体激素、维生素、抗生素等物质也都能用纸层析法进行分离。目前，纸层析法已成为一种常用的生化分离分析方法。图 2-2 为纸层析装置示意图。装置主要由层析缸、滤纸和展开剂组成。

滤纸是理想的支持介质，滤纸纤维中的羟基具有亲水性，和水以氢键相连，能吸附

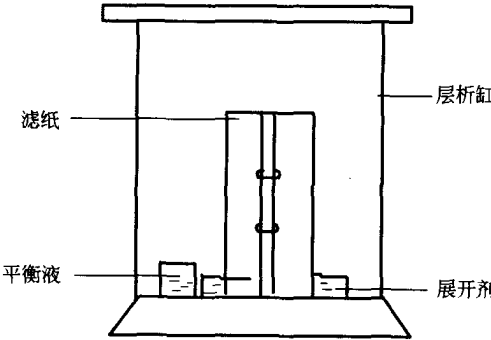


图 2-2 纸层析装置示意图

22%左右的水，而滤纸纤维与有机溶剂的亲合力较弱，因此滤纸上吸附的水可作为固定相。在层析过程中通过毛细作用沿着滤纸流动的有机溶剂（流动相）流过层析点时，层析点的溶质就在水相和有机相之间进行分配，一部分溶质离开原点随有机相移动而进入无溶质区域，另一部分溶质从有机相进入水相。当有机相不断流动时，溶质也就不断进行分配。溶质在有机相中溶解度越大，则在纸上随流动相移动速度越快。溶质在纸上的移动速率可用迁移率 R_f 值来表示：

$$R_f = \frac{\text{原点到处析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}} \quad (2.2)$$

R_f 值主要决定于被分离物质在两相间的分配系数。在同一条件下 R_f 值是一个常数，不同物质的 R_f 值不同，这一性质可作为混合物分离鉴定的依据。 R_f 值受分离物的结构、流动相组成、pH 值、温度、滤纸性质等多种因素的影响。

纸层析的具体操作参见第三章实验四。

（三）薄层层析

薄层层析是以均匀涂布于玻璃板上的薄层基质为固定相，以液体为流动相的一种层析技术。由于层析在薄板上进行，故叫薄层层析。薄层层析可根据固定相的种类不同分为吸附薄层层析、离子交换薄层层析和凝胶过滤薄层层析，各层析原理分别与吸附柱层析、分配层析、离子交换层析相同。薄层层析具有操作方便、设备简单、展层时间短、温度变化和溶剂饱和度影响小、灵敏度高优点，适用于微量样品分析（小到 0.01 mg）。它不仅可用腐蚀性显色剂显色，还可利用在支持物中加荧光染料进行鉴别。目前，薄层层析已在生物化学、医药卫生、化工、农药生产等领域得到了广泛应用，日益成为一种常用的生化分析方法。图 2-3 为薄层层析实验装置图。

薄层层析的操作步骤有：制板、点样、展开、显色、 R_f 值测定和结果分析等。下面以硅胶为吸附剂的薄层层析为例来说明其操作过程。

1. 样板的制备

将固定支持物均匀地涂布在玻璃板上，形成薄层，此过程为制板。使用的玻璃板必须光滑，并用洗液洗净（如有油渍，可用 95% 乙醇擦洗干净）。可采用 6 cm ×

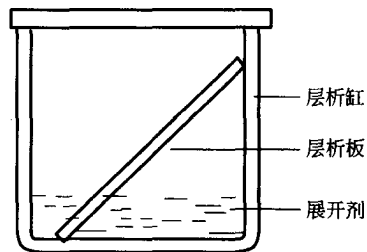


图 2-3 薄层层析装置示意图

20 cm 或 4 cm × 20 cm 的长方形玻璃板，以及 20 cm × 20 cm 或 10 cm × 10 cm 的正方形玻璃板。制板方法有两种：一种不加胶黏剂，将吸附剂直接涂到玻璃板上，称为软板；另一种是加胶黏剂，将吸附剂调成糊状涂板并干燥后使用，称为硬板。具体方法为：称取一定量硅胶，加 2~3 倍体积的水，在研钵中充分研磨至光洁呈凝胶状，立即倒在玻璃板上，用下列方法涂布。

（1）玻璃棒涂布法：在一根玻璃棒的两端绕几圈胶布，将玻璃棒压在玻璃板上，将支持物向一个方向推动，即可涂为薄层（图 2-4）。

（2）有机玻璃尺涂布法：在欲涂薄层的玻璃板两旁各放一块高 1 mm 的玻璃板，把调好的吸附剂倒在中间板上，然后用尺压在两块玻璃板上向一个方向推。

制好的薄板要放入 105 的烘箱中干燥 1~2 h，进行活化。活化过程中要尽量避免突然升温和降温操作，否则薄层在展层过程中易于脱落。

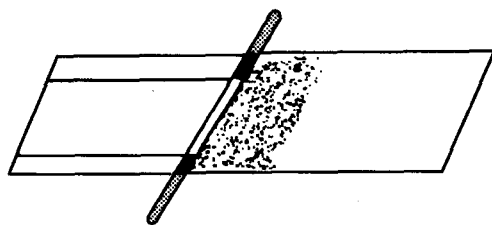


图 2-4 玻璃棒涂布制板示意图

2. 展层

将样品点在薄板上，将点好样的薄板置于密闭容器中，容器内预先放好展层剂使其达到饱和。薄层层析的展开方式与纸层析一致，可以是上行或下行。

3. 鉴定

展层结束后，将样品烘干，喷洒适当的显色剂或放于紫外灯下进行荧光显色。如果要准确测定样品中某组分的含量或要收集样品，则在展开后将该组分的斑点连同吸附剂一起刮下，然后将该组分从吸附剂上洗脱下来，收集洗脱液进行定量测定。

(四) 凝胶层析

凝胶层析法也叫凝胶过滤层析法，是 20 世纪 60 年代发展起来的一种简便有效的生化物质分离方法。凝胶过滤又叫分子筛层析。分子筛指的是多孔介质，这种介质具有立体网状结构，内部充满孔隙，孔径虽大小不一，但有一定范围。当含有不同相对分子质量溶质的混合物流经这一介质时，小分子物质能进入介质内部空隙，而大分子物质被排阻在介质之外。这样，不同相对分子质量的溶质分子在凝胶层析过程中的移动速度不同，从而得到层析分离。

可作为凝胶过滤的介质很多，如交联葡聚糖（商品名 Sephadex）、交联琼脂糖（商品名 Sepharose）、聚丙烯酰胺凝胶等。下面以葡聚糖为例说明凝胶层析的基本原理。

交联葡聚糖是细菌葡聚糖（右旋糖苷）（Dextran）用交联剂环氧氯丙烷交联而成的具有三维空间的网状结构物。在合成凝胶时，如控制葡聚糖和交联剂的配比，即可以获得具有不同孔径范围的葡聚糖凝胶。交联葡聚糖凝胶含有大量的羟基，极性大，易吸水，使用前必须用水溶液进行充分的溶胀处理。交联度越大（Sephadex 系列凝胶的 G 值小），孔径越小，吸水量也就越小。

将经过充分溶胀处理的凝胶装柱，再将含有不同相对分子质量溶质的样品液上柱，并用同一溶剂洗脱展开，就可实现各溶质的分离。如上所述，凝胶层析是根据凝胶介质对相对分子质量不同的溶质分子产生的不同排阻作用而达到分离目的的。凝胶对溶质的排阻程度可用分配系数 K 表示：

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (2.3)$$

式中 V_t ——凝胶柱的总体积；

V_0 ——柱的空隙体积或外水体积；

V_e ——溶质的洗脱体积。

在一定的层析条件下 V_t 和 V_0 的值都是一定的，而 V_e 的值随溶质相对分子质量的

变化而变化。小分子物质能够进入凝胶的大部分孔隙中，因此分配系数大，洗脱体积 V_e 值大；大分子溶质仅能进入凝胶内的部分尺寸较大的孔隙，因此分配系数较小，洗脱体积 V_e 值也小；相对分子质量很大的溶质可完全被排阻在凝胶之外，分配系数为零，洗脱体积 V_e 就等于柱的空隙体积 V_0 。完全不能扩散进入到凝胶内部的最小分子的相对分子质量称为凝胶的排阻极限。不同凝胶的排阻极限不同，Sephadex G 系列凝胶中，G 值越大，排阻极限越大。

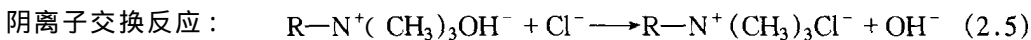
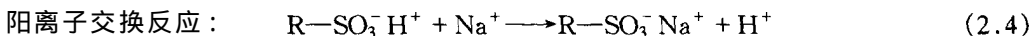
凝胶过滤实验的具体操作参见第四章实验五。

（五）离子交换层析

离子交换层析是最常用的层析方法之一。它是在以离子交换剂为固定相，液体为流动相的系统中进行的。离子交换剂主要由惰性基质（如苯乙烯和二乙烯苯聚合物、琼脂糖凝胶等）键合在基质表面的荷电基团和反离子构成。离子交换剂不溶于水和有机溶剂，在水中能释放反离子。离子交换剂基质是一种不溶性的高分子聚合物，具有特殊的网状或多孔结构。离子交换剂分阳离子交换剂和阴离子交换剂两种。

阳离子交换剂的荷电基团为酸性，带负电荷，反离子为正电荷。这种交换剂可以与溶液中的带正电荷的化合物或阳离子发生离子交换反应。根据离子交换剂所带电荷的强弱，又可将阳离子交换剂分为强酸型（如磺酸基）、中强酸型（如磷酸基）和弱酸型（如羧甲基）树脂。阴离子交换剂的荷电基团为碱性，带正电荷，反离子为负电荷。这种交换剂可以与溶液中的带负电荷的化合物或阴离子发生离子交换反应。同样，阴离子交换剂也可分为强碱型 [如季铵基— $N(CH_3)_3$]、中强碱型（如二乙胺乙基）和弱碱型（如仲胺基— NH_2CH_3 、氨基）树脂。

典型的离子交换反应式如下：



根据离子交换剂的基质组成和性质，可将基质分为两类。

1 疏水性离子交换剂

疏水性离子交换剂的基质是一种人工合成的、与水亲和力较小的树脂。常用的基质是苯乙烯和二乙烯苯的聚合物。该树脂中二乙烯苯的含量决定了树脂的交联度大小。

2. 亲水性离子交换剂

亲水性离子交换剂中的基质是一类天然的或人工合成的与水亲和力较大的物质。常用的有纤维素、交联葡聚糖和交联琼脂糖。

对于一个具体的分离物系，选择离子交换剂的主要依据是分离物系的种类和性质。通常分离小分子物质可采用以苯乙烯和二乙烯苯的聚合物为基质的离子交换树脂。对于核酸和蛋白质等生物大分子，应选用亲水性基质的离子交换剂，如纤维素类、交联葡聚糖和交联琼脂糖等。

离子交换剂在使用前需要进行处理。首先用水浸泡使之充分溶胀，然后加酸、碱处理除去水不溶性杂质。另外，使用前离子交换剂还要进行转型处理，即使树脂带上某种反离子。阳离子交换剂可处理成 Na^+ 型、 NH_4^+ 型或 H^+ 型，阴离子交换剂可处理成 Cl^- 型或 OH^- 型。常见的离子交换剂参见附录五。

离子交换层析实验的操作见第四章实验五。

（六）高效液相色谱

高效液相色谱（high performance liquid chromatography，简称 HPLC）又称高压液相色谱或高分离度液相色谱，该技术是在 20 世纪 60 年代中期吸收了普通液相层析和气相色谱的优点，经过适当改进发展起来的。到 20 世纪 70 年代中期，随着微机技术的应用，仪器的自动化水平和分析精度得到了进一步提高。与经典液相色谱和气相色谱相比，HPLC 具有分离性能高、速度快、检测灵敏度高、应用范围广等特点。它不仅适用于很多高沸点、大分子、强极性、热稳定性差的物质的定性分析，而且也适用于上述物质的制备和分离。因而广泛应用于生命科学、化学化工、医药卫生、环境科学、食品、保健等各个领域。

高效液相色谱按其固定相的性质可分为高效凝胶色谱、液固吸附色谱、离子交换色谱、疏水性液相色谱、反相液相色谱、高效亲和液相色谱、高效聚焦液相色谱等类型。

高效液相色谱装置主要由高压泵、色谱柱、进样器、检测器、温度控制器、记录仪、数据处理装置等部分组成（如图 2-5 所示）。

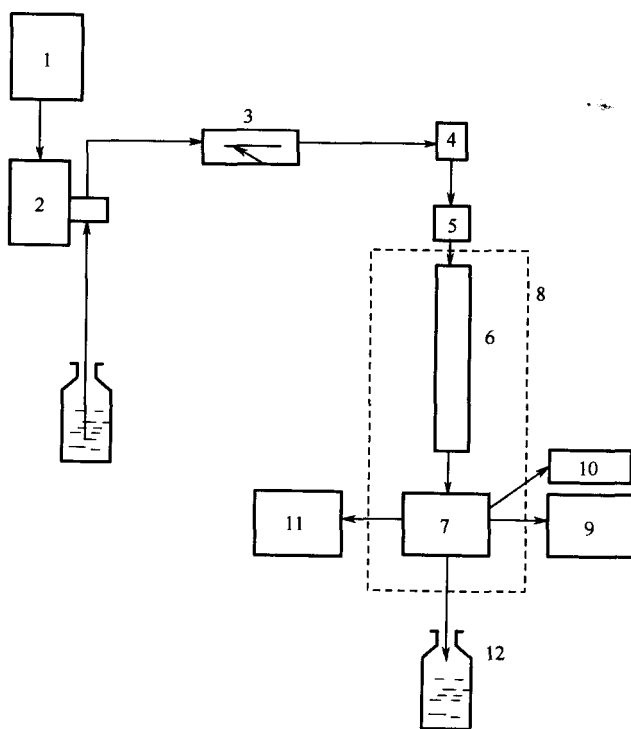


图 2-5 高效液相色谱流程示意

- 1—溶剂贮槽；2—泵；3—压力、流量测量器；4—进样阀（器）；5—保护柱；
6—分离柱；7—检测器；8—温控设备；9—数据处理设备；10—记录仪；
11—馏分收集器；12—废液瓶

其中最关键的是色谱柱、高压泵和检测器三部分。现对这三部分做简单介绍。

1 高压泵

高压泵是高效液相色谱的主要元件之一。高压泵的主要作用就是保证移动相以稳定的

流量流过色谱柱。因此对泵有以下要求。

流量稳定：因为流量不稳定不仅会造成记录仪基线波动，还会改变各组分的保留时间，产生较大的误差。对于 4~5 mm 的常规色谱柱，最常用的流量范围是 0.5~2.0 mL/min。

耐高压：一般最大的压力范围是 14.7~49 MPa。

耐腐蚀：泵必须对各种试剂具有耐腐蚀性，因此泵通常用优质不锈钢或陶瓷制成。

泵的死体积要小。

2. 色谱柱

色谱柱是高效液相色谱仪最重要的元件。而柱中填料又是色谱的核心部分，它是影响分离、分析效果的决定性因素，因此在选择填料时要根据待测样品的性质与填料的性能选择最佳的填料。常见的填料见表 2-2。

表 2-2 高效液相色谱常用填充剂

填充剂类型	表面多孔型	全多孔型
吸附型	Corasil™—II Vydac Adsorbent	Porasil C Poragel PN Amberlite XAD 日立凝胶 Woelm Alumina
分配型	Zipax -BOP, -ANH, -PAM, -HPC -TMG -Ethylenglycol -Carbowax 400 -Squalene -bonded Nitrile polymer Croasil/C ₁₈ Vydac™ reverse phase Permaphase ODS, ETH Durapak Carbowax 400/Porasil C Durapak OPN/Proasil C	
离子交换型	Zipax CSX, SAX, WAX Permaphase AAX WBAX Pellicular strong cation or anion exchange resin	Amimex BRX VC-10 日立气体离子交换
凝胶过滤型		Poragel 60A~500A, Styragel Aquapark A-440 Merckogel OR Porasil A, B, C, D, E, F Merckogel SI-50 ~ -1000 Bio-Glas 200~2500 GPG 10~75, ~2000

色谱柱通常要能耐高压、耐化学腐蚀，因此一般是由不锈钢或耐高压玻璃制成的直形柱。要根据不同的分离分析要求，采用不同规格的柱子。最常用的是内径为 2~5 mm，长 10~30 cm，采用高压匀浆装柱技术填充 5~10 μm 的高效微粒固定相的不锈钢管柱。