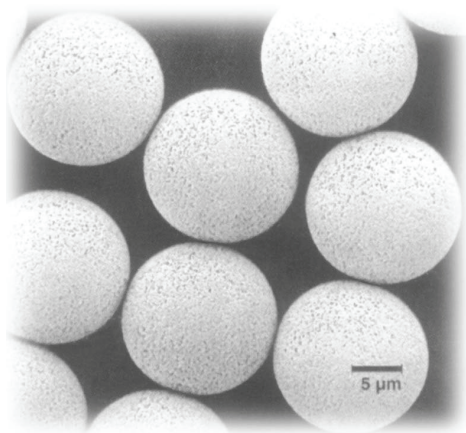


H&E
High quality & Expert

树脂和填料操作手册

(2011)



北京慧德易科技有限责任公司

前 言

近年来，从有机体（植物、动物、生物）中寻找具有生物活性化合物的工作日益受到人们的关注，特别是医药界。研究人员竭力运用高效的筛选方法，试图从植物、海洋生物及微生物中发现新的先导化合物和药物成分。人们只有将新的有效成份纯化之后才能进一步利用谱学技术鉴定其化学结构，测定其理化性质和生物活性，同时提供其作为制药原料、标准品或者合成工作的起始原料。分离纯化技术是其中的核心，从一个粗提物中获得纯的化合物通常需经过许多纯化步骤，这些步骤烦琐、耗时，且花费较大。研究人员一般需要综合运用多种分离纯化手段，开发一个快速、有效的分离方法以分离目标化合物。

为此，人们开发出了各种应用于天然产物及生物制药的树脂、填料和凝胶，以及适合这类填料的层析和制备系统。面对众多的分离介质，研究人员一般通过参考国内外众多文献以帮助选型，但是涉及分离过程的操作细节往往轻描淡写，无法复现文献的结果或者走了许多弯路。

北京慧德易科技有限责任公司作为全国最大的天然产物和生物制药分离、纯化、分析耗材和设备供应商，一直致力于向广大的研究人员和生产厂商提供世界上最先进的从实验室到工业化生产全过程所需的分离设备和耗材，并解决他们在分离纯化的生产放大的过程中所遇到的各种问题，为了满足人们对树脂和填料的一般操作的了解的需要，特编辑此手册。

相信研究人员在具体使用过程中可能发现更好的操作方法，希望此书可以起到抛砖引玉的作用，促使大家更多的相互交流使用心得，以此提高国内分离纯化用树脂和填料的应用水平。

2010年11月1日

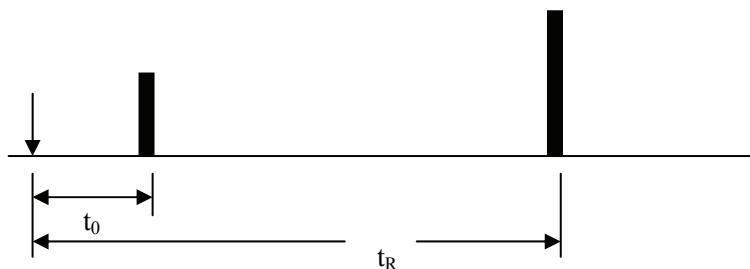
目 录

基本概念	1
样品前处理	8
硅胶基层析柱装填指南	13
Sephadex LH-20 装填指南	18
Toyopearl 凝胶填料装填指南	22
Amberchrom 及 MCI GEL 装填方法	41
大孔吸附树脂处理程序	52
三菱化学大孔吸附树脂试验方法	54

基本概念

1. 保留值

进样



(1) 保留时间“ t_R ”：进样至出峰的时间。

(2) 死时间“ t_0 ”：不被柱子吸附的惰性物质的出峰时间。死时间“ t_0 ”的测定通常是使用不被柱子保留而又有紫外吸收的惰性物质，例如：正相色谱常用四氯化碳，反相色谱常用甲醇、尿嘧啶、 NaNO_2 、 NaNO_3 等。

(3) 容量因子“ k' ”：

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{或：} \quad k' = \frac{\text{溶质在固定相中的量}}{\text{溶质在流动相中的量}}$$

“ k' ”是比“ t_R ”还常用的保留值，它与柱子的大小及流速无关，只与溶质在固定相和流动相的分配性质、柱温以及相空间比（即固定相和流动相之体积比）有关。“ k' ”又定义为在分配平衡时某溶质在两相中绝对量之比，消除了保留值的波动因素，而平衡常数“ K ”是平衡时物质在两相中的浓度比。

k' 值的范围： $0.4 < k' < 20 \sim 30$ $k' = 2 \sim 5$ 为佳，过大则耗时太长。

(4) 保留体积： $V_R = t_R \cdot F_C$ （ F_C --- 流动相的流速 mL/min）


V_R 是在 t_R 时间内流动相流过柱子的体积。

调整保留时间： $t_R' = t_R - t_0$

调整保留体积： $V_R' = V_R - V_0 = t_R' \cdot F_C$

(5) 选择性指标“ α' ”和相对保留值“ α ”

α' 可以更直观和方便地反映色谱峰分离的好坏：

$$\alpha' = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}}$$


相对保留值(分离因子):

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} = \frac{k'_{(2)}}{k'_{(1)}} \quad (\alpha > 1.1 \text{ 为好})$$

分离因子又称为选择因子 α , 其是所用的固定相、流动相和柱温的函数。

为了分离, 选择因子 α 应尽可能大, 以减小纯化难度。同时, 选择因子 α 得到改善, 主峰更容易与杂质峰分离, 这样上样量得到提高而又不影响产品的纯度。

一般而言:

当 $\alpha \geq 2$, 容易分离

当 $\alpha \geq 1.5$, 可以分离, 需要有效填料

当 $\alpha \geq 1.3$, 有难度, 要求有效填料

当 $\alpha \leq 1.3$, 很困难, 需要进一步优化选择因子

通常提高选择因子的方法为:

a: 改变色谱分离类型。

b: 寻找适合的溶剂组成和改良剂。

2. 柱效率:

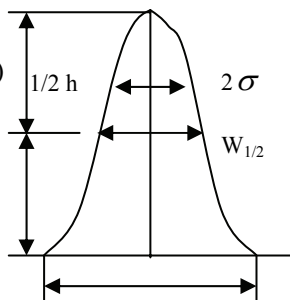
定义: 理论塔板数 $N = 5.54 \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$ (每米柱)

σ —— 标准偏差, 曲线拐点处峰宽的一半
即峰高 0.607 处峰宽的一半

为便于测量, 改用半峰宽:

$$W_{1/2} \text{ (或 } 2 \times \Delta t_{1/2} \text{)}$$

最常用的计算式:



$$N=5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2$$

另一计算式:

$$N=16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2$$

W_b 不如 $W_{1/2}$ 容易测量, 因而此式用的较少。

理论塔板高度: $H=\frac{L}{N}$ L——柱长

经验式:

$$H=2d_p \quad (d_p=10 \mu \quad H=20 \mu \quad N=5 \text{ 万})$$

$$(d_p=5 \mu \quad H=10 \mu \quad N=10 \text{ 万})$$

d_p —— 柱填料的颗粒直径

柱效的测定和计算:

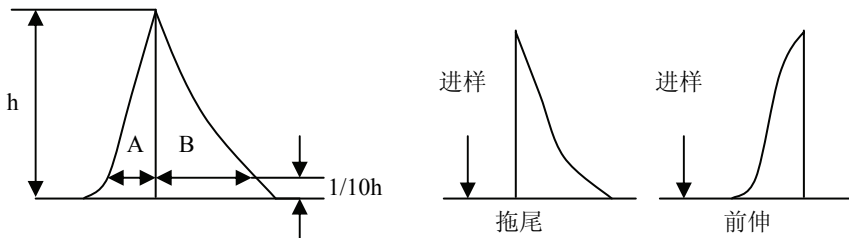
以反相柱为例, 流动相用 87%(V/V)的甲醇:水, 样品用苯、联苯、萘等, 加快记录仪的走纸速度, 测出半峰宽 $W_{1/2}$, 并由走纸速度换算为与 t_R 相同的单位“分”或“秒”, 代入公式, 计算出柱效 N 。

提高柱效的方法: ①固定相填料要均一, 颗粒细, 装填均匀。②流动相粘度低。③低流速。④升高柱温。

当 A,B 两物质无法提高选择因子 α 时, 可以提高柱效, 使色谱峰变尖锐, 从而提高分离度。

3. 不对称因子“ T_f ”:

用于形容色谱峰拖尾和前伸的程度, 多数为拖尾峰。



$$T_f = \frac{B}{A} \quad \text{A、B 如上图所示}$$

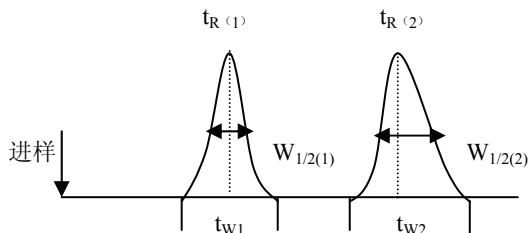
通常 $T_f = 1.2 \sim 1.3$ ，若 $T_f > 2$ 则峰不合格。

峰拖尾的原因是硅胶基质上的 Si-OH 羟基未被全部键合而与溶质发生反应。

改进拖尾要用封尾技术：即用小分子的含甲基的物质再次对硅胶进行键合，封闭硅羟基；还可在流动相中加入带 $-\text{NH}_2$ 氨基（对羟基敏感）的物质，将残余的羟基掩闭。

分辨率：

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{t_{W1} + t_{W2}}$$

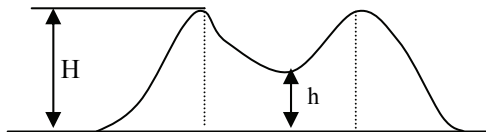


4. 分离度 K_1 和 K_3

HPLC 的目的和要求是：峰要尽可能窄 ($W_{1/2}$ 小)，峰的间距尽可能大 (t_R 相差大)。

(1) 基线分离度 K_1 ：

$$K_1 = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{W_{1/2(2)} - W_{1/2(1)}}$$



基线分离时用 K_1 。

(2) 峰高分离度：

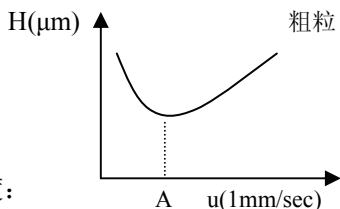
$$K_3 = \frac{H-h}{H}$$

$K_3 = 1$ 基线分离， K_3 更反映了实际分离心度。

5. 线速度：溶剂在柱中移动的速度。

$$u = \frac{L}{t_0} \text{ mm/sec} \quad L - \text{柱长} \quad t_0 - \text{死时间}$$

如右图所示，用实验可找到最佳的线速度：



即图中的 A 点: $u=1 \text{ mm/sec}$

此处不用流量而用线速度, 是因为流量与柱径有关, 而线速度与柱径无关。请记住不同柱内径的最佳流量:

柱内径	流量	线速度
5 mm	1.0 mL/min	1 mm/sec
2 mm	0.2 mL/min	1 mm/sec
1 mm	50 $\mu\text{L}/\text{min}$	1 mm/sec

由 1 mm/sec 最佳线速度可计算出适合各种柱径的最佳流量。

由上表可以看出, 用 5mm 柱, 一天要用一瓶昂贵的乙腈, 若用 1mm 柱, 则一个月才用一瓶。

$$V_{\text{体积}} = S \times V_{\text{线性}} = \pi r^2 V_{\text{线性}}$$

常用已知规格的色谱柱的体积流速换算为线性流速, 用该线性流速大致推算出制备柱的最大体积流速。当然也受填料最大耐受压力的影响。也要考虑系统的硬件条件, 因为流速增大, 柱长增加及小粒度填料的使用会对系统产生相当大的背压。

例如: 我们在 250×4.6 的分析柱上, 我们常使用 1ml/min 的流速, 而在 250×20 的制备柱时体积流速可以扩大至:

$$V_{\text{线性}} = V_{\text{体积}} / S = (1 \text{ ml/min}) / (\pi \times 2.3^2)$$

$$V_{\text{体积}} = S \times V_{\text{线性}} = \pi r^2 V_{\text{线性}} \\ = \pi \times 10^2 (1 \text{ ml/min}) / (\pi \times 2.3^2) = 18.9 \text{ ml/min}$$

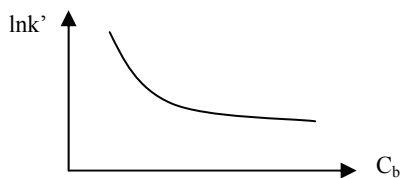
6. 保留值方程:

正相色谱: $\ln k' = a + b \ln C_b + c C_b$ C_b —强冲洗剂浓度

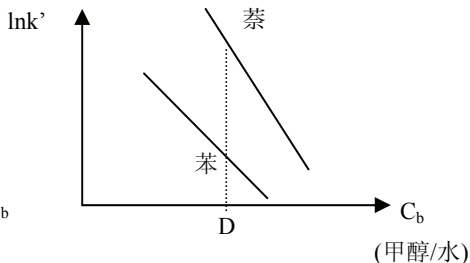
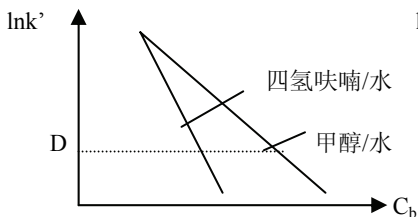
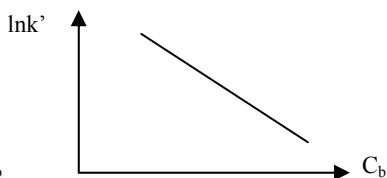
反相色谱: $\ln k' = a + c C_b$ 对于不同溶质 a、b、c 系数不同

离子交换色谱: $\ln k' = a + b \ln C_b$ 反相色谱是线性方程

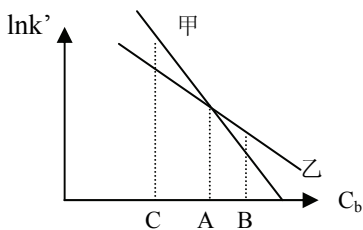
正相色谱:



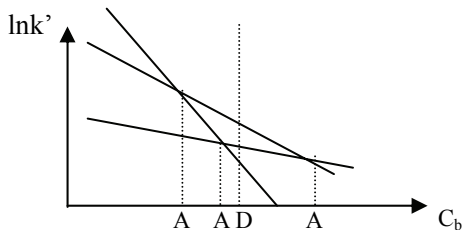
反相色谱:



D点:同样的容量因子, 四氢呋喃用量少

D点:萘非极性, k' 大, 斜率陡

A点甲、乙二溶质分不开, B点比C点冲洗剂浓度高, 但 k' 小, 省时



A点分不开, 要寻找不是交叉点的
D点的 C_b 浓度为分离条件

所以, 改变 C_b 浓度, 保留值 k' 和选择性 α 都改变了, 寻找最佳的 C_b 浓度就是 HPLC 高效液相色谱技术的精髓所在。

例如, 通常用 10%~90% 的甲醇/水, 梯度洗脱 30min, 即可找出适宜的 C_b 浓度。

用高浓度 C_b 洗脱, 可保证先将所有的峰都洗脱出来, 不丢失组份, 然后再调节 C_b 浓度, 找到更好的分离效果, 加大各组份色谱峰的分度。

甲醇降低 10%， k' 可降低 2~3 倍。

7. 纯化的放大

分离的优化通常从小规模制备开始，之后放大到大规模制备柱上。

在制备高压液相中，首先用分析柱对分离进行优化，提高选择因子，降低纯化难度。

当优化条件确定后，在分析柱上进行上样量的研究，以确定特定填料的容量。

如果使用相同的填料且洗脱线流速也相同，大规模分离与小规模分离是等同的。

制备柱的上样量=分析柱的上样量×放大倍数

放大倍数=(制备柱内径/分析柱内径)²×(制备柱长/分析柱长)

同时，最大上样量也取决于样品的复杂程度。

同理，也可依据预期的纯化量，确定制备柱的规格。

以下因素也对上样量有影响：

固定相类型影响上样量

强保留组分有更高的上样量

简单的样品混合物有较高的上样量

流动相 pH 影响碱性/酸性化合物的上样量

有高分离度要求时，要减少上样量

上样体积超载会降低分离度和纯度

注意溶解样品的溶剂。强溶解溶剂将会破坏洗脱过程并降低分离度

样品溶解度影响上样量

8. 放大公式

A 相同的线性流速： $F_2=F_1(r_2/r_1)^2$

B 相同的保留时间： $F_2=F_1 \times (L_2/L_1) \times (r_2/r_1)^2$

C 放大后的上样量： $W_2=W_1 \times (L_2/L_1) \times (r_2/r_1)^2$

其中：L 为色谱柱长度(mm)，r 为色谱柱半径(mm)，F 为流速(ml/min)，W 为上样量。

样品前处理

样品的制备对于复杂的分离与纯化非常重要。恰当样品预处理可以免去后续操作中许多麻烦，使得分离纯化变得更为容易。

一. 提取

合理的选择单一或混合溶剂进行提取是保证正确的样品制备的第一步。中草药成分在溶剂中的溶解度直接与溶剂性质有关。溶剂可分为水、亲水性有机溶剂及亲脂性有机溶剂，被溶解物质也有亲水性及亲脂性的不同。选择溶剂要注意以下三点：

- ① 溶剂对有效成分溶解度大，对杂质溶解度小；
- ② 溶剂不能与中药的成分起化学变化；
- ③ 溶剂要经济、易得、使用安全等。

常见的提取溶剂可分为以下三类：

1. 水：水是一种强的极性溶剂。中草药中亲水性的成分，如无机盐、糖类、分子不太大的多糖类、鞣质、氨基酸、蛋白质、有机酸盐、生物碱盐及甙类等都能被水溶出。为了增加某些成分的溶解度，也常采用酸水及碱水作为提取溶剂。酸水提取，可使生物碱与酸生成盐类而溶出，碱水提取可使有机酸、黄酮、蒽醌、内酯、香豆素以及酚类成分溶出。但用水提取易酶解甙类成分，且易霉坏变质。某些含果胶、粘液质类成分的中草药，其水提取液常常很难过滤。沸水提取时，中草药中的淀粉可被糊化，而增加过滤的困难。

2. 亲水性的有机溶剂：也就是一般所说的与水能混溶的有机溶剂，如乙醇（酒精）、甲醇（木精）、丙酮等，以乙醇最常用。乙醇的溶解性能比较好，对中草药细胞的穿透能力较强。亲水性的成分除蛋白质、粘液质、果胶、淀粉和部分多糖等外，大多能在乙醇中溶解。难溶于水的亲脂性成分，在乙醇中的溶解度也较大。还可以根据被提取物质的性质，采用不同浓度的乙醇进行提取。

3. 亲脂性的有机溶剂：也就是一般所说的与水不能混溶的有机溶剂，如石油醚、苯、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、二氯乙烷等。这些溶剂的选择性能强，不能或不容易提出亲水性杂质。但这类溶剂挥发性大，多易燃（氯仿除外），一般有毒，价格较贵，设备要求较高，且它们透入植物组织的能力较弱，往往需要长时间反复提取才能提取完全。

提取方法：用溶剂提取中草药成分，常用浸渍法、渗漉法、煎煮法、回流提取法及连续回流提取法等。同时，原料的粉碎度、提取时间、提取温度、设备条件等因素也都能影响提取效率，必须加以考虑。

近年来，超临界流体萃取（SFE）技术广泛应用于天然产物的提取过程中。该方法尤其适用于对热及化学不稳定的化合物提取，并主要用于从混合物中提取低极性的组分。

大孔吸附树脂技术早已成功应用于工业脱色、环境保护、药物分析、抗生素提取分离等领域。运用于植化成分的分离、浓集也获得了极大成功。比如，对于银杏叶，目前的树脂分离技术可以做到对银杏黄酮收集率达 90%；可以一次性浓集银杏黄酮，使之含量超过 50%；也可以除去绝大部分（超过 99.5%）作为有害成分的银杏酸，使之低于 5ppm，同时使有效成分损失控制在 3% 以下。值得注意的是，美国 FDA 在 Food Additive Regulation 21CFR173.65 中对树脂交联剂二乙烯苯的含量作出了明确规定，同时，国家药品监督管理局曾于 2000 年 2 月 17 日以药管注[2000]56 号文下发了《大孔吸附树脂分离纯化中药提取液的技术要求（暂行）》，要求使用树脂工艺时需提供有关残留物的检测资料。而目前国内销售的大孔吸附树脂中，仅 Amberlite XAD 系列及三菱化学 HP 系列满足国际标准，这对于需要出口的项目十分重要。

二. 过滤

过滤是在进行低压、中压及高压液相色谱分离前最简单易行的样品制备手段。通过滤纸或烧结玻璃漏斗的过滤，可除去颗粒状物质及不溶物质。

此外，也可通过装有硅胶、活性炭或其他填料的短柱进行过滤，去除其中具有强吸附力的污染物。

若待分离的物质和杂质分子量或体积相差较大，可以采用膜过滤技术，这样可以将某个分子量范围内的物质分离出来进行进一步纯化。类似的技术还有尺寸排阻（SEC）技术，可以使用 Sephadex LH-20 或 Toyopearl 系列树脂将目标分子量的物质提取出来。

三. 沉淀

植物提取物中许多有效成分可以通过沉淀的方法提取：

1) 通过改变溶剂极性改变成分的溶解度。常见的有水提醇沉法（沉淀多糖、蛋白质）、醇提水沉法（沉淀树脂、叶绿素）、醇提乙醚或丙酮沉淀法（沉淀皂

苷)等。

2) 通过改变溶剂强度改变成分的溶解度。使用较多的是盐析法,即在中药水提液中加入一定量的无机盐,使某些水溶性成分溶解度降低而沉淀出来。

3) 通过改变溶剂 pH 值改变成分的存在状态。适用于酸性、碱性或两性亲脂性成分的分离。如分离碱性成分的酸提碱沉法和分离酸性成分的碱提酸沉法。

4) 通过加入某种试剂与欲分离成分生成难溶性的复合物或化合物。如铅盐沉淀法(包括中性醋酸铅或碱式醋酸铅)、雷氏盐沉淀法(分离水溶性生物碱)、胆甾醇沉淀法(分离甾体皂苷)等。

作为一种初步的纯化方法,沉淀经常被用于皂苷的研究中。将含有皂苷的提取物(如经过丁醇-水分配之后)的浓缩甲醇液倾入大量的乙醚中,利用过滤或离心的方法收集沉淀的皂苷。反复利用这种沉淀法可达到更好的效果。

四. 固相萃取技术

固相萃取(Solid Phase Extraction),简称 SPE,是从八十年代中期开始发展起来的一项样品前处理技术。由液固萃取和液相色谱技术相结合发展而来。主要通过固相填料对样品组分的选择性吸附及解吸过程,实现对样品的分离,纯化和富集,主要目的在于降低样品基质干扰,提高检测灵敏度。

固相萃取填料按保留机理分为:

正相: Sillica, NH₂, CN, Diol, Florisil, Alumina

反相: C18, C8, Ph, C4, NH₂, CN 等

离子交换: SCX, SAX, COOH, NH₂ 等

混合型: PCX, PAX, C8/SCX 等

基本操作步骤:

针对填料保留机理的不同(填料保留目标化合物或保留杂质),操作稍有不同。

1) 填料保留目标化合物

固相萃取操作一般有四步:

活化—除去柱子内的杂质并创造一定的溶剂环境。

上样—将样品用一定的溶剂溶解,转移入柱并使组分保留在柱上。

淋洗—最大程度除去干扰物。

洗脱—用小体积的溶剂将被测物质洗脱下来并收集。

2) 填料保留杂质

固相萃取操作一般有三步：

活化—除去柱子内的杂质并创造一定的溶剂环境。

上样—将样品转移入柱，此时大部分目标化合物会随样品基液流出，杂质被保留在柱上，故此步骤要开始收集。

洗脱—用小体积的溶剂将组分淋洗下来并收集、合并收集液。

此种情况多用于食品或农残分析中去除色素。

如需了解更详细的固相萃取技术信息,可以来电索取《固相萃取操作手册》。

五. 样品处理专题

(一) 脱除叶绿素

通常可以将提取物通过装有硅胶或活性炭的层析柱去除叶绿素，但有时会损失大量的产品，而且叶绿素不可逆的吸附会造成层析柱的报废。

另外，粗提物可用丙酮溶解后，拌样于三倍量的聚酰胺，然后以 1:1 的比例上一根短柱，先用 80%乙醇-水洗脱，然后再用 90%乙醇-水洗脱，去除叶绿素。

如果样品量不大，将提取物通过装有 C18 硅胶的短柱可把所含的叶绿素方便的除去。缺点是反相 C18 较为昂贵，有时会吸附在层析柱上难以清除。

MCI GEL 脱叶绿素的效果非常好，石油醚浸膏，醋酸乙酯浸膏都可以用（石油醚浸膏用得更多一些，色素重），MCI 用水装柱，样品最好用水溶解（低极性的可用一定比例甲醇水溶）上样，用甲醇水洗脱，也可用不同比例的甲醇水洗脱分段，流出液不含色素，色素留在 MCI 柱上。用纯甲醇和丙酮可将色素洗下，MCI GEL 可以反复使用。一般情况下，可以将快报废的 MCI GEL 专用于脱除叶绿素。

也可以使用大孔吸附树脂去除叶绿素，某些特定的树脂，如 Amberlite™ FP 系列就具有脱除色素的功能。

如果是到了后期的纯化阶段，样品 5-200mg，但是还带有一点颜色，感觉不太纯时，可用 TOSOH Toyopearl HW-40 凝胶，上一根短柱，稍微粗一点，即可分开，效果很不错。也可以使用 Sephadex LH-20，与 Toyopearl HW-40 类似。

(二) 去除蜡质

用乙腈除去所含蜡质是较合适的方法。如将茄科植物 *Petunia integrifolia* 的氯仿提取物悬浮于沸腾的乙腈中搅拌 1h，冷却至 5℃后，析出蜡状的固态物质。

在倾出的上清液中约含原提取物的 50%。再将该溶液流经 C18 柱以乙腈洗脱，可除去其中的叶绿素和低极性脂类物质。对菊科植物黄花蒿中具有细胞毒性的黄酮类和萜类物质进行分离中，先将该植物的地上部分以己烷提取，提取物溶于 20mL 氯仿中，加入 180mL 乙腈后析出蜡质，然后进行色谱分离工作。

（三）脱除单宁类物质

对植物提取物或某一部位进行生物活性测试前，有时要求先去单宁类物质。使用以下几种方法可达到该目的：

1. 用明胶/氯化钠溶液沉淀
2. 可溶解的聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、咖啡因或皮粉（hide powder）处理
3. 经过聚酰胺柱色谱脱除

在上述几种方法中，最后一种最为有效，但由于其选择性较差，有时也会吸附去一些除单宁外的多酚类化合物。

硅胶基层析柱装填指南

一、干法装柱

干法装柱有装柱速度快，溶剂消耗少的优点，但由于其分辨率较低，柱效差，比较适合大量样品的初步分离层析工作。常用的填充剂有硅胶、氧化铝、活性炭和反相硅胶等。

装柱前准备

1. 准备好合适的层析柱，内壁应干净，光滑，干燥。
2. 装柱材料尽量选用粒径均一的产品，这样装出的色谱柱柱效最好。若填料粒径分布极不均匀，应先过筛，常压柱最常使用的为 100~200 目的填料。
3. 一台真空泵，带缓冲瓶。

装柱步骤

1. 将层析柱垂直放置，封闭下端出口。
2. 向层析柱内加入约 3~5mm 柱床高度的填料，然后轻轻敲打柱子两侧，或在桌面上垂直地轻轻磕几下，至填料界面不再下降为止。
3. 重复步骤 2，直到填料高度达到要求为止。须注意的一点是，在干法填装制备液相色谱柱时，不要过分剧烈地振动和敲打侧壁。振动和敲打会使填料因自身粒径的不均匀性而产生柱子整体上的不均一性，即较大的填料粒子靠近柱壁，而较细粒径者则倾向集中于柱中心。这种柱内颗粒分布的不均匀性，会导致柱效的降低。
4. 装填好的柱子下端接入真空泵，开泵抽气，抽至柱内气体基本抽光为止。注意抽真空时间不要过长，以免层析柱装的过实，流速过慢而导致扩散。
5. 先将缓冲瓶慢慢放空，然后停泵。如果突然停泵，柱床会因受到冲击而断裂。
6. 层析柱装填完毕，等待平衡。

柱平衡

1. 先用 TLC 确定展开剂的比例。平衡时按照 TLC 确定的展开剂比例稀释一倍来进行平衡。
2. 将平衡用溶剂缓慢加入层析柱，注意不要扰动柱床上层的填料。或者在柱床上层铺一层石英砂，然后加入洗脱溶剂。

3. 由于溶剂和填料之间的吸附放热，容易产生气泡，刚开始时平衡速度应慢，避免柱床“变花”。尤其是使用低沸点的乙醚、二氯甲烷时更应注意。

4. 如果溶剂流速过慢，可以从上端加压，或从底部抽真空的办法加快平衡。但在使用低沸点溶剂时不建议使用抽真空的办法，并且加压时一定要用较多的溶剂平衡，直到柱子下端不再发热为止时才撤去压力。

保存

使用后的反相硅胶使用纯有机溶剂清洗后保存在纯有机溶剂中(甲醇,乙醇等)即可。

二、湿法装柱

若填料粒径较小，或想得到更高的柱效，一般常用湿法装柱。

装柱理论

湿法装柱一般用一种或几种溶剂将填料润湿成浆液后，在填料颗粒还未沉降前装入层析柱，然后利用自然沉降或外力（如加压或减压）使得填料在层析柱内形成密实的柱床。

粒子沉降的速度 V 为：

$$V(\text{cm/s}) = \frac{2gd^2(\rho - \rho_0)}{3600\eta}$$

式中， g 为重力加速度 (cm/s^2)， d 为粒子直径 (cm)， ρ 为粒子密度 (g/cm^3)， ρ_0 为液体密度 (g/cm^3)， η 为液体的粘度 ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)，从上述公式可知，粒子在液体中的沉降速度，与粒径直径的平方以及液-固密度之差成正比，而与液体粘度成反比。因此，湿法填装可以依阻止沉降的思路分成三种：一条思路是设法寻找与硅胶密度相近的溶液，以使 $(\rho - \rho_0)$ 减小而降低沉降速度。第二种方法是增加液体的粘度以阻止粒子的下沉。第三种方法是综合利用前两种方法，尽力减小沉降并尽快地在发生较显著的沉降之前完成装柱操作。

(1) 等密度法装柱

多孔硅胶的骨架密度较高。例如，LiChrospher 100 的表观密度约为 2.3g/cm^3 ，LiChrospher 500 为 2.46g/cm^3 ，LiChrospher 1000 为 2.49g/cm^3 。不同牌号的硅胶因制法不同（例如，含有超细孔和封闭孔者表观密度小）而有差异，但多在 2.2g/cm^3 以上。因此，需以高密度溶剂配制密度与硅胶骨架密度相近的

混合液。常使用的高密度溶剂为碘代和溴代烷类（如下表），再与适当比例的其它溶剂相配，配制出具有密度适宜的液体，使填料能呈“失重”状态悬浮于匀浆液中，以从容地将其压入空色谱柱中，制出填装均匀的层析柱。在配制上述等密度悬浮液时，除密度外，还要考虑填料的表面状况与化学性质。如填装反相柱，应选用极性较弱的溶剂，而填充正相柱，如以硅胶为填料时，则应选择极性较强的溶剂，以防止颗粒板结并保证有良好的润湿性，以使填料颗粒均匀地分散在匀浆液中。但是，碘代或溴代烷价格昂贵且多数有较大的毒性，因此，这种方法目前已经很少使用。不过，当填料粒径较大，且又难以干法填装时，等密度法将能发挥出特殊的作用。

表一 常用于湿法填充的溶剂

名称	密度($\rho/\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	粘度 η
二碘甲烷	3.3	29 (mPa.s 20°C)
四溴乙烷	3.0	—
二溴甲烷	2.5	10
碘甲烷	2.3	5
四氯化碳	1.6	10
氯仿	1.5	6
乙二醇	1.11	17
正丁醇	0.8	30
正丙醇	0.8	23
乙醇	0.8	12

(2) 高粘度法

即使用粘度较高的匀浆液体系以阻止颗粒的沉降。可以采用乙二醇、聚乙二醇、甘油以及石蜡油等高粘度液体调配匀浆液。但是，高粘度导致流体阻力加大，必将延长装柱时间且需使用更高的装柱压力，在实用上很不方便。因此，高粘度法已很少被采用。

(3) 高压匀浆法

将填料悬浮在适宜的匀浆液中制成匀浆，在其尚未沉降之前，很快以高压泵将其以很高的流速压进柱中，便可制备出填充均匀的柱子。这是常见的分析和制备色谱柱的装填方法。

下面以 YMC-Pack AA12S50 反相 C18 硅胶为例简述如何使用 Millipore Vantage V2 层析柱完成装柱过程。

装柱前准备

1. 装柱压力: 50 μ m 粒径的反相硅胶可以在敞开体系内使用, 若加压至 1~2bar 则流速更快。为了避免柱装的过实引起流速过慢以及防止柱破裂, 装柱压力不得超过 7bar。
2. 去除小颗粒: YMC S50 的反相硅胶粒径分布较为均匀 ($D_{40}/D_{90}=1.33$) 可以不用去除小颗粒。
3. 匀浆液组成: 正己烷: 氯仿 = 1: 1
4. 匀浆浓度: 一般在 20~40%, 更低的密度有利于装填, 不过要注意防止颗粒沉降。
5. 匀浆过程: 取适量的反相填料, 加入合适的匀浆液, 缓慢搅拌至均匀浆液。

装填步骤 (参考 Toyopearl 与 Amberchrom & MCI GEL 装填工艺)

1. 将柱筛板安装好, 确保柱容积足够将匀浆液一次注入。确保层析柱水平。
2. 将柱底板上的筛板用匀浆液润湿。将匀浆液放空一部分以便赶走所有的气泡。关闭柱出口并在柱底部留出 1~2cm 的匀浆液。若使用普通的下端带活塞的层析柱, 需要注意不要在活塞上抹润滑剂, 容易污染样品。最好选用四氟阀门。
3. 将浆液搅拌均匀, 确保均一。
4. 立即将匀浆液小心的倒入层析柱中, 避免倒入时产生气泡。
5. 将匀浆液倒入后, 用喷壶清洗层析柱的内壁。
6. 立即将充满装柱缓冲液的液体分配器放入层析柱中。分配器放入缓冲液中但不应接触到浆液。在分配器和缓冲液间不能有气泡。
7. 打开柱底开关, 启动泵。
8. 缓慢升到目标流速。这可以阻止压力对正在形成的柱床的冲击, 还可以避免柱床的不均匀性。流速可以分为几个阶段缓慢升高。增加量取决于层析柱的尺寸和目标流速。
9. 当柱床最终形成时, 停泵, 关闭柱出口。
10. 所有的柱床都应在层析柱的下部。如果需要, 用吸液管或虹吸管将储槽上部漂浮液体吸走。然后取走上部的储槽和联接圈, 小心的将液体分配器放入柱中, 放置在柱床表面。注意不要将气泡带入层析柱。

11. 小心的去除液体分配器的密封，将分配器降至柱床表面。注意在移动分配器的时候不要碰到柱床。分配器应轻轻接触柱床。

12. 打开柱出口，开泵，同步骤 8。

13. 柱床应被进一步压缩。等柱床稳定后，停泵，保持柱出口开启状态。调节液体分配器高度，降到柱床表面。分配器应压在柱床表面不能前进为止。注意不要将填料弄到密封圈上。关闭柱出口。

14. 此时装柱完毕，等待平衡。

柱平衡

1. 将柱出口接一个合适的废液容器。

2. 用 100% 甲醇以最大线性流速 150cm/h 冲洗层析柱 8~10 个柱体积。

3. 分别用 80% 甲醇/20% 水，70% 甲醇/30% 水，和 50% 甲醇/50% 水以最大线性流速 40cm/h 冲洗层析柱 2 个柱体积。注意在切换溶剂时流速要慢，避免气泡过多引起柱床不稳定。

4. 层析柱平衡完毕。

Sephadex LH-20 装填指南

Sephadex LH-20 是由葡聚糖 G-25 羟丙基化加工而成，属于分子筛凝胶，尤其适用于天然产物在有机溶剂中的纯化。例如：类固醇、萜类、脂类以及小分子多肽等，Sephadex LH-20 同时适用于分子类别非常相似的物质分离和工业规模的制备，既可用于初步纯化步骤，也可用于最终精制步骤，如非对映同分异构体的分离。

制备凝胶悬浮液

装填的重要原则之一就是需要形成一个稳定均一的柱床。胶颗粒越均一（粒径分布越窄），越容易获得稳定均一的柱床。但是对于 Sephadex LH-20 而言，25~100 μm 的粒径范围相对于许多用于制备色谱的填料而言，不能说分布均一，也就是说其粒径分布较宽。然而当胶溶胀后就相对容易得到均一的柱床。这对于长柱（最高至 250cm）而言也是同样的。在装柱前，层析柱和储槽都必须进行彻底的清洗。

Sephadex LH-20 在使用之前必须进行溶胀。在溶胀的过程中，要尽量避免过分搅拌，否则会破坏球形胶粒，且要避免使用磁力搅拌器。

1. 在室温下，将凝胶溶胀于层析溶剂中至少三小时，溶胀后胶体体积的大小决定于所使用的溶剂系统，请参考后页之表一干胶溶胀表计算特定柱体积所需要干胶的量。

2. 使溶胀胶体体积沉淀之后占总体积的 75%，上层溶剂占 25%，这时，悬浮液从一个容器倒入另一容器时胶粒可移动。

3. 将溶胀后的凝胶根据装柱要求均匀倒入柱内，在保证胶粒不变形的前提下，应在尽可能高的压力下装柱，反压不要超过 1.5bar。

平衡

上样前，用洗脱液平衡层析柱至少两个柱体积直到基线变得平稳为止，如改变溶剂应该注意凝胶在新溶剂中的溶胀性质，并根据性质确定柱高调节器的位置，如使用相同的溶剂，在以后的层析中柱平衡可以省略。

表一 干胶溶胀表

溶 剂	床体积 (mL 凝胶/g 干胶粉末)
Dimethyl sulphoxide 二甲亚砜	4.4~4.6
Pyridine 吡啶	4.2~4.4
Water 水	4.0~4.4
Dimethylformamide 二甲基甲酰胺	3.8~4.2
Saline 生理盐水	3.9~4.1
Methanol 甲醇	3.8~4.1
Methane dichloride 二氯乙烷	3.8~4.1
Chloroform ¹ 氯仿	3.8~4.1
Propanol 丙醇	3.7~4.0
Ethanol ² 乙醇	3.6~3.9
Isobutanol 异丁醇	3.6~3.9
Formamide 甲酰胺	3.6~3.9
Methylene dichloride 二氯甲烷	3.6~3.9
Butanol 丁醇	3.5~3.8
Isopropanol 异丙醇	3.3~3.6
Tetrahydrofuran 四氢呋喃	3.3~3.6
Dioxane 二氧杂环己烷	3.2~3.5
Acetone 丙酮	2.4~2.6
Acetonitrile ³ 乙腈	2.2~2.4
Carbon tetrachloride 四氯化碳	1.8~2.2
Benzene 苯	1.6~2.0
Ethyl acetate 乙酸乙酯	1.6~1.8
Toluene 甲苯	1.5~1.6

1. 包含 1% 的乙醇
2. 包含 1% 的苯
3. 溶胀胶体积小于 2.5mL/g 的溶剂没有使用价值

洗脱液

为确保延长层析柱的使用寿命,所有的缓冲液都应该离心或经过 0.45um 的膜过滤以除去杂质。

样品

样品体积应该占柱总体积的 1-2%, 同样在使用之前样品应该离心或经过 0.45um 的膜过滤。

洗脱

洗脱流速应根据情况而定,最大线性流速约 12cm/min (反压 1.5ba), 建议流速为 1-10cm/h。总体来说, 较低的流速, 具有较高的分辨率。

再生

凝胶再生通常是先用 2-3 个柱体积的洗脱液进行清洗, 如更换洗脱液, 则需要重新平衡。

Sephadex LH-20 变色是由于制备过程中, 夹带杂质引起, 处理办法:

1. 用蒸馏水冲洗, 用量一般是柱体积 10 倍;
2. 用 1N 的 NaOH 液冲洗, 也为柱体积的 8-10 倍;
3. 用 1N 的 HCL 液冲洗, 也为柱体积的 8-10 倍;
4. 再用蒸馏水冲洗, 用量一般是柱体积 10 倍; 即可

体积流速与线性流速的关系

$$\text{线性流速} = \text{体积流速} / \text{横截面积}$$

溶胀体积

由于 Sephadex LH-20 的溶胀体积依赖于溶剂, 所以对于不同直径的柱可根据比例增加或减少旧柱体积以便计算出新体积。

$$\text{新体积} = \text{旧体积} \times (\text{新柱体积} / \text{旧柱体积})$$

胶的性质

Sephadex LH-20 同时具备亲水和亲脂双重性质，且被分离物质的极性在分离过程中起着重要作用。

排阻极限	4-5KD (与所用溶剂有关)
上样量	
吸附模式	取决于所需分辨率
分子量大小	小于总体积的 20%
正相分配	小于总体积的 1%
胶粒形状	球形，多孔
颗粒大小 (干)	18-111um (直径)
颗粒大小中间值 (干)	70um (直径)
颗粒大小 (甲醇)	27-163 um (直径)
颗粒大小中间值 (甲醇)	103 um (直径)
最大线性流速	720cm/min
参考线性流速	60 cm/min
pH 的稳定性	
操作中	2-11
清洗中	2-13
化学稳定性	在许多水溶液及有机溶剂系统中都稳定。 在 pH2 以下或强氧化剂中不稳定
高压灭菌	121℃可忍受 20 分钟
操作温度	4℃到 40℃
保存条件	
新填料	4-25℃ (干燥)
使用后填料	4-8℃, pH6-8, 切勿冷冻, 加入抑菌剂 (如 20%乙醇, 0.04%叠氮钠)

Toyopearl 凝胶填料装填指南

介绍

Toyopearl 和 TSK-GeL 5PW 层析树脂是用于生物色谱和天然产物分离的大孔聚合物填料，非常适合应用于实验室和工业级纯化球状蛋白、多肽、核酸以及其他生化衍生物、天然产物单体。这种树脂是改性的聚甲基丙烯酸酯，由于醚及羟基的存在使其具有亲水的表面，并且具有了更好的耐压性能、流动特性及 pH 的稳定性。

1. 装填

1. 装填前的预备工作

a) 装填 Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 的一般原则

装填 Toyopearl 的压力最好在 0.5~3bar (7~45psi)。TSK-GEL 5PW 树脂最好在 3~10bar (45~140psi) 下装填。不过 Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 也可以通过重力沉降的方法装填，但这并不值得推荐。Toyopearl 的装填压力不应过高（不应超过 5bar），TSK-GEL 5PW 的装填压力不应超过 20bar。



图 1

成功装填 Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 所需的设备（如图 1 所示）有：泵（HPLC 或者蠕动泵）；压力表；水平仪；玻璃、聚丙烯酸、PEEK 或不锈钢层析柱；储槽（可选）。

b) 去除小颗粒 (TOSOH 建议最好去除小颗粒)

在匀浆后的胶中存在的小颗粒会阻塞筛板或烧结板, 最终导致整个柱子压力的增加。通过如下描述的过程就可以将匀浆后树脂中的小颗粒去除。

(1) 在包装容器内的树脂应通过一根搅拌棒搅拌成悬浮液 (请不要使用磁力搅拌器, 这会磨碎树脂, 产生小颗粒)。一旦成为悬浮液后, 立即将需要量的悬浮液 (大概 4 体积的悬浮液=3 体积的树脂) 倒入一个容器内, 容器的体积应不小于需要装柱树脂体积的 4 倍。加入蒸馏水或者缓冲液至 4 倍树脂体积, 并一直保持搅拌。

例如: 5L 树脂=7~8L 悬浮液 (65~70% 匀浆浓度) 因此你需要至少 20L 的容器。

(2) 将浆液静置。静置时间取决于容器的直径、匀浆溶剂和树脂粒径。Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 用水匀浆时的平均静置时间如下:

Toyopearl

Coarse C 级: 100 μ m 15-30 分钟

Medium M 级: 65 μ m 30-45 分钟

Fine F 级: 45 μ m 45-60 分钟

Superfine S 级: 35 μ m 60-90 分钟

TSK-GEL 5PW

30 μ m 90-120 分钟

20 μ m >120 分钟

(3) 一旦树脂静置完成后, 小心倒出表面的悬浮液, 如图 2。

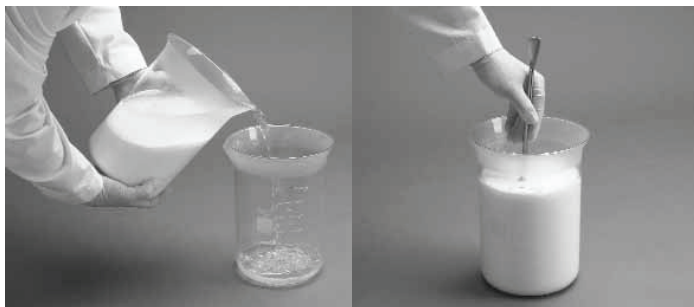


图 2

图 3

(4) 加入 3 倍树脂体积的蒸馏水或缓冲液, 轻轻在表面搅拌使树脂重新悬浮, 如图 3。请不要使用磁力搅拌棒, 这样会打碎树脂, 产生小颗粒。

(5) 重复步骤 3 和步骤四至少 3 次以上, 直到悬浮液不在浑浊。

c) 缓冲液平衡

对于所有的 Toyopearl 和 TSK-GEL 树脂, TOSOH 建议装填时使用高离子强度的缓冲液。虽然这些树脂可以用水装填, 但是相对于用同样装填方法, 而使用盐溶液作为缓冲液的层析柱而言, 塔板数较低, 不对称因子较高。另外, HIC 柱用水装填时, 相对于高离子强度的缓冲液, 更容易在内壁形成管道。这些管路对于柱层析而言并不是必须的。

当选择装填缓冲液时, 最好根据经验来进行选择, 因为根据您特定的应用而选择是最合适的。总的来说, 在层析中(包括清洗和消毒步骤)使用高离子强度流动相是首选。一些常见的装填缓冲液如表一。

表一

SEC	
Toyopearl HW-40, HW-50, HW-55, HW-65 和 HW-75	0.1M Na ₂ SO ₄ , NaNO ₃ , 或 NaCl 溶于 50mM 磷酸盐或 Tris 缓冲液
IEC	
Toyopearl DEAE, QAE, SuperQ, CM, SP 和 Toyopearl MegaCap SP-550	1M NaCl 溶于 50mM 磷酸盐, Tris, 或 醋酸盐缓冲液
TSK-GEL DEAE-5PW, SuperQ-5PW, SP-5PW	
HIC	
Toyopearl Ether, Phenyl, Butyl, Hexyl-650, PPG-600, Super Butyl-550	2M Na ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ 或 NaCl 溶于 50mM 磷酸盐缓冲液
TSK-GEL Ether-5PW, Phenyl-5PW	
AFC	
Toyopearl AF-Tresyl 和 AF-Epoxy-650	0.5M NaCl 溶于 0.1M NaHCO ₃ 或磷酸盐缓冲液
Toyopearl AF-Formyl-650, AF-Amino-650, 和 AF-Carboxy-650	1M NaCl 溶于 100mM 磷酸盐或 NaHCO ₃ 缓冲液
Toyopearl AF-Chelate-650, AF-Blue HC-650 和 AF-Red-650	0.5M NaCl 或 0.2M 甘氨酸溶于 20mM 磷酸盐或 Tris 缓冲液

★在去除小颗粒时最后一次可加入层析缓冲液以节省时间

d) 匀浆准备

将树脂中的小颗粒去除后，调节匀浆液浓度。匀浆液的浓度按静置胶体积除以匀浆后总体积计算，匀浆浓度按如下调节：

(1) 将去除小颗粒后容器中的树脂浆液搅拌均匀后将均匀的浆液倒入一个量筒。

(2) 将浆液静置过夜 (>12 小时) 以便取得最佳的效果

(3) 对于 Toyopearl 树脂，确定静置胶体积后，加入或去除装柱缓冲液将匀浆液浓度调节至 30~50%。对于 TSK-GEL 5PW 树脂，最常用的匀浆液浓度范围为 25~70%。当匀浆液浓度在 40~50% 时结果最好。

(4) 对于装填一个给定的空柱，按表二静置胶体积装柱。

表二

Toyopearl HW-40, HW-50, HW-55, HW-65 和 HW-75F	使用约 1.1 倍柱体积的胶
Toyopearl Ether-650, Phenyl-650, Butyl-650, Super Butyl-550, Hexyl-650, PPG-600, DEAE-650, SuperQ-650, CM-650, SP-650 和其他应用	使用大约 1.2 倍柱体积的胶
TSKgel DEAE-5PW, SuperQ-5PW, SP-5PW, Ether-5PW 和 Phenyl-5PW	
Toyopearl QAE-550C, SP-550C 和 Toyopearl MegaCap	使用大约 1.25 倍柱体积的胶

可选的匀浆准备

(1) 将去除小颗粒后容器中的树脂浆液搅拌均匀后将均匀的浆液倒入一个布氏漏斗或类似容器中。

(2) 用水泵抽滤，直至匀浆液成为一块湿滤饼(所有的溶剂被去除)。

(3) 称量树脂滤饼的大概重量(1g 湿滤饼 \approx 1ml 静置胶)使用上表确定装柱用胶量。

(4) 将滤饼转移至一个大口杯中，加入足够量的装柱缓冲液，使得匀浆浓度在 30~50%，如图 4。

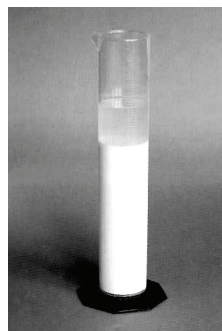


图 4

2. 装填步骤

表三

	树脂类型		柱尺寸 (cm ID×L)	级别	装填流速 (cm/hr)	操作流速	
						(cm/hr)	(ml/min)
SEC	HW40		2.2×60	S (30μm)	30-40	10-25	0.6-1.6
				F (45μm)	60-80	25-50	1.6-3.2
				C (75μm)	120-160	50-100	3.2-6.4
	HW-50		2.2×60	S (30μm)	25-35	10-20	0.6-1.3
				F (45μm)	50-70	25-35	1.6-2.2
	HW-55		2.2×60	S (30μm)	25-35	10-20	0.6-1.3
F (45μm)				50-70	25-35	1.6-2.2	
HW-65		2.2×60	S (30μm)	20-75	10-15	0.6-1.0	
			F (45μm)	40-150	15-30	1.0-1.9	
HW-75		2.2×60	F (45μm)	40-150	15-30	1.0-1.9	
IEC*	DEAE-650		2.2×20	S (35μm)	400-600	45-65	3.0-4.0
	SuperQ-650			M (65μm)	800-1000	80-130	5.0-8.0
	CM-650			C (100μm)	800-1200	80-600	5.0-40
	SP-650						
SP-550		2.2×20	C (100μm)	700-1000	80-240	5.0-15	
QAE-550							
	Toyopearl MegaCap SP-550			EC (100-300μm)	800-1200	80-500	5.0-30.0
HIC*	Ether-650	Hexyl-650	2.2×20	S (35μm)	400-600	45-65	3.0-4.0
	Phenyl-650	PPG-600 Super		M (65μm)	800-1000	80-130	5.0-8.0
	Butyl-650	Butyl-550		C (100μm)	800-1200	80-500	5.0-30
AFC*	AF-Amino-650	AF-Tresyl-650	2.2×10	M (65μm)	800-1000	30-130	2.0-8.0
	AF-Carboxy-650	AF-Blue-650					
	AF-Formyl-650	AF-Chelate-650					
	AF-Epoxy-650	AF Blue-650					

表三 (续)

	树脂类型	柱尺寸 (cm ID x L)	级别	装填流速 (cm/hr)	操作流速	
					(cm/hr)	(ml/min)
IEC/HIC	TSK-GEL 5PW	5.5 x 20	20 μ m	100 - 400	50 - 300	19.8 - 119
		10.8 x 20	20 μ m	100 - 400	50 - 300	76.3 - 458
		15.8 x 30	30 μ m	100 - 500	50 - 400	163 - 1307
		21 x 30	30 μ m	100 - 500	50 - 400	289 - 2309
		30 x 20-30 (DAC*)	20 - 30 μ m	(N/A)	50 - 400	589 - 4712

*DAC = Dynamic Axial Compression 柱压力>3 bar.

如下描述适用于一般的装填过程。如果你有其他的设备或者一次装填量大于 5L，请与我们的技术支持部门联系：010-59812370，我们有着丰富的经验，了解不同柱厂家的装填工艺。

恒流速/半恒压模式

(1) 将柱筛板安装好，确保柱容积足够将匀浆液一次注入。

(2) 将柱底板上的筛板用缓冲液润湿。将缓冲液放空一部分以便赶走所有的气泡。关闭柱出口并在柱底部留出 1~2cm 的缓冲液，如图 5。

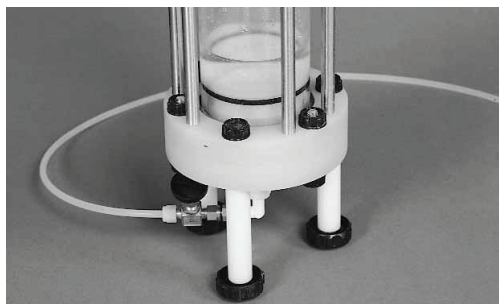


图 5

(3) 将浆液搅拌均匀，确保均一，如图 6。



图 6

(4) 小心将匀浆液倒入层析柱中，避免倒入时产生气泡，如图 7。

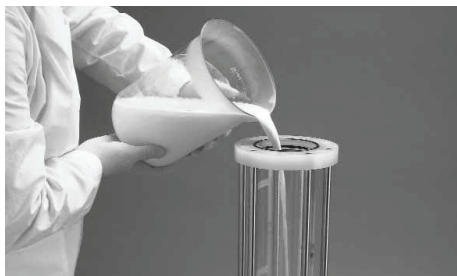


图 7

(5) 将匀浆液倒入后，用喷壶清洗层析柱的内壁。

(6) 立即将进样分配器放置在匀浆液表面。在分配器和溶液间不应有气泡存在，如图 8。



图 8

(7) 打开层析柱出口，开启泵。开始缓慢将缓冲液流过层析柱。

(8a) (恒流速模式) 缓慢增加至最终流速。这可以避免水压对于形成的柱床的冲击，也可以避免柱床的不均匀。流速可以阶段性的增加，增加量取决于层析柱尺寸和目标流速。表四中列出了一些例子。

表四

柱尺寸 (ID×L)	介质类型	目标流速 (mL/min)	增加量 (mL/min)	保持时间 (min)
2.2cm×60cm	HW-55S	2	0.5	0.5
9cm×30cm	QAE-550C	300	50	2
25cm×30cm	DEAE-650M	2000	400	3

(8b) (半恒压模式) 缓慢升至目标压力。这可以避免水压对于形成的柱床的冲击，也可以避免柱床的不均匀。可以通过手工减小流速来获得形成柱床所需的稳定压力。对于 Toyopearl 树脂而言最合适的装填压力约为 3bar (44psi)。

(9) 当柱床最终形成后，关闭泵，关闭层析柱出口。

(10) 如果使用筛板的话柱床应保持在柱的低端部分。用一个吸液管或泵利用虹吸吸走上层筛板中的悬浮液。移走上层的筛板并卡好密封圈。

(11) 小心的将液体分配器加入到柱子中，离柱床约 2~3cm。避免将空气带入层析柱，如图 9。

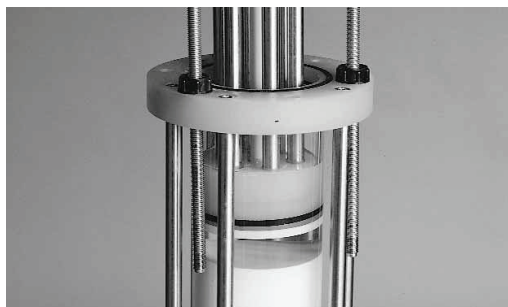


图 9

(12) 确保液体分配器就位后，按步骤 8 打开泵，打开层析柱出口，如图 10。



图 10

(13) 柱床将进一步被压缩。当压缩完成，压力稳定时，停泵，并关闭层析柱出口，如图 11。



图 11

(14) 小心的松开液体分配器密封，将分配器降到柱床表面。在移动分配器时小心不要扰动柱床。分配器应直接接触柱床。

(15) 重复步骤 12~14，直到柱床无法进一步压缩，柱床与分配器距离小于 0.5cm。这需要重复 2~3 次直到柱床稳定。

(16) 层析柱装填完毕，准备进行柱效评价。

可替代的装填方法

由于硬件的局限,有时候可能没有储槽来进行 Toyopearl 树脂的装填。如下的方法适用于没有储槽的装填。

(1) 调节浆液浓度至 50%, 轻轻的搅动浆液, 不要使用磁力搅拌棒!

(2) 如图 12 所示, 将一蠕动泵连接至层析柱底部出口。

(3) 确保层析柱水平。

(4) 当泵向上工作时, 将缓冲液向下加入到层析柱中, 直到大约 50%柱高为止, 停泵。

(5) 当泵以希望的流速向下工作时, 慢慢向层析柱中加入均匀的浆液。将浆液沿着层析柱壁倒入以避免产生气泡。

(6) 当柱床基本形成, 缓冲液高出柱床大约 2~3cm 时, 停泵, 关闭层析柱的出口。

(7) 轻轻的用装缓冲液的喷壶冲洗层析柱的内表面。

(8) 小心的将液体分配器放入层析柱, 使得分配器刚好接触到缓冲液面。

(9) 当分配器就位后, 将泵放置在柱前。排除管路中的空气。

(10) 开泵, 以低的流速运行, 打开底部的出口。

(11) 缓慢将流速升至目标流速。这可以避免水压对于形成的柱床的冲击, 也可以避免柱床的不均匀。流速可以较先前装填时增加几毫升/分钟。这取决于装填层析柱的尺寸, 如表五。

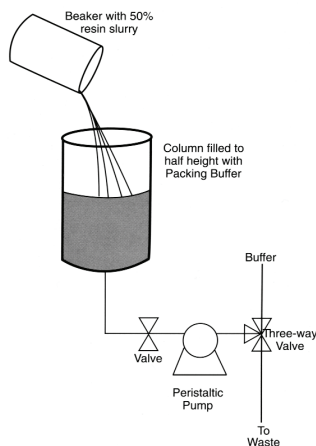


图 12

表五

柱尺寸 (ID×L)	介质类型	目标流速 (mL/min)	增加量 (mL/min)	保持时间 (min)
2.2cm×60cm	HW-55S	2	0.5	0.5
9cm×30cm	QAE-550C	300	50	2
25cm×30cm	DEAE-650M	2000	400	3

(12) 当柱床稳定下来。停泵，关闭底部的出口。

(13) 小心的松开液体分配器密封，将分配器降到柱床表面。在移动分配器时小心不要扰动柱床。

(14) 重复步骤 10~13，直到柱床无法进一步压缩，柱床与分配器距离小于 0.5cm。

(15) 层析柱装填完毕，准备进行柱效评价。

3. 平衡和柱效评价

对于 Toyopearl 树脂：一旦装填过程完成，用 5~10 个柱体积的低离子强度缓冲液平衡柱床。测试装柱效果可以进一个 (0.25~1% 柱体积) 低分子量无保留的样品 (如丙酮，维生素 B12，氯化钠)，然后确定柱塔板数及不对称因子。按照如上所述的装填步骤，按线性流速 50~250cm/hr (取决于颗粒尺寸) 操作，最小的塔板数如表七，不对称因子在 0.8~1.4 之间。

对于 TSK-GEL 5PW 树脂：以 20mm 和 30mm 大包装的 TSK-GEL 5PW 树脂与 Toyopearl 有类似的化学性质。TSK-GEL 5PW 与 Toyopearl 650 类似，孔径为 1000 Å。然而，TSK-GEL 5PW 树脂交联度更高，这使得这种树脂可以比 Toyopearl 在更高压力下使用。实际上，这种树脂可以装的更好，在动态轴向压缩柱 (DAC) 中表现出更好的效率，压力可大于等于 3bar。TSK-GEL 5PW 树脂一般在 3~10bar 的压力下操作，然而如果硬件允许，其也可以在 15~20bar 的压力下工作。

表六 装柱常见问题

As < 0.8	As > 1.4
装柱过度 装柱压力过高 柱床塌陷	柱床没有装的足够实，足够紧 柱头或柱底的筛板阻塞 柱头处有空隙 层析柱死体积内有空气 进样技术不好
理论塔板高度过高	理论塔板高度过低
进样或检测距离层析柱过远 进样量过大 柱装的效率不高	由于与功能团作用使得样品分子保留在柱中

表七 Toyopearl 最小柱效率（丙酮作为样品）

模式	柱内径 I.D.(cm)	S 级 (块/米)	F 级 (块/米)	M 级 (块/米)	C 级 (块/米)
SEC	2.2	5000	3500	-	3000
	5.5	5000	3300	-	-
	10.8	5000	2500	-	-
	21	4000	2200	-	1500
	31	-	2000	-	1200
	40	-	1800	-	1000
IEC	2.2	6000	-	4000	2000
	5.5	6000	-	4000	-
	10.8	6000	-	4000	-
	21	4000	-	2600	2000
	31	-	-	2000	1000
	40	-	-	1500	750
HIC	2.2	6000	-	4000	2000
	5.5	6000	-	4000	-
	10.8	6000	-	4000	-
	21	4000	-	2600	2000
	31	-	-	2000	1000
	40	-	-	1500	750
AFC	2.2	-	-	4000	-
	5.5	-	-	4000	-
	10.8	-	-	4000	-
	21	-	-	2600	-
	31	-	-	2000	-
	40	-	-	1500	-

表八

模式	装填方法	装填缓冲溶液	柱尺寸 I.D. (cm)	20 μ m 级 (块/米)	30 μ m 级 (块/米)
IEC	传统方法	水	5.5	1500	
	传统方法	水	10.8	1500	
	传统方法	水	15.8		1200
	传统方法	水	21		1000
	DAC*	高盐含量**	20-30	10000	7000
HIC	传统方法	水	5.5	1500	
	传统方法	水			
	传统方法	水	10.8	1500	
	传统方法	水	15.8		1200
	传统方法	水	21		1000
	DAC*	高盐含量**	20-30	10000	7000

*DAC = Dynamic Axial Compression 柱塞压力>3bar

** 高盐含量=>0.5M NaCl

II. 层析柱操作

1. 柱层析

a) 尺寸排阻层析 (SEC)

用合适的缓冲溶液(参见表十)5~10个柱体积平衡柱床。在 Toyopearl HW 柱上进行尺寸排阻层析一般在中性环境下进行,使用中等离子强度的盐溶液作为缓冲液。进样量一般在1~3%柱床体积。如果保留时间短于或长于期望值,就有必要调整流动相。请参考表九改变流动相。

表九

现象	原因/解决方法
保留时间短于预期值	样品部分或全部从柱中排出,确定样品的分子量,如果必要,使用更高排阻限的树脂。 阴离子分子会因离子排斥而被排出柱子,增加流动相的离子强度。

现象	原因/解决方法
保留时间长于预期值	阳离子分子会因离子吸引而被吸附，增加流动相的离子强度。 疏水性分子会因疏水作用而被吸附，减小流动相的离子强度或加入少量（10~20%）有机溶剂，如甲醇、乙醇或乙腈。

b) 离子交换层析 (IEC)

用缓冲液（参见表十）平衡层析柱 5~10 个柱体积。洗脱时增强盐浓度或者改变洗脱液的 pH 值。

表十

树脂类型	缓冲液	缓冲范围
阳离子交换	醋酸	4.8 - 5.2
	柠檬酸	4.2 - 5.2
	MES	5.5 - 6.7
	磷酸	6.7 - 7.6
	HEPES	7.6 - 8.2
阴离子交换	L-组氨酸	5.5 - 6.0
	咪唑	6.6 - 7.1
	三乙醇胺	7.3 - 7.7
	Tris-Cl	7.5 - 8.0
	二乙醇胺	8.4 - 8.8

如果目标蛋白在柱上无吸附，用酸或碱溶液活化离子交换。如果活化后还不能吸附目标蛋白，改变平衡缓冲液的 pH 值，增强蛋白和离子交换剂的静电作用，或者减小缓冲液的盐浓度。

c) 疏水相互作用层析 (HIC)

用含高浓度（一般来说 1M~3M）中性盐溶液（参考表十一）的适当缓冲液平衡层析柱。高离子强度可以增强蛋白和树脂间的疏水相互作用，利于吸附。在上样前，用最初的流动相走一次，平衡柱。减小洗脱液的盐浓度可以洗脱被吸附的蛋白。疏水作用弱的蛋白会比疏水性强的蛋白最先洗脱下来，高的盐浓度也可以做到这一点。如果目标蛋白无法用这一方法洗脱，加入小比例的有机溶剂或非离子表面活性剂，改变洗脱液 pH 值，或者降低洗脱温度。如何选择有机溶剂，表面活性剂或离液剂，请参考表十二。

表十一 在 HIC 中使用中性盐

盐 (按强度递减顺序排列)	评 述
柠檬酸钠盐	会导致很强的紫外吸收, 易于滋生微生物。
硫酸铵	pH 高于 8 时不稳定, 低紫外吸收, 抗微生物生长, HIC 最常用的盐
硫酸钠	溶解度低 (1.5M 在 25° C)
氯化钠	卤盐会腐蚀不锈钢, 便宜
氯化钾	卤盐会腐蚀不锈钢

表十二 在 HIC 中使用的流动相添加剂

有机添加剂	表面活性剂	离液剂
乙醇	Triton X-100	
甲醇	辛基葡萄糖苷	
异丙醇	Tween 20	盐酸胍
正丁醇	SDS	氯化四乙胺
乙腈	CHAPS	尿素
乙二醇	Emulgen 911 CTAB	硫氰酸钾
	Lubrol PX	

如果样品不稳定, 首先应增加柱平衡步骤, 额外加入 3~10 个柱体积的初始洗脱液。如果目标蛋白未被柱吸附, 增强初始洗脱液的盐浓度, 或者调节缓冲液 pH 值接近蛋白的等电点。

d) 亲和层析 (AFC)

Toyopearl 亲和层析树脂均为特殊的配体树脂 (螯合, 红或蓝密胆碱), 树脂表面经过化学处理可以吸附特定的配体。

平衡

AF Red, AF Blue-HC 和配体树脂应用 3~5 柱体积合适的初始缓冲液平衡, 如磷酸盐或 Tris, 含少量或不含盐。染色亲和层析树脂会在储存中释放少量的

结合染料。每次使用前应清洗染色亲和层析柱。对于一个新装填的柱子，用 1M 氯化钠或氯化钾溶液清洗。用 2M 氯化钾或 4M 尿素清洗用过的树脂。平衡一根用过或者新装填的层析柱，可以使用合适的初始缓冲液，如 20mM pH7.5 的磷酸盐

上样和洗脱

上样后，用 3~5 个柱体积的初始缓冲液冲洗层析柱，去除未吸附的不纯物。通常用于亲和层析的洗脱方式有两种：非特异性和特异性。

非特异性洗脱一般来说是通过增加洗脱液的盐浓度。绝大多数蛋白会被 2M 氯化钠或 3M 氯化钾溶液洗脱下来。未能洗脱的蛋白可以使用如下的洗脱液：

选择 1： 2M KCl 或 3M NaCl

选择 2： 1% Triton X-100 / 1M NaSCN / 75% 乙二醇 / 4M 尿素或 0.1M NaOH / 4.2M 硫酸铵(饱和的)

对于特定洗脱，酶会被包含其培养基和辅酶的洗脱液洗脱。培养基或辅酶浓度低于 10mM 就足以洗脱。

2. 清洗

Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 树脂可以在层析柱内或卸柱后清洗。清洗方法和持续时间取决于污染的程度。清洗时至少需要 3 个柱体积的清洗溶液。

SEC 树脂

大多数情况下，树脂可以用去离子水清洗，除去吸附的蛋白。对于那些结合很紧密的物质，可以用如下的方法：

(1) 离子键合物质

对于适当键合的物质，0.5~1M 盐水溶液就可以用于清洗树脂。对于键合很强的物质，最好使用 0.1~0.5M 氢氧化钠或 0.1~0.5M 盐酸或硫酸。无论如何也不要使用硝酸清洗 Toyopearl 树脂！硝酸会与 Toyopearl 树脂强烈反应。由于有时候酸会引起蛋白聚集，所以首先应使用碱溶液去除蛋白。

(2) 疏水键合物质

使用 10~20% 的醇，如乙醇，甲醇或异丙醇，来去除疏水物质。一些溶剂，如乙腈和丙酮也可以使用。需要牢记的是，溶剂有时候会引起蛋白聚集。

在使用完任何的酸、碱和有机溶剂后，用蒸馏水做最后的清洗。

IEC 树脂

对于中等的污染，用 0.5~1M 氯化钠溶液清洗，然后用初始缓冲液平衡。对于严重的污染，用 0.1~0.5M 氢氧化钠清洗，然后用 0.1~0.5M 氯化钠清洗，最后用初始缓冲液平衡。

对于 DEAE 和 QAE 树脂来说，极度严重的污染可以用 0.1~0.5M 氢氧化钠，蒸馏水，0.1~0.5M 盐酸，0.1~0.5M 氯化钠依次冲洗，然后用初始缓冲液平衡。

用高浓度盐溶液流动相做最后的冲洗可以保证正确的对抗离子的保留。

HIC 树脂

大多数情况下，树脂可以用蒸馏水清洗，去除残留的蛋白。对于那些结合很紧密的物质，可以用如下的方法：

(1) 离子键合物质

对于适当键合的物质，0.5~1M 盐溶液就可以清洗树脂。对于更强键合的物质，0.1~0.5M 氢氧化钠或合适的酸，如盐酸或硫酸，就可以清洗树脂。在任何情况下都不要使用硝酸清洗 Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 树脂！因为酸有时候会使蛋白聚集，因此首先应使用碱溶液清除蛋白。

(2) 疏水键合物质

可用 10~20% 的醇，如乙醇、甲醇或异丙醇来清洗。一些溶剂，如乙腈和丙酮也可以使用。需要牢记的是，溶剂有时候会引起蛋白聚集。非离子表面活性剂也可以用于清洗。

在使用完任何的酸、碱和有机溶剂后，用蒸馏水做最后的清洗。

AFC 树脂

高浓度的中性盐、离液剂或表面活性剂可用来做初步的清洗。在树脂上残留的蛋白可被 2 个柱体积的 0.5M 氢氧化钠清洗掉，然后用蒸馏水清洗。对于 AF-Heparin 来说，氢氧化钠只能用于重度污染物的清洗。

3. 保存

SEC, IEC 和 HIC

装填好的柱子和用过的树脂保存在含有抑菌剂的蒸馏水中，如 20% 乙醇，最好在 4~25° C 下储存。

AFC

装填好的柱子和用过的树脂保存在含有抑菌剂的中性 1M 氯化钠或氯化钾溶液中，如 20% 乙醇，最好在 4~10° C 下储存。

对于 AF-Formyl 650M，装填好的柱子和用过的树脂保存在中性的 1M 氯化钠或氯化钾溶液中，含有 1% gluteraldehyde，最好在 4~10° C 下储存。

请注意染色亲和层析树脂会在储存中释放少量的染料。请在每次使用前清洗树脂以除去释放出的染料。

4. 灭菌/去热源/防腐剂清除

(1) 灭菌

Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 树脂可以用高压 121° C 灭菌 20 分钟而不必担心影响其性能。

另外，预装柱可以暴露在 200ppm 次氯酸钠溶液中长达 12 小时而不影响其功能。

(2) 去热源

Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 树脂可以在 pH2~12 下使用。然而，短时间 (<12h) 的暴露在更高 pH (0.5N NaOH) 对于去热源来说也是可以接受的。用 0.5N NaOH 处理 4 个小时，然后再用 3 个柱体积的缓冲液平衡，典型的内毒素水平可以降低 4 个数量级。

(3) 去除防腐剂

Toyopearl 和 TSK-GEL 5PW 在运输过程中包含了 20% 的乙醇(除了一些亲

和层析产品)。在对树脂预处理过程中就可以减少乙醇的含量。

5. 柱筛板

与压力相关联的问题往往都是因为柱筛板堵塞。取下柱筛板，按照层析柱制造商提供的方法彻底清洗筛板。如果问题还存在，更换筛板。推荐使用网状筛板，而不要使用多孔的特氟纶，聚乙烯或不锈钢。

Amberchrom 及 MCI GEL 装填方法

Amberchrom™和 MCI GEL 层析树脂是用于吸附和反相层析的大孔聚合物树脂，主要用于实验室和中试级纯化蛋白、多肽、核酸、抗体和小分子药物。Amberchrom™ CG161, CG300, CG1000 以及 MCI GEL CHP20P 是聚苯乙烯-二乙烯苯聚合物基体，而 Amberchrom™CG71 和 MCI GEL CHP2MGY 是丙烯酸基体。所有的树脂均为浆液包装，有 25mL 至 50L 的包装。本文以 Amberchrom 系列树脂为例，介绍了如何使用这些树脂在实验室规模装填出最好的层析柱。对于装填更大规模的色谱柱，请与我公司技术支持部门联系：010-59812370。

一、装填前准备

1. 装填 Amberchrom 层析树脂的一般事项

若想装填出最好的效果，装填压力应在 0.5~10bar (7~150psi)。我们不推荐使用自然沉降装柱的方法。

Amberchrom 层析树脂是用含 20%乙醇的液体包装的。为了达到最好的装填效果，推荐使用 10~20%有机溶剂（乙醇、甲醇、异丙醇或乙腈等）含 0.1%酸（TFA、硫酸或醋酸）作为装填缓冲液。

不要使用强氧化性酸如硝酸！硝酸会与聚合物直接发生剧烈反应。

2. 去除小颗粒

任何树脂在使用前均需要除去小颗粒，因为小颗粒会堵塞筛板或砂芯造成整个柱子压降增加。在装填层析柱之前，需按照如下的步骤去除小颗粒。

(1) 摇动原始的包装，使得树脂悬浮。

(2) 将树脂倒入一个合适的容器内备用。重新静置的时间取决于容器的几何尺寸、稀释的量、缓冲液的种类和树脂粒径的大小。

(3) 轻轻倒掉或抽走静置树脂表面的悬浮物。

(4) 加入新的缓冲溶液，在上部轻轻搅拌使其悬浮。不要用磁力搅拌或超声波震荡，因为这样会产生小颗粒。

(5) 让树脂重新澄清下来，倒出表面的悬浮物。

(6) 重复如上的步骤，直到看不到小颗粒为止。根据树脂颗粒尺寸的大小，

这一步骤需要 1~24 个小时。

3. 匀浆准备

匀浆液的浓度按静置胶体体积除以匀浆后总体积计算。为了得到最好的装填效果，浆液浓度在 50%~65%。浆液浓度可以按如下步骤调节：

- (1) 轻轻将原始容器中的树脂搅拌起来成为悬浮液。
- (2) 将部分树脂倒入一个量筒，如图 1，测量浆液的体积，记录下来。
- (3) 将部分树脂倒入一个可抽真空的玻璃柱中，如图 2。



图 1

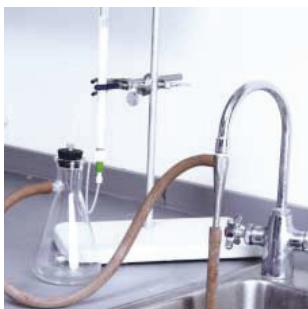


图 2

- (4) 将玻璃柱底部接入一个合适的真空源中。
- (5) 抽真空除去多余的液体。当液体抽走后，计算干树脂的体积，计算树脂浆液：

$$(\text{干树脂体积}/\text{总浆液体积}) \times 100 = \text{匀浆液浓度}$$

(6) 一旦匀浆液浓度确定，计算需要装填的层析柱体积。所有的聚合物树脂在压力下均会被略微压缩，因此为了装填一根紧密的柱子，需要略微多一些的树脂。需要的树脂量为层析柱体积的 1.1 倍。

(7) 匀浆浓度 50~65% 的浆液十分适合装填标准的层析柱。如果需要调整，移走/抽走或加入新的流动相。

二、装填需要的设备

若想成功装填 Amberchrom 树脂，需要以下的设备：

1. 泵（仅流动装填需要）— 泵必须具有 2~3 倍额定装填流速。推荐使用

没有脉冲的泵。泵硬件上应耐受装填和层析用的溶剂。

2. 压力表 — 在装柱时需要一块压力表。装柱的压力应在压力表量程的中段。

3. 层析柱 — 层析柱需耐受装柱和层析溶剂。我们不推荐使用丙烯酸层析柱，因为这类柱溶剂耐受性不好。层析柱应有径向或轴向压缩的能力，并且有一个可调的液体分配器。不推荐使用固定柱头的层析柱，因为树脂会收缩和膨胀。流动装填的层析柱，如 Millipore 和 E.Merck，已经成功的使用 Amberchrom 树脂。动态轴向压缩柱，如 TechniKrom 和 ProChrom 也已成功使用 Amberchrom 树脂。

4. 柱支持 — 可用一个不锈钢或尼龙网筛做柱支持件。一个圆盘支持件可以使用，不过它会增加整个层析柱的压降。筛网尺寸可以按如下选用：

S 级 - 10~15 mm

M 级 - 30~40 mm

C 级 - 50~70 mm

5. 储槽 — 在装填过程中根据浆液需要量，可能会需要一个储槽。如果浆液体积大于层析柱体积，就需要一个储槽。这保证装填时一次操作成功。也可以多次将浆液倒入层析柱，但这不值得推荐。

三、装填步骤

(一) 装填方法 — 流动装填

对于实验室规模层析柱，我们推荐装填流速为至少 2~3 倍常规操作流速。然而，中试和生产规模的层析柱可以使用小于 2 倍正常操作流速来装填。对于更大的层析柱装填，请于我们联系。

表一 Amberchrom 树脂推荐装填和操作流速

柱尺寸 (cm ID × cm)	级别	装填流速 (ml/min)	操作流速 (ml/min)
1.0 × 10	S	4.0 - 10	0.2 - 4.0
2.2 × 30	S	15 - 25	1.0 - 10
7.0 × 100	S	100 - 200	10 - 50
1.0 × 10	M	5.0 - 10	0.2 - 5.0

柱尺寸 (cm ID × cm)	级别	装填流速 (ml/min)	操作流速 (ml/min)
2.2 × 30	M	15 - 40	1.0 - 15
7.0 × 100	M	100 - 300	10 - 100
1.0 × 10	C	7.5 - 15	0.2 - 10
2.2 × 30	C	20 - 60	1.0 - 30
7.0 × 100	C	100 - 400	10 - 200

1. 按图 3 装好层析柱。层析柱的柱体积应足够将浆液一次注入。



图 3

2. 用喷壶或反向流的方法将装填缓冲液润湿底部的筛板。关闭层析柱出口，并在柱底部留 1~2cm 缓冲液，如图 4。



图 4

3. 将浆液搅匀，确保均一性，如图 5。



图 5

4. 沿层析柱壁将浆液缓慢倒入层析柱，避免气泡产生，如图 6。



图 6

5. 当浆液全部倒入层析柱后，用含装柱缓冲液的喷壶冲洗柱内壁，图 7。



图 7

6. 立即将充满装柱缓冲液的液体分配器放入层析柱中（图 8 和图 9）。分配器放入缓冲液中但不应接触到浆液。在分配器和缓冲液间不能有气泡。



图 8



图 9

7. 打开柱底开关，启动泵。

8. 缓慢升到目标流速。这可以阻止压力对正在形成的柱床的冲击，还可以避免柱床的不均匀性。流速可以分为几个阶段缓慢升高。增加量取决于层析柱的尺寸和目标流速。表二是一些例子。

表二 Amberchrom 树脂装填流速指南

柱尺寸 (cm ID x cm)	介质类型	目标流速 (ml/min)	增加量 (ml/min)	保持时间 (min)
1.0 x 10	CG71c	15	5	0.5
2.2 x 30	CG161m	40	10	1
7.0 x 100	CG1000s	200	40	2

9. 当柱床最终形成时，停泵，关闭柱出口。

10. 如果层析柱装填时没有储槽，转至步骤 11。如果使用了储槽，所有的柱床都应在层析柱的下部。如果需要用吸液管或虹吸管将储槽上部漂浮液体吸走。然后取走上部的储槽和联接圈，小心的将液体分配器放入柱中，放置在树脂床表面。注意不要将气泡带入层析柱。

11. 小心的去除液体分配器的密封，将分配器降至树脂柱床表面。注意在移动分配器的时候不要碰到柱床。分配器应轻轻接触柱床。（注意图 10 中分配器的位置）



图 10

12. 打开柱出口，开泵，同步骤 8。

13. 柱床应被进一步压缩。等柱床稳定后，停泵，保持柱出口开启状态。调节液体分配器高度，降到柱床表面。分配器应压在柱床表面不能前进为止。注意不要将树脂弄到密封圈上。关闭柱出口。

14. 此时装柱完毕，等待平衡。

（二）装填方法 — 动态轴向压缩柱（DAC）

1. 按图 11 装配好层析柱。层析柱的柱体积应足够将浆液一次注入。



2. 用喷壶或反向流的方法将装填缓冲液润湿底部的筛板。关闭层析柱出口，并在柱底部留 1~2cm 缓冲液。

3. 将浆液搅匀，确保均一性。如图 5 所示。

4. 沿层析柱壁将浆液缓慢倒入层析柱，避免气泡产生，如图 12。



图 12

5. 当浆液全部倒入层析柱后，用含装柱缓冲液的喷壶冲洗柱内壁。

6. 按照层析柱生产商的指引完成层析柱装填。装填 DAC 层析柱时，推荐使用柱压力为 8~10bar。图 13 演示了装柱前柱塞的位置，图 14 演示了柱塞在装填完后的位置。



图 13



图 14

四、柱平衡

为保证 Amberchrom 树脂有着最佳的柱效，装填后必须平衡。平衡的过程只需要在新树脂上进行。而用过的树脂可以用普通的在位清洗（CIP）程序来进行。

1. 将柱出口接一个合适的废液容器。不要将层析柱接在监测器上！
2. 用 100% 乙腈、丙酮或异丙醇以最大线性流速 150cm/h 冲洗层析柱 8~10 个柱体积（CV）。
3. 用 45% 乙腈/55% 水，50% 丙酮/50% 水，或 50% 异丙醇/50% 水以最大线性流速 40cm/h 冲洗层析柱 5 个柱体积。
4. 层析柱平衡完毕，准备测试。

五、柱操作

检测

当柱平衡完成后，在用 3~5 个柱体积的流动相平衡，以便检测柱效。

用于检测柱效的流动相组成如下：

25% 乙腈/75% 水 用于 Amberchrom CG1000s

35% 乙腈/65% 水 用于 Amberchrom CG71 和 CG300

45% 乙腈/55% 水 用于 Amberchrom CG161

对羟基苯甲酸甲酯（1mg/ml），氯化钠（5%）或丙酮（5%）的溶液被用来检测装填好的层析柱的柱效和不对称性，线性流速 40cm/h。上样量应为层析柱体积的 0.5%~1%。

装填好的层析柱不对称因子值应在 0.8~1.6。Amberchrom 树脂最小柱效列于表三。

表三 Amberchrom 树脂最小柱效

柱内径 (cm)	S 级 (块/米)	M 级 (块/米)	C 级 (块/米)
1.0	5000	2500	1000
2.2	2500	1500	750
7.0	1500	1000	500

六、层析分离

先用 3~5 个柱体积的层析流动相平衡树脂。用 Amberchrom 层析可使用等度或梯度洗脱，可使用的溶剂有异丙醇、乙醇、甲醇或乙腈。离子对试剂，如三氟乙酸（TFA），也可使用改进层析效果。

如果层析柱使用梯度洗脱，建议在真正分离前走一个空白样品。在空白样品走完后检查层析柱，如果需要，调整柱头的液体分配器。

虽然 Amberchrom 树脂溶胀系数很小（2~6%），还是建议在进样、洗脱和清洗步骤中保持最少（2~3%）比例的有机溶剂。在使用 100% 水溶液流动相时，柱效会因柱床收缩而受到影响。

七、层析柱保养

1. 清洗

Amberchrom 树脂可以在层析柱中或从层析柱中取出进行清洗。污染的树脂可以用 0.5M NaOH 处理 12~18 小时，然后用水/有机溶剂混合液冲洗。碱液对去除蛋白聚集以及其他污染物很有帮助。层析柱可用 100% 溶剂梯度清洗，10% 的梯度或线性梯度 4% 每分钟。

注意：绝对不能使用硝酸清洗 Amberchrom 树脂！

2. 储存

将层析柱或使用过的树脂用 20% 异丙醇，甲醇，乙醇或乙腈浸泡，储存于 4°C~25°C。

3. 卸柱

Amberchrom 树脂可以耐受多次装柱和卸柱。卸柱时，将一个足够大的容器放在柱底部，打开柱底塞，放出浆液（图 15a 和图 15b）。用容器收集浆液。另外一个卸柱的方法是移走柱顶部的液体分配器，向层析柱中加入足够量的流动相，轻轻搅拌使得柱内树脂成浆液。悬浮的浆液可以用虹吸管抽至合适的容器中。



图 15a



图 15b

罗门哈斯树脂参数

特性参数	CG161 CG300 CG1000(S)(M)(C)	CG71(S)(M)(C)
介质类型	疏水性较强的反相介质	疏水性较弱的反相介质
基质	聚苯乙烯-二乙烯苯	聚甲基丙烯酸酯
PH稳定范围	1-14	1-14
解析条件	提高有机溶剂浓度	提高有机溶剂浓度
可使用的线流速	>600cm/h	>600cm/h
使用温度	4-60℃	4-60℃
保存方法	20%乙醇悬浮液(4-35℃)	20%乙醇悬浮液(4-35℃)
清洗、再生	1-2M NaOH, 1-2M HCL, 乙醇 或丙酮	1-2M NaOH, 1-2M HCL, 乙醇 或丙酮
灭菌	121℃高温灭菌	121℃高温灭菌

大孔吸附树脂处理程序

新购树脂可能含有分散剂、致孔剂、惰性溶剂等化学残留，所以使用前应按以下步骤进行预处理。

1. 装柱前清洗吸附柱与管道，并排净设备内的水，以防有害物质对树脂的污染。

2. 于吸附柱内加入相当装填树脂 0.5 倍的水，然后将新大孔树脂投入柱中，把过量的水从柱底放出，并保持水面高于树脂层表面约 20 厘米，直到所有的树脂全部转移到柱中。

3. 从树脂底部缓缓加水，逐渐增加水的流速使树脂床接近完全膨胀，保持这种反冲流速直到所有气泡排尽，所有颗粒充分扩展，小颗粒树脂冲出。

4. 用 2 倍树脂床体积 (2BV) 的乙醇，以 2BV/H 的流速通过树脂层，并保持液面高度，浸泡过夜。

5. 用 2.5-5BV 乙醇，2BV/H 的流速通过树脂层，洗至流出液加水不呈白色浑浊为至。

6. 从柱中放出少量的乙醇，检查树脂是否洗净，否则继续用乙醇洗柱，直至符合要求为止。检查方法：

a. 水不溶性物质的检测 取乙醇洗脱液适量，与同体积的去离子水混合后，溶液应澄清；再在 10℃ 放置 30 分钟，溶液仍应澄清。

b. 不挥发物的检查 取乙醇洗脱液适量，在 200~400nm 范围内扫描紫外图谱，在 250nm 左右应无明显紫外吸收。

7. 用去离子水以 2BV/H 的流速通过树脂层，洗净乙醇。

8. 用 2BV4% 的 HCL 溶液，以 5BV/H 的流速通过树脂层，并浸泡 3 小时，而后用去离子水以同样流速洗至水洗液呈中性 (pH 试纸检测 pH=7)。

9. 用 2.5BV 5% 的 NaOH 溶液，以 5BV/H 的流速通过树脂层并浸泡 3 小时，而后用去离子水以同样流速洗至水洗液呈中性 (pH 试纸检测 pH=7)。

10. 树脂吸附达饱和的终点判定方法：药液以一定速度通过树脂柱，根据预算用量，在其附近，取过柱液约 3ml，置 10ml 具塞试管中，密塞后猛力振摇。观察泡沫持续时间，如泡沫持续时间为 15 分钟以上，则为阳性，此时树脂达到饱和。

表一 XAD 大孔吸附树脂处理程序

步骤	流速 (BV/h)	流量	备注
装柱前			使用乙醇—水溶液将树脂浸泡，除去其中的气泡，使其充分膨胀收缩
装柱			
反洗			除去小粒子和破碎树脂
前处理	1-5	5-10BV	用含水乙醇进行洗脱
水洗脱	1-5	5-10BV	用去离子水冲洗，必要时根据吸附树脂的 pH 值使用缓冲溶液
吸附	0.5-3	根据吸附量	在吸附容量以下
水洗	1-5	0.5-1BV	将多余的吸附溶液洗出
洗脱	0.5-3	2-10BV	不同浓度的乙醇、丙酮等的含水溶液，用酸、碱、缓冲溶液等调节 pH 值，或两者并用，将吸附在树脂上的物质洗脱下来
水洗脱	1-5	3-4BV	用去离子水冲洗，必要时根据吸附树脂的 pH 值使用缓冲溶液
再生	0.5-3	3-4BV	多次应用 75% 乙醇、丙酮、碱+乙醇溶液
水洗脱	1-5	3-4BV	用水冲洗干净，如果用碱再生后先要加入酸中和

注：前处理处理干净的指标：用乙醇洗至 1 份乙醇于 3 份水中不产生白色浑浊。

三菱化学大孔吸附树脂试验方法

1. 前言

大孔吸附树脂大致分为苯乙烯—二乙烯苯的 HP、SP 系列及甲基丙烯酸酯系的 HP-MG 系列。

大孔吸附树脂具有多孔性，是表面积大的聚合物，因此能够作为吸附剂使用。另外，使用有机溶剂能够容易再生（洗提）。

吸附现象根据范德华力，主要基于疏水的相互作用。

2. HP 名称的选定

使用大孔吸附树脂时，为了使应被吸附的物质在吸附剂的细孔内扩散，并到达吸附面，必须具有充分且适当的孔径。

(1) 吸附力强度

吸附力的强度(Cap 的大小)为, SP200 系列>HP 及 SP800、900 系列>HP-MG 系列, 并且 SP200 系列具有反相难以洗脱的性质, 因此洗提时要考虑到洗脱液浓度和种类。

另外, 由于 SP200 系列吸附力强, 可在以前不能使用的、难以吸附的水溶性的分子物质, 以及用活性炭都不能去除的淡黄色色素的吸附。另外, 以前 HP-MG 系列不能洗脱, 因而不能使用大孔吸附树脂的疏水性大的高分子体系内也可以使用 SP200 系列树脂。

(2) 比重大小

SP200 系列>HP-MG 系列>HP 及 SP800、900 系列

(3) 膨润性

HP-MG 系列<SP200 系列<HP 系列

以前, 大孔吸附树脂在吸附/洗脱时产生 20~30% 的体积变化, 但在 HP-MG 系列中为 10% 以下, SP200 系列在 20% 以下。

(4) 细孔分布的均匀性

SP800、900 系列>HP 系列及 HP-MG 系列

要求高分辨率的场合, 由于 SP800、900 系列具有均匀的细孔分布, 因此是最佳的选择。

3. HP 及 SP 系列处理方法

工序	流速	方法
前处理		第一次使用 HP 及 SP 时, 用醇、醇水溶液、NaOH 水溶液、NaOH 加醇等进行前处理, 除去不纯物及气泡
水洗		
吸附	SV: 0.5~2	抗生素、天然产物、植物提取物等
水洗	SV: 0.5~2	
(反洗)	LV: 0.2~0.7 (HP) LV: 5~8 (SP)	通常不进行, 当树脂被悬浮物堵塞, 对后续工序带来影响时进行, 但由于 HP 比重小, 要注意。
洗脱	SV: 0.5~2	
洗脱液置换	SV: 0.5~2	
水洗	SV: 1~5	
回收再生		HP 及 SP 吸附了不纯物, 被污染, 目的物质的吸附量下降, 这时应进行回收再生操作。(并不是每个周期均实施)
回收再生剂 置换	SV: 0.5~2	[回收再生剂] •50% 异丙醇+1N NaOH (或氨) •4% NaCl [回收再生方法] •3~4BV 以 SV: 0.5~1 冲洗 •浸泡树脂层, 放空气泡
水洗	SV: 1~5	

SV: Space Velocity 体积流速 每小时流过柱床的体积数

LV: Linear Velocity 线流速 每小时流过柱床的高度

BV: Bed Volume 柱体积

公司简介

北京慧德易科技有限公司(H&E Co.,Ltd.)作为全国最大的天然产物和生物制药分离、纯化、分析耗材和设备供应商，致力于为广大提取物厂家、制药企业、科研机构、大专院校以及化妆品、食品、化工企业提供各种天然提取物和一流的实验室仪器、设备以及试剂、耗材等产品。重点服务于广大的天然产物提取物、药物、生物制品的生产厂商，为客户提供从实验室到工业化生产全过程所需的分离设备和耗材，解决您在分离纯化的生产放大的过程中遇到的问题。

作为 GE HealthCare Sephadex LH-20 填料，Millipore 层析柱，CG 系列精细分离填料，Cellufine 纤维素凝胶填料在中国区的总代理，以及罗门哈斯树脂产品，MERCK 分析试剂和色谱产品，TOSOH 生物分离填料和色谱柱，日本 Develosil 和 YMC 高压液相色谱柱和填料等世界著名色谱产品在中国区的一级代理，我们除了负责以上各公司产品在中国的销售和市场开发以外，还结合本公司的技术专长，人才优势，积极开展分离技术，色谱技术，样品前处理技术的推广和服务工作。

我们会以高质量的产品、专业的服务为您的工作提供最大的便利。

全国统一热线电话：4008-111-326

H&E 北京慧德易科技有限责任公司

High quality & Expert

总部：北京回龙观西大街龙冠置业大厦 609 室
电话：+86-10-59812371, 59812372, 59812373
传真：+86-10-59812400
邮箱：sales@prep-hplc.com
网址：www.prep-hplc.com
邮编：102208

上海办：上海市长宁区汇川路 99 号新时空国际商务广场 909 室
电话：+86-21-58950178
传真：+86-21-58950139
邮编：201203