



# 生物化学实验

## 层析技术

### 4.3 离子交换层析

北京大学 王青松 胡晓倩

# 概述

- 离子交换层析 (Ion Exchange Chromatography, IEC) 是利用固定相上的离子交换基团和流动相中的离子化合物之间发生可逆的离子交换反应而进行层析分离的方法。
- 离子交换层析具有分辨率高、工作容量大、分析速度快且易于操作等优点，广泛应用于很多生化物质如氨基酸、多肽、蛋白质、糖类、核苷酸等的分离纯化。

# 基本原理

- 离子交换层析是用离子交换剂（具有离子交换性能的物质）作固定相，利用它与流动相中被分离的各种离子间的亲和力不同，经过可逆的交换平衡达到分离的目的。
- 离子交换剂是在一种高分子的不溶性固相载体上引入具有活性的离子交换基团，这些基团与溶液中相同电荷的基团能进行可逆的交换反应。
- 假定以RA代表阳离子交换剂，在溶液中其可解离出阳离子A<sup>+</sup>与溶液中阳离子B<sup>+</sup>发生可逆的交换反应。



# 平衡常数K

- 离子交换剂对溶液中不同离子具有不同的结合力，结合力的大小取决于离子交换剂的选择性。离子交换剂的选择性可用其反应的**平衡常数K**表示。
- 平衡常数K：是一定条件下，吸附在离子交换介质上离子的量与溶液中游离离子的量达到平衡时，二者物质的质量之比。

$$K = [RB][A^+]/[RA][B^+]$$

- 如果溶液中 $[A^+]$ 等于 $[B^+]$ ，则： $K = [RB]/[RA]$ 
  - $K > 1$ ， $[RB] > [RA]$ ，表示离子交换剂对 $B^+$ 的结合力大于 $A^+$ ；
  - $K = 1$ ，即 $[RB] = [RA]$ ，表示离子交换剂对 $A^+$ 和 $B^+$ 的结合力相同；
  - $K < 1$ ，即 $[RB] < [RA]$ ，表示离子交换剂对 $B^+$ 的结合力小于 $A^+$ 。

# 离子交换剂

- 离子交换剂：主要由**惰性载体和离子交换基团**组成。
- 载体：高分子化合物聚合而成的球形颗粒或多糖类化合物交联成的颗粒。
- 离子交换基团：容易解离的酸性或碱性基团（电荷基团+反离子）。



基 质

电荷基团

+

反离子

离子交换基团

# 载体性质与分类

## ● 载体性质

- 良好的亲水性、水不溶性
- 较好的化学稳定性
- 较多的易被活化的基团
- 疏松、多孔的网状结构

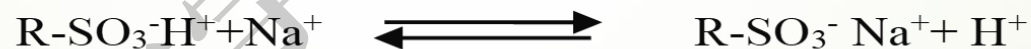
## ● 载体分类

- 疏水性的载体：聚苯乙烯树脂
- 亲水性的载体：纤维素、琼脂糖凝胶、交联葡聚糖凝胶等

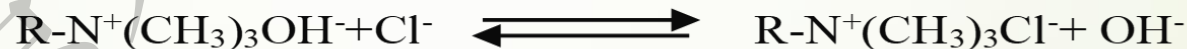
# 离子交换基团

- 离子交换基团：容易解离的酸性或碱性基团。
- 酸性基团：为阳离子交换剂，平衡离子带正电荷。有磺酸基-SO<sub>3</sub>H、羧基-COOH
- 碱性基团：为阴离子交换剂，平衡离子带负电荷。有季胺、叔胺、仲胺、伯胺

阳离子交换反应：



阴离子交换反应：



# 离子交换树脂的分类

根据离子交换基团可分为：

分类	活性基团
强酸性阳离子交换树脂	$-\text{SO}_3\text{H}$ (磺酸基) 和 $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ (次甲基磺酸基)
弱酸性阳离子交换树脂	$-\text{COOH}$ 、 $-\text{OCH}_2\text{COOH}$ 等弱酸性基团
强碱性阴离子交换树脂	季胺基团
弱碱性阴离子交换树脂	伯胺或仲胺基团 (碱性较弱)



# 离子交换剂的交换容量

- **交换容量：**是表示树脂交换能力大小的指标，通常指单位质量或单位体积树脂所含有可交换一价离子基团的量。用mmol/g（干树脂）、mmol/mL（湿树脂）表示。
- **总交换容量：**为理论交换容量，是树脂交换基团中所有交换离子全部被交换的交换容量，它只和离子交换剂本身的性质有关。
- **有效交换容量：**实际使用时树脂所具有的交换容量，与实验条件有很大的关系，一般未经说明都是指有效交换容量。

# 离子交换层析的实验操作

1. 离子交换剂  
及缓冲液选择

2. 装柱、平衡

3. 上样、吸附

4. 洗脱

5. 离子交换树脂  
的再生/保存

# 离子交换剂的选择

- 离子交换剂的选择：根据被分离物质的性质，选择对目的分离物各组分之间结合力差异大的交换剂。
- 两性离子如蛋白质、核苷酸、氨基酸等与离子交换剂的结合力，主要决定于它们的理化性质和特定的条件下呈现的离子状态。
- 根据被分离物质在溶液中的解离度及解离后离子所带电荷的性质选择使用离子交换层析介质的类型。
  - 缓冲液pH > 生物大分子等电点时，分子带负电荷，选择阴离子交换剂
  - 缓冲液pH < 生物大分子等电点时，分子带正电荷，选择阳离子交换剂

# 缓冲液的选择

有利于样品的  
稳定，避免使  
样品变性

有利于样品的  
吸附和洗脱

有利于样品的  
后处理

考虑溶剂毒性  
和热源问题  
(制药和食品  
生产)

# 缓冲液配制需考虑的因素

- **缓冲容量及浓度：**高浓度缓冲液影响吸附能力。缓冲能力能满足的情况下，缓冲液浓度尽量降低。
- **pH：**缓冲液的pH尽量远离样品的等电点，有利于样品的解离，形成离子化合物。
- **离子强度：**尽可能低的离子强度，利于样品与介质交换基团的交换反应。
- **保护剂：**加入抗氧化剂、糖类等，保护样品的性质与生物活性。

### 3. 上样、吸附

- **上样量**：根据交换剂的总交换容量来定，通常不超过总交换容量的10~20%。
- **样品溶液浓度**：高浓度样液粘度大，层析时传质速度慢，不利于离子交换反应，交换效率降低，需稀释后上样。
- **离子强度**：一定离子强度有利于抑制杂质的非特异吸附，但离子强度过高会影响介质吸附溶质。
- **上样流速**：取决于样品浓度、粘度、解离度及分子大小。一般，低浓度样品流速快，缩短上样时间；高浓度样品流速宜慢，有利于提高离子交换效率。

## 4. 洗 脱

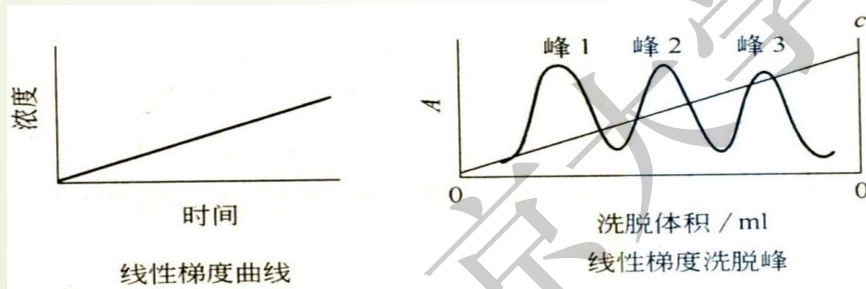
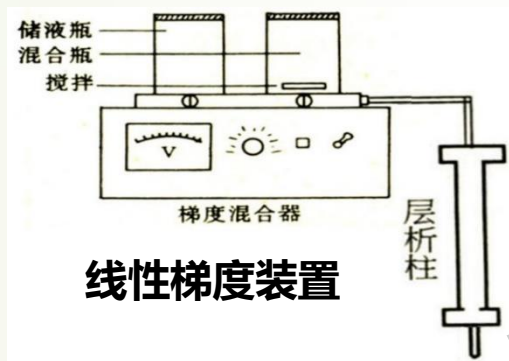
- **原则：**对分离不同物质所用洗脱液不同，原则是洗脱液有更活泼的离子把树脂上吸附物洗脱出来，主要通过**改变pH及离子强度**实现。
- **常用洗脱剂**
  - **酸、碱洗脱液：**通过改变吸附物的电荷或改变树脂吸附基团的解离状态，以消除静电结合力，使目的物被释放出来。
  - **盐类洗脱液：**通过高浓度的同种电荷的盐离子与目的物竞争树脂上的活性基团，使之解离。常用NaCl和KCl。
    - **带电荷量少，亲和力小：**先被洗脱下来
    - **带电荷量多，亲和力大：**后被洗脱下来

# 洗脱方式

- **一步洗脱**：是针对离子交换柱**吸附的组分较单一**时使用，用一种浓度的洗脱剂即可进行洗脱；
- **分步洗脱**：是在离子交换柱中吸附着两种以上吸附能力有较大差异的组分，采用不同浓度或不同种类的洗脱剂进行洗脱，适用于**吸附数量较少、分离度差别较大的组分**；
- **梯度洗脱（常用）**：是在离子交换柱中吸附着多种吸附能力具有一定的差异的组分，采用浓度连续变化的洗脱剂进行洗脱，适用于**吸附数量较多、分离度差别较小、用前两种方法难以分离的组分**。梯度洗脱最常见的方式为线性梯度洗脱。



# 梯度洗脱装置与洗脱曲线



- **梯度洗脱装置（梯度混合器）：**由2个相通的圆筒容器和1个磁力搅拌器组成。
  - 第1个容器为混合瓶：装有起始缓冲液；
  - 第2个容器为储液瓶：装有等量的、含较高离子强度或不同pH的上限缓冲液。

# 离子交换树脂的再生及保存

- **再生：**使用过的离子交换树脂重新具有交换能力的过程。
  - 酸性阳离子树脂：酸-碱-酸-缓冲溶液洗涤。
  - 碱性阴离子树脂：碱-酸-碱-缓冲溶液洗涤。
- **保存**
  - 用过的树脂须再生后保存，酸碱处理后，用水充分洗涤干净，成中性盐型保存。
  - 低温密封保存，防止干燥、长菌，**不要冷冻保存。**
  - 长期保存可加入适量防腐剂保存。

# 离子交换层析的应用

1. 除去离子：制备去离子水

2. 改变成分：如钾型离子交换剂可将青霉素钠盐变成钾盐

3. 浓缩与提取：低浓度生物活性物质的浓缩；微量金属的回收

4. 生物分子的分离纯化：纯化蛋白质、核酸、氨基酸等

5. 测定蛋白质的等电点

6. 抗生素的分离