

离子交换层析原理

离子交换层析 (ion-exchange chromatography, IEC) 是利用离子交换剂为固定相, 根据荷电溶质与离子交换剂之间静电相互作用力的差别进行溶质分离的洗脱层析法。它是发展最早的层析技术之一, 也是目前蛋白质分离纯化中最常用的方法, 大约占了 75% 的比例。

离子交换层析具有许多的特点, 包括:

- (1) 分辨率高, 合适的离子交换介质对蛋白质等生物分子具有较高的选择性;
- (2) 料液处理量大, 具有浓缩作用, 可在较高流速下操作;
- (3) 应用范围广泛, 优化操作条件后, 可大幅度提高分离的选择性, 所需柱长较短;
- (4) 产品回收率高;
- (5) 商品化的离子交换剂种类多, 选择余地大, 价格也远远低于亲和吸附剂;
- (6) IEC 的操作变量多, 影响分离特性的因素复杂, 虽然增加了优化的机遇, 但也增加了放大的难度。

离子交换层析技术已广泛用于各学科领域。在生物化学及临床生化检验中主要用于分离氨基酸、多肽及蛋白质, 也可用于分离核酸、核苷酸及其它带电荷的生物分子。

1、离子交换层析原理

离子交换介质是由球形基质、表面阴离子或者阳离子功能基团以及与功能基团电荷相反的反离子组成。基质和功能基团是固定不可移动的固定相, 而各种反离子具有竞争关系。蛋白质等生物分子本身具有一定的等电点, 液相的 pH 与 pI 的差异必然引起生物分子表面电荷的改变, 使其带负电荷或者正电荷。因此生物分子与离子交换剂的相互作用首先取决于液相的 pH 值。由于各种分子的等电点不同, 而且蛋白质等表面一般是多价态的。因此同一 pH 下分子的带电情况不同, 最后导致与离子交换介质的作用力也不同, 即生物分子的分配系数有差异。在盐离子存在的情况下, 一方面蛋白质的分配系数对离子强度非常敏感, 离子强度的微小改变, 就会引起分配系数的很大变化; 另一方面, 不同

蛋白质的分配系数变化可能相差很大，有时甚至达到几个数量级。离子交换层析就是利用 pH 值环境、分子之间的分配系数差异以及离子强度的变化，最终达到生物分子之间的分离。如图 1 所示，以阴离子交换为例，两种带负电荷的生物分子（pH 均大于 pI 值）在平衡状态下与交换剂相互作用，通过梯度盐浓度洗脱，依次被洗脱下来而得到分离。

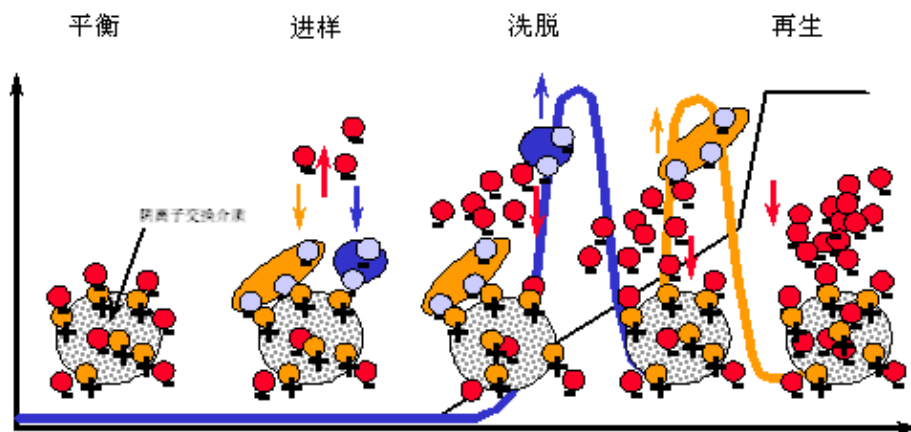


图 1 阴离子交换层析分离蛋白质示意图

不同的生物分子随 pH 的变化带电情况是不同的，因此选择不同的 pH 环境和不同类型的离子交换剂，其分离结果最终是大相径庭的。如图 2，六种分离条件的选择只有其中两种可以将三组蛋白质完全分开。一般来说，酸性条件下选择阳离子交换剂，而碱性条件下则需要选择阴离子交换剂。

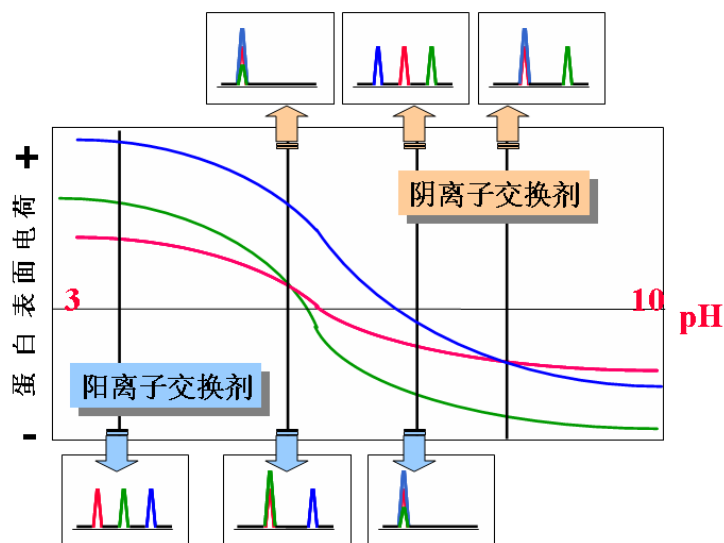


图 2 pH 与分离介质的选择对三组蛋白质分离的影响

2、离子交换平衡

离子交换的实质可以通过方程式表达：



式中 R 表示离子交换剂，X 是交换剂的反离子，即平衡离子，Y 是交换离子。X 和 Y 所带的电荷性质相同，与 R 相反。当 R 带负电，X 和 Y 为正离子时，称为阳离子交换；当 R 带正电，X 和 Y 为负离子时，称为阴离子交换。离子交换是一个平衡反应方程，符合质量作用定律。当反应体系中 Y 离子浓度增加时，平衡向右移动，即发生吸附现象，当加入过量的 X 离子时，平衡向左移动，即发生洗脱现象。

从式 (1) 可以看出，离子交换已不是物理平衡，而属于化学平衡，因此有关离子交换平衡应该按照化学平衡的原理来推导。离子交换平衡基本符合 Langmuir 吸附等温式：

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{K_d + C^*} \quad (2)$$

式中 C^* 为吸附平衡时的交换离子浓度； Q^* 为对应吸附平衡时的吸附量； K_d 为吸附平衡的解离常数； Q_m 为最大吸附容量。

$K_d \gg C^*$ ，即生物分子溶液的浓度不高时，上面方程就简化为线性方程，可用于实际计算中。

$$Q^* = m(I) \times C^* \quad (4.26)$$

其中 $m(I)$ 为分配系数，通过如下公式计算：

$$m(I) = \frac{A}{I^B} + m_\infty \quad (4.27)$$

I 为流动相的离子强度， A 和 B 为常数， m_∞ 为离子强度无限大时溶质的分配系数。对于不同的溶质，常数 A 、 B 不同，表现在离子交换剂上的分配行为不同。

3、离子交换层析的介质

离子交换介质是离子交换层析的核心，很大程度上决定了生物分子的分离效果。如前所述，离子交换介质的结构主要是球形基质、表面功能基团以及与功能基团电荷相反的反离子组成。

(1) 基质

离子交换的基质是一类水不溶性的有机或无机材料。理想的基质需要满足以下几个条件：①基质表面的亲水性，生物分子一般是在水溶液中进行离子交换，这就要求离子交换介质具有相溶性；②适合功能基团的接合，表面应该具有一定的可活化的活性基团；③化学稳定性，耐强酸、强碱，能够在有机溶剂和去污剂中保持稳定；④较强的机械强度，适应一定的流速和压强；⑤一般为球形状态。

常用的基质材料是天然高分子类材料。天然高分子材料的离子交换基质主要指天然高分子多糖类，包括葡聚糖、纤维素和琼脂糖。他们亲水性和生物相容性好，可供活化的基团（主要是羟基）密度高，制成球形颗粒后孔径大，比表面积大，化学性质稳定，因此广泛的应用到生物分子的离子交换层析中。这类离子交换基质实质上可以借用凝胶层析介质，接上一定的功能基团即可。

(2) 离子交换功能基团

离子交换剂表面的功能基团决定了交换剂的基本性质，也决定了交换剂的交换强弱和交换容量。功能基团可以分为两类，即阳离子交换基团（酸性功能基团）和阴离子交换基团（碱性功能基团）。阳离子交换基团的 pK_a 值低于中性 pH 值，而阴离子交换基团的 pK_a 值则高于中性 pH 值。根据 pK_a 值偏离中性 pH 值的层度，又可以将离子交换剂分为强弱两种性质，偏离越大则越强，靠近中性则越弱。一般常用的强酸型功能基团为磺酸基，弱酸型基团为羧酸基，强碱型基团为季铵基，弱碱型基团为氨基。

4、离子交换层析过程

(1) 离子交换介质的选择

离子交换剂种类繁多，性质各异，因此必须根据实际分离的情况进行选择。主要的选择依据是应用对象的特殊要求。包括层析操作模式、目标分辨率、可放大性和经济效益。

首先在进行离子交换层析的同时，操作模式是一个首先考虑的内容。操作模式主要指的是进行离子交换的方式，如固定柱床层析、扩张床层析和分批分离吸附洗脱。一般实验室小规模分析和分离采用常规的固定床柱层析，选择介质时也应该选择适合实验室柱层析用的介质，如 Sepharose Fast Flow 系列。大规模工业化生产进行初分离时，有时候需要用到扩张床离子交换，这是可以选择扩张床介质，如 Amersham 公司的 Streamline 系列、pall 公司的 Hyperz 系列。分批分离时，基质类型就没有太多的要求，只要吸附容量大即可。

目标分辨率是很重要的参考因素。每一种生物产品在从原料到纯品的过程中不能一步到位，都要经过预处理、初分离、精致等好几个步骤，每一个步骤料液的组成都有自己的特点，因此不同的分离阶段所采用的交换剂可能不完全一样。离子交换的分辨率取决于介质的选择性和自身的理化性质。选择介质时主要的参考指标是交换剂的交换基团、交换容量和孔道性质。只要带有净的相反电荷就可进行离子交换，这种离子间的连接是静电吸引和可逆的。对于既带有正电又带有负电的两性物质，其净电荷取决于环境的 pH。所选择的功能基团对目标生物分子和杂质的吸附性质应尽量不同，通过酸碱强弱的选择和后面的层析条件的确定一般可以接近此目标。高交换容量是分离效率的重要保证，样品组分对带电基团的接受能力将决定离子交换剂与物质交换的有效容量。交换剂的孔道性能也会影响介质的有效交换容量，几乎所有的离子交换剂都有分子量的限制。如果目标分子不能进入介质的孔道，有效交换容量会大大的降低，因此对于大分子生物分子一般采用孔径较大的交换介质。在选择离子交换剂时，不必考虑样品的凝胶过滤效应，此时静电吸附已经占了主导作用力。

工业生产中，离子交换层析首先是在小规模实验装置中寻找出优化条件，然后再用于大规模分离，因此，选择的离子交换剂要能简单和方便地用于规模较大的柱。生产中又需要交换介质具有一定的再生产能力，在经过分离阶段和再生阶段后，层析柱特性应保持不变。一般而言，介质的刚性越好，床层受 pH 值、离子强度的影响就越小，就可以经受多次清洗和再生，再生产能力就更强。

离子交换操作也要考虑其经济性，包括了设备成本、原料成本和操作成本。离子交换剂的使用量和使用次数是一个主要因素。要避免离子交换剂被使用一次就失效的柱层析操作，同时也要避免离子交换剂用量很大的层析，这在经济上不合算。

(2) 层析条件的选择

在离子交换层析前，首先要确定起始的层析条件，这包括确定起始 pH 值的确定、介质强弱的确定和缓冲液性质的确定

起始 pH 的选择是为了使目标物质带电，生物分子是在在等电点的 ± 0.5 pH 单位时开始离解的。使用阳离子交换剂时 pH 值应该比生物分子的等电点至少低 1 个单位，而使用阴离子交换剂时应该至少高 1 个单位。如果样品的等电点未知，最好事先做一个简单实验来确定起始 pH 值。确定起始 pH 的步骤如下：①选择 5-10 个 15 mL 的试管，加入 1ml 离子交换介质；②用 10mL 0.5M 缓冲液清洗每一个试管中的离子交换剂 10 次，使其在不同的 pH 下平衡，对于阴离子交换剂 pH 范围为 5-9，阳离子交换剂 pH 范围为 4-8，每个试管之间的间隔为 0.5 pH 单位；③在低离子强度用 10mL 相同的 pH，但是离子强度要低的缓冲液清洗 5 次，再次平衡离子交换剂；④在每个试管中加入定量的样品，混合 5-10 min，让离子交换剂沉下来；⑤分析上清液中目标物质的含量。图 4.36 所示的试管中，pH 值在 7.5 时刚好吸附完全，因此起始 pH 值可以定为 7.5。

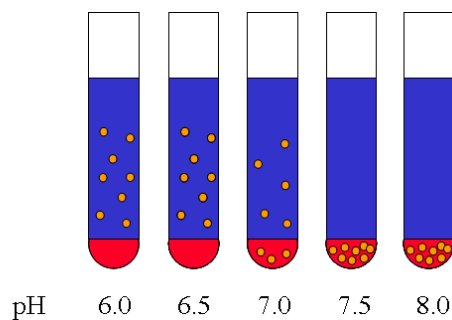


图 3 起始 pH 值的确定

在选择了一个合适的起始 pH，不管是阴离子还是阳离子交换剂，还必须确定强和弱离子交换基团。在最大分辨率出现在极端 pH、而且要得到的物质在该 pH 下也能适应的话，很清楚就可使用强交换离子基团。而大多数蛋白质的等电点都是在 5.5 - 7.5，因此分离既可用强离子也可用弱离子交换剂，但是一般弱离子功能基团对于不同蛋白的吸附和洗脱性能差异大，所以考虑到分辨率多使用弱离子交换基团。

缓冲液的选择主要是缓冲液 pH 和离子强度的选择，常用的如磷酸缓冲液、乙酸-乙酸钠缓冲液、Tris-HCl 缓冲液等在层析 pH 范围内的缓冲液均能满足一般的需要。通常缓冲液的离子浓度不超过 0.05M，以免引起吸附容量的下降。工业化大规模生产时一般还要考虑缓冲液的价格问题。

(3) 预处理与装柱

以柱层析为例，装柱的方法基本与体积排阻层析相同。（见体积排阻层析章节）装柱前需要对离子交换介质进行一定的处理。对于离子交换纤维素要用流水洗去少量碎的不易沉淀的颗粒，以保证有较好的均匀度，对于已溶胀好的产品则不必经这一步骤。溶胀的交换剂使用前要用稀酸或稀碱处理，使之成为带 H^+ 或 OH^- 的交换剂型。阴离子交换剂常用“碱-酸-碱”处理，使最终转为 OH^- 型或盐型交换剂；对于阳离子交换剂则用“酸-碱-酸”处理，使最终转为 H^+ 型交换剂。

(4) 进样和洗脱

对于固定柱床离子交换层析，样品中的不溶物应在上样前用离心或者过滤的方法除去。样品溶液应与起始缓冲液有相同的 pH 和离子强度，所选定的 pH 值应落在交换剂与被结合物有相反电荷的范围，同时要确保离子强度较低，如果溶液中含有较高的盐类，可用透析、凝胶过滤或稀释法降低离子强度。为了达到满意的分离效果，上样量要适当，不要超过柱的负荷能力。柱的负荷能力可用交换容量来推算，通常上样量为交换剂交换总量的 1-5%。

在洗脱时，使用常规方法洗脱，即离子浓度恒定不变的洗脱方法，其洗脱体积相差很大，甚至使一些分配系数较大的蛋白质很难洗脱，造成洗脱剂的量大量消耗和洗脱时间的大幅度增加。一般采用

流动相离子强度线性增大的线性梯度洗脱法(linear gradient elution)和离子强度阶跃增大的分步(阶跃)洗脱法(stepwise elution)。

在线性梯度洗脱中,流动相的离子强度线性增大,因此溶质的分配系数连续降低、移动速度逐渐增大,使恒定洗脱条件下难于洗脱的溶质可以在较小的流动相体积下洗脱。通过改变流动相离子强度的增加速度(浓度梯度),可调整溶质的洗脱体积,即溶质洗脱峰之间的距离,在改善分离度的同时,缩短洗脱时间。

分步洗脱过程中,流动相的离子强度阶跃增大,因此,溶质的分配系数的降低和移动速度的增大也是阶段式的。如果流动相离子强度的阶跃速度很快,分步洗脱就接近了线性梯度洗脱;反之则接近恒定洗脱。所以说分步洗脱介于恒定洗脱和线性梯度洗脱之间的一种洗脱法。

总体来说,最好的洗脱方法是连续梯度洗脱。洗脱时,采用连续混合无盐和高盐两个管路,通过调节两管路的流速来调节混合液的离子强度,这样最终流入柱中的缓冲液的洗脱能力即成梯度变化。

洗脱时应满足以下要求:①洗脱液体积应足够大,一般要几十倍于床体积,从而使分离的各峰不致于太拥挤。②梯度的上限要足够高,使紧密吸附的物质能被洗脱下来。③梯度不要上升太快,要恰好使移动的区域在快到柱末端时达到解吸状态。目的物的过早解吸,会引起区带扩散;而目的物的过晚解吸会使峰形过宽。

洗脱液的收集一般是按照一定体积逐管进行,然后进行组成的分析,最后相同组分进行合并。分析时依目的物的不同可采用适宜的检测方法,如电泳、生物活性测定、免疫学测定等。

(5) 清洗和再生

离子交换剂可直接在柱上再生。清洗液可用 1mol/L NaOH 和 1mol/L NaCl。若有脂溶性物质则可用非离子型去污剂洗柱后再生,也可用乙醇洗涤,其顺序为:1mol/L NaOH-水-乙醇-水-20%NaOH-水。保存离子交换剂时要加防腐剂。对阴离子交换剂宜用 0.002%氯己定(洗必泰),阳离子交换剂可用乙基硫柳汞(0.005%)。有些产品建议用 0.02%叠氮钠。