

第一部分

生物化学技术基本理论

第一章

分光光度技术

有色溶液对光线有选择性的吸收作用，不同物质由于其分子结构不同，对不同波长光线的吸收能力也不同，因此，每种物质都具有其特异的吸收光谱。有些无色溶液，虽对可见光无吸收作用，但所含物质可以吸收特定波长的紫外线或红外线。分光光度技术（分光光度法）主要是指利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的技术，其理论依据是 Lambert 和 Beer 定律。

分光光度法是比较法的发展。比色法只限于在可见光区，分光光度法则可以扩展到紫外光区和红外光区。比色法用的单色光通过滤光片产生，谱带宽度为 40~120 nm 精度不高，而分光光度法则要求近于真正单色光，其光谱带宽最大不超过 3~5 nm，在紫外光区可到 1 nm 以下。单色光通过棱镜或光栅产生，具有较高的精度。

第一节 基本原理

一、光的基本知识

光是由光子组成的，具有二重性，即不连续的微粒性和连续的波动性。波长和频率是光的波动性的特征，可用下式表示：

$$\lambda = c/\nu$$

式中 λ 为波长，具有相同的振动相位的相邻两点间的距离叫波长。 ν 为频率，即每秒钟振动次数。 c 为光速，等于 $299\,770 \pm 4 \text{ km/s}$ 。光属于电磁波。

自然界中存在各种不同波长的电磁波，列成表 1-1 所示的波谱图。分光光度法所使用的光谱范围在 200 nm~10 μm (1 μm = 1 000 nm) 之间。其中 200~400 nm 为紫外光区，400~760 nm 为可见光区，760~10 000 nm 为红外光区。

二、朗伯 - 比尔 (Lambert - Beer) 定律

朗伯 - 比尔定律是比色分析的基本原理，这个定律是讨论有色溶液对单色光的吸收程度与溶液的浓度及液层厚度间的定量关系。此定律是由朗伯定律和比尔定律归纳而得。

表 1-1 电 磁 波 谱

区 域	波 长		来 源
	m	常用单位	
γ 射线	$10^{-12} \sim 10^{-10}$	$10^{-3} \sim 0.1 \text{ nm}$	原子核
X 射线	$10^{-10} \sim 10^{-8}$	$0.1 \sim 10 \text{ nm}$	内层电子
远紫外	$10^{-8} \sim 2 \times 10^{-7}$	$10 \sim 200 \text{ nm}$	中层电子
紫外	$2 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-7}$	$200 \sim 400 \text{ nm}$	外层价电子
可见	$4 \times 10^{-7} \sim 7.6 \times 10^{-7}$	$400 \sim 760 \text{ nm}$	外层价电子
红外	$7.6 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5}$	$0.76 \sim 50 \text{ }\mu\text{m}$	分子振动与分子转动
远红外	$5 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$	$50 \sim 1\,000 \text{ }\mu\text{m}$	分子振动与分子转动
微波	$10^{-3} \sim 1$	$0.1 \sim 100 \text{ cm}$	分子转动
无线电波	$1 \sim 10^3$	$1 \sim 1\,000 \text{ m}$	核磁共振

1. 朗伯定律 一束单色光通过溶液后，由于溶液吸收了一部分光能，光的强度就要减弱：若溶液浓度不变，则溶液的厚度愈大（即光在溶液中所经过的途径愈长），光的强度减低也愈显著。

设光线通过溶液前的强度为 I_0 （入射光的强度）通过液层厚为 L 溶液后 光的强度为 I_t （透过光的强度）则 $\frac{I_t}{I_0}$ 表示透过光的强度是入射光强度的几分之几，称为透光度（transmittance）用 T 表示。透光度随溶液厚度的增加而减少，但实践证明，透光度和溶液层厚度间并不存在简单的定量关系，只有透光度的负对数 $-\lg T$ ）才随着溶液层厚度的增加而成正比例地增加，即

$$-\lg T = -\lg \frac{I_t}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I_t} \propto L$$

将上述比例式写成等式，得到

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_1 L$$

式中 $\lg \frac{I_0}{I_t}$ 称为吸光度（ A ）(absorbance)，又称为消光度（ E ）(degree of extinction) 或光密度（ D ）(optical density)。所以

$$A = K_1 L$$

式中 K_1 为比例系数，其值取决于入射光的波长，溶液的性质和浓度以及溶液的温度等。

上式表明，当溶液的浓度不变时，吸光度与溶液液层的厚度成正比，这就是朗伯定律。

2. 比尔定律 当一束单色光通过有色溶液后，溶液液层的厚度不变而浓度不同时，溶液的浓度愈大，则透射光的强度愈弱，其定量关系如下：

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = K_2 C$$

$$A = K_2 C$$

式中 C 为有色物质溶液的浓度； K_2 为比例系数，其值取决于入射光的波长，溶液的性质和液层的

厚度，以及溶液的温度等。

上式表明，当溶液液层的厚度不变时，吸光度与溶液的浓度成正比，这就是比尔定律。

3. 朗伯 - 比尔定律 如果同时考虑吸收层的厚度和溶液浓度对光吸收的影响，则必须将朗伯定律和比尔定律合并起来，得

$$\lg \frac{I_0}{I_t} = KLC$$

$$A = KLC$$

即吸光度与溶液的浓度和液层的厚度的乘积成正比，这就是朗伯 - 比尔定律。

在上式中，若 L 用厘米表示， C 用克 / 升表示，则比例常数 K 称为吸光系数，其值取决于入射光的波长，溶液的性质和温度等，而与光的强度、溶液的浓度及液层的厚度无关。

若 L 用厘米表示， C 用摩尔 / 升表示，则上式中的比例常数用 ϵ 表示，得到

$$A = \epsilon LC$$

式中 ϵ 称为物质的摩尔吸光率 (molar absorptivity) 或摩尔吸光系数 (molar absorption coefficient)，其值相当于 $L = 1 \text{ cm}$, $C = 1 \text{ mol/L}$ 时，在一定波长下的吸光度，它是物质的特性常数。

$$A = \epsilon LC = \epsilon \times 1 \times 1 = \epsilon$$

不同的物质可能会有相同的最大吸收波长，但其摩尔吸光系数不一定相同。 ϵ 值愈大，说明该物质溶液对光吸收愈强烈，则比色测定的灵敏度愈高。

第二节 分光光度计结构简介

能从含有各种波长的混合光中将每一单色光分离出来，并测量其强度的仪器称为分光光度计。

分光光度计因使用的波长范围不同而分为紫外光区、可见光区、红外光区以及万用 (全波段) 分光光度计等。无论哪一类分光光度计都由下列五部分组成，即光源、单色器、狭缝、样品池，检测系统。如图 1-1 所示。

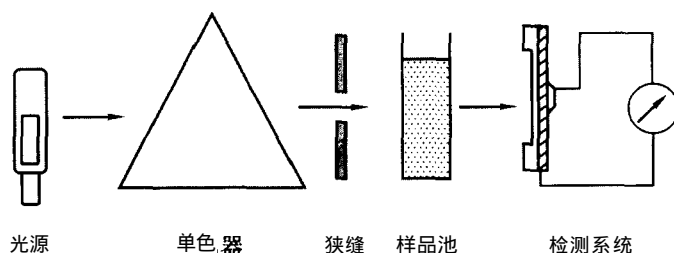


图 1-1 分光光度计各部分示意图

一、光源

要求能提供所需波长范围的连续光谱，稳定而有足够的强度。常用的有白炽灯（钨丝灯、卤钨灯等），气体放电灯（氢灯、氘灯及氙灯等），金属弧灯（各种汞灯）等多种。

钨灯和卤钨灯发射 320~2 000 nm 连续光谱，最适宜工作范围为 360~1 000 nm，稳定性好，可用作可见光分光光度计的光源。氢灯和氘灯能发射 150~400 nm 的紫外线，可用作紫外光区分光光度计的光源。红外线光源则由纳恩斯特（Nernst）棒产生，此棒由 $ZrO_2:Y_2O_3 = 17:3$ （Zr 为锆，Y 为钇）或 Y_2O_3, GeO_2 （Ge 为锗）及 ThO_2 （Th 为钍）之混合物制成。汞灯发射的不是连续光谱，能量绝大部分集中在 253.6 nm 波长处，一般作波长校正用。

钨灯在出现灯管发黑时应及时更换，如换用的灯型不同，还需要调节灯座的位置和焦距，氢灯及氘灯的灯管或窗口是石英的，且有固定的发射方向，安装时必须仔细校正。接触灯管时应戴手套以防留下污迹。

二、分光系统（单色器）

单色器是指能从混合光波中分解出所需单一波长光的装置，由棱镜或光栅构成。

用玻璃制成的棱镜色散力强，但只能在可见光区工作，石英棱镜工作波长范围为 185~4 000 nm，在紫外光区有较好的分辨率，而且也适用于可见光区和近红外光区。棱镜的特点是波长越短，色散程度越好，越向长波一侧色散程度越差。所以用棱镜的分光光度计，其波长刻度在紫外区可达到 0.2 nm，而在长波段只能达到 5 nm。

有的分光系统是衍射光栅，即在石英或玻璃的表面上刻划许多平行线，刻线处不透光，于是通过光的干涉和衍射现象，较长的光波偏折的角度大，较短的光波偏折的角度小，因而形成光谱。

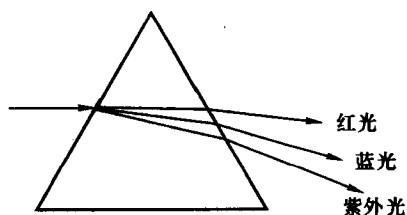


图 1-2 棱镜分光器

三、狭缝

狭缝是指由一对隔板在光通路上形成的缝隙，用来调节入射单色光的纯度和强度，也直接影响分辨率。狭缝可在 0~2 nm 宽度内调节，由于棱镜色散力随波长不同而变化，较先进的分光光度计的狭缝宽度可随波长一起被调节。

四、比色杯

比色杯也叫样品池、吸收器或比色皿，用来盛测定溶液，各个杯子壁厚度等规格应尽可能完全相等，否则将产生测定误差。玻璃比色杯只适用于可见光区，在紫外光区测定时要用石英比色杯。不能用手指拿比色杯的光学面，用后要及时洗涤，可用温水或稀盐酸、乙醇以至铬酸洗液（在浓酸中浸泡时不要超过 15 min），表面只能用柔软的绒布或拭镜头纸擦净。

五、检测系统

有许多金属能在光的照射下产生电流，光愈强电流愈大，此即光电效应。因光照射而产生的电

流叫做光电流。受光器有两种，一是光电池，二是光电管。光电池的组成种类繁多，最常见的是硒光电池。光电池受光照射产生的电流较强，可直接用微电流计量出。但是，当连续照射一段时间后会疲劳现象而使光电流下降，要在暗中放置一段时间才能恢复。因此使用时不宜长期照射，随用随关，以防止光电池因疲劳而产生误差。

光电管装有一个阴极和一个阳极，阴极是用对光敏感的金属（多为碱土金属的氧化物）做成，当光射到阴极且达到一定能量时，金属原子中的电子发射出来。光愈强，光波的振幅愈大，电子放出愈多。电子是带负电的，被吸引到阳极上而产生电流。光电管产生电流很小，所以需要放大。分光光度计中常用电子倍增光电管，在光照射下产生的电流比其他光电管要大得多，这就提高了测定的灵敏度。

检测器产生的光电流以某种方式转变成模拟的或数字的结果，模拟输出装置包括电流表、电压表、记录器、示波器及与计算机连用等，数字输出则通过模拟 / 数字转换装置如数字式电压表等进行。

第三节 分光光度技术的应用

一、测定溶液中物质的含量

可见或紫外分光光度法都可用于测定溶液中物质的含量。这需要测定标准溶液（浓度已知的溶液）和未知液（浓度待测定的溶液）的吸光度，将两者进行比较。由于所用吸收池的厚度是一样的，可用下式进行计算。

$$\frac{A_x}{A_s} = \frac{KC_xL}{KC_sL} = \frac{C_x}{C_s}, \text{即 } C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

式中 C_x 代表未知液的浓度， C_s 代表标准液的浓度， A_x 和 A_s 分别代表未知液和标准液所测得的吸光度值，式中只有 C_x 是未知的，可由上式计算得之。

也可以先测出不同浓度的标准液的吸光度，绘制标准曲线，在选定的浓度范围内标准曲线应该是一条直线，然后测定出未知液的吸光度，即可从标准曲线上查到其相对应的浓度。

含量测定时所用波长通常要选择被测物质的最大吸收波长，这样做有两个好处：①灵敏度大，物质在含量上的稍许变化将引起较大的吸光度差异；②可以避免其他物质的干扰。

还可利用摩尔吸光率（ ϵ ）求得测定物质的浓度，由于物质的 ϵ 是已知的，读取光径（液层厚度）为 1 cm 时溶液的吸光度（ A ），则可以用下式计算溶液中物质的浓度（ C ）：

$$C = \frac{A}{\epsilon}$$

此式常在紫外光吸收法时应用，无需显色反应，操作方便。

二、用紫外光谱鉴定化合物

使用分光光度计可以绘制吸收光谱曲线。方法是用各种波长不同的单色光分别通过某一浓度

的溶液，测定此溶液对每一种单色光的吸光度，然后以波长为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制吸光度—波长曲线，此曲线即吸收光谱曲线。

各种物质有它自己一定的吸收光谱曲线，因此用吸收光谱曲线图可以进行物质种类的鉴定。当一种未知物质的吸收光谱曲线和某一已知物质的吸收光谱曲线形状一样时，则很可能它们是同一物质。一定物质在不同浓度时，其吸收光谱曲线中峰值的大小不同，但形状相似，即吸收高峰和低谷的波长是一定不变的。

紫外光吸收是由不饱和的结构造成的，含有双键的化合物能表现出吸收峰。紫外光吸收光谱比较简单，同一种物质的紫外光吸收光谱应完全一致，但具有相同吸收光谱的化合物其结构不一定相同。除了特殊情况外，单独依靠紫外光吸收光谱不能决定一个未知物的结构，必须与其他方法配合。紫外光吸收光谱分析主要用于已知物质的定量分析和纯度分析。

第四节 分光光度法的误差

在分光光度法中，即使将各种因素都控制好，对于浓度过大或过小的样品，误差仍然很大。因为浓度过大的样品，其吸光度过高，影响检测器的灵敏度，且读数标尺刻度的精度差，误差亦大，故难于准确。浓度过低的样品，其吸光度小，则因与仪器本身因素有关，也容易引起检测器标尺上的读数误差。例如光源波动的影响：当光源强度改变 1%、吸光度为 1.0 时，只有 0.4% 的误差，但在吸光度为 0.045 时，则可产生 9.6% 的误差。实际上，在整个透光度（或吸光度）范围的不同部分均有不同的误差。从理论上推算，相对误差的最小的部分在透光度为 36.8% 处（或吸光度为 0.4343 处），故通常认为测定值在吸光度 0.20~0.80 范围内（透光度为 20%~65%）误差较小，超出此范围，相对误差均会增大。

影响分光光度法精确度的主要原因还有光谱纯度。分光光度计应能正确选出光源光谱中所需部分波长作为入射光，一般应保持光谱带宽度在 10 nm 以下，如果测定样品有很狭窄的吸收峰，就必须有更小的光谱宽度，所以分光光度计大多均有可调的狭缝。在实际使用中，用较大狭缝虽可提高重现性，但由于加大光谱宽度反而降低了准确度。

散射光也是引起误差的重要因素。这里所说的散射光是指一切未经测定溶液吸收，而又落到检测器上引起干扰的光，如室内自然光，经过某些漏洞进入仪器而明显增大了透光度，故高灵敏度的分光光度计宜安装的光线较暗的室内。散射光也包括能透过比色皿的非测定需要的其他波长的光，实际上是光谱不纯，但因效果与散射光一样，故也称为散射光干扰。散射光干扰对高浓度测定特别有害，能使吸光度降低，标准曲线的高浓度部分向下弯曲。

第五节 常见国产分光光度计的使用

一、721 型分光光度计

这一种采用光电管为受光器的较高级可见光分光光度计。其波长范围为 360~800 nm，在 410

~710 nm 之间的灵敏度较好。

使用方法如下：

1. 灵敏度选择钮放在“1”档(如调不到“0”时选用较高的档)。
2. 转动波长选择钮, 选用所需的波长。
3. 接通电源(指示灯亮)。
4. 揭开比色杯暗箱盖, 转动“0”电位钮使电表指针对准 $T=0$ 处。

5. 将比色杯放入比色杯架, 使空白管对向光路, 盖好比色杯暗箱盖。转动“100”电位钮, 调准电表指针使之指向 $A=0$ ($T=100$) 处。

6. 拉动比色杯架的拉杆, 使测定杯进入光路, 迅速从电表上读取吸光度值, 记录。测读过程中, 随时推回拉杆到原位, 使空白杯进入光路并转动“100”电位钮使指针回到 $A=0$ 处。

7. 比色完毕后, 关上电源开关, 取出比色杯, 将比色杯暗箱盖好, 清洗比色杯并晾干。

二、751 型分光光度计

这是一种可供从紫外光到红外光区(200~1 000 nm)测量吸收光谱的较高级分光光度计。在波长 320~1 000 nm 范围内, 用钨丝白炽灯泡作光源; 在波长 200~320 nm 范围内, 用氢灯作光源。此型分光光度计操作较复杂, 操作时务必要按操作规程进行, 以防损坏仪器。

使用方法如下：

1. 准备

- (1) 将光门关闭。
- (2) 将选择开关放在“校正”位置, 打开电源开关(稳压电源总开关)后, 根据需要选择灯源, 钨灯为可见光, 氢灯为紫外光光源。
- (3) 将波长刻度盘转到所需波长的位置。
- (4) 选择适应的光电管。光电管选择拉杆推入为紫敏光电管(200~625 nm), 拉杆拉出为红敏光电管(625~1 000 nm), 使之与选用的波长和光源相一致(为减少杂散光, 可将滤光片推入光路, 一般无此必要)。
- (5) 根据需要选用比色杯。350 nm 以上者可用玻璃比色杯, 350 nm 以下者应用石英杯, 并将比色杯放入比色架。将试样室盖盖好。

2. 调透光度的零点

- (1) 旋转暗电流调节钮, 使 0 位计指针指到 0 位。为了得到较好结果, 每测量一次应随时进行

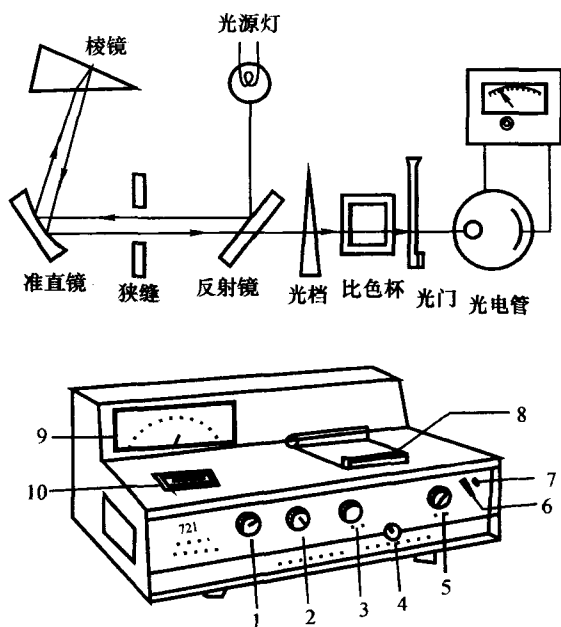


图 1-3 721 型分光光度计原理图和仪器图

1. 波长选择钮 2. “0”电位钮 3. “100”电位钮 4. 比色杯拉杆 5. 灵敏选择钮 6. 电源开关 7. 电源开关 8. 暗箱盖 9. 读数表 10. 波长读数窗

调整 使指针指向 0 位。

(2) 顺时针转动灵敏度钮三圈左右, 此时透光度改变 1%, 0 位计指针可偏转三小格。

3. 调透光度 100% 点

(1) 拉动换样拉杆, 使空白管移入光路之中。

(2) 旋转读数钮, 使测量读数盘指到透光度 100% 处。

4. 测量

(1) 扳动选择开关到“ $\times 1$ ”处。

(2) 拉开光门, 使单色光通过样品后射到光电管上。

(3) 旋转狭缝选择钮 使 0 位计指针指向 0 位, 并用灵敏度钮细调, 使指针准确指到 0 位上。

(4) 拉动换样拉杆, 将待测溶液移入光路之中。此时 0 位指针偏离 0 位。

(5) 旋转读数钮 使 0 位计的指针重新指向 0 位。此时, 从读数盘上便可读出透光度和吸光度数值。

(6) 如果样品过浓 透光度 $< 10\%$ 吸光度 > 1 时, 可将选择开关放到“ $\times 0.1$ ”位置。此时, 当 0 位计指针重新移到 0 位时, 读取盘上的透光度值必须乘 0.1 吸光度值则应加 1 才是真实的数据。

(7) 在测定中, 如需反复校准仪器的透光度的 100% 时, 仪器选择开关的校正档便相当于读数盘上 100% 的位置。所以需调 100% 时 可以将选择开关扳回“校正”档 用灵敏度钮调零位计的“0”位即可, 不必要旋转刻度盘到 100% 位置上。

三、使用分光光度计的注意事项

1 分光光度计必须放置在固定而且不受振动的仪器台上, 不能随意搬动, 严防振动, 潮湿和强光直射。

2. 比色杯盛液量以达到杯容积 $2/3$ 左右为宜。若不慎将溶液流到比色杯的外表面, 则必须先用滤纸吸干, 再用擦镜纸或绸布擦净, 然后才能把比色杯放入比色杯槽内。移动比色杯槽要轻, 以防溶液溅出, 腐蚀机件。

3. 不可用手拿比色杯的光学面, 禁止用毛刷等物摩擦比色杯的光滑面。

4. 用完比色杯后应立即用自来水冲洗, 再用蒸馏水洗净。若用上法洗不净时, 可用 5% 的中性皂溶液或洗衣粉稀溶液浸泡, 也可用新配制的重铬酸钾 - 硫酸洗液短时间浸泡, 之后立即用水冲洗干净。洗涤后应把比色杯倒置晾干或用滤纸条将水吸去, 再用擦镜纸轻轻揩干。

5. 一般应把溶液浓度尽量控制在吸光度值 $0.1 \sim 0.7$ 的范围内进行测定。这样所测得的读数误差较小。如吸光度不在此范围内, 可调节比色液浓度, 适当稀释或加浓, 使其在仪器准确度较高的范围内进行测定。

6. 仪器连续使用时间不应超过 2 h, 每次使用后需要间歇半小时以上才能再用。

7. 每套分光光度计上的比色杯及比色杯槽不得随意更换。

8. 分光光度计内放有硅胶干燥袋, 需定期更换。

(第四军医大学 杨安钢)

参 考 文 献

- 1 首都医学院主编，医用生物化学实验，天津：天津科学技术出版社，1987
- 2 李学骥主编，医用化学实验技术，西安：陕西科学技术出版社，1986
- 3 湖南医学院第二附属医院，临床生化检验，长沙：湖南科学技术出版社，1981
- 4 郭尧君编著，分光光度技术及其在生物化学中的应用，北京：科学出版社，1987
- 5 生物化学编审小组，生物化学实验指导，北京：人民卫生出版社，1987

第二章

液相色谱技术

色谱技术是生物大分子研究中必不可少的工具，已被普遍认为是当前分离生化样品最有效的手段。不管是哪一种色谱方法，其最基本的特征是具有一个固定相和一个流动相，各种物质得以分离的最基本原因就在于它们在这两个相间具有不同的分配系数。当两相作相对运动时，这些物质在两相间进行反复多次的分配，从而得到分离。

色谱技术有多种分类方法。按两相状态来分类，有气相色谱法和液相色谱法两种。气相色谱以气体作流动相，液相色谱以液体作流动相。在生物大分子分离中，主要以液相色谱为主，故气相色谱在此不做介绍。液相色谱按照作用机制来分类有：离子交换色谱、凝胶排阻色谱、亲和色谱、反相色谱、疏水作用色谱、正相色谱等几种。若按操作方式来分类，又有柱色谱、薄层色谱、纸色谱等数种。按照制备量来分类，有分析色谱和制备色谱。按照填料的强度来分类，有经典的软胶色谱和现代高效液相色谱，等等。尽管分类方法很多，但按照色谱作用机制的分类方法是最重要和最基本的方法，也是大家最常用的方式。表 2-1 列入了各种分离生物大分子的液相色谱技术。在生物大分子的纯化过程中通常以液相色谱为主，故本章以液相色谱为例，介绍它的原理及在生物大分子分离提纯方面的应用。

表 2-1 蛋白质纯化技术

分离依据	分离方法 (色谱类型)	特 点	用 途
分子大小	凝胶过滤	分级分离，分辨率适中，非常适于脱盐(分级分离时流速较慢 ≥ 8 h/循环)的情况，脱盐时流速快 30 min / 循环)容易受限于样品体积	大规模纯化的最后一步。用于去除微量杂质及聚集体脱盐可用于任何阶段，特别是步骤衔接时的缓冲液更换
电荷	离子交换	分辨率通常较高，流速较快(合适的填料)容量很大，样品体积不受限	最适于早期纯化，即大体积样品及蛋白纯度较低时使用
等电点	色谱聚焦	分辨率较高，流速快容量很大，样品体积不受限	纯化最后阶段
疏水特性	疏水作用	分辨率较高，流速大容量大，样品体积不受限	适于任何阶段，特别适用于离子强度较高时，如沉淀、离子交换和亲和层析后
	反相	分辨率较高，流速很快，容量大	适于最后阶段，特别适于相对分子质量较小的肽
生物亲和性	亲和	分辨率极高，流速大，容量大，体积不限	适于任何阶段，特别是样品浓度小、杂质含量多时使用

同其他分离技术相比较，液相色谱方法具有以下优点：①分离效率高 选择性好 适用于各种多

元复杂混合物的分离；②应用范围从无机物到有机物，从天然物质到合成产物，从小分子到大分子，从一般化合物到生物活性物质等，可以说几乎包括了所有类型物质；③根据分离对象，按不同分离机制，可广泛选择色谱柱，洗脱体系和操作参数；④既是精细的分离纯化方法，也是快速、灵敏、准确、简便的分析检测手段；⑤它可以处理从痕量以至较大规模制备的样品量，可以实现在线检测和自动化操作。

第一节 色谱原理及基本装置

液相色谱法既可以用比较复杂的装置，也可以用简单的设备。用一根适宜的柱子，一个流量控制装置和一个部分收集器就可以构成最基本的分离装置。

色谱柱是整个过程的中心，在使用时必须满足下述要求：

- (1) 柱底应有一凝胶的支持层，该支持层应保证溶液能从柱中自由流出。
- (2) 支持层下面的死体积要尽可能小。
- (3) 柱子的出口应有一个合适的接头与检测器和部分收集器相连。
- (4) 以玻璃管和塑料管较好。柱子的基本结构如图 2-1。

早期，通过柱子的液体以重力输入为主，这时柱子入口高于出口，以产生静的水压差。但在洗脱期间，贮液容器中洗脱液液面的下降会降低流体压力，从而也降低了洗脱液通过柱子的流速。目前多使用蠕动泵来输送洗脱液。蠕动泵可以产生一个稳定的液体流速而被广泛地使用，它可以用

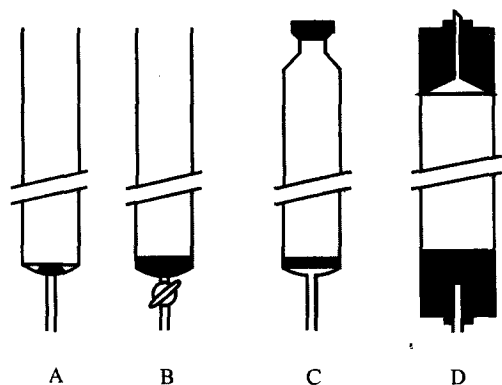


图 2-1 柱子的基本结构

A. 最简单的玻璃柱，其末端拉成毛细管，出口装有脱脂棉塞；B. 带有封闭多孔玻璃滤板的玻璃柱，其出口装有毛细管阀，玻璃圆片下面装有玻璃珠，以减小死体积；C. 顶端装有球面玻璃接头的玻璃柱，出口接上毛细管，多孔玻璃过滤板下面的死体积最小；D. 柱塞式色谱柱，柱塞底部装有起支撑作用的多孔层，柱中的柱塞用“O”形圈密封并用一锥体固定以防止移动

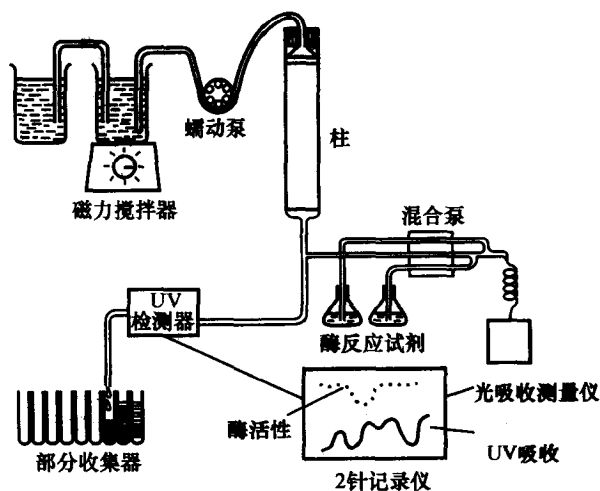


图 2-2 经典柱色谱的基本装置

于上样品，输送缓冲液，产生梯度洗脱方式。

分离生物大分子时，液体流出后要尽快地进行检测，基本装置如图 2-2。生物大分子一般在 280 nm 进行连续的检测（Trp + Tyr 或者在更灵敏的 220→205 nm(肽带) 波长进行检测，最后使用收集器收集所需的组分。

第二节 凝胶色谱

凝胶过滤法是利用分子筛效应分离提纯各种具有生物特性的高分子物质的一种方法。

一、原理

凝胶排阻色谱法所用的载体为一定孔径的多孔性亲水性凝胶。当分子大小不同的混合物通过这种凝胶柱时，如图 2-3 所示，直径大于孔径的分子将不能进入凝胶内部，便直接沿凝胶颗粒的间隙流出，称为全排出。较小的分子在容纳它的空隙内，自由出入，造成在柱内保留时间长。这样，较大的分子先被洗脱下来，而较小的分子后被洗脱下来，从而达到相互分离的目的。洗脱时峰的位置和该物质相对分子质量有直接的定量关系。在一根凝胶柱中，颗粒间自由空间所含溶液的体积称为外水体积 V_o ，不能进入凝胶孔径的那些大分子，当洗脱体积为 V_o 时出现洗脱峰。

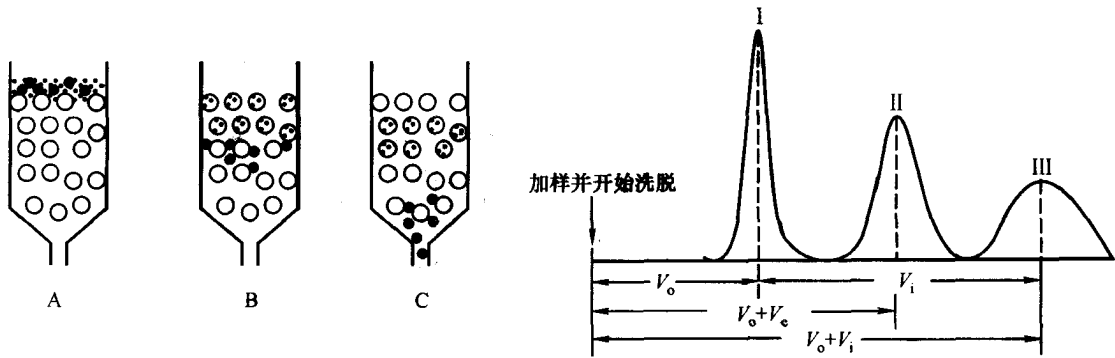


图 2-3 凝胶色谱原理

图 2-4 凝胶色谱中洗脱的三种峰

A. 加样：含有溶质分子的溶液，通过网状结构的凝胶粒子；
B. 洗脱：小分子溶质自由扩散于凝胶粒子的缝隙中而进入凝胶相，大分子溶质被排阻于外；C. 分离：大分子物质由于扩散受阻，在凝胶中行径较短而最先洗脱下来，小分子物质从凝胶相中扩散出来，最后被洗脱下柱

凝胶颗粒内部孔穴的总体积称为内水体积 V_i ，能全部透入凝胶的那些小分子，当洗脱体积为 $V_o + V_i$ 时出现洗脱峰，介于其间的分子将在洗脱体积为 $V_o + V_e$ 时出现洗脱峰(图 2-4)。

我们将分子筛分配系数定义为：

$$K = V_e / V_i \quad (2-1)$$

若生物大分子的分子为球形，其 K 与生物大分子的相对分子质量间存在如下关系：

$$K = -b \lg M_r + c \quad (2-2)$$

其中 b 和 c 为常数

实验已证实这一关系的存在（图 2-5）。图中两条标准曲线分别是使用交联葡聚糖 G-75 和 G-100 取得的，其纵坐标用 V_e 表示，因对一固定的柱来讲， V_i 是常数 所以 V_e 与 K 相当。

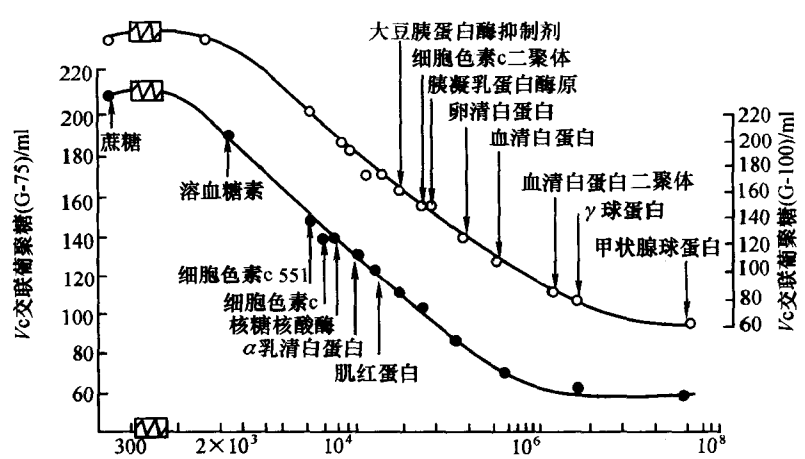


图 2-5 排阻体积与相对分子质量的关系

二、凝胶的种类

用作凝胶的载体物质有交联葡聚糖、聚丙烯酰胺和琼脂糖。

交联葡聚糖商品名为 Sephadex，它的原料是细菌分泌的链状葡聚糖。通过交联剂 1-氯代-2,3-环氧丙烷交联而成。交联剂添加越多，孔径越小，吸水量也就越小；反之越大。商品 Sephadex 以 G 值表示不同交联度，G 值越大，空穴也越大，G 后边的数字表示每克干胶膨胀时吸水量的 10 倍，G-25 表示每克干胶可吸附 2.5 g 水。各种型号的交联葡聚糖及其适用范围列于表 2-2。这类凝胶的使用量尤其是 G-75 以上的凝胶正日益减少。

表 2-2 Sephadex G型主要物理性质

型 别	吸水量 (ml/g)	干粒子直径 /μm	筛 孔	分离范围(相对分子质量)	
				肽类和球蛋白	多 糖
G-10	1.0	40~120	60	< 700	< 700
G-15	1.5	40~120	60	< 1 500	< 1 500
G-25 粗	2.5	100~300	40~60	1 000~5 000	100~5 000
中		50~150	60~100		
细		20~80	100~200		
超细		10~40	250~400		
G-50 粗	5.0	同上	同上	1 500~30 000	500~10 000
中					
细					
超细					

续表

型 别	吸水量 /(ml/g)	干粒子直径 / μm	筛 孔	分离范围(相对分子质量)	
				肽类和球蛋白	多 糖
G-75 细	7.5	40~120	60	3 000~70 000	1 000~50 000
超细		10~40	250~400		
G-100 细	10.0	40~120	60	4 000~150 000	1 000~100 000
超细		10~40	250~400		
G-150 细	15.0	40~120	60	5 000~400 000	1 000~150 000
超细		10~40	250~400		
G-200 细	20.0	40~120	60	5 000~800 000	1 000~200 000
超细		10~40	250~400		

1. 交联葡聚糖凝胶

2. 聚丙烯酰胺凝胶 聚丙烯酰胺凝胶是丙烯酰胺和 N,N'-次甲基二丙烯酰胺聚合而成。这种凝胶的商品名为 Bio-gel P。其孔穴大小也是随交联增多而减少,并用 P 值表示不同的交联度,P 值越大,孔径也越大。各种型号的生物胶及其适用范围列于表 2-3。

表 2-3 Bio-gel-P 的各种型号及物理性质

型 号	每克干胶吸水量 /g	每克干胶床体积 /ml	肽和蛋白的 工作范围	全排阻的相对 分子质量	室温最小溶胀 时间/h
P2	1.5	3.8	200~2 000	3 000	2~4
P4	2.4	5.8	500~3 000	3 000	2~4
P6	3.7	8.8	1 000~4 000	5 000	2~4
P10	4.5	12.4	3 000~17 000	25 000	2~4
P30	5.7	14.8	3 000~30 000	40 000	10~12
P60	7.2	19.0	3 000~50 000	60 000	10~12
P100	7.5	19.0	5 000~100 000	200 000	24
P150	9.2	24.0	5 000~150 000	250 000	24
P200	14.7	34.0	5 000~200 000	300 000	48
P300	18.0	40.0	10 000~300 000	$\geq 500 000$	48

3. 琼脂糖凝胶 琼脂糖是从海藻琼脂中分离除去琼脂胶后的中性级分。它是 D-半乳糖和 3,6-脱水 L-半乳糖相间重复结合而成的链状化合物。

这种糖链依靠糖基之间的氢键作用,形成稳定的网状结构,网状结构的疏密依靠改变琼脂糖浓度的方法来控制,因此商品也是以含水状态供应。因为琼脂糖凝胶靠的是氢键相交联,一般型号只能在 0~40℃ 以及 pH 4~9 范围内使用。近年,应用交联剂制备得到的 CL 型和 FF 型琼脂糖则有更好的稳定性,能用于浓脲、胍、有机溶剂及非离子型去污剂溶液,还能经受 110~120℃ 高压灭菌处理,对生物大分子的吸附能力也特别低。无论是哪种琼脂糖凝胶,其机械强度都比葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶好得多,同时它对生物大分子等高分子的吸附作用也小得多。另外,琼脂糖凝胶适用相对分子质量的范围宽,最大可以到 10^8 ,这一点是另外两种凝胶所无法达到的。正由于以上这些优点,它的应用受到人们的重视。琼脂糖的商品名为 Sepharose 或 Bio-gel A 主要型号的琼脂糖凝胶列于表 2-4。

表 2-4 Sepharose 及 Bio-gel A 的型号

型 号	使用范围(蛋白质)	含琼脂糖/%	
Sepharose	6B	10 000~3 000 000	6
	4B	100 000~20 000 000	4
	2B	1 000 000~100 000 000	2
Sepharose ^R CL	6B	同 上	同 上
	4B		
	2B		
Bio - Gel	0.5 m	10 000~500 000	10
	1.5 m	10 000~1 500 000	8
	5 m	10 000~5 000 000	6
	15 m	40 000~15 000 000	4
	50 m	100 000~50 000 000	2
	150 m	1 000 000~150 000 000	1

4. Sephacryl 凝胶 Sephacryl 是由丙烯基葡聚糖和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺共价交联而成的硬凝胶。其类型有 Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400 和 S-500 几种, 它们都是超细颗粒。其填料的性质及类型见表 2-5。

Sephacryl 在常用溶剂除化学去垢剂外 中不溶解 可以使用 pH 的范围是 3~11 在低 pH 时, 葡聚糖链可以发生有限的水解, 凝胶用 0.2 mol/L NaOH 在室温中处理 100 h, 凝胶的多孔性和流速没有可见变化。Sephacryl 可以用含有 SDS 和 6 mol/L 盐酸胍的溶剂进行洗脱。Sephacryl 在 pH 7 环境中 120 ℃ 重复消毒不影响凝胶的色谱性质。以上几种 Sephacryl 有不同的分离范围, 在作用时可根据分离范围和选择曲线选用合适的凝胶。

表 2-5 Sephacryl 凝胶系列的性质

凝 胶	近似颗粒体积/ μm	使用相对分子质量范围 (葡聚糖)	使用相对分子质量范围 (球蛋白)
S-100	25~75		$1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$
S-200	25~75	$1 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$	$5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^5$
S-300	25~75	$2 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5$	$1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$
S-400	25~75	$1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$	$2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$
S-500	25~75	$4 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$	

5. Superdex 凝胶 Superdex 是最新的凝胶填料, 它是将葡聚糖以共价方式结合到高交联的多孔琼脂糖珠体上形成的复合凝胶。琼脂糖的高交联骨架为珠体提供了较高的物理化学性质, 葡聚糖为介质提供了优良的选择性。

这类凝胶物理化学性质稳定, 刚度强, 适合于高流速, 且分辨率高。使用 pH 范围为 3~12 在 pH=7 时可经 120 ℃ 消毒处理, 分离中可用 1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 处理 在 1% SDS、6 mol/L 盐酸胍和 8 mol/L 尿素中使用, 色谱行为不变。目前有 Superdex G-30、G-75 和 G-200 可供选择, 它们的分离范围对于蛋白质来讲, 分别为 10 000, 70 000 和 600 000。

6. 聚乙烯醇凝胶 聚乙烯醇系列是以交联聚乙烯醇为骨架的凝胶过滤填料。20 世纪 80 年代初问世, 商品名为 Toyopearl 该填料为多孔的三向网状结构, 大分子链上含有丰富的羟基, 骨架为高亲水性, 还可以进行化学改造, 而得到多功能的离子交换和亲和色谱填料。