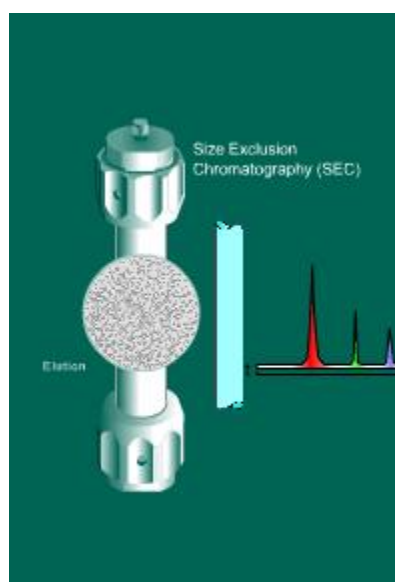


慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 150 期

尺寸排阻色谱法填料的选择



第 150 期 尺寸排阻色谱法填料的选择

一、什么是尺寸排阻色谱

利用填料的细孔，根据分析样品中各分子大小的差异进行洗脱的分离模式。取Size Exclusion Chromatography 开头字母，简称为SEC。由于填料与分析样品之间不发生相互作用（如吸附），因此，这是一种分析样品变性发生可能性较低分离模式。此外，该模式只使用单一流动相，相对简单的设备就能进行稳定的分析，且当知道有关分子量（大小）的信息时，还可以预测洗脱位置。另外，还有可以在保持聚体不解离的情况下即可对其进行分离的一大特长。分离模式图如图1-1 所示。色谱柱中充填了具有几十到几百纳米细孔的填料。分子通过色谱柱时，尺寸较小的分子渗透至填料的细孔内部，像绕行一样绕过色谱柱内部流过。另一方面，尺寸较大的分子由于无法渗透至细孔内部，从填料外侧流过。结果，分子尺寸较大的分子较早洗脱，较小的分子较晚洗脱。

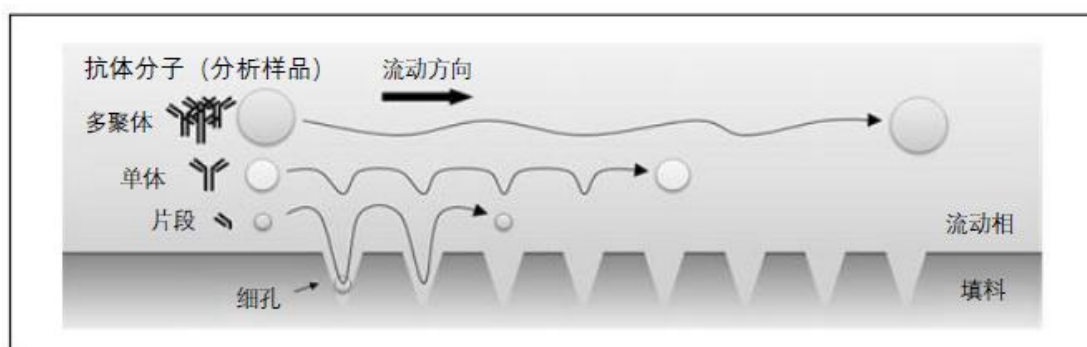


图 1-1 尺寸排阻色谱法的分离示意图

图1-2 是色谱柱内示意图和分子量计算用校正曲线示例。校正曲线是通过测定已知分子量的分子量标准物质，以各自的分子量对数与洗脱体积（或洗脱时间）绘制而来。比填料细孔直径大的分子无法渗透到填料内部，因此，它们由填料外部体积部分流出，并从色谱柱中洗脱出来（这称为空隙体积或排阻极限洗脱体积 V_0 ）。无论什么分子，在理论上，其洗脱速度不会比 V_0 快。另一方面，比细孔小的分子则根据尺寸渗透到细孔内部。流动相总体积 V_M 是流经填料外部的体积（ V_0 ）和填料内的细孔内体积（ V_i ）之和（= 流动相体积， $V_M = V_0 + V_i$ ）。因此，在理论上，没有洗脱迟于 V_M 的分子。该体积称为总渗透极限洗脱体积。所有分子均在排阻极限洗脱体积（ V_0 ）和总渗透极限洗脱体积（ V_M ）之间洗脱，从分子尺寸较大的开始，依次进行洗脱。

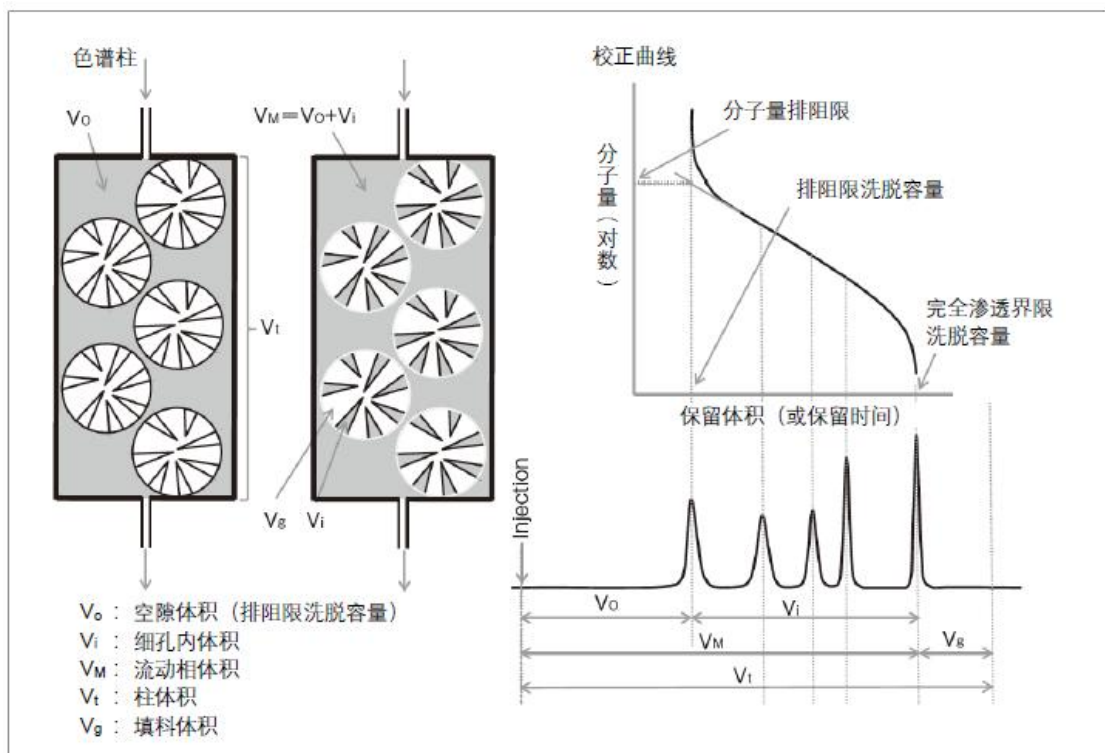


图 1-2 尺寸排阻色谱用色谱柱的示意图和校正曲线

二、填料选择

1. 基质种类

尺寸排阻色谱主要有两种填料，一种是以**硅胶作为基质**的硅胶类填料，另一种是以**多孔聚合物为基质**的聚合物类填料。由于蛋白的单个分子量通常在1万到数十万Da之间，分离时，一般使用在特定分子量区间中校正曲线斜率较缓的硅胶类填料的色谱柱。硅胶类填料机械强度高，耐压性好，而且，还有小粒径填料装填的高分辨率色谱柱可选用。图1-3是标准蛋白硅胶类填料的校正曲线，图1-5是标准样品的分离色谱图。

另一方面，与硅胶类填料相比，聚合物类填料色谱柱的校正曲线的坡度较陡，但分子量分离范围较宽，校正曲线的线性也很好，因此，适用于核酸等具有分子量分布的分析样品的分离。另外，还有大孔径的色谱柱，可适用于病毒和DNA等巨型生物大分子的分离。同时还具有耐碱性，可在较大的pH值范围内使用，可以使用碱溶液进行清洗。图1-4是标准蛋白聚合物类填料的校正曲线，图1-6是标准样品的分离色谱图。

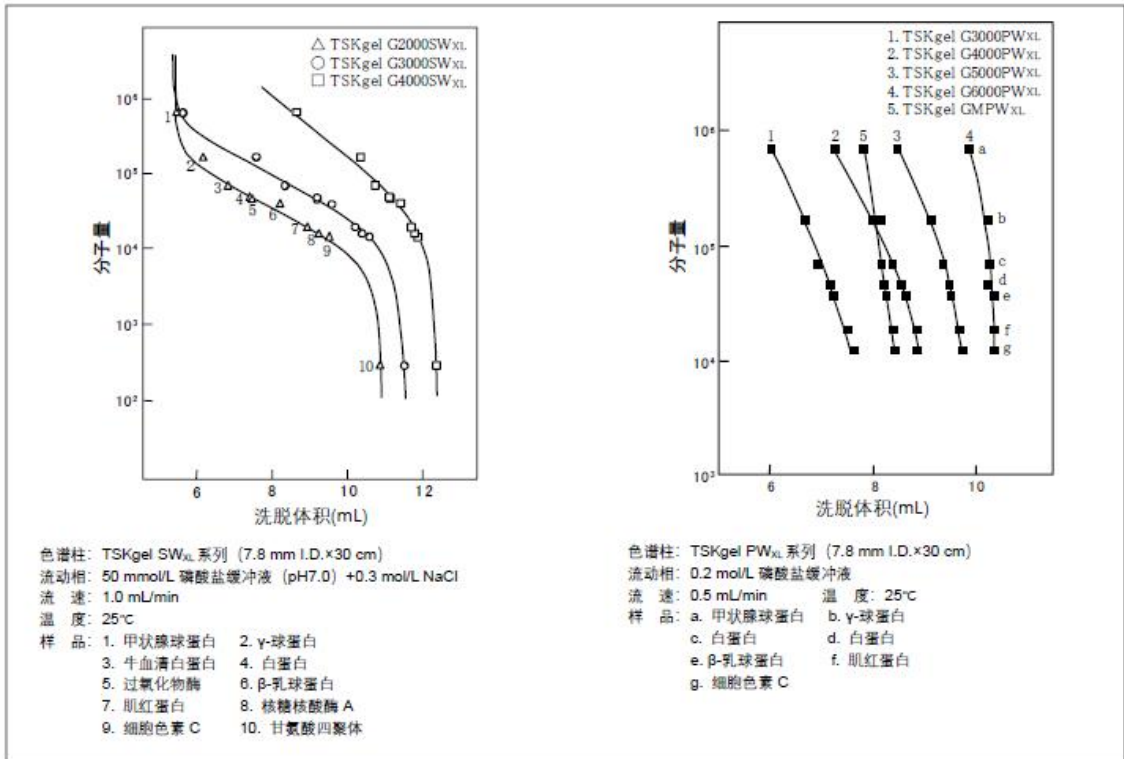


图 1-3 校正曲线 (硅胶基质填料)

图 1-4 校正曲线 (聚合物基质填料)

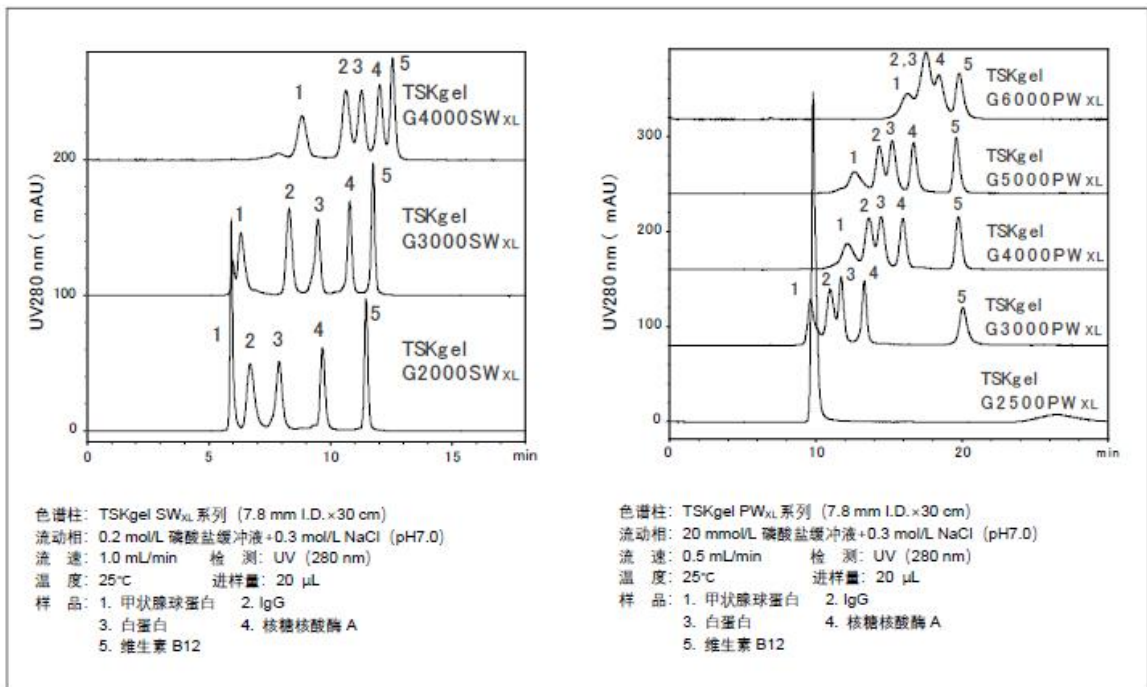


图 1-5 标准样品的分离实例 (硅胶基质填料) 图 1-6 标准样品的分离实例 (聚合物基质填料)

2. 基质的种类和特点

基质	优点	缺点
硅胶类填料	孔分布狭窄，特定分离范围内分辨率较高，刚性好，可进行高速分离	不耐碱
聚合物类填料	孔分布较宽，校正曲线在较大范围内具有良好的线性 耐碱 有较大粒径的色谱柱，可轻松放大至分离制备	分辨率低于硅胶类填料

3. 孔径

孔径决定可以分离的分子尺寸，因此，选择适合所测分子孔径的色谱柱是必要的。具体而言，应选择所测分子在校正曲线较为平缓的范围内洗脱的色谱柱。测定分子量分布较宽的分子时，可将填料孔径不同的色谱柱串联。

4. 粒径

粒径越小，理论塔板数越高，分辨率就高。另一方面，压力损失与粒径的平方呈反比，粒径越小时，色谱柱压力越高。因此，选择时需要同时考虑所使用的仪器的耐压性能。使用不同粒径的色谱柱分离标准样品的色谱图如图1-7所示。可以看出，粒径为5 μm 的 TSKgel G3000SWXL与粒径为 2 μm 的 TSKgel UP-SW3000 相比，后者峰形更尖锐，理论塔板数也更高，即分辨率更高。

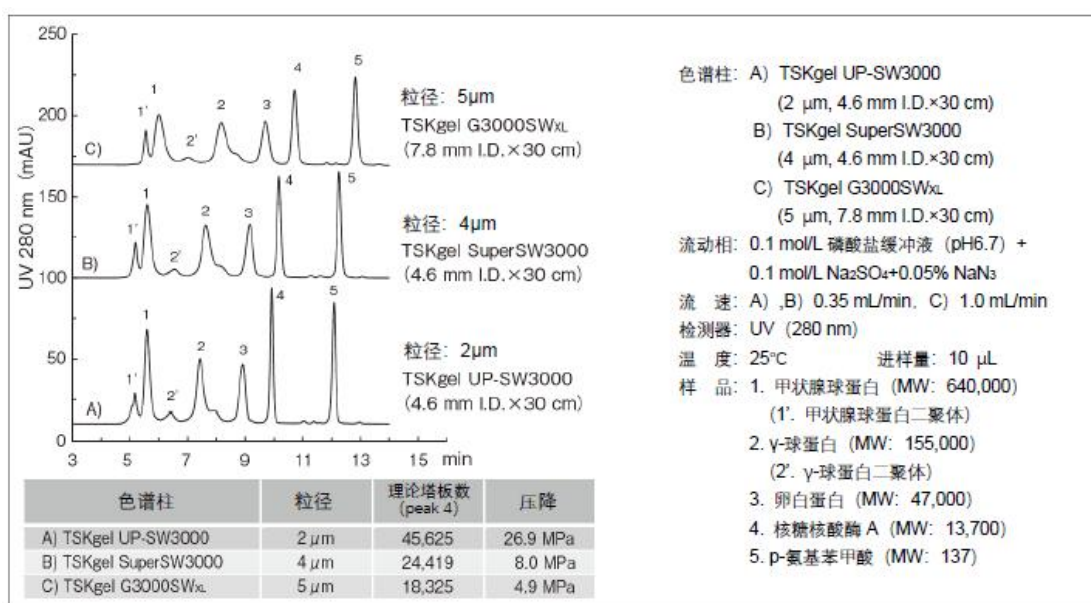


图1-7 粒径对分离的影响

* 如果需要更详细的资料，请联系我们。



北京慧德易科技有限责任公司

咨询电话：010-59812370/1/2/3

公司官网：www.prep-hplc.com

邮 箱：sales@prep-hplc.com

微信公众号：北京慧德易