

色谱柱发展动态

——第41届匹兹堡分析化学及应用光谱学会议 及展览会展出的新型色谱柱

第四十一届匹兹堡会议于1990年3月5日至9日在美国纽约召开,许多色谱公司展出了它们的最新产品,包括液相色谱、气相色谱、超临界色谱及有关色谱配件。本文着重介绍色谱柱的发展动态,包括新型反相柱,新的高效液相色谱(HPLC)柱系列、离子交换柱、吸附柱、正相键合柱及体积排斥色谱柱等液相色谱柱及生物分子分离用色谱柱。

一、HPLC反相柱

同过去一样,反相柱仍占主导地位,约占全部应用的65%。对其重复性、表面化学(主要针对碱性化合物)、使用便利(用低价的卡套系统)及聚合物固定相的柱效等方面不断进行改进。专用固定相也有较大的变化(常用样品测试过)。表I列出了今年展出的某些反相柱,大般分为常规固定相、专用固定相及碱钝化固定相。

1. 常规反相固定相

常规反相固定是指 C_{18} 、 C_8 等烷基键合相以及表面“裸露”的或者用烷基官能团(如 C_{18})衍生的聚合物(如聚苯乙烯-二乙烯基苯)。另外用聚硅氧烷或聚丁烯等聚合物涂渍或键合的硅胶固定相最近已商品化。后者可承受较高的pH值,但是除了氧化铝基质外,其余不能长时间置于高于pH=10的环境中。Alltech Associates(Deerfield, Illinois)介绍了一种以聚甲基丙烯酸羟基乙酯共聚物为基质的色谱柱,在pH值2—13范围是稳定的。因此,和其它聚

合物填充柱一样,可用较强的酸、碱溶液清除柱中残留的蛋白质。Eka Nobel公司(Surte Sweden)提供的 C_8 和 C_{18} 固定相在pH值为9.5时仍是稳定的。

Biotage公司介绍了一种Unisphere—PBD的独特固定相,其基质是氧化铝在微球上快速长成的微晶。这种固定相流通性好,柱压降小。其表面交联聚丁烯,形成耐碱的反相色谱填料。

聚合物固定相的应用日益增长,其柱效虽经改进但仍低于硅胶键合相。对于需要较高pH条件下的应用,人们有时用较低的柱效率来换取较长的柱寿命。Jordi Associates(Southborough, Massachusetts)推出的二乙烯基苯聚合物固定相可承受150℃高温,由于其聚合物骨架,可用强酸或强碱处理而不损害柱效。

2. 专用反相固定相

专用固定相是根据特殊的应用需要而开发的,并由生产厂家针对其专门用途予先经过测试。Hypercarb PGC固定相是Keystone Scientific公司生产的多孔石墨化碳黑。这种固定相最初是由英国爱丁堡大学的Knox教授开发的。这种7 μ m的填料其性能类似于吸附剂,可用于分离几何异构体和旋光异构体,流动相是水溶液,其性能大部分符合反相色谱的规律。ES Industries(Marlton, New Jersey)的Chromagbond AS带有金刚烷官能团,具有较硬的刚性结构和60Å的孔径,它能排阻聚合物和高分子化合物,使得“溶剂前沿”尖锐,因

而对随后流出组分干扰很小且免除了样品的予处理。

3. 碱钝化反相固定相

一般反相固定相存在残余硅羟基, 使得碱性样品的分离拖尾、柱效低, 回收率低及保留特征改变, 最糟的是样品损失。近年来, 某些反相填料在合成或者处理过程中除去了残余硅羟基, 通常叫做“碱钝化”。这种反相填料并不是用碱涂层去活而是对碱性化合物失去活性。这种固定相不需往流动相中加入三甲基铵盐之类的改性剂而同样可获得碱性化合物的漂亮峰形, 而过度封尾的固定相有时反而出现对碱性样品的吸附。专门合成的这种填料通常在键合之前用烷基硅烷予处理担体, 使得对羟基复盖得更均匀, 键合更完全。例如Burdick & Jackson(Muskegon, Michigan)的高配基密度(HLD)OC5C₈反相填料其表面覆盖度>50%而未封尾。

二、离子交换和离子色谱

戴安公司(Dionex Corporation, Sunnyvale, California)发展出一种可转换为若干不同相的聚合基质材料。首先合成8.5 μm粒度的高交联度聚苯乙烯—二乙烯基苯小球, 然后将100nm的微球共价键合到上述小球上, 再对微球表面进行适当的改性, 从而得到耐较宽范围pH值的不同类型填料。Omnipac PCX—100是其中的产品之一。这是一种磺酸型阴离子交换填料, 可用有机改性剂改变选择性。这种填料亦可用于分析不溶于纯水的样品。Omnipac PCX—500是经另外不同方法表面修饰的多种分离模式填料, 同一根柱可进行阳离子交换(用填料的磺酸基官能团)和反相色谱分离, 可同时分离无机阳离子、有机阳离子和中性化合物。Hamilton公司(Reno, Nevada)介绍两种新型柱: RCX—10带有三甲基铵

官能团的PS—DVB10 μm球形填料, 孔径100 Å, 主要用梯度淋洗分离从dp—1到dp—16的碳水化合物。PRP—X100是一支类似的色谱柱, 该柱用于替代双柱式离子色谱中的阴离子柱, 这种塑料柱亦用于一般的阴离子分析。Shandon Scientific(Runcorn, Cheshire, UK)介绍了两种球型阴离子交换剂: Hypersil WAX和Hypersil SAX, 都是硅胶为基质的键合相, 孔径120—300 Å, 粒度有5, 12, 15 μm, 其分析规模可由分析级直接到制备级。

三、其它类型HPLC柱

1. 吸附及正相键合相

Shandon公司推出了Hypersil的乙二醇键合相, 二醇基有一定的极性但小于羟基。Keystone公司的Deltabond PEG柱是硅胶基质键合聚乙烯醇, 适用于分离含氢键的化合物如醇、酸和甙体化物, 亦可用于超临界色谱。

2. 排阻色谱(SEC)

与往年相比, 今年展出的SEC填料较多, 有水相、非水相和水—非水兼容相。对于水溶性聚合物, Jordi展出了水溶性GPC柱, 其填料是高交联度的磺酸二乙烯苯聚合物, 溶剂选择范围宽, 包括酸碱, pH值达14, 水和非水溶剂混合物也可使用, 不会造成收缩或溶胀。Polymer Lab公司展出了水溶性聚合物分离用的PL Aguagel—OH系列柱, 其孔径分布宽。该填料即使在大孔径时仍有较好的化学和机械性能。对于非水溶性聚合物的分离, Waters公司展出了用于分离高分子量的高温HT系列的μ—Styragel柱, 其填料基质是PS—DVB(聚苯乙烯—二乙烯基苯)这种填料在改变溶剂或升温使用及降温情况下, 其性能保持不变。Polymer Laboratories展出混合床线性校准的GPC柱—PLgel—5 μm Mixed—Low, 该

柱被推荐用于分离分子量范围200到 3×10^5 的聚合物。此外,对于水—非水兼容的SEC柱, Jordi展出了有机聚合物分离用的新型系列柱,粒度为 $5 \mu\text{m}$,高交联PS—DVB,孔径范围 $100—10^5 \text{ \AA}$ 。所用溶剂范围很广,如水、甲醇、四氢呋喃及甲苯等。

四、专用HPLC柱

表 I 列出了本次会议展出的某些专用柱。对环境样品分析专用柱,如多环芳烃(PAHs)专用柱, Phase Separations公司和Macherey Nagel公司展出了反相PAH柱,在梯度淋洗条件下可以基线分离美国国家环保局规定的16种重点多核芳烃污染物。对于一般反相柱难于分离的物质对如 α -苯并蒽和芘、菲和蒽以及萤蒽和芘三对物质可给出基线分离。

为了解决难挥发除草剂的分析, Bio-Rad公司和Hamilton公司分别展出了磺化的PS—DVB柱HRLC及PRP—X400。为了适应食品与饮料工业需求, Phase Separations公司推出了Spherisorb TG柱,用于分析脂肪混合物中三甘脂类化合物。随着人们对蛋白、肽和氨基酸的兴趣增长, Phenomenex和Phase Separations公司展出了分析苯异氰酸酯和乙内酰苯硫脲—氨基酸衍生物专用柱(PTC和PTH—AA),这两种物质都是蛋白质序列分析中的Edman降解产物。两种柱稍有差别。Phenomenex的PTC/PTH柱是硅胶键合的 C_{18} 固定相; Phase Separations的Spherisorb OD/CN柱是 C_{18} 和氰基相的混合物,这种固定相的选择性与 C_{18} 不同,与其它氰基固定相相比其稳定性有较大的改善,也推荐用来分析一般氰基固定相不易分离的三环类抗抑郁剂。

五、生物分子分离用HPLC柱

这方面的色谱柱涉及液相色谱(LC)的离子色谱(IEC),反相色谱(RPC)、疏水作用色谱(HIC)、排阻色谱(SEC)和亲和色谱(AC)等模式。固定相的基质主要分为无机基质(大多数为硅胶)和聚合物基质,如表 II 所示。

由于许多HPLC公司已熟练地掌握了硅胶键合技术,大量的硅胶基质生物色谱已经商品化。但是细粒度球型聚合物的合成需要特殊的技术,故只有少数几家公司才有这种产品。硅胶基质通常键合乙二醇类亲水相或者聚吡嗪类聚合物,或者复盖交联的聚乙烯醇(PEG)。细粒度硅胶键合相机械性能更加稳定、耐高压。但是即使表面复盖有聚合物,仍不能在 $\text{pH} > 10$ 的条件下长时间使用,否则氢氧根离子仍能透过聚合物溶解硅胶,而生物学家常常使用强碱如氢氧化钠或6M的尿素溶液去除柱中的污染物—通常是强烈吸附的蛋白质。

聚合物生物色谱填料(如聚甲基丙烯酸酯和聚苯乙烯)能承受宽范围的pH值,但机械强度较差,柱效低于硅胶键合相。聚合物的另一个优点是亲水性强,蛋白质非特异性吸附低,而硅胶键合相即便有少量的残余硅羟基也会严重影响蛋白质的回收。

大多数硅胶和聚合物填料孔径都在 300 \AA ,这种孔径可使蛋白质有较好的传质。今年展出的填料有更大的孔径,大孔粒子常用于分离大分子量的生物样品,如核酸和病毒。机械强度稳定,粒度细($5 \mu\text{m}$)的大孔径填料极难合成,而且装柱时常因高压而破碎。

Polymer Laboratories已成功地生产出孔径高达 4000 \AA 的离子交换树脂。Waters公司也展出了 1000 \AA 的Protein Pak离子交换柱。Poly LC展出了孔径为 4000 \AA 的聚

羟基乙基天冬酰胺硅胶柱,此柱适用于反相色谱难于分离的亲水肽, Poly LC 公司称之为亲水作用色谱(相对于疏水作用色谱而言)。

今年展出的唯一的无孔树脂是 Nest Group 的 MRPH—Gel NPR, 这是用很细的 ($<3\ \mu\text{m}$) 有一层薄的多孔涂层的填料装填的柱子, 类似于早期的薄壳填料, 但粒度小得多。该柱可用于监测发酵过程或检查低压色谱流出峰纯度。这种柱的负荷量很低, 要严格控制进样量以防止过载。其竞争对手是大孔、全孔填料。因为大孔、全孔填料流通性好且负荷量大。同样今年只展出了一种球型羟基磷灰石柱, 是由 EM Science/E. Merck 展出的, 该柱可用于分离各种核酸及蛋白质。其优点是较“中性”的表面和在弱缓冲液中有较好的稳定性。

亲和色谱是与分离蛋白的几种模式之

一, 由于选择性极高, 高效亲和色谱已成为最后一步纯化蛋白的方法之一。亲和色谱填料上需要有专一的配基(如抗原)或通过反应基(如环氧基、重氮盐)以便生物体能作为配基连上。前一类例子是 Rainin Instruments 展出的 Hydropore—protein A。A 蛋白是纯化许多免疫球蛋白的通用配基。Regis Chemical 展出了模拟细胞膜的磷酸酯胆碱固定相, 用于一步纯化和回收膜蛋白。带反应基的例子是 Pharmacia LKB Biotechnology 公司送展的 N—羟基磷酰胺活化的 Suprose 和 Chromatochem 公司的叠氮活化的 HiPac。N—羟基磷酰胺 Suprose 有一活化酯基, 可与伯氨连接形成配基。HiPac 产品上有一重氨基, 被推荐用于分离治疗蛋白。

李彤、张玉奎 根据《GC·LC》

Vol. 8, No 3 和 4 编译而成

国外仪器公司机构变更信息几则

王 辉

(东方科学仪器进出口公司)

- 美国 Finnigan 公司已于今年上半年归属于美国 Thermo Electron Co, 并属于该公司子公司 Thermo Instrument Systems Inc.。
- 英国 Kratos 已于去年归属日本 Shimadzu 公司。
- 英国 VG Instruments 已在去年归属于 Fisons, 并属于该公司支公司 Fisons Instruments。
- Fisons 公司又已买下了西德的 Haake 公司、美国的 Kevex 和 ARL 公司。
- 英国 Link 公司今年上半年已归属于英国 Oxford Instrument Group。
- 英国 Cambridge 和西德 Leitz 公司已合并称为 LeiCa 公司, 原二个公司在香港的分公司也已合并。
- 法国 Riber 公司的表面分析部已归属于法国 Camca 公司。

表 I 新 型 反 相 HPLC 柱

品 名	厂 商	类 型	基 质	官能团	粒 度 (μm)	孔 径 Å	备 注
Capcell Pak	Shiseido	常 规	硅 胶	C ₁₈	3, 5	120, 300	pH 范围2—10, 聚硅氧烷复盖, 美Dychrom销售
Chromagabond AS	ES industries	专 用	硅 胶	金刚烷	5 ± 1	60, 100, 120, 300	适用于合成药物分析, 溶剂前沿尖锐
Deltabond 500	Keystone Scientific	通 用	硅 胶	多 种	5 ± 1	500	C ₁ , C ₈ , C ₁₈ , CN, 苯基等是聚硅氧烷键合相, PEG是聚乙二醇, 聚合物涂复在硅胶基质表面, 当使用弱冲洗剂时峰形很好
Deltabond ODS	Keystone Scientific	通 用	硅 胶	C ₁₈	5 ± 1	300	键含量为12% (w/w), 残余羟基少, 对碱性化合物峰形对称, 对非极性化合物选择性高, 亦用作SFC填充柱
HEMA—RP C ₁₈	Alltech Associates	通 用	聚合物	C ₁₈	10, 60	100, 300	pH范围2—12, 可用酸, 6M脲及1MNaOH清洗, 耐压4400 psi, 耐温180°C
HLD OC ₈ Octyl	Burdick & Jackson	碱纯化	硅 胶	C ₁₈	5	120	适用于碱性化合物, 对非氢键化合物疏水性强, 未封尾键合量大于50%
Hypercarb PGC	Keystone Scientific	专 用	PGC	石墨化碳	7 ± 1.4	250	PGC是一种全孔石墨(Porous Graphitic Carbon), 表面积为150m ² /g, pH范围0—14, 亦可认为是吸附机理, 可用作SFC填充柱, 应用范围很广
Jordi Reversed-Phase Column	Jordi Associates	通 用	聚合物	DVB	5	300, 500	高交联度, pH范围可达14, 可用NaOH或硫酸清洗, 耐温达150°C
Kromasil	Eka Noble	通 用	硅 胶	C ₁ , C ₄ , C ₈ , C ₁₈	5, 7, 10, 13, 16	—	C ₈ 和C ₁₈ 的pH达9.5, 特别适用于碱性化合物, 已批量生产
LC Cartridges	HP	通 用	硅 胶	C ₁₈	5	—	用Shandon公司的Hypersil ODS和Phase Sep公司的ODS-2, 装填Merck公司的卡套系统, 低价, 高效, 寿命长
MRPH—Gel RP	Nest Group	通 用	聚合物	DVB	5	300, 500	pH范围1—12稳定, 可用任意的LC溶剂或缓冲液冲洗, 柱床不易塌陷或溶胀, 可用NaOH或硝酸清洗, 与一般反相填料相比, 对芳香烃可给出不同的选择性

表 I (续)

品名	厂商	类型	基质	官能团	粒度(μm)	孔径Å	备注
Nova-Pak C8	Waters	通用	硅胶	C8	4	60	用于日常质量控制分析,键含量4%,封尾,比C18柱分离速度快
Nucleosil 5 C18AB	Macherey Nagel	专用	硅胶	C18	5	100	用于酸性和碱性化合物的分离,予填充柱或卡套柱(1.1, 3或10cm×4mm)
PYE	Nacalai Tesque	专用	硅胶	无	5	110	适用于Dioxins, PAHs, 维它命和氯化物,在美国市场由JM Science代售
Techsphere ODS-BDS	HPLC Technology	碱钝化	硅胶	C18	3, 5, 10	100	适用于碱性化合物,特别是胺类化合物,不需改性剂即可获得尖峰,14%疏含量,单分子层,批量可得
Unisphere-PBD	Biotage	通用	氧化铝	聚丁烯	8±1	250	聚合物覆盖,形态独特,粒子由氧化铝铝晶体微粒组成,操作压力低,容量高,非特异吸附小,PH范围2—13,6%疏含量(w/w),峰形和柱效极好
Zorbax Rx-C18	Rockland Technologies	碱钝化	硅胶	C18	5	80	适用于碱性化合物,特别是碱性药物的分析,分析碱性化合物时流动相中不需胺类改性剂,从前由Du Pont公司生产

表 I HPLC 专用柱

品名	厂家	用途	基质	官能团	粒度(μm)	孔径Å	柱长(cm)	柱内径(mm)	备注
Acetylcholine Kit	ChromPak International	胆碱, 乙酰胆碱	硅胶	C18-SO3H	5	120	10	3	可分析Pmol到Fmol级,包括保护柱,柱后酶反应器,溶剂饱和柱及反相—阴离子交换混合模式Chromspher 玻纤分析柱
CA AM5 Carbohydrate分析柱	Burdick & Jackson	碳水化合物	硅胶	氨基	5	120	1.5, 2.5	4.6	用碳水化合物测试过以保证柱性能,键含量2%(重量)

表 I (续)

品名	厂家	用途	基质	官能团	粒度(μm)	孔径Å	柱长(cm)	柱内径(mm)	备注
Catecholamine Kit	Chrompack international	儿茶酚胺	硅胶	阴离子交换	5	120	10	3	适用于血浆和尿液
Chiraspher 25 μm	EM Science E. Merck	手性	硅胶	—	25	100	—	—	键合上光学活性聚丙烯酰胺脂, 可买到5 μm的Chiraspher分析柱, 可用水或非水流动相
HRLC glyphosate 分析柱	Bio-Rad	糖磷酸酯及代菌物	聚合物	磷酸	—	—	10, 25, 30	4.6	适用于除草剂及其甲酰胺代谢物
Hydroxypropyl-cyclodextrin	Astec Inc.	手性	硅胶	—	5 ± 0.5	100	25	4.6	键合相为环糊精, 适用手性样品
Hypersil Green 柱	Shandon Scientific	环境	硅胶	C ₈ , C ₁₈	5	120	—	—	适用于苯酚, 氨基甲酸酯, 多核芳烃分析
Nucleosil 5 C ₁₈ PAH	Macherey-Nagel	多芳	硅胶	C ₁₈	5	100	15	4	适用于美国国家环保局规定的16种重点污染物, 用梯度淋洗分离
PRP-X400	Hamilton	糖磷酸酯及代菌物	聚合物	磷酸盐	7	—	25	4.1	粗网状PS-DVB磺酸盐, 适用于除草剂及其甲氨基代谢物, 选择性优于现有柱, 价格低廉, 室温下可完成分离
PTC/PTH 氨基酸柱	Phenomenex	氨基酸衍生物	硅胶	C ₁₈	5 ± 0.5	150	15, 25	4.6	适用于PTC和PTH氨基酸, 键合量10%
Spherisorb OD/CN	Phase-Sep	PTH氨基酸, TCAs	硅胶	烷基-CN	5	80	15	4.6	适用于PTH氨基酸和抗抑郁药, 也用于三或四铵药物
Spherisorb PAH	Phase-Sep	多核芳烃	硅胶	C ₁₈	5	80	15	4.6	分析多核芳烃, 键合量14%
Spherisorb	Phase-Sep	三甘酯	硅胶	C ₁₈	3	80	15	4.6	分析脂肪中的三甘酯

表 I 生物分子分析用色谱柱

产品名称	厂家	类型	基质	官能团	粒度(μm)	孔径Å	备注
Dynamax Pure DNA	Rainin	反相	硅胶	Proprietary	5	300	用于合成寡核苷酸的纯化
HEMA-Bio 系列	Alltech Associates	可变	聚合物	可变	10	80—300	一系列生物色谱填料, 包括DEAE, Q(季胺), CM(弱阴离子), SB(强碱), HIC和亲和
Hiload 柱	Pharmacia LKB	IEC HIC SEC	交联琼脂糖	季胺 羧酸 苯基	24—44 25—75 45—165	—	适用于蛋白质系列分析
Hipac Hydrazine-activated	Chromato Chem	亲和	硅胶	联氨	5		纯化治疗用蛋白, 包括重组DNA产物
Hydrophase HP-PEI Glass	Interaction Chemicals	阴离子交换	聚合物	聚乙烯	10±1	100	蛋白质分离, 耐压1500psi
Hydropore-5	Rainin	离子交换, 疏水排阻	硅胶	PEG, SP	5	300	适用于蛋白质分离, 非特异性吸附低
Hydropore-Protein A	Rainin	亲和	硅胶	蛋白A	12	300	适用于纯化单克隆抗体和多抗, 容量高, 活性抗体回收率高
Hydroxylapatite Column	EM Science E. Merck	离子交换液固	无机	羟基磷灰石	5	—	适用于蛋白质, 肽类, 核酸, 机械性能稳定, 球形, 可用去垢剂(中性表面, 弱缓冲液中稳定性好)
Hypesil WP500	Shandon Scientific	反相, 正相离子交换排阻	硅胶	C4, C8, C18, SAX	5, 15	500	适用于分离蛋白质, 肽, 聚合物, 亦可用于亲和色谱, 键合量3.5mol/m ²
Immobilized Artificial Membranes	ReSis Chemical CO.	亲和	硅胶	磷酸酯胆碱	5, 12	300	用于分离回收膜蛋白, 不需其它纯化方法

表 I (续)

产品名称	厂家	类型	基质	官能团	粒度(μm)	孔径Å	备注
MRPH-Gel NPR	Nest Group	RPC	聚合物	DVB	2	无孔	适用于蛋白质分离, pH范围1-12, 可使用任何LC溶剂, 包括去垢剂, 可用NaOH或硝酸清洗, 可用于发酵时监测或低压色谱, 芳烃可给出独特的选择性, 负载低, 进样量要小
NHS-activated Superose HR	Pharmacia LKB	亲和	交联琼脂糖	NHS-activated ECH spacers	13	—	用于免疫亲和色谱, 高容量, 低渗透, 易于使用, 生物兼容, 宇装玻璃柱
Nucleobond AX	Macherey-Nagel	阴离子交换	硅胶	WAX	80	4000	用于日常不同族核酸的纯化, 如DNA质粒, DNA噬菌体
Partisil Bioprep10	Whatman Biosystems	反相、正相	硅胶	可变	10±5	75, 150, 300	有八种官能团供选择
PL-SCX	Polymer Laboratories	阳离子交换	聚合物	磺酸	80, 10, 20	1000, 4000	适用于蛋白质, 肽类分离, 大孔径用于改善粒子间传质, pH=1-13范围, 聚合物化学性质稳定, 可用于NaOH清洗
Polyhydroxyethyl Aspartamide	Poly LC	离子交换	硅胶	羧基 天门冬酰胺	3-12	200-4000	适用于亲水肽, 核酸(如质粒、寡核苷酸等)
Protein-PakHR	Waters	离子交换	聚合物	可变	8, 15, 40	1000	分离蛋白质、DNA
Superdex 75HR 10/30	Pharmacia LKB	排阻	交联琼脂糖	琼脂糖	13	—	分析和制备3000-70000 Da的蛋白质
Super Pac Pep-s	Pharmacia LKB	反相	硅胶	C ₂ -C ₁₈	12-15	100	适用于小生物分子、肽、寡核苷酸
TSK-Gel QC-Pak GFC柱	TosoHaas.	排阻	硅胶	PEG	5.5, 8	125, 250 500	分析蛋白质, 快速分析, 短柱, 生物兼容玻璃柱