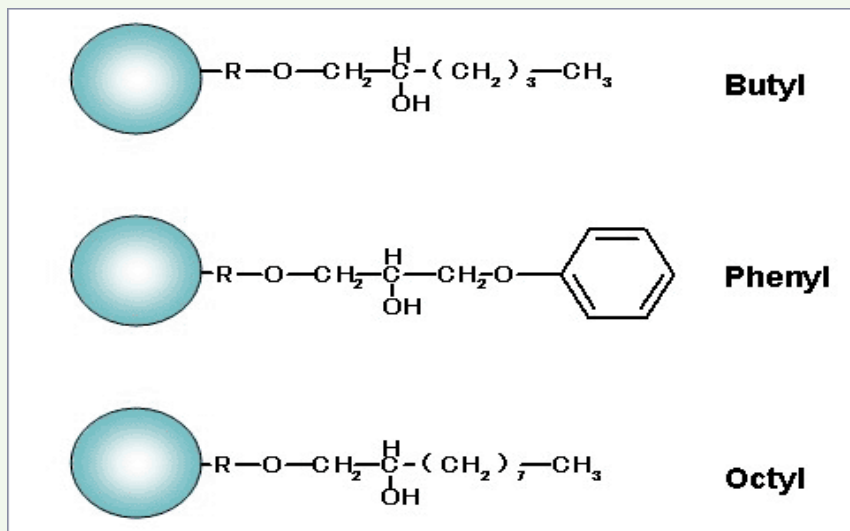




疏水层析填料

疏水层析，是根据不同的蛋白与疏水表面产生的相互作用的差异，进行蛋白分离的一种方法。一般而言，离子强度（盐浓度）越高，物质所形成的疏水键越强。影响疏水作用的因素包括：盐浓度，温度，pH，表面活性剂和有机溶剂。疏水层析的应用与离子交换层析的应用刚好互补，因此，可以用于分离离子交换层析很难或不能分离的物质。

Chisso 公司生产的疏水层析填料，有三种类型：**Cellufine™ Butyl**, **Phenyl** 和 **Octyl**，分别为在多孔的交联纤维素颗粒上通过一个短接头，共价键和丁基，苯基或者辛基的层析填料。结构见下图：



填料的疏水性按丁基、苯基、辛基，疏水性程度依次增大。通常，**Cellufine™ Octyl** 对疏水性蛋白的吸附性会强于 **Cellufine™ Butyl** 对疏水性蛋白的吸附。然而，蛋白被吸附的越厉害，也就越难洗脱。**Cellufine™ Phenyl**，具芳香族物质的特性，因此，在某些情况下，可以更好地吸附丁基和辛基等脂肪族所不能吸附的物质。在使用疏水层析分离物质时，没有通法，只能根据待分离物质的特性，筛选合适的填料，摸索优化其分离纯化的条件。

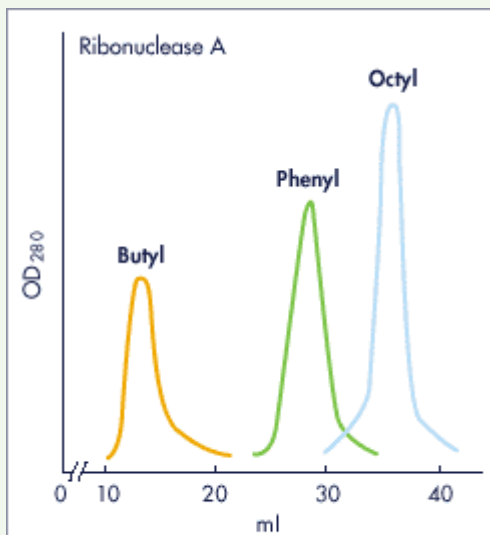


Figure 1
Variation of the Hydrophobic Degree

三种疏水层析填料的疏水性差异（左图）

色谱柱：8.2 x 150 mm

柱体积：8 ml

流动相：2.0 – 0.0M

Ammonium Sulfate

in 0.01M phosphate, pH 7.0

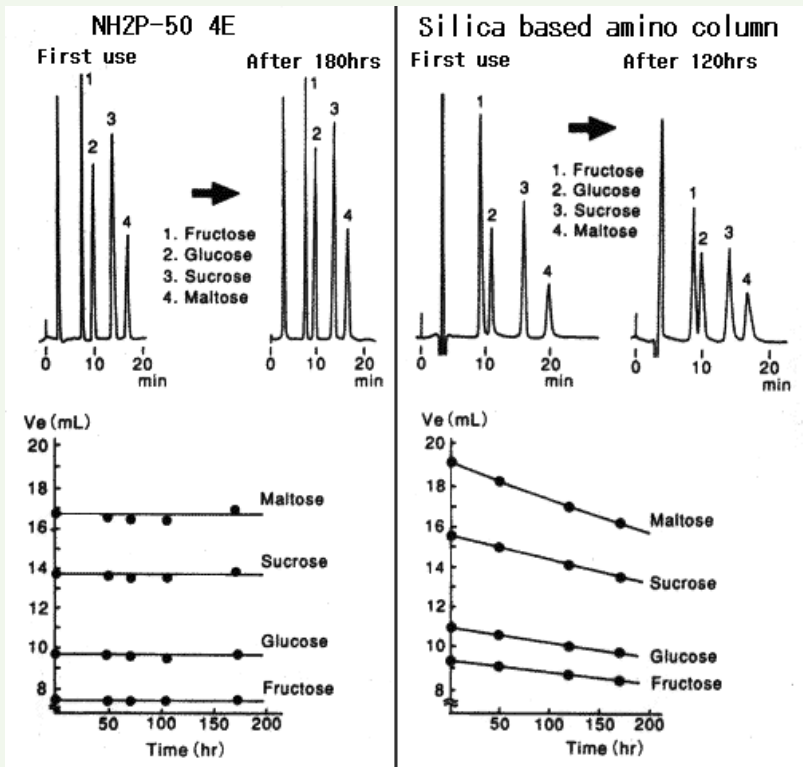
流速：1.32 ml/min

样品：5 mg/3 ml– 100 μl



Asahipak NH2P 色谱柱（氨基柱）

Asahipak NH2P 色谱柱是 Shodex 公司生产的用于分析糖类物质的正相柱。Asahipak NH2P 色谱柱，是以聚合物为基材的氨基柱，化学稳定性良好，在 pH2-13 的条件下均可使用。与硅胶基材的氨基柱相比，聚合物基材的氨基柱 Asahipak NH2P，可以很好地实现硅胶基材氨基柱的各种应用；对流动相的耐受性更好，使用寿命更长久；另外，Asahipak NH2P 可用于定量分析；还可以用碱性溶剂冲洗。



聚合物基材氨基柱与硅胶基材氨基柱的柱寿命比较

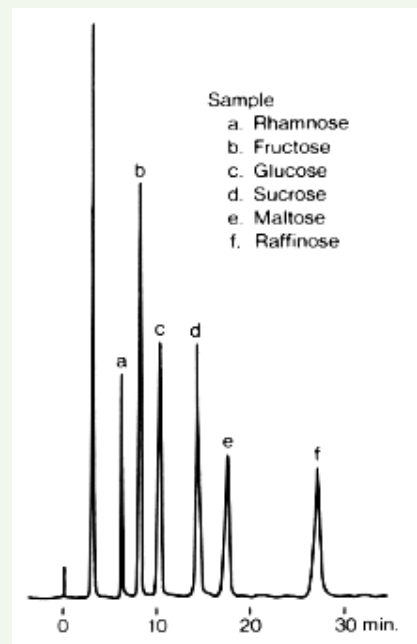
左图为 Asahipak NH2P 色谱柱与硅胶基材氨基柱的寿命对比试验。结果显示：随着使用时间的延长，硅胶基材氨基柱对单糖、二糖的保留快速下降，其原因应是硅胶基材氨基柱的氨基降解所致。

色谱柱：Asahipak NH2P-50 4E, 其它公司的氨基柱 (4.6mmID*250mm)
 流动相：CH3CN/H2O=75/25
 流速：1.0mL/min
 检测器：Shodex RI
 柱温：30度

Asahipak NH2P 色谱柱可在正相模式下分离糖类物质，糖类物质按照分子量由小到大的顺序依次被洗脱。增加洗脱液中有机溶剂的比例可以延迟糖类的洗脱时间。Asahipak NH2P 色谱柱可以在碱性，室温条件下分离单糖、二糖和糖醇混合物。右图为 Asahipak NH2P 色谱柱分离单糖、二糖及三糖混合物的应用实例。

单糖、二糖及三糖混合物的分离

色谱柱：Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6mmID*250mm)
 流动相：H2O/CH3CN=25/75
 流速：1.0mL/min
 检测器：Shodex RI
 柱温：30度



学习园地

导致色谱柱柱压升高的原因及解决方案

第一阶段：确认是柱子导致的压力上升，还是 HPLC 系统导致的压力上升。

由于 HPLC 系统有很多环节，如泵、管路等，都容易吸附和积聚杂质，这些因素均会导致压力上升，所以，应先对 HPLC 系统进程性排查。

排查方法：取下色谱柱，仅用管路连接并正常输送流动相时记录系统压力。如果此时 HPLC 系统压力正常，则考虑是柱压升高。

第二阶段：确定是否使用了保护柱（预柱）。

一般在测定容易堵塞色谱柱的样品时，应该使用保护柱。如果使用了保护柱，那么压力的升高就有可能保护柱的柱压升高导致的。

排查方法：取下色谱柱，仅以保护柱连接管路并正常输送流动相测试柱压，再反过来取下保护柱仅以色谱柱连接管路正常输送流动相测试柱压，如果仅当连接保护柱时柱压高的话，则为保护柱引起的柱压升高，请清洗、或更换保护柱。

第三阶段：如果不是上述第一、第二点原因造成压力升高，就可以确认是色谱柱的原因了。

如果柱压是随着使用时间的延长，慢慢上升，这属于正常现象，是色谱柱达到使用寿命了，只能更换色谱柱了。

如果柱压是在实验开始时，实施中或经过一次、几次实验后，突然上升，则要结合实验情况考虑以下因素：

| | 原因 | 解决方案 |
|-----|-------------|--|
| 色谱柱 | 柱长 | 色谱柱越长，柱压越高。可根据实验情况适当减小柱长。 |
| | 柱内径 | 柱内径越小，柱压越高。可选择大内径色谱柱。 |
| 填料 | 基质的形态 | 填料的形态也会对柱压有影响。硅胶基质的形态可以分为无定形和球形两种，现在一般装柱使用球形硅胶。 |
| | 颗粒大小 | 小粒径填料装填的色谱柱柱压较高，在不影响分离效果的同时，可选择大粒径的填料。 |
| | 填料合成条件及装柱条件 | 不同厂家生产的色谱柱有的柱压可能相差 4、5 个 MPa，特别是低端和高端色谱柱之间，这一区别比较明显。例如：YMC 公司生产的色谱柱，就属于高效高压型的。 |
| 流动相 | 流动相的前处理 | 流动相中存在的杂质也会堵塞色谱柱，引起柱压升高。因此，在实验前应进行必要的试剂前处理，包括滤膜过滤，用固相萃取方法去除容易吸附于色谱柱填料的强疏水性杂质。 |
| | 流动相的种类 | 不同流动相，因其理化性质差异，产生的柱压有所差异。例如：乙腈产生的压力低于甲醇，但两者的分离效果相似。在某些情况下，可以通过替换流动相的种类减小柱压。 |

| | | |
|----|----------|--|
| | 混合流动相的比例 | 流动相成分间的比例，也可以引起柱压的差异。如：当甲醇/水=50/50 时，柱压就较高。可以通过调整流动相成分间的比例降低柱压。 |
| | 温度 | 温度的变化也会导致柱压的变化。最好使用柱温箱控温，可根据实验情况，适当升高柱温以减小柱压。 |
| 样品 | 含有不溶性成分 | 过滤样品，充分离心，防止堵塞预柱及色谱柱，引起柱压升高。 |
| | 盐分 | 样品或缓冲液中的盐分结晶于柱内，也可引起柱压升高。如：乙酸铵。根据实验情况，清洗色谱柱中的盐分，从而降低柱压。如：先用 40~50 °C 的纯水，低速正向冲洗柱子，待柱压逐渐下降后，相应提高流速冲洗，柱压大幅度下降后，用常温纯水冲洗，之后用纯甲醇冲洗柱子 30 分钟。 |
| | 被填料吸附沉积 | 样品污染沉积也会导致柱压升高。须根据实验情况和柱子类型进行清洗。（常规的清洗方法如下。） |

常规的色谱柱清洗方法（正向冲洗）

使用比目前使用的流动相对样品溶解能力更强的试剂清洗色谱柱。如果您使用的流动相是乙腈：水（70:30），请使用更高浓度的乙腈水溶液进行清洗，比如乙腈：水（80:20）或乙腈：水（90:10）。但是，如果高浓度的乙腈水溶液导致样品溶解困难的话，请停止使用上述流动相，转而使用对样品易溶的流动相。

如果该方法仍不见效，请试用下述方法。

色谱柱清洗方法（反向冲洗）

将色谱柱反向连接（即与色谱柱上箭头标识相反的方向使流动相由出口处流入、入口处流出）输送流动相试试。此时，如果柱压太高会对色谱柱造成损坏，所以请将流速调至平时操作时的一半。但是，如果使用相同的流速，反洗比正向清洗柱压还低的话，可能会发生色谱柱入口处的填料在筛板处聚集，那么就使用原有流速进行反洗。反洗流动相的选择与上述正向冲洗相同，请选用比平时使用的流动相溶解性更强的、更易溶解样品的流动相。

注意，反洗时请断开检测器的管路连接，以避免污染检测器。

反洗色谱柱容易对色谱柱造成伤害，不到万不得已不要轻易使用。

本期的内容就先介绍到这里，欢迎大家各抒己见，希望以上内容能对大家的学习工作有所帮助。