



生物化学实验

层析技术

4.1 概述

北京大学 王青松 胡晓倩

概述

- 层析技术 (chromatography)：又称色谱法，是生物大分子分离纯化过程中不可缺少的关键分离技术。
- 特点：选择性好、分离效能高、灵敏度高、分析速度快等优点。
- 应用范围：
 - 生物大分子的分离纯化
 - 生物制药
 - 食品、药品检测
 - 农药残留、农副产品分析
 - ...

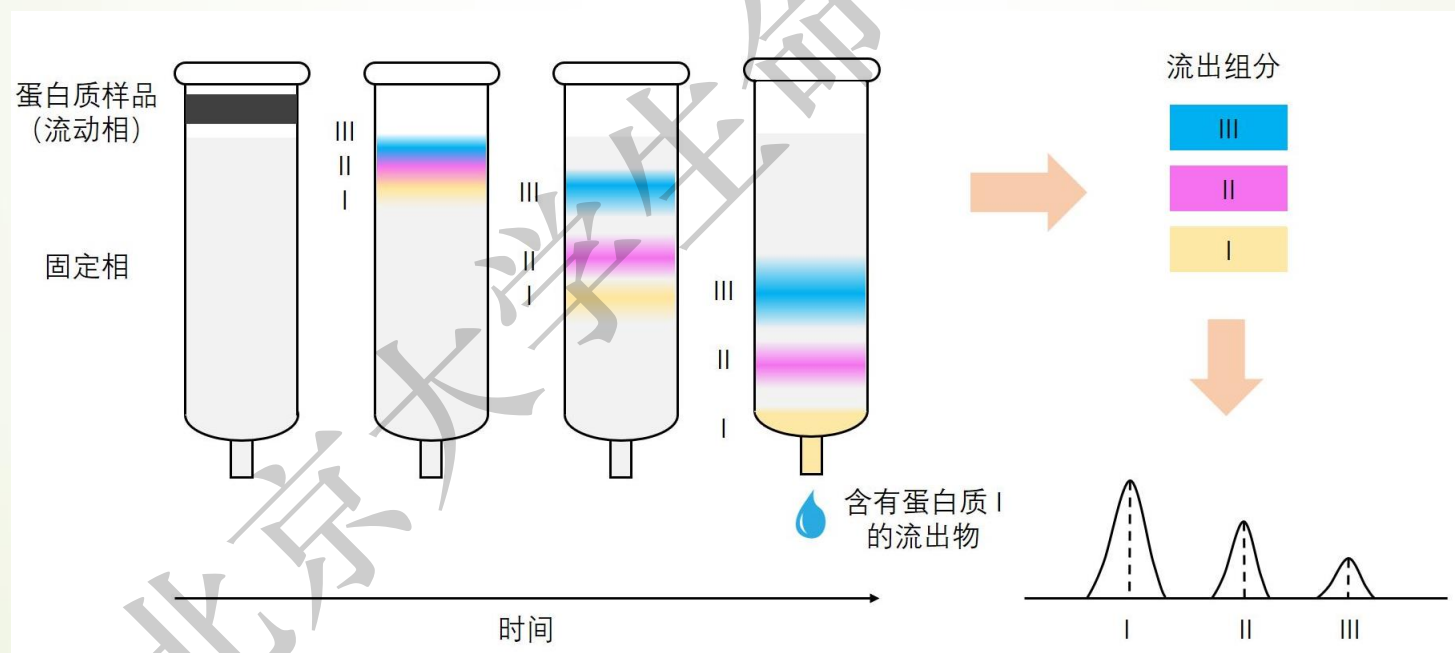
层析方法起源

- 1903年，俄国植物学家茨维特（Tsweet）首先提出层析方法和概念。
- 他将碳酸钙放在竖立的玻璃管中，从顶端倒入植物色素的石油醚浸取液，并用石油醚冲洗。由于碳酸钙对叶绿素中的各种色素的吸附能力不同，在碳酸钙管柱的不同部位形成色带，且以不同速度通过柱子流出，并按谱带颜色对混合物各个流出组分进行鉴定分析。
- 茨维特把这种分离结果称为色谱图，把这种分离方法命名为色谱法（chromatography）。



层析的基本原理

- 层析是根据待分离物质的物理、化学及生物学性质，利用**物质在固定相和流动相中吸附或分配系数的差异**，使混合物各组分在固定相中因移动速度不同而进行分离分析的方法。



层析的基本概念

- **固定相：**固定相是层析的基质，在柱层析中称其为层析填料。固定相可以是固体或液体物质，能与待分离的化合物进行可逆的吸附、溶解、交换等作用，对层析效果起着关键的作用。
- **流动相：**层析过程中，推动固定相上待分离的物质朝着一个方向移动的液体、气体等，都称为流动相。柱层析中一般称为洗脱剂，是层析分离中的重要影响因素。
- **分配系数**
- **分离度**

分配系数

- 定义：一定条件下，某个组分在固定相和流动相中含量（浓度）的比值。
- 不论层析原理如何，当溶质浓度较低时，它在固定相和流动相中的浓度成线性的平衡关系，常用 K_d 表示。

$$K_d = \frac{M}{C}$$

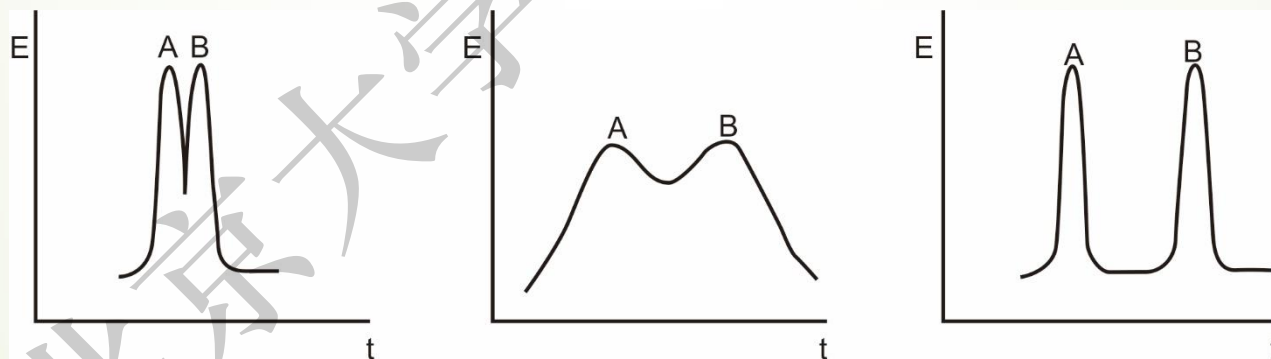
M , C 表示溶质在固定相和流动相中的浓度。

分离度

- 层析分离技术的目的是要将混合样品中的各个组分彼此分开。需要：
 - 1) 2个层析峰之间有足够远的距离，这是由组分在层析柱中固定相和流动相的分配系数决定的，与层析过程中的热力学性质有关。
 - 2) 每个层析峰的峰宽尽可能窄，层析峰的宽窄是由组分在层析过程中的传质速度和扩散行为决定的，与层析过程中的动力学性质有关。

分离度的定义

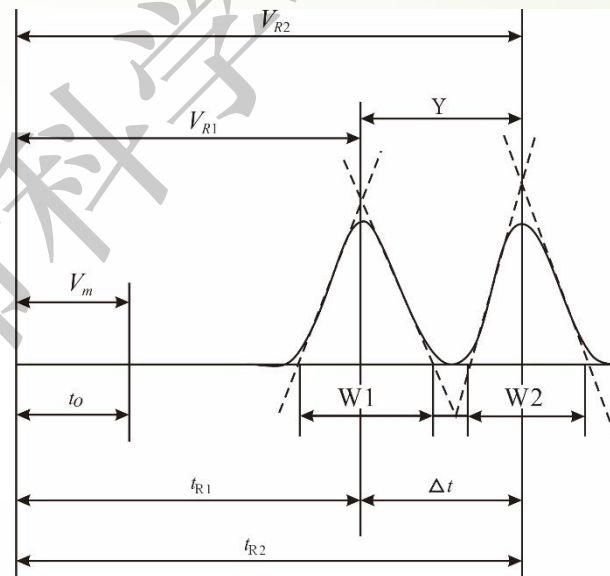
- 分离度 (R_s , resolution) : 相邻2组分的层析峰保留值之差与峰底宽总和1/2的比值, 也称分辨率。
- 分离度是用来判断相邻2个洗脱峰组分在层析柱内的分开程度, 衡量层析柱分离总效能的综合指标。



分离度计算法

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2} (W_1 + W_2)} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

$$R_s = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{\frac{1}{2} (W_1 + W_2)} = \frac{2Y}{W_1 + W_2}$$



- t_{R1} 和 V_{R1} : 组分1从进样点至对应的洗脱峰尖之间所需要的保留时间和保留体积。
- t_{R2} 和 V_{R2} : 组分2从进样点至对应的洗脱峰尖之间所需要的保留时间和保留体积。
- W_1 : 组分1对应的洗脱峰宽度。
- W_2 : 组分2对应的洗脱峰宽度。

分离度 R_s 的意义

- $R_s < 0.8$: 2个峰未达到分离要求。
- $R_s < 1$: 2个峰有部分重叠。
- $R_s = 1$: 2个峰基本分开, 可达到98%分离。
- $R_s = 1.5$: 2个峰完全分开, 可达到99.7%的分离。
- 通常用 $R_s = 1.5$ 作为相邻2个层析峰达到完全分离的指标。
- R_s 值越大, 2个峰分得越开, 分离效果越好。

层析技术分类

根据流动相的形式分类

- 1) 液相层析

以液体为流动相的层析方法，称为液相层析 (liquid chromatograph, LC)。根据固定相的状态，可分为液—液层析和液—固层析。

- 2) 气相层析

以气体为流动相的层析方法，称为气相层析 (gas chromatograph, GC)。根据固定相的状态，可分为气—液层析和气—固层析。

生物化学实验及科研中最常用到的是液相层析中的液-固层析

层析技术分类

根据分离原理不同分类

分离原理	层析方法
分子的大小	凝胶过滤层析
分子的电荷	离子交换层析
生物大分子与配基专一性的亲和作用	亲和层析
分子表面疏水结构	疏水层析、反相层析
吸附力不同	吸附层析
各物质在两液相间的分配系数不同	分配层析

层析方法分类

根据实验操作压力大小分类

分类	操作压力
低压	$< 0.5 \text{ MPa}$
中压	$0.5 \sim 5 \text{ MPa}$ 之间
高压	$5 \sim 40 \text{ MPa}$ 之间
超高压	$> 40 \text{ MPa}$ 之间