

中药鉴别：凝胶色谱法简介 PDF转换可能丢失图片或格式，
建议阅读原文

https://www.100test.com/kao_ti2020/275/2021_2022__E4_B8_AD_E8_8D_AF_E9_89_B4_E5_c67_275631.htm 【全文】

凝胶色谱技术是六十年代初发展起来的一种快速而又简单的分离分技术，由于设备简单、操作方便，不需要有机溶剂，对高分子物质有很高的分离效果。目前已经被生物化学、分子生物学、生物工程学、分子免疫学以及医学等有关领域广泛采用，不但应用于科学实验研究，而且已经大规模地用于工业生产。

一、基本理论（一）分子筛效益 一个含有各种分子的样品溶液缓慢地流经凝胶色谱柱时，各分子在柱内同时进行着两种不同的运动：垂直向下的移动和无定向的扩散运动。大分子物质由于直径较大，不易进入凝胶颗粒的微孔，而只能分布颗粒之间，所以在洗脱时向下移动的速度较快。小分子物质除了可在凝胶颗粒间隙中扩散外，还可以进入凝胶颗粒的微孔中，即进入凝胶相内，在向下移动的过程中，从一个凝胶内扩散到颗粒间隙后再进入另一凝胶颗粒，如此不断地进入和扩散，小分子物质的下移速度落后于大分子物质，从而使样品中分子大的先流出色谱柱，中等分子的后流出，分子最小的最后流出，这种现象叫分子筛效应。具有多孔的凝胶就是分子筛。各种分子筛的孔隙大小分布有一定范围，有最大极限和最小极限。分子直径比凝胶最大孔隙直径大的，就会全部被排阻在凝胶颗粒之外，这种情况叫全排阻。两种全排阻的分子即使大小不同，也不能有分离效果。直径比凝胶最小孔直径小的分子能进入凝胶的全部孔隙。如果两种分子都能全部进入凝胶孔隙，即使它们的大小有差别，也不会有

好的分离效果。因此，一定的分子筛有它一定的使用范围。综上所述，在凝胶色谱中会有三种情况，一是分子很小，能进入分子筛全部的内孔隙；二是分子很大，完全不能进入凝胶的任何内孔隙；三是分子大小适中，能进入凝胶的内孔隙中孔径大小相应的部分。大、中、小三类分子彼此间较易分开，但每种凝胶分离范围之外的分子，在不改变凝胶种类的情况下是很难分离的。对于分子大小不同，但同属于凝胶分离范围内各种分子，在凝胶床中的分布情况是不同的：分子较大的只能进入孔径较大的那一部分凝胶孔隙内，而分子的可进入较多的凝胶颗粒内，这样分子较大的在凝胶床内移动距离较短，分子较小的移动距离较长。于是分子较大的先通过凝胶床而分子较小的后通过凝胶床，这样就利用分子筛可将分子量不同的物质分离。另外，凝胶本身具有三维网状结构，大的分子在通过这种网状结构上的孔隙时阻力较大，小分子通过时阻力较小。分子量大小不同的多种成份在通过凝胶床时，按照分子量大小“排队”，凝胶表现分子筛效应。

(二) 色谱柱的重要参数

柱体积：柱体积是指凝胶装柱后，从柱的底板到凝胶沉积表面的体积。在色谱柱中充满凝胶的部分称为凝胶床，因引柱体积又称“床”体积，常用 V_t 表示。

外水体积：色谱柱内凝胶颗粒间隙，这部分体积称外水体积，亦称间隙体积，常用 V_o 表示。

内水体积：因为凝胶为三维网状结构，颗粒内部仍有空间，液体可进入颗粒内部，这就分间隙的总和为内水体积，又称定相体积，常用 V_i 表示。不包括固体支持物的体积（ V_g ）。

峰洗脱体积：是指被分离物质通过凝胶柱所需洗脱液有体积，常用 V_e 表示。当使用样品的体积很少时，（与洗脱体积比较可以忽略不计）

，在洗脱图中，从加样到峰顶位置所用洗脱液体积为 V_e 。当样品体积与洗脱体积比较不能忽略时，洗脱体积计算可以从样品体积的一半到峰顶位置。当样品很大时，洗脱体积计算可以从应用样品开始到洗脱峰升高的弯曲点（或半高处）。

二、凝胶的种类及性质（一）交联葡聚糖凝胶（Sephadex）

Sephadex G交联葡聚糖的商品名为Sephndex，不同规格型号的葡聚糖用英文字母G表示，G后面的阿拉伯数为凝胶得水值的10倍。例如，G-25为每克凝胶膨胀时吸水2.5克，同样G-200克每克干胶吸水20克。交联葡聚糖凝胶的种类有G-10，G-15，G-25，G-50，G-75，G-100，G-150，和G-200。因此，“G”反映，凝胶的交联程度，膨胀程度及分部范围。

Sephadex LH-20，是 Sephadex G-25的羧丙基衍生物，能溶于水及亲脂溶剂，用于分离不溶于水的物质。（二）琼脂糖凝胶：

商品名很多，常见的有，Sepharose（瑞典，pharmacia），Bio-Gel-A（美国Bio-Rad）等。琼脂糖凝胶是依靠糖链之间的次级链如氢键来维持网状结构，网状结构的疏密依靠琼脂糖的浓度。一般情况下，它的结构是稳定的，可以在许多条件下使用（如水，pH4-9范围内的盐溶液）。琼脂糖凝胶在40℃以上开始融化，也不能高压消毒，可用化学灭菌活处理。（三）聚丙烯酰胺凝胶：是一种人工合成凝胶，是以丙烯酰胺为单位，由甲叉双丙烯酰胺交联成的，经干燥粉碎或加工成形制成粒状，控制交联剂的用量可制成各种型号的凝胶。交联剂越多，孔隙越小。聚丙烯酰胺凝胶的商品为生物胶-P（Bio-Gel P），由美国Bio-Rod厂生产，型号很多，从P-2至P-300共10种，P后面的数字再乘1000就相当于该凝胶的排阻限度。（四）聚苯乙烯凝胶商品为Styrogel，

具有大网孔结构，可用于分离分子量1600到40,000,000的生物大分子，适用于有机多聚物，分子量测定和脂溶性天然物的分级，凝胶机械强度好，洗脱剂可用甲基亚砷。

三、实验技术

(一) 层析柱

层析柱是凝胶层析技术中的主体，一般用玻璃管或有机玻璃管。层析柱的直径大小不影响分离度，样品用量大，可加大柱的直径，一般制备用凝胶柱，直径大于2厘米，但在加样时应将样品均匀分布于凝胶柱床面上。此外，直径加大，洗脱液体体积增大，样品稀释度大。分离度取决于柱高，为分离不同组分，凝胶柱床必须有适宜的高度，分离度与柱高的平方根相关，但由于软凝胶柱过高挤压变形阻塞，一般不超过1米。分族分离时用短柱，一般凝胶柱长20-30厘米，柱高与直径的比较5:1 10:1，凝胶床体积为样品溶液体积的4-10倍。分级分离时柱高与直径之比为20:1

100:1，常用凝胶柱有50amp.times.25厘米。层析柱滤板下的死体积应尽可能的小，如果支撑滤板下的死体积大，被分离组分之间重新混合的可能性就大，其结果是影响洗脱峰形，出现拖尾现象，降低分辨率。在精确分离时，死体积不能超过总床体积的1/1000。

(二) 凝胶的选择

根据所需凝胶体积，估计所需干胶的量。一般葡聚糖凝胶吸水后的凝胶体积约为其吸水量的2倍，例如Sephadex G-20的吸水量为20，1克Sephadex G 200吸水后形成的凝胶体积约40ml。凝胶的粒度也可影响层析分离效果。粒度细胞分离效果好，但阻力大，流速慢。一般实验室分离蛋白质采用100-200号筛目的的Sephadex G-200效果好，脱盐用Sephadex G-25、G-50，用粗粒，短柱，流速快。

(三) 凝胶的制备

商品凝胶是干燥的颗粒使用前需直接在欲使用的洗脱液中膨胀。为了加速膨胀

，可用加热法，即在沸水浴中将湿凝胶逐渐升温至近沸，这样可大大中速膨胀，通常在1-2小时内即可完成。特别是在使用软胶时，自然膨胀需24小时至数天，而用加热法在几小时内就可完成。这种方法不但节约时间，而且还可消毒，除去凝胶中污染的细菌和排除胶内的空气。（四）样品溶液的处理 样品溶液如有沉淀应过滤或离心除去，如含脂类可高速离心或通过Sephadex G-15短柱除去。样品的粘度不可大，含蛋白为超过4%，粘度高影响分离效果。上柱样品液的体积根据凝胶床体积的分离要求确定。分离蛋白质样品的体积为凝胶床的1-4%（一般约0.5-2ml），进行分族分离时样品液可为凝胶床的10%，在蛋白质溶液除盐时，样品可达凝胶床的20-30%。分级分离样品体积要小，使样品层尽可能窄，洗脱出的峰形较好。（五）防止微生物的污染 交联葡聚糖和琼脂糖都是多糖类物质，防止微生物的生长，在凝胶层析中十分重要，常用的抑菌剂有：叠氮钠（ NaN_3 ）在凝胶层析中只要用0.02%叠氮钠已足够防止微生物的生长，叠氮钠易溶于水，在20℃时约为40%；它不与蛋白质或碳水化合物相互作用，因此叠氮钠不影响抗体活力；不会改变蛋白质和碳水化合物的层析特性。叠氮钠可干扰荧光标记蛋白质。 可乐酮[$\text{Cl}_3\text{C}-\text{C}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$]在凝胶层析中使用浓度为0.01-0.02%。在微酸性溶液中它的杀菌效果最佳，在强碱性溶液中或温度高于60℃时易引起分解而失效。 乙基汞代巯基水杨酸钠在凝胶层析中作为抑菌剂使用浓度为0.05-0.01%。在微酸性溶液中最为有效。重金属离子可使乙基代巯基的物质结合，因而包含巯基的蛋白质可在不同程度上降低它的抑菌效果。

苯基汞代盐 在凝胶层析中使用浓度为0.001-0.01%。在微碱

性溶液中抑效果最佳，长时间放置时可与卤素、硝酸根离子作用而产生沉淀；还原剂可引起此化合物分解；含巯基的物质亦可降低或抑制它的抑菌作用。 100Test 下载频道开通，各类考试题目直接下载。详细请访问 www.100test.com