



目 录

	Page
1. 序言-----	1
2. HPLC 分离蛋白质、多肽 -----	1
3. 各种分离模式-----	4
3-1. 尺寸排阻模式 -----	4
3-2. 离子交换模式 -----	8
(附录) 缓冲液的种类-----	16
3-3. 反相模式-----	17
3-4. 疏水色谱模式 -----	23
3-5. 亲和模式-----	24
3-6. 复合模式 -----	34

1. 前言

蛋白质·多肽的分离精制技术在医药品、食品等领域中的运用必不可少，这其中高效液相色谱仪 HPLC 发挥着非常重要的作用。主要应用的分离模式有尺寸排阻、反相、离子交换、疏水色谱、亲和色谱这 5 类、而且还有尺寸排阻和反相（或离子交换）相结合的复合模式。本文首先对各种分离模式进行介绍，然后再介绍所对应的 Shodex 色谱柱的专有技术和分析实例。

2. HPLC 对蛋白质·多肽的分离

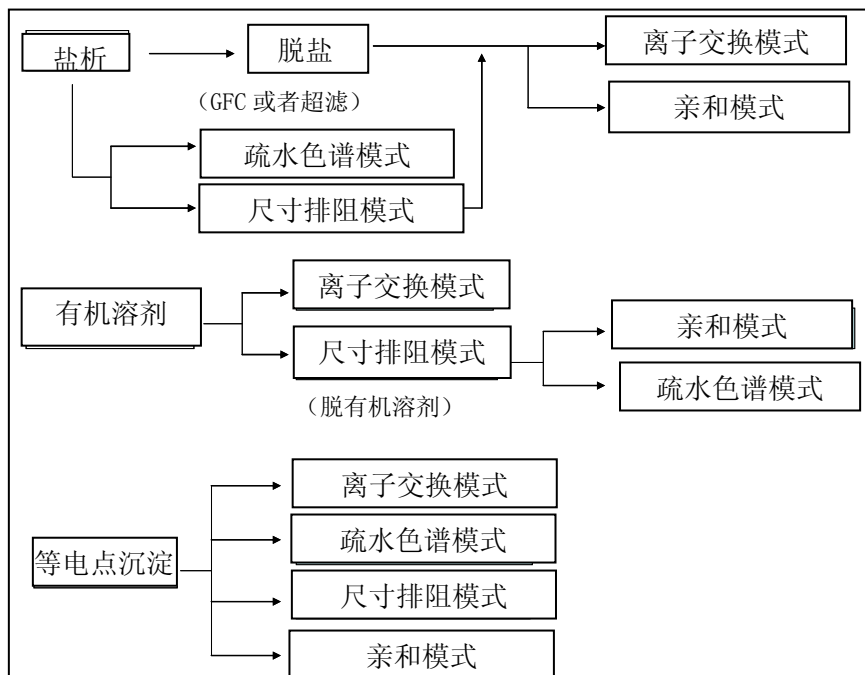
建立分离精制计划，首先要明确对象试料的性质，然后选择最适合的分离模式。考虑选择什么样的分离模式时，首先要分析一下试料的性质。

- ①目的成分和其它成分的分子量相差很大时 → 选择尺寸排阻模式
- ②目的成分和其它成分的等电点相差 1 以上时 → 离子交换模式
- ③目的成分和其它成分的疏水性有差别时 → 反相模式、疏水性色谱模式
- ④使用对目的成分有亲和作用的填充剂时 → 亲和模式
- ⑤目的成分的 pH、盐浓度以及温度稳定性

以分析为目的时，参考上述的①~④分离模式进行选择一般就满足了。以制备为目的时，为避免所要成分性质发生变化，就需要对第⑤项内容进行确认了。

通常几种分离模式组合起来进行逐步分离精制。图 1 表示了逐步分离的设计实例。未知样品的一次筛选选用在一定时间内从大分子量到小分子量按顺序洗脱的 GFC 色谱柱。

图 1：分离精制逐步实现的设计实例



Shodex 有用于蛋白质·多肽分析的上述分离模式的各种色谱柱。图 2-1、2-2 从对象试料的性质来选择最适合的色谱柱的标准表。各分离模式的特征在第 3 章说明。

图 2 - 1 : Shodex 色谱柱的选择方法 (GFC、逆相)

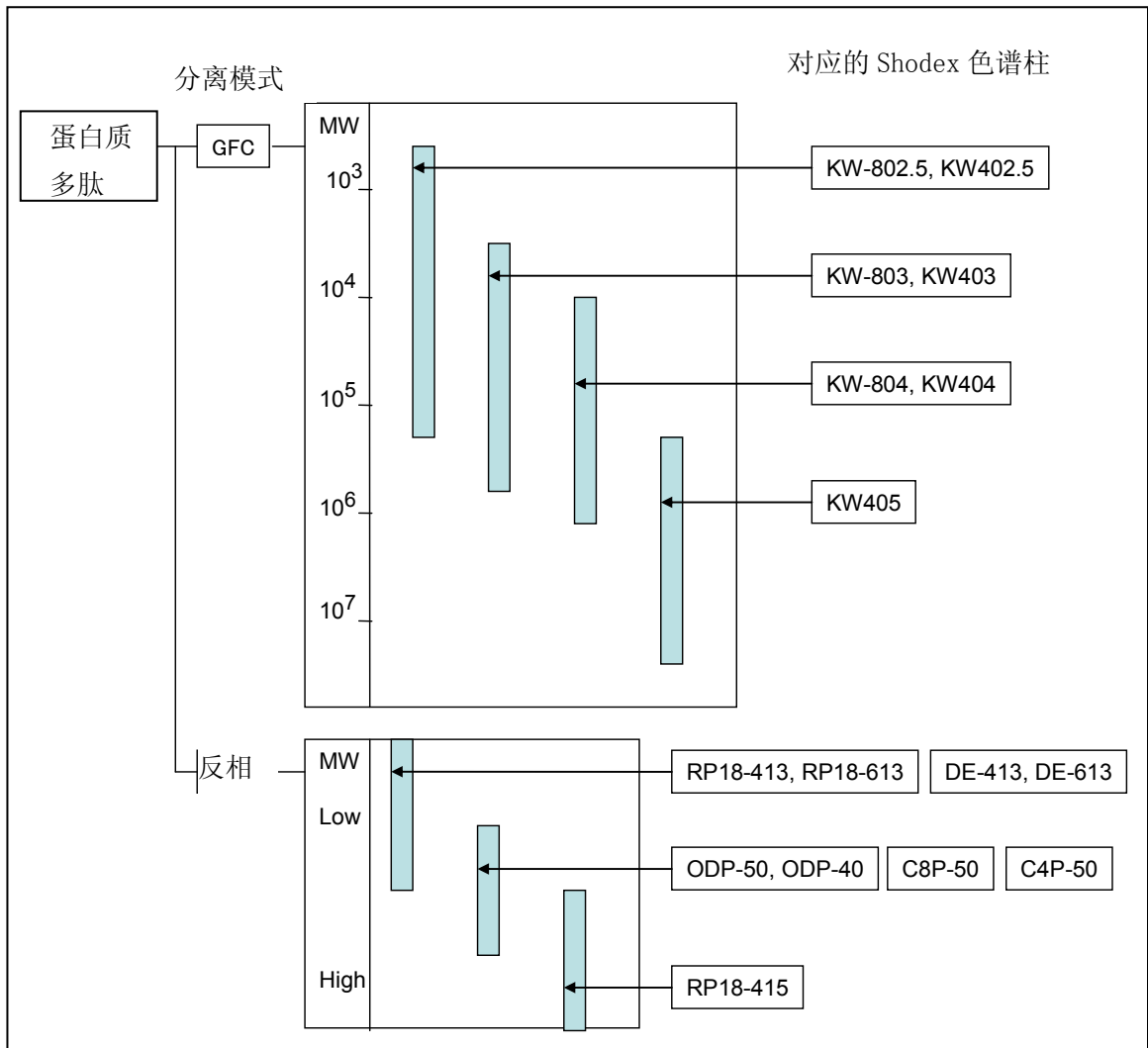
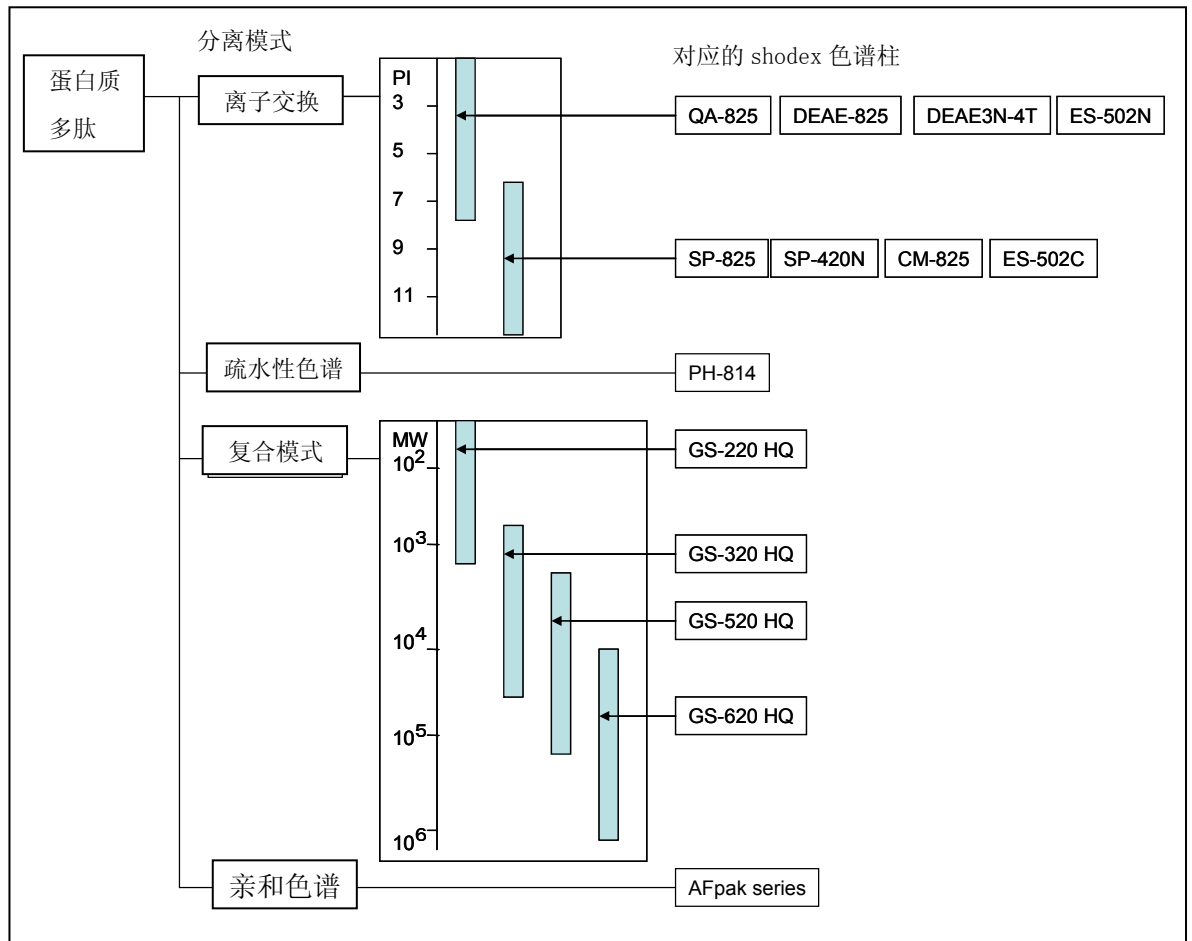


图 3 : Shodex 色谱柱的选择方法 (离子交换、疏水性色谱、复合模式、亲和模式)



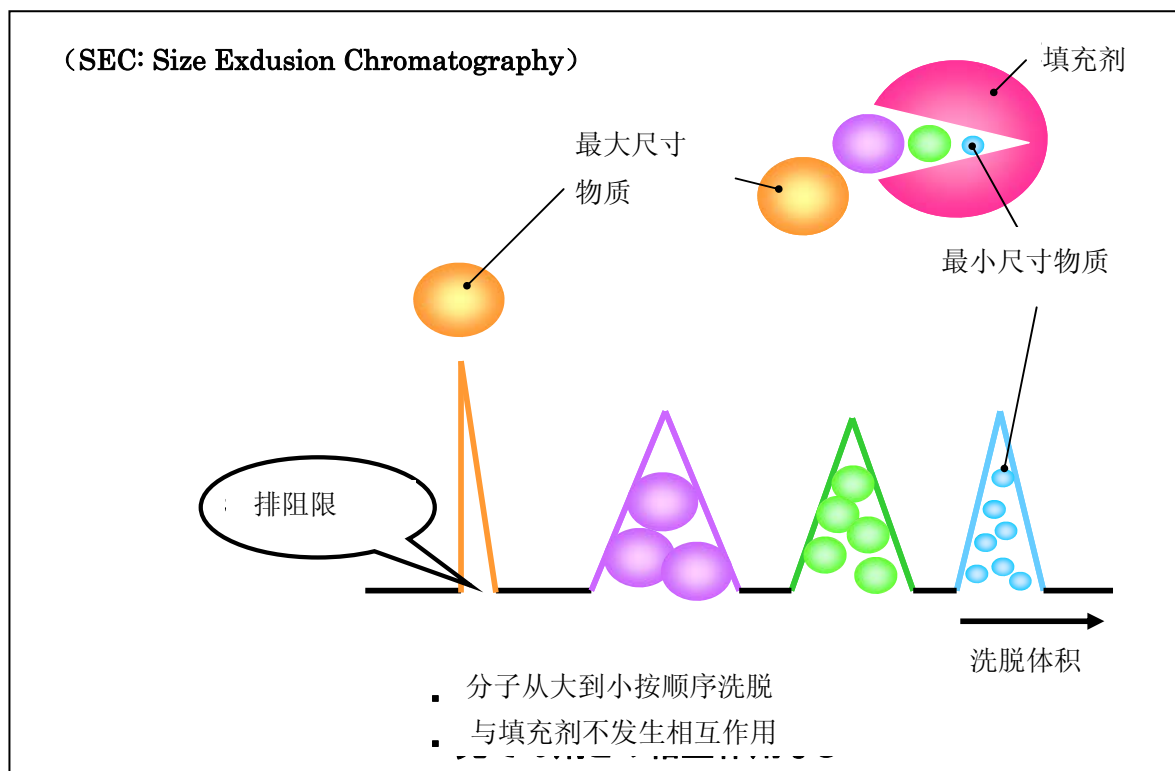
3. 各种分离模式

3-1. 尺寸排阻模式

3-1-1. 分离的原理

SEC 是利用溶液中的样品分子的形状（三元空间的占有体积）越大越早洗脱出来的原理（图 3）来分离的。

图 3：尺寸排阻模式的原理



填充剂具有楔形细孔。蛋白质进入色谱柱内由于毛细管现象会向孔内扩散。比细孔径（孔的大小）大的蛋白质无法进入孔内，与流动相一起先流出来。因此，分子尺寸大的蛋白质先洗脱，分子尺寸小的蛋白质后洗脱。SEC 就是按照这个原理，分子尺寸从大到小依次被洗脱出来。

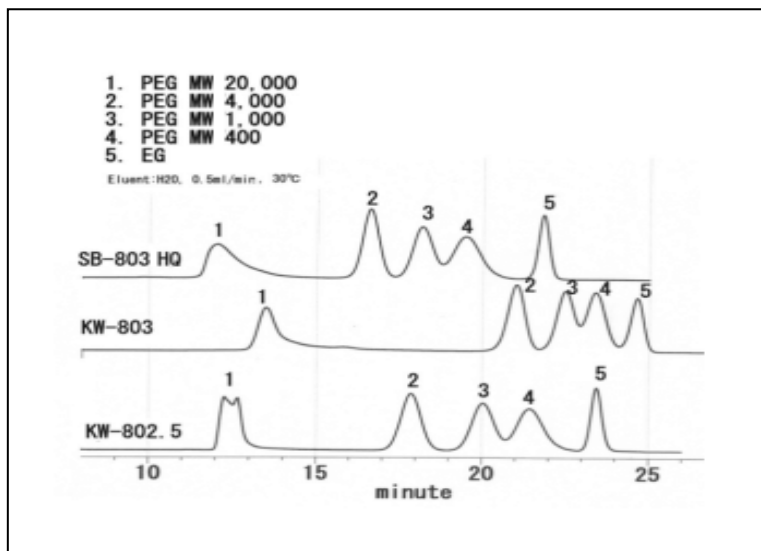
SEC 试料负荷量小，试料的容量系数(k')提高到 1.0 以上，在理论上来说是不可能的，这是它的不利之处。因此 SEC 不适合分离非常复杂的试料。即使这样 SEC 也是在蛋白质的分离中经常被使用到的分离模式。这是因为 SEC 流动相的选择简单，按分子量顺序轻松分离，以及精制效率高等优点。SEC 最适合对未知试料的一次筛选。

3-1-2. Shodex 产品介绍

填充剂的基质有硅胶系和聚合物系两大类。一般对于蛋白质·多肽的分析，硅胶系色谱柱有较好的分离性能，这是因为填充剂的孔径分布比较窄。但是，pH 大于 7.5 时硅胶填料会被溶解而劣化，聚合物系不存在这个问题。图 4 为用聚合物系 Ohpak SB-803 HQ 和硅胶系 PROTEIN KW-803 和 802.5 色谱柱对 PEG 混合物分析的谱图比较。一般情况下聚合物系的 SB-803 HQ 孔径分布广，适合分子量分布宽的合成高分子。硅胶系列填充剂的 KW-803 以及 KW-802.5 孔径分布比较窄，适合蛋白质的分离。

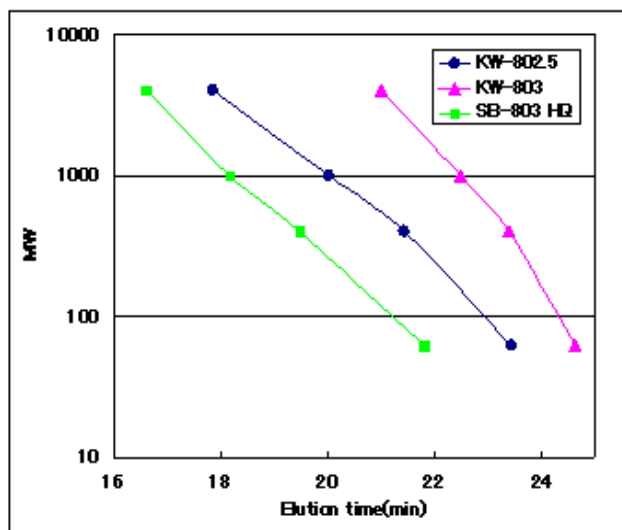
图 4：硅胶系基质色谱柱(KW-803 & KW-802.5)和聚合物系基质色谱柱(SB-803 HQ)的比较

图 4-1：色谱图的比较



1. Poly(ethylene glycol) (MW: 20,000) 2. Poly(ethylene glycol) (MW: 4,000) 3. Poly(ethylene glycol) (MW: 1,000)
 4. Poly(ethylene glycol) (MW: 400) 5. EG, Ethylene glycol (MW: 62)
 Columns : Shodex OHpak SB-803 HQ or PROTEIN KW-802.5 or KW-803 (8.0mmID*300mm each)
 Eluent: H₂O Flow rate: 0.5mL/min Detector: Shodex RI
 Column temp. : 30°C

图 4-2：校正曲线的比较

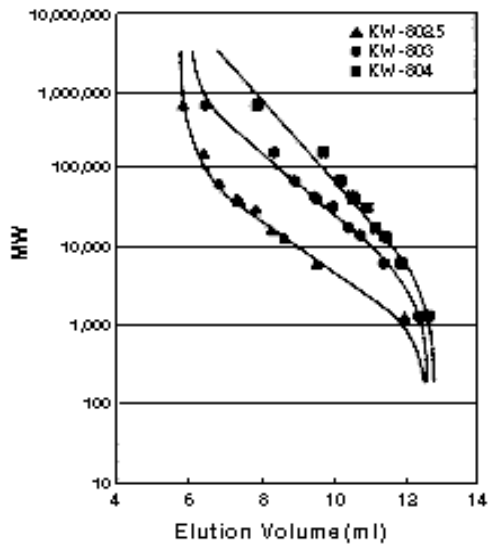


[PROTEIN KW-800 系列（硅胶系列）]

Shodex PROTEIN KW-800 系列是在表面涂覆了亲水性聚合物的硅胶基质的水系 SEC (GFC) 用色谱柱。作为对蛋白质·多肽回收率很高的 SEC 用色谱柱已经得到了大家的好评。填料分别有 3 种孔径。

下面介绍了 PROTEIN KW-800 系列对 10 种市场上的蛋白质标准样品测定的校正曲线 (图 5) 和各色谱柱的谱图 (图 5-1, 2, 3)。

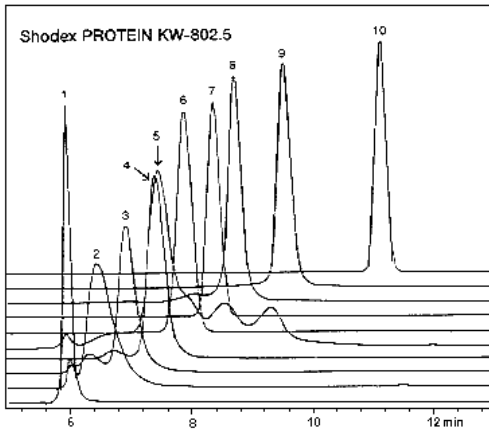
图 5 : PROTEIN KW-800 系列的校正曲线



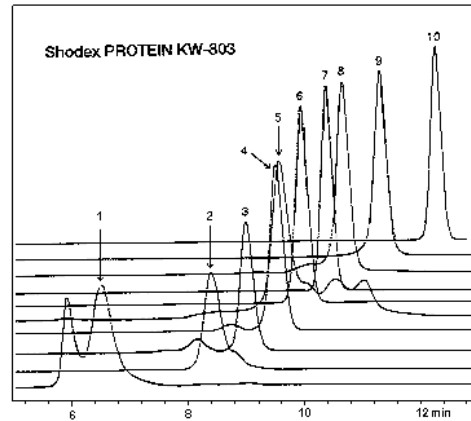
Sample

1. Thyroglobulin (Mw: 669,000)
2. Aldolase (Mw: 158,000)
3. BSA (Mw: 67,000)
4. Ovalbumin (Mw: 43,000)
5. Peroxidase (Mw: 40,200)
6. Adenylate kinase (Mw: 32,000)
7. Myoglobin (Mw: 17,000)
8. Ribonuclease A (Mw: 13,700)
9. Aprotinin (Mw: 6,500)
10. Vitamin B₁₂ (Mw: 1,350)

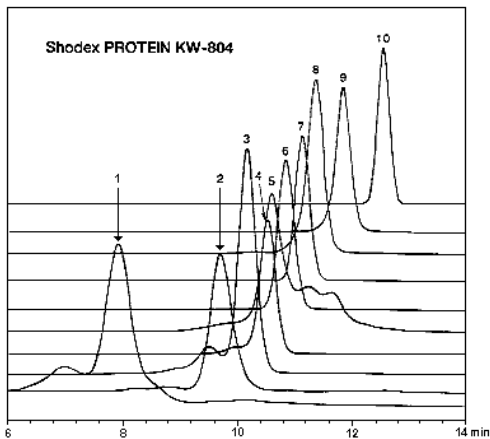
PROTEIN KW-802.5



PROTEIN KW-803



PROTEIN KW-804



Column: Shodex PROTEIN KW-800 series
(8.0mmID*300mm)

Eluent: 50mM Sodium phosphate buffer (pH7.0) + 0.3M NaCl

Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV(220nm)

Column temp.: Room temp.

PROTEIN KW-800 系列产品

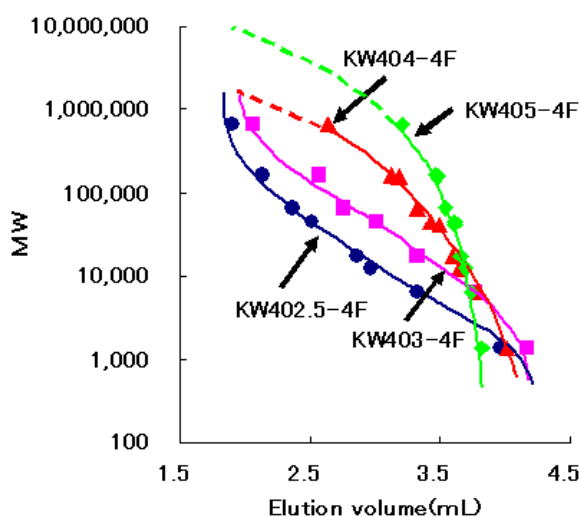
PROTEIN KW-800 series	Size (mm) I.D. × L	Plate Number (TP/column)	Exclusion Limit		Particle Size (μ m)	Pore Size (Å)	
			Pullulan	Protein		Max.	Avg.
KW-802.5	8.0×300	> 21,000	60,000	150,000	5	400	150
KW-803	8.0×300	> 21,000	170,000	700,000	5	1,000	300
KW-804	8.0×300	> 16,000	500,000	1,000,000	7	1,500	500
KW-G	6.0×50	(Guard column)	—	—	7	—	—

[KW400 系列 (硅胶系)]

Shodex KW400 系列是 KW-800 高性能化的半微量色谱柱。粒径缩小到 $3\mu\text{m}$ ，实现了理论塔板数和灵敏度的同时提高。还有，KW400-4F 系列比早期产品 (PROTEIN KW-800 系列) 孔径大，对早期产品无法测定的分子量在 1,000,000 以上的 (蛋白质) 高分子能够进行分析。对于蛋白质的全体分析也可以使用。

水系 SEC(GFC)用色谱柱 KW400 系列蛋白质的校正曲线如图(图 6)。

图 6 : KW400-4F 系列的校正曲线

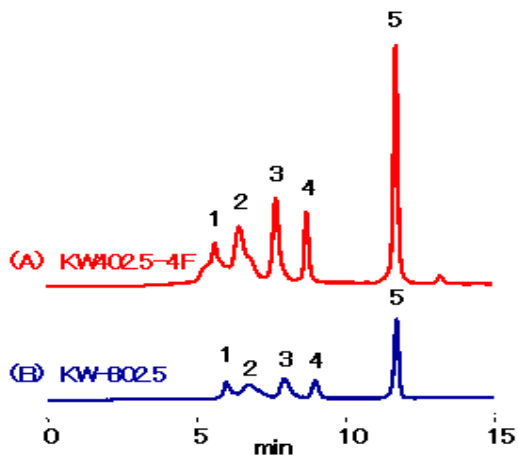


水系 SEC(GFC)用的高性能半微量色谱柱 KW402.5-4F 和早期产品 PROTEIN KW-802.5 分别对蛋白质进行了分析(Fig. 1-1-6)。 KW400-4F 系列的理论塔板数与早期产品(KW-800 系列)相比提高了约 1.5 倍。另外灵敏度与早期产品相比提高了 3 到 4 倍，适合高性能、高灵敏度的分析。

图 7 : KW402.5-4F 和 KW-802.5 的比较

Sample : 10 μ L

1. Blue dextran 2000, 0.2mg/mL
2. γ -Globulin, 0.8mg/mL
3. Ovalbumin, 0.8mg/mL
4. Myoglobin, 0.56mg/mL
5. Uridine, 0.04mg/mL



Columns : (A); Shodex KW402.5-4F (4.6mmID*300mm)
 (B); Shodex PROTEIN KW-802.5 (8.0mmID*300mm)
 Eluent : 50mM Sodium phosphate buffer (pH7.0) + 0.3M NaCl
 Flow rate : (A); 0.33mL/min, (B); 1.0mL/min
 Detector : UV (280nm)
 Column temp. : Room temp. (25°C)

KW400 系列产品群

KW400 series	Size (mm) I.D.×L	Plate Number (TP/column)	Exclusion Limit		Particle Size (μm)	Pore Size (Å)	
			Pullulan	Protein		Max.	Avg.
KW402.5-4F	4.6×300	> 35,000	60,000	150,000	3	400	150
KW403-4F	4.6×300	> 35,000	150,000	600,000	3	800	250
KW404-4F	4.6×300	> 25,000	500,000	1,000,000	5	1,500	500
KW405-4F	4.6×300	>25,000	1,300,000	20,000,000	5	2,000	1,000
KW400G-4A	4.6×10	(Guard column)	—	—	5	—	—

我们也备有以下的半微型/微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

3-2. 离子交换模式

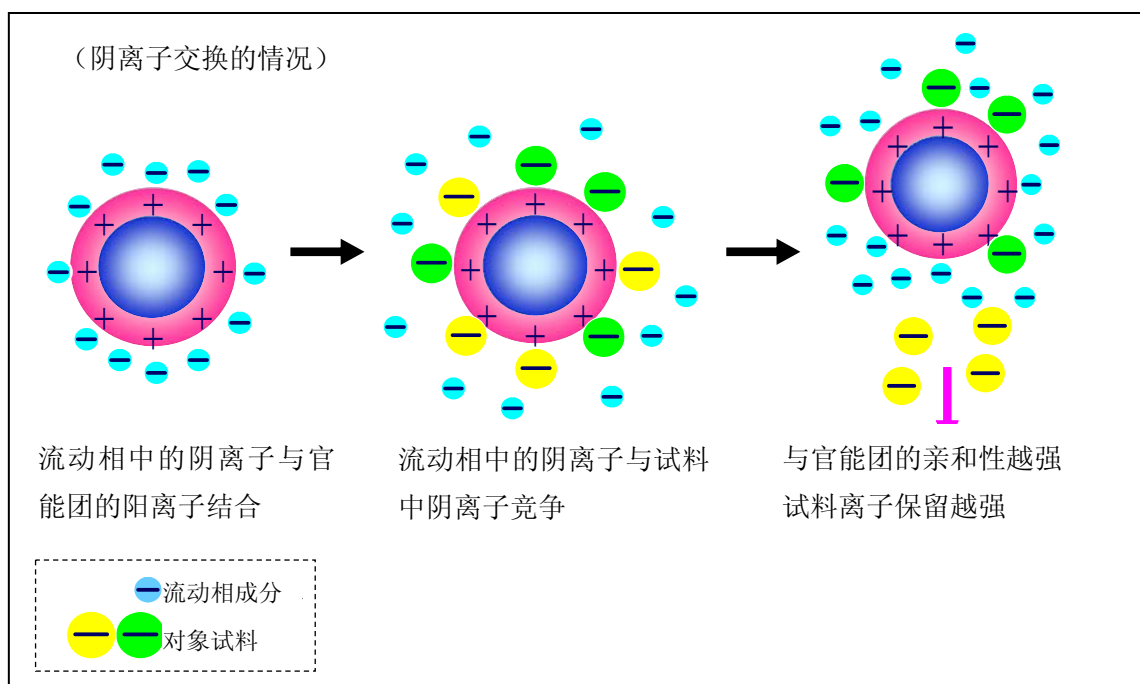
3-2-1. 分离原理

离子交换色谱法是根据蛋白质表面的离子电荷与填充剂表面的电荷相互作用来分离的分析方法。填充剂表面呈正电荷时是对阴离子有保留的阴离子交换体，呈负电荷时是对阳离子有保留的阳离子交换体。

蛋白质的等电点 (pI) 对分离条件的选择很有用。蛋白质是由氨基酸构成的两性化合物，在一定 pH 的缓冲液中的蛋白质的电荷总和是零。这个 pH 值叫等电点 (pI)。等电点附近蛋白质表面的电荷呈中性因此很难被填充剂吸附 (也会发生等电点沉淀)。为了吸附蛋白质，把流动相的 pH 值调离等电点 1 以上，调制成酸性或碱性。偏酸性条件下时采用阳离子交换体，偏碱性时采用阴离子交换

体。图 8 是阴离子交换体的分离原理的模型图。

图 8：阴离子交换模式的原理



这里讨论一下使用以二乙基胺乙基 (DEAE) 为离子交换体的阴离子交换树脂的情况。例如想分离的蛋白质的等电点是 7 时, 流动相的 PH 值调至 8 使蛋白质呈阴离子。DEAE 离子交换体预先吸附缓冲液中平衡化的对离子 Cl^- 。当呈阴离子的蛋白质进入后, 蛋白质阴离子就会把 Cl^- 置换出去而与 DEAE 离子交换体发生离子交换结合。如果这时试料是等电点为 9 的蛋白质进入后, 这个蛋白质是作为阳离子存在的, 因此不被色谱柱吸附而直接洗脱出来。

为了把色谱柱上吸附的蛋白质洗脱出来, 流动相中添加 NaCl 等盐, 有两种方法, 一种是慢慢提高盐的浓度叫盐的浓度梯度洗脱法, 还有一种是流动相的 PH 梯度洗脱法, 一般用盐浓度梯度洗脱法。以负电荷的蛋白质分子的盐浓度梯度洗脱法为例, 流动相中的 NaCl 浓度一上升, 与吸附的蛋白质分子 (负电荷) 相竞争的阴离子 Cl^- 的浓度增加, 蛋白质分子就从填充剂表面脱附, 取代为 Cl^- 吸附在表面。

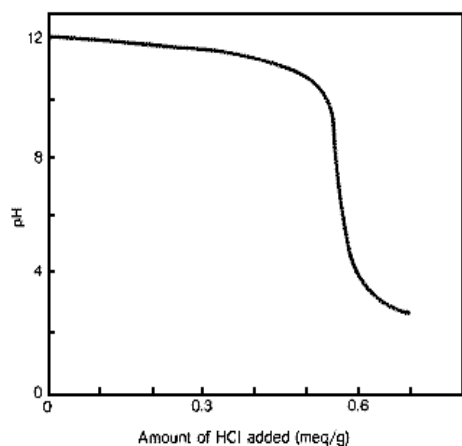
分离状况与离子交换体的选择有关。离子交换体不只分为阴离子交换体和阳离子交换体两种, 依据官能团的种类不同还分强离子交换体和弱离子交换体。这种强弱不是与蛋白质结合的强弱, 而是指与蛋白质表面的离子的结合状态不易受 PH 改变的影响, 在宽的 PH 范围内也可保持同样的电荷状态 (强), 易受 pH 改变的影响离子交换容量很易改变 (弱) 的区别。

下面对 Shodex 离子交换体最合适的分析条件进行说明。

3-2-2. 阴离子交换体

Shodex IEC QA-825 是键合了季铵基的强阴离子交换树脂填充的色谱柱。离子交换基的 pka 是 11.7, 因此可在很宽的 pH 范围内使用(图 9)。

图 9：季铵 IEC QA-825



用 IEC QA-825 对 5 种蛋白质进行了分离(Fig. 2-1-4)。伴清蛋白的等电点(pI)是 6.0 到 6.8 之间, 比流动相的 PH6.0 要高, 因此伴清蛋白不被色谱柱保留很快就洗脱出来。另外, Transferrin、Ovalbumin、以及 Trypsin inhibitor 的 pI 都在 6.0 以下。由梯度法盐浓度变高, 蛋白质就依次从填充剂上脱离而洗脱出来。

图 1 0 : QA-825

Sample : 1. Conalbumin 2. Transferrin 3. Ovalbumin 4. Trypsin inhibitor

Column: Shodex IEC QA-825 (8.0mmID*75mm)

Eluent: (A); 20mM Piperazine-HCl buffer (pH6.0)

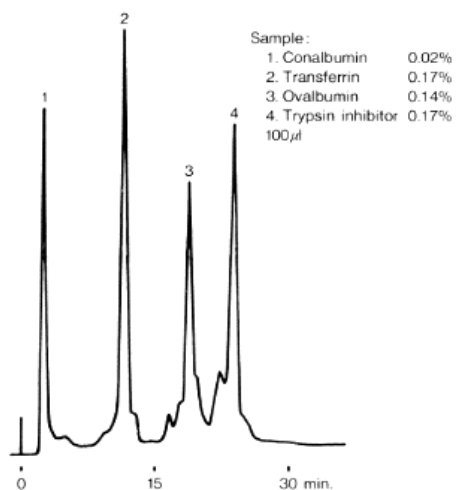
(B); (A) + 0.5M NaCl

Linear gradient: 0min to 30min, 100% (A) to

50% (B)

Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV (280nm)

Column temp.: Room temp.



IEC DEAE-825 及 Asahipak ES-502N 是键合了二乙基氨基乙基的弱阴离子交换树脂填充剂的色谱柱。离子交换基的 pKa 约 7.8, 适合酸性蛋白质的分离(图 1 1)。

图 1 1 : 二乙基氨基乙基 IEC DEAE-825 / Asahipak ES-502N 7C

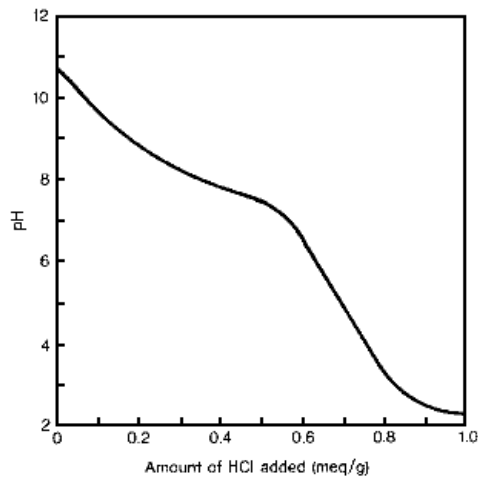
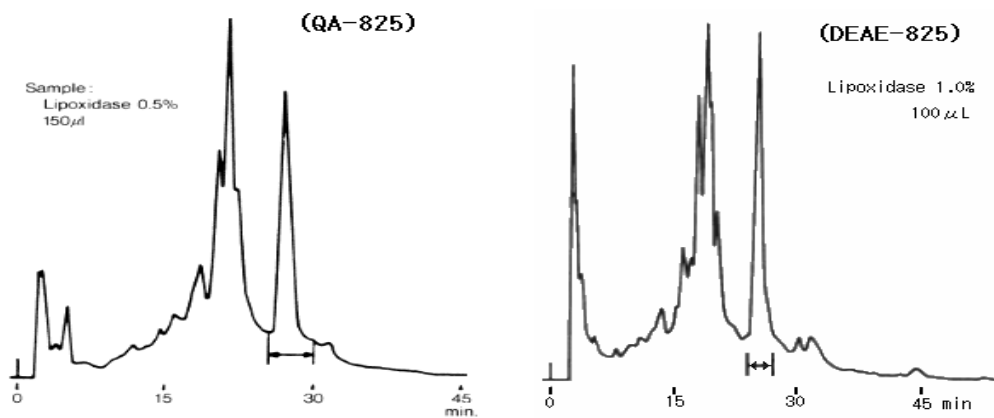


图 1 3 : Comparison between QA-825 and DEAE-825



Sample : Lipoxidase from soybean

Columns: Shodex IEC QA-825 (8.0mmID*75mm)

: Shodex IEC DEAE-825 (8.0mmID*75mm)

Eluent : (A); 20mM Ethanolamine-HCl buffer (pH9.0)

: (A); 20mM Tris-HCl buffer (pH8.0)

(B); (A) + 0.5M NaCl

(B); (A) + 0.5M NaCl

Linear gradient: 0min to 60min, (A) to (B)

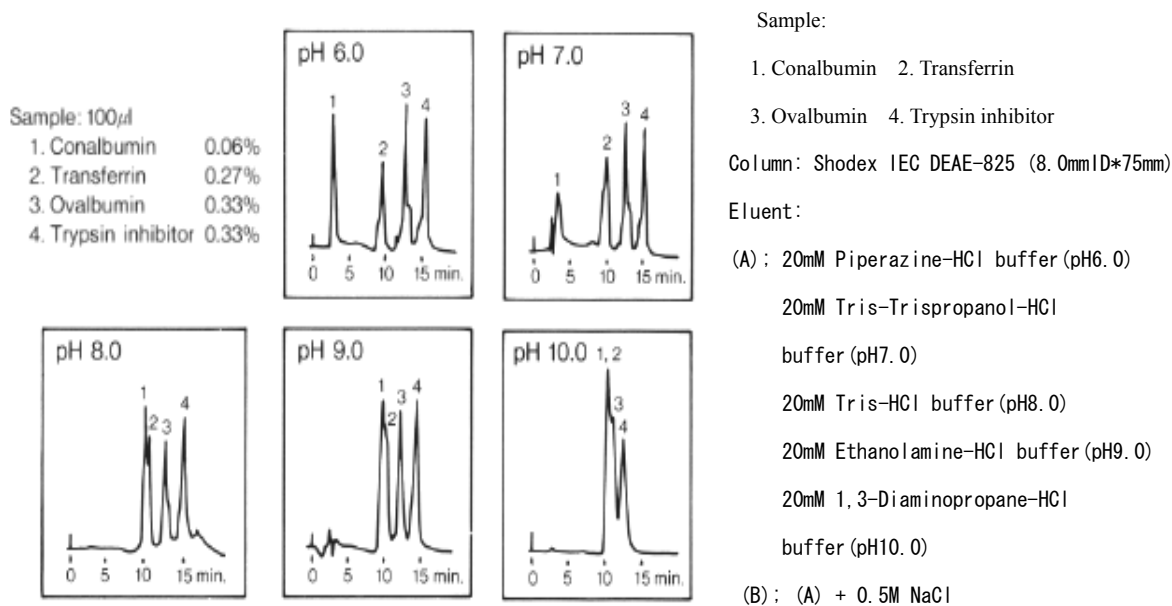
Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV(280nm)

Column temp.: Room temp.

图 1 2 是弱阴离子交换色谱法用色谱柱 IEC DEAE-825, PH 值对蛋白质的分离的影响考察结果。酸性流动相条件下, 4 种蛋白质可以很好的分离。流动相呈碱性时分离变差, pH 再升高 4 个峰有变成 1 个峰的趋势。这是填充剂的离子交换基在 pH 很高的状态下不再充分解成离子的原因。

弱阴离子交换体的 DEAE 对蛋白质保留的 PH 范围要比强阴离子交换体窄, 因为在比较适度的条件下可以分离, 因此常用于蛋白质的分析。

图 1 2



Linear gradient: 0min to 20min, (A) to (B)

Flow rate : 1.0mL/min

强阴离子交换色谱法用色谱柱 IEC QA-825 以及弱阴离子交换色谱柱 IEC DEAE-825 对试剂级的 Lipoxidase 进行分离(图 1 3)。尖锐的 2 个峰之外，箭头的范围内可以考察出酶的活性。

阴离子交换用色谱柱产品群

Product	Type	Size (mm) ID x L	Base Material	Ion Exchange Capacity (meq/g)	Pore size (Å)	Particle size (μ m)
IEC QA-825	Strong	8.0 x 75	Polyhydroxymethacrylate	0.45	5,000	12
IEC DEAE-825	Weak	8.0 x 75	Polyhydroxymethacrylate	0.6	5,000	8
Asahipak ES-502N 7C	Weak	7.5 x 100	Polyvinyl alcohol	0.55	2,000	9

我们也备有以下的微型和半微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

3-2-3. 阳离子交换体

IEC SP-825 是键合了磺基丙基的强阳离子交换树脂的填充色谱柱。离子交换基的 pKa 是 2.3, 在宽的 pH 范围内可以使用(Fig. 2-1-2)。

图 1 4 : 磺基丙基 IEC SP-825

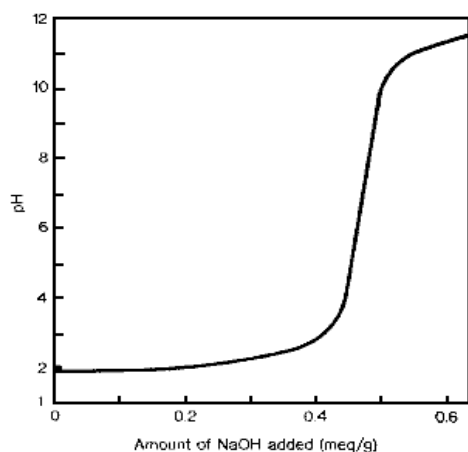
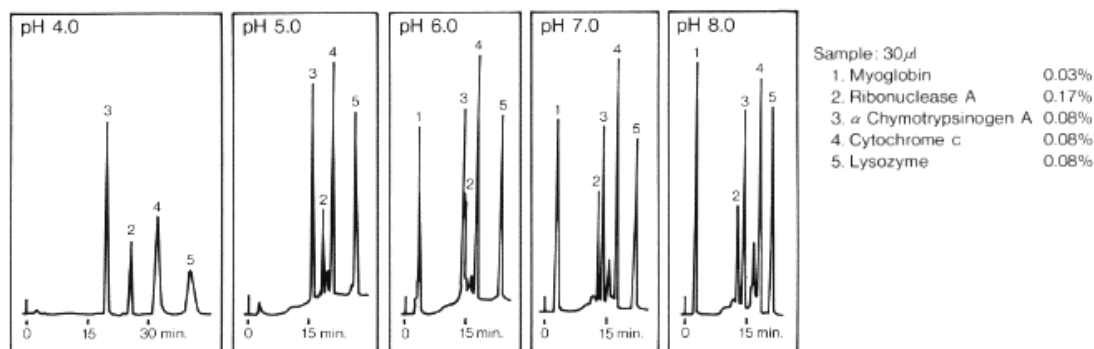


图 1 5 是 IEC SP-825 色谱柱 PH 值对蛋白质分离的影响的调查结果。宽的 pH 范围下可以保留蛋白质，流动相 pH 在 7.0-8.0 时，5 种蛋白质可以很好的分离。当 pH 值降低，pH6.0 以下时核糖核酸酶 A 的保留时间会在 α 糜蛋白酶原 A 的后面洗脱出来。pH6.0 时核糖核酸酶 A 和 α 糜蛋白酶原 A 的分离不充分。pH4.0-5.0 时肌球素的出峰不再尖锐。

图 1 5 : pH 的影响 (SP-825)



Sample : 1. Myoglobin, 2. Ribonuclease A, 3. α Chymotrypsinogen A, 4. Cytochrome c, 5. Lysozyme

Column : Shodex IEC SP-825 (8.0mmID*75mm)

Eluent : (A); 20mM Sodium formate buffer (pH4.0) 20mM Sodium malonate buffer (pH5.0 and 6.0) 20mM Sodium phosphate buffer (pH7.0) 20mM HEPES (pH8.0)

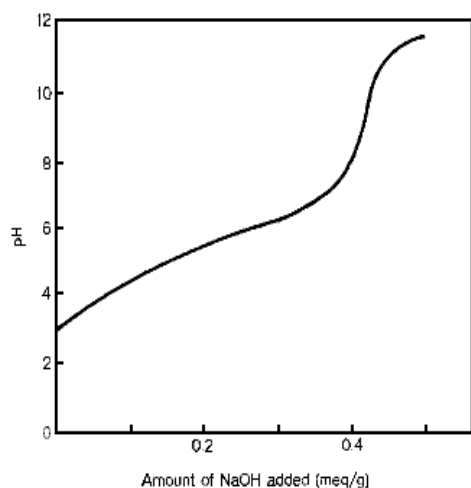
(B); (A) + 0.5M NaCl

Linear gradient: 0min to 20min, (A) to (B)

Flow rate : 1.0mL/min

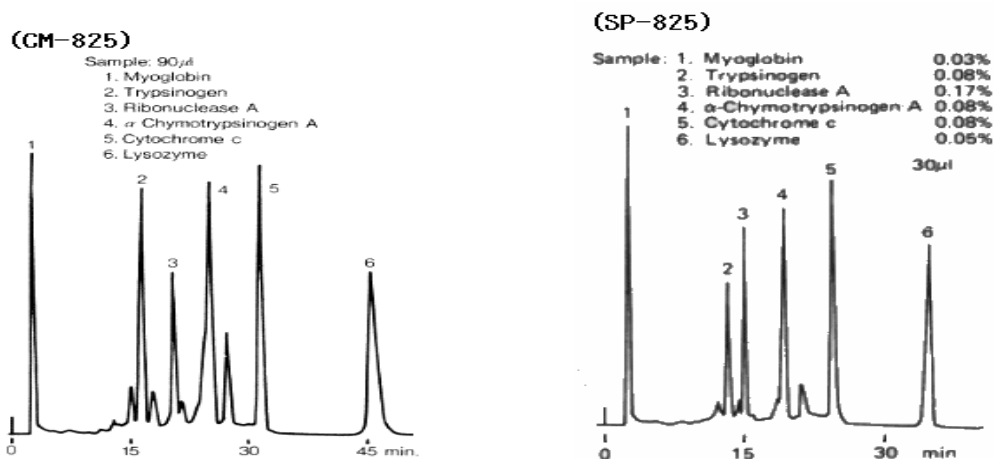
IEC CM-825 和 Asahipak ES-502C 是键合羧甲基的弱阳离子交换树脂的填充色谱柱。离子交换基的 pKa 是 5.7，适合碱性蛋白质的分离(图 1 6)。

图 1 6 : 羧甲基 IEC CM-825 / Asahipak ES-502C 7C



含有胰蛋白酶的 6 种蛋白质混合物可以用两种阳离子交换色谱柱 IEC CM-825 (弱阳离子交换色谱柱)和 IEC SP-825 (强阳离子交换色谱柱)来分离(图 1 7)。洗脱谱图很相似,与 CM-825 相比,SP-825 洗脱要稍早一些。

图 1 7 : CM-825 和 SP-825 的比较



Sample :

1. Myoglobin 2. Trypsinogen 3. Ribonuclease A 4. α Chymotrypsinogen A 5. Cytochrome c 6. Lysozyme

Columns: (Left) Shodex IEC CM-825 (8.0mmID*75mm) (Right) Shodex IEC SP-825 (8.0mmID*75mm)

Eluent: (A); 20mM Sodium phosphate buffer (pH7.0) (B); (A) + 0.5M NaCl

Linear gradient: 0min to 60min, (A) to (B)

Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV(280nm) Column temp. : Room temp.

阳离子交换色谱柱产品群

Product	Type	Size (mm) ID x L	Base Material	Ion Exchange Capacity (meq/g)	Pore size (Å)	Particle size (μm)
IEC SP-825	Strong	8.0 x 75	Polyhydroxymethacrylate	0.4	5,000	8
IEC CM-825	Weak	8.0 x 75	Polyhydroxymethacrylate	0.4	5,000	8
Asahipak ES-502C 7C	Weak	7.5 x 100	Polyvinyl alcohol	0.55	2,000	9

同时也备有下面的微型/半微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

3-2-4. 无孔凝胶 (快速分析)

快速分析时选择无孔凝胶填充的色谱柱。

无孔凝胶是指填充剂是无孔的。因为是没有孔, 填充剂的粒径可以作成很小, 机械强度也很好, 因此可以提高流量快速分析。

<最大使用流量> DEAE-825、SP-825(有孔): 1.5mL/min

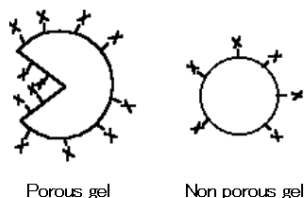
DEAD3N-4T、SP-420N(无孔): 2.0mL/min

但是最大样品负荷量小。

<最大样品负荷量(蛋白质)> DEAE-825(有孔): 1,000μg/色谱柱

DEAD3N-4T(无孔): 20μg/色谱柱

(填充剂的模型图)



无孔凝胶填充的弱阴离子交换色谱柱 IEC DEAE3N-4T 对蛋白质进行了分离(图 1 8)。与有孔凝胶填充的弱阴离子交换色谱柱 IEC DEAE-825 相比测定时间缩短了很多。

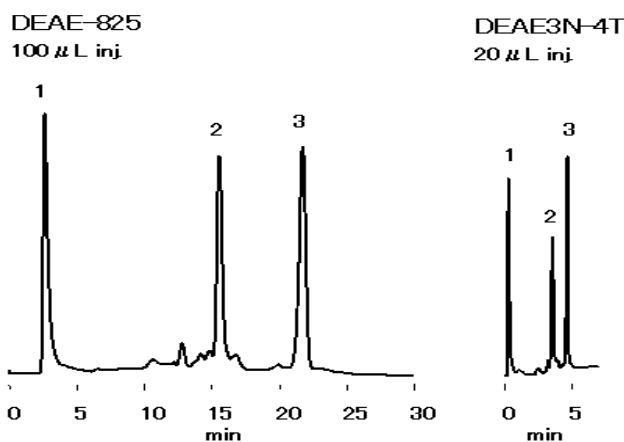


图 1 8 : DEAE-825 和 DEAE3N-4T(无孔)的比较

Sample :

1. Conalbumin (0.4mg/mL)

2. Ovalbumin (1.2mg/mL)

3. Trypsin inhibitor (1.0mg/mL)

Columns: Shodex IEC DEAE-825 (8.0mmID*75mm)

:Shodex IEC DEAE3N-4T

(4.6mmID*35mm)

Eluent: (A); 20mM Piperazine-HCl buffer (pH6.0) : (A); 25mM Piperazine-HCl buffer (pH6.0)

(B); (A) + 0.5M NaCl (B); (A) + 0.5M NaCl

Linear gradient: 0min to 60min, (A) to (B) Linear gradient: 0min to 10min, (A) to (B)

Flow rate: 1.0mL/min : 1.5mL/min

Detector: UV (280nm) Column temp.: Room temp.

无孔离子交换色谱柱产品群

Product	Type	Size (mm) ID x L	Base Material	Ion Exchange Capacity (meq/g)	Pore size (Å)	Particle size (μm)
IEC DEAE3N-4T	Strong anion	4.6 x 35	Polyhydroxymethacrylate	0.4	-	2.5
IEC SP-420N	Strong cation	4.6 x 35	Polyhydroxymethacrylate	0.3	-	2.5

我们也备有下面的半微型/微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

(附录) 缓冲液的种类

作为流动相的缓冲液选用缓冲能大的PH值, 以及起缓冲作用的离子要与离子交换体有相同的电荷。如下表所示。NaCl、KCl、Na₂SO₄、K₂SO₄等盐的水溶液或者与缓冲液可以一起使用。浓度一般在20~600mM的范围。

pH	Cation Exchange Resin	pH	Anion Exchange Resin
3.8~4.3	Sodium formate	4.8~5.0	N-Methylpiperazine HCl
4.3	Sodium succinate	5.0~6.0	Piperazine HCl
4.8~5.2	Sodium acetate	5.8~6.4	Bis Tris HCl
5.0~6.0	Sodium malonate	6.4~7.3	Bis Tris Propane HCl
5.5~6.7	MES	7.3~7.7	Triethanolamine HCl
6.7~7.6	Sodium phosphate	7.5~8.0	Tris HCl
7.6~8.2	HEPES	8.0~8.5	N-Methyldiethanolamine HCl
8.2~8.7	BICINE	8.4~8.8	Diethanolamine HCl
		8.5~9.0	1,3-Diaminopropane HCl
		9.0~9.5	Ethanolamine HCl

MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

HEPES: 4-(2-hydroxymethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid

BICINE: N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

Bis Tris : Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane

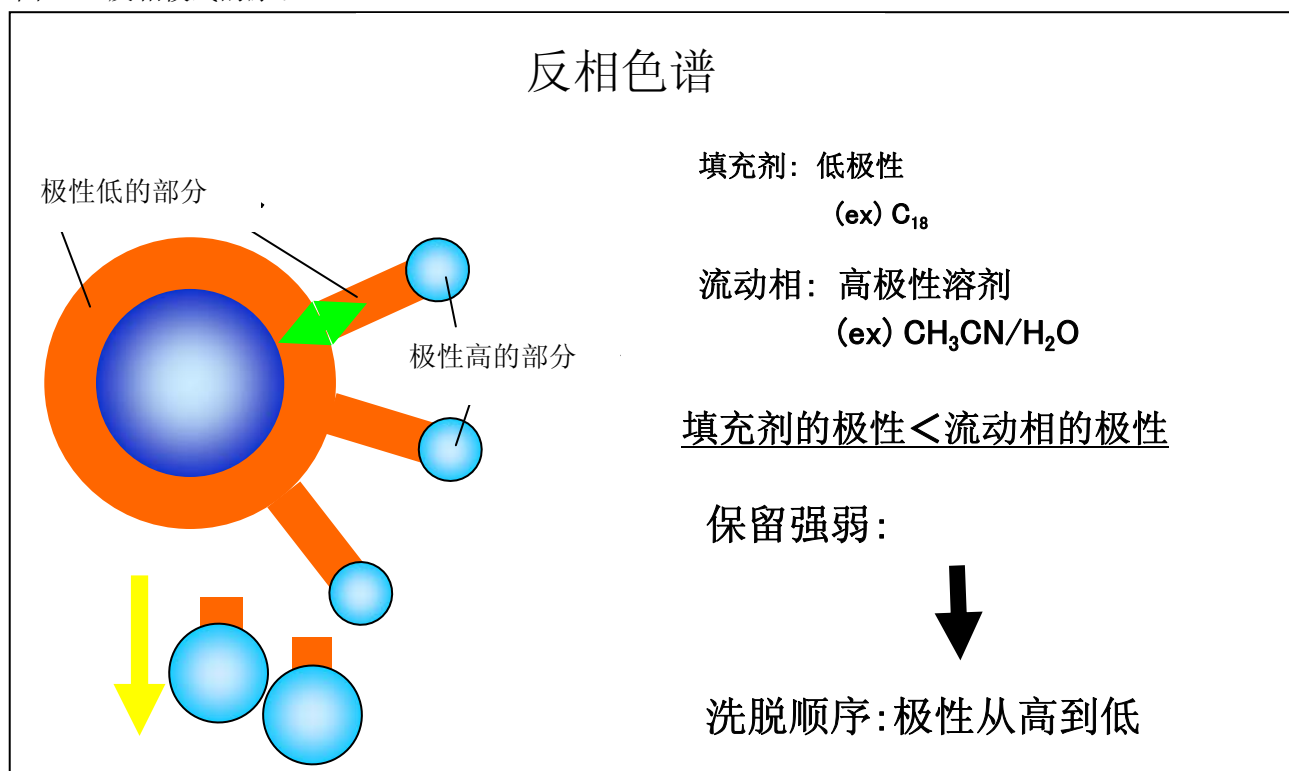
Bis Tris propane: 1,3-Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane

3-3. 反相模式

3-3-1. 分离原理

反相色谱法是蛋白质的非极性氨基酸侧链与填充剂表面之间发生疏水性相互作用，并依据分配平衡来分离的一种模式（图 1 9）。填充剂是在硅胶基质或聚合物基质上键合十八烷基（C₁₈）等极性低的各种官能团。聚合物凝胶中不结合官能团，利用基质自身的疏水性来分离。疏水性越高的蛋白质，保留越强，因此是按照极性从高到低来洗脱的。

图 1 9.反相模式的原理

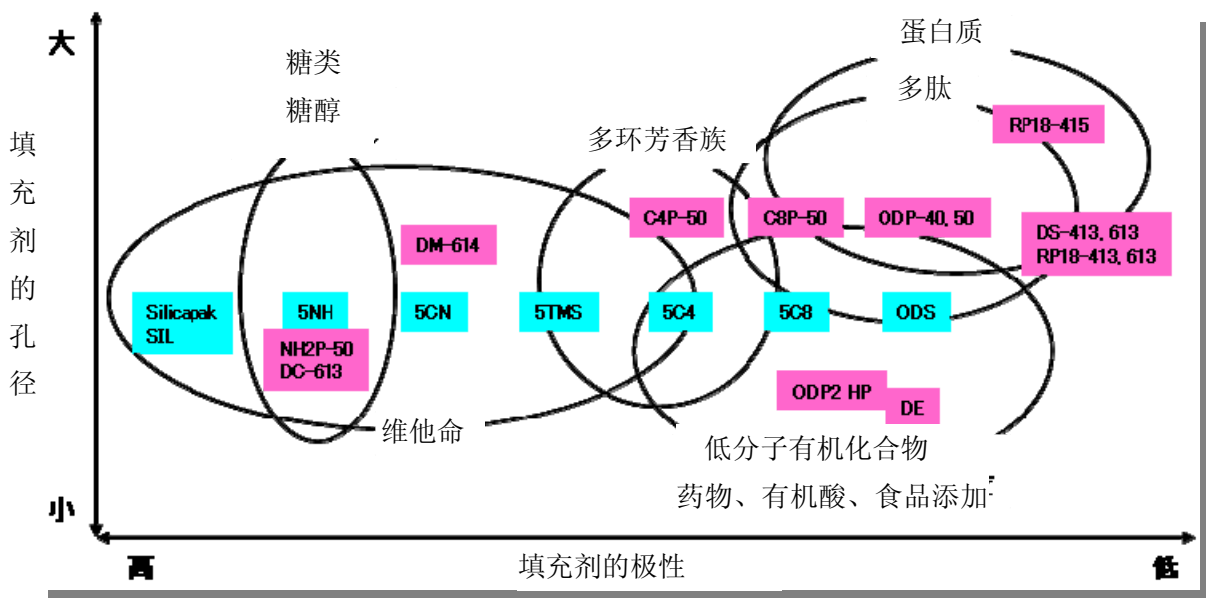


3-3-2. Shodex 产品介绍

为了利用反相模式达到好的分离效果，我们准备了不同极性的填充剂和细孔的各种色谱柱（图 2 0）。从低分子量的多肽到高分子量的蛋白质都有可以相适合的不同孔径的各种色谱柱。

Shodex 的聚合物系反相色谱柱中孔径最大的（450 Å）RSpak RP18-415 适合分析蛋白质，孔径 250 Å 的 Asahipak ODP、C8P、C4P 适合分析从蛋白质到多肽。而且孔径小的 RSpak DE 适合寡肽等低分子领域的分析，能够与硅胶系的 ODS 色谱柱在同样的条件下分析。DE-613、DE-413 和 ODS 色谱柱在吸附弱时就可以选择 RSpak RP18-413、RP18-613 来发挥其作用。

图 2 0. 反相模式（以及正相模式）色谱柱的填充剂的特性和适用领域



聚合物系反相色谱柱 RSpak RP18-415 对各种蛋白质的回收率的考察(图 2 1)。不管那种都能得到高的回收率, 适合蛋白质和多肽的快速分离。最高使用压力是 22MPa, 因此可以提高流量。

图 2 1:

Column:

Shodex RSpak RP18-415
(4.6mmID*150mm)

Eluent:

(A); 0.1% TFA aq./CH₃CN=99/1

(B); 0.1% TFA aq./CH₃CN=5/95

Linear gradient: 0 to 25min, 20%

(B)

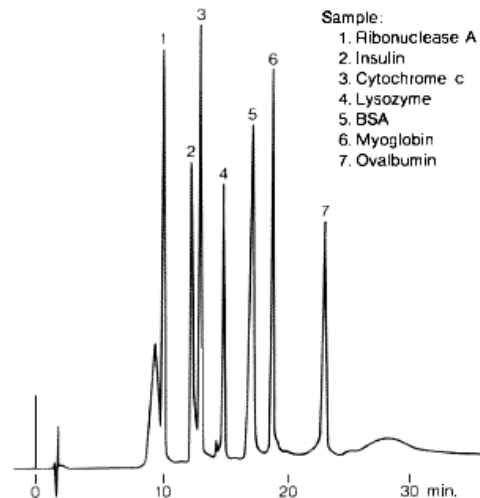
Flow rate: 1.0mL/min

Detector: UV(220nm)

Column temp.: Room temp.

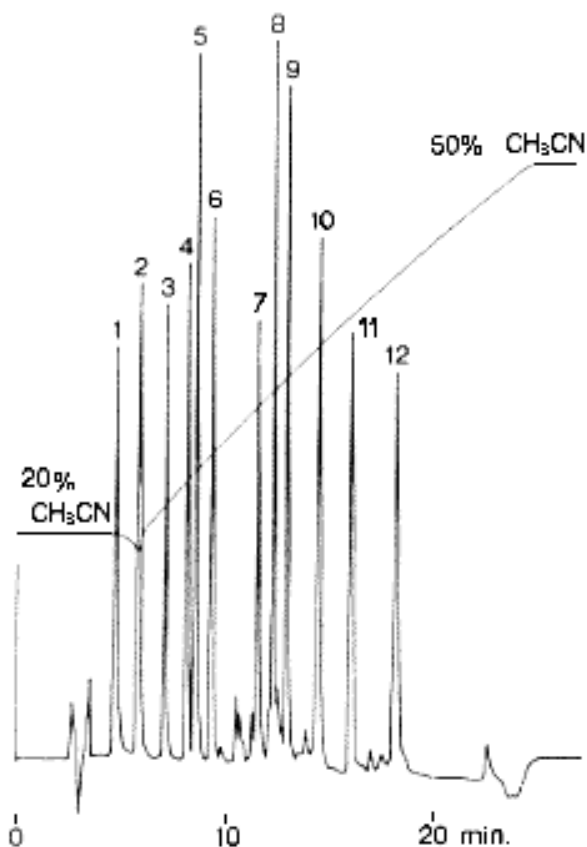
Recovery of Proteins	
1. Ribonuclease A	93%
2. Insulin	98%
3. Cytochrome c	100%
4. Lysozyme	100%
5. BSA	98%
6. Myoglobin	108%
7. Ovalbumin	---

(B) to 60%



蛋白质以及各种各样分子量的多肽混合在一起的样品采用梯度法分离的谱图(图 2 2)。聚合物系反相色谱柱 Asahipak ODP-50 6D 对蛋白质·多肽的分析, 洗脱容量的再现性优异, 并有高的回收率。

图 2 2:



No.	Proteins Peptides	MW	VR(mL) First Analysis	VR(mL) Second Analysis	Recovery (%)
1	Lys-Bradykinin	1188	4.63	4.64	97
2	Bradykinin	1060	5.73	5.70	92
3	Met-Enkephalin	574	7.00	7.00	97
4	Neurotensin	1673	8.04	8.05	99
5	Leu-Enkephalin	556	8.47	8.48	100
6	Substance P	1348	9.24	9.26	93
7	Bacitracin	1450	11.47	11.48	81
8	Insulin	5750	12.24	12.25	95
9	Insulin B chain	3476	12.87	12.89	91
10	Lysozyme	14300	14.43	14.44	96
11	Mastoparan	1479	15.97	15.98	96
12	Myoglobin	17500	18.17	18.18	83

Column: Shodex Asahipak ODP-50 6D (6.0mm * 150mm)

Eluent: 0.05% TFA aq./CH₃CN

Linear gradient: 80/20 to 50/50, 20min

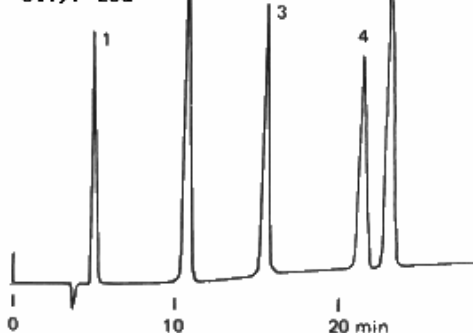
Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV (220nm) Column temp.: 30°C

聚合物系反相色谱柱 RSpak DE-613 对二肽的分离(图 2 3)。

图 2 3:

Sample: Dipeptides

1. Gly-Val
2. Phe-Gly
3. Ala-Gly
4. Val-Phe
5. Tyr-Leu



Column: Shodex RSpak DE-613 (6.0mmID*150mm)

Eluent: (A); 0.05% TFA aq./CH₃CN=96/4 (B); 0.05% TFA aq./CH₃CN=75/25

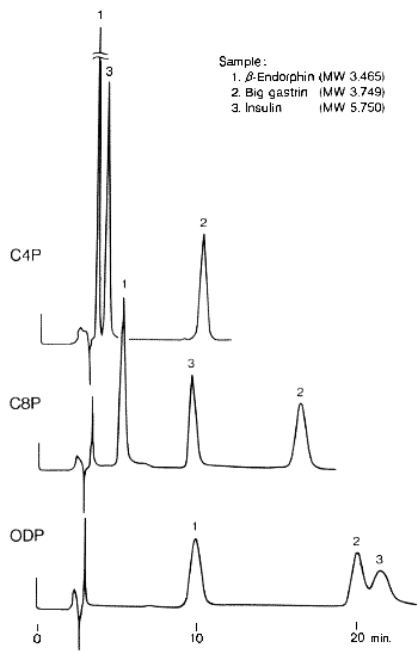
Linear gradient: 0 to 30min, (A) to (B)

Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV (220nm)

3 种类的聚合物系反相色谱柱 Asahipak ODP-50、C8P-50、

C4P-50 对蛋白质样品的保留力的比较(图 2 4)。ODP-50 色谱柱键合十八烷基、C8P-50 上键合辛基、C4P-50 色谱柱上键合丁基。官能团的碳链越短疏水性相互作用越弱。ODP 色谱柱保留太强时，选用 C8P 和 C4P 色谱柱，降低流动相的有机溶剂量，选择对于蛋白质和多肽相对温和的分析条件。

图 2 4:



Sample:
 1. β -Endorphin (MW 3.465)
 2. Big gastrin (MW 3.749)
 3. Insulin (MW 5.750)

Sample :

1. β -Endorphin
2. Big gastrin
3. Insulin

Columns: Shodex Asahipak ODP-50, C8P-50, C4P-50
 (4.6mmID*150mm each)

Eluent: 0.05% TFA aq./CH₃CN=72/28

Flow rate: 0.6mL/min Detector: UV (220nm) Column temp. :
 30°C

Shodex Asahipak series line-up

Product	Size (mm) ID x L	Functional group	Base material	Pore size (Å)	Plate number (TPN/column)	Particle size (µm)
ODP-40 4D	4.6 x 150	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 11,000	4
ODP-40 4E	4.6 x 250	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 17,000	4
ODP-50 6D	6.0 x 150	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 9,000	5
ODP-50 6E	6.0 x 250	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 14,000	5
ODP-50G 6A	6.0 x 10	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	—	(Guard column)	5
ODP-50 4B	4.6 x 50	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 2,500	5
ODP-50 4D	4.6 x 150	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 9,000	5
ODP-50 4E	4.6 x 250	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 14,000	5
ODP-50G 4A	4.6 x 10	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	—	(Guard column)	5
ODP-50 2D	2.0 x 150	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	250	> 5,000	5
ODP-50G 2A	2.0 x 10	Octadecyl	Polyvinyl alcohol	—	(Guard column)	5
C8P-50 4D	4.6 x 150	Octyl	Polyvinyl alcohol	250	> 7,000	5
C8P-50 4E	4.6 x 250	Octyl	Polyvinyl alcohol	250	> 11,000	5
C8P-50G 4A	4.6 x 10	Octyl	Polyvinyl alcohol	—	(Guard column)	5
C4P-50 4D	4.6 x 150	Butyl	Polyvinyl alcohol	250	> 6,000	5
C4P-50 4E	4.6 x 250	Butyl	Polyvinyl alcohol	250	> 9,000	5
C4P-50G 4A	4.6 x 10	Butyl	Polyvinyl alcohol	—	(Guard column)	5

我们也备有下面的半微型／微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

Shodex RSpak series line-up

Product	Size (mm) ID x L	Functional group	Base material	Pore size (Å)	Plate number (TPN/column)	Particle size (µm)
RP18-415	4.6 x 150	—	Styrene divinylbenzene copolymer	450	> 5,000	6
RP18-613	6.0 x 150	—	Styrene divinylbenzene copolymer	200	> 13,000	3.5
RP18-413	4.6 x 150	—	Styrene divinylbenzene copolymer	200	> 11,000	3.5
RP18-G	4.6 x 10	—	Styrene divinylbenzene copolymer	—	(Guard column)	6
DS-613	6.0 x 150	—	Styrene divinylbenzene copolymer	200	> 6,500	6
DS-413	4.6 x 150	—	Styrene divinylbenzene copolymer	200	> 11,000	4
DS-G	4.6 x 10	—	Styrene divinylbenzene copolymer	—	(Guard column)	10
DE-613	6.0 x 150	—	Polymethacrylate	25	> 7,000	6
DE-413	4.6 x 150	—	Polymethacrylate	25	> 11,000	4
DE-413L	4.6 x 250	—	Polymethacrylate	25	> 17,000	4
DE-413S	4.6 x 50	—	Polymethacrylate	25	> 3,000	4
DE-G	4.6 x 150	—	Polymethacrylate	—	(Guard column)	10
DE-213	2.0 x 150	—	Polymethacrylate	25	> 3,000	4
DE-SG	2.0 x 10	—	Polymethacrylate	—	(Guard column)	6

我们也备有下面的半微型／微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

3-4. 疏水色谱模式

3-4-1. 分离原理

疏水色谱法跟反相一样，是基于蛋白质和填充剂表面的疏水性相互作用来分离的，只是流动相条件不同。硫酸铵等盐析效果大的盐类流动相的盐浓度升高，蛋白质表面的疏水性就强，就会被填充剂吸附。之后，流动相的盐浓度慢慢下降，蛋白质与填充剂的疏水性相互作用变弱，就会被洗脱出来。

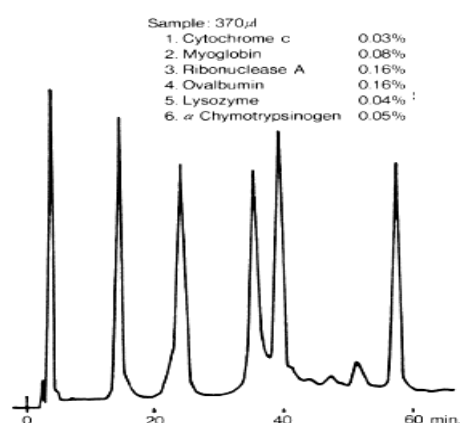
填充剂的吸附是在高盐浓度的条件下进行的，硫酸铵沉淀在离子交换色谱法之后。另外，官能团是苯基等疏水性低的配体与反相色谱法相比，对生物高分子来说在保持生物活性的温和条件下也可以进行分析。

3-4-2. Shodex 产品介绍

Shodex HIC PH-814 是键合了疏水性配体苯基的疏水色谱柱。

用 HIC PH-814 对 6 种类蛋白质进行了分离(图 2 5)。

图 2 5:



Sample :

1. Cytochrome c 2. Myoglobin 3. Ribonuclease A
4. Ovalbumin 5. Lysozyme 6. α Chymotrypsinogen

Column: Shodex HIC PH-814 (8.0mmID*75mm)

Eluent: (A): (B) + 1.8M Ammonium sulfate

(B): 0.1M Phosphate buffer (pH7.0)

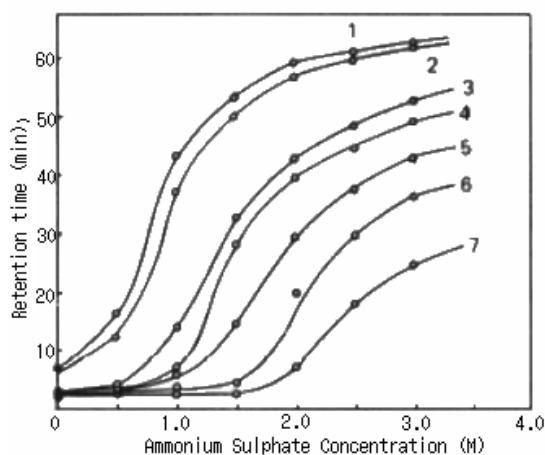
Linear gradient: 0min to 60min, (A) to (B)

Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV (280nm)

Column temp.: Room temp.

用 HIC PH-814 对蛋白质分离时流动相中的硫酸铵浓度对分离的影响(图 2 6)。除了盐浓度影响蛋白质的保留时间外，流动相 PH 和温度也对其有影响，高的 PH 值和高温下保留变强，低 PH 和低温下保留变弱。

图 2 6:



Sample :

1. α Chymotrypsinogen A 2. α Chymotrypsin
3. Lysozyme 4. Ovalbumin
5. Ribonuclease A 6. Myoglobin
7. Cytochrome c

Column : Shodex HIC PH-814 (8.0mmID*75mm)

Eluent : (A): (B) + Ammonium sulfate

(B): 0.1M Phosphate buffer (pH7.0)

Linear gradient: (A) to (B)

Flow rate : 1.0mL/min

HIC column

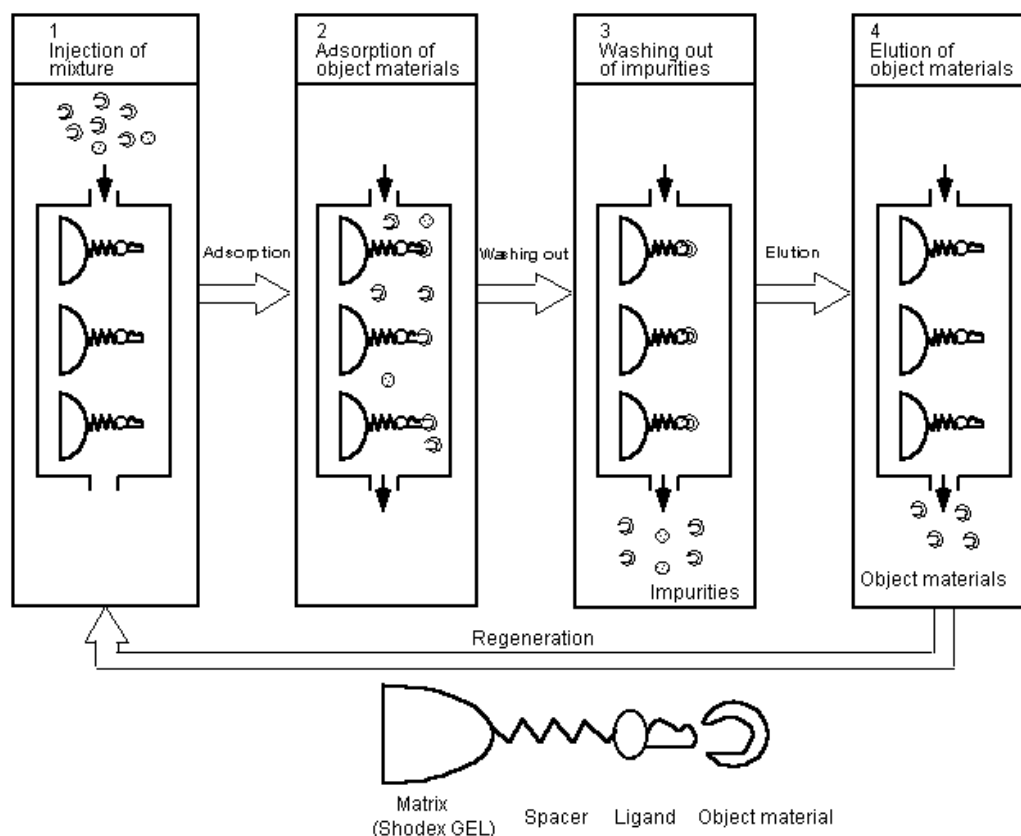
Product	Size (mm) ID x L	Functional group	Base material	Pore size (Å)	Particle size (μm)
HIC PH-814	8.0 x 75	Phenyl	Polyhydroxymethacrylate	2,000	10

3-5. 亲和色谱模式

3-5-1. 分离原理

亲和色谱法是利用生物化学的亲和性，选择性高的一种分离精制手段。原理的说明见模型图(图 2 7)。

图 2 7



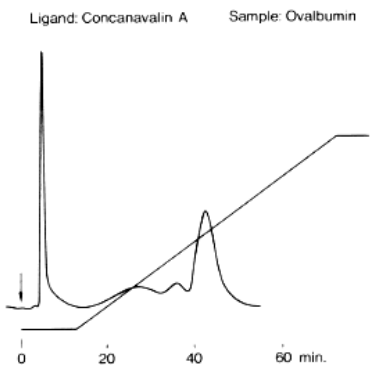
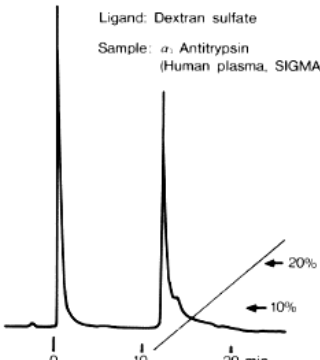
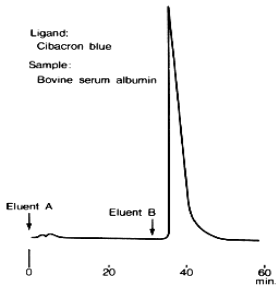
- ① 初期平衡化的 AFpak 色谱柱内注入样品。
- ② 只有与配体有亲和性作用的样品能被色谱柱保留。
- ③ 同时，与配体没有亲和性的样品从色谱柱直接流出。
- ④ 接下来随着流动相中的盐浓度、pH 和有机溶剂量改变，色谱柱上保留的样品得以洗脱出来。

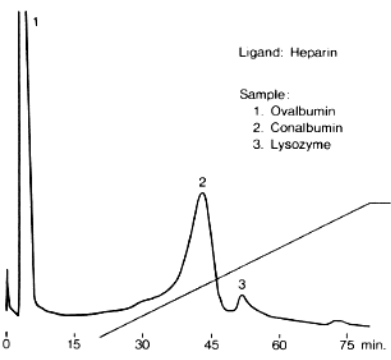
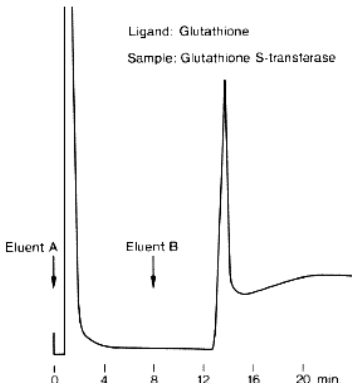
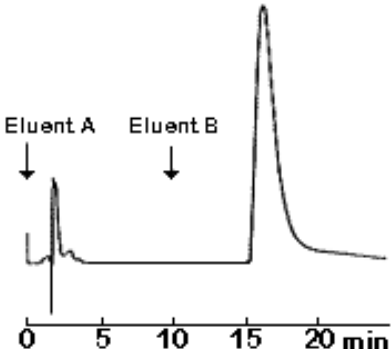
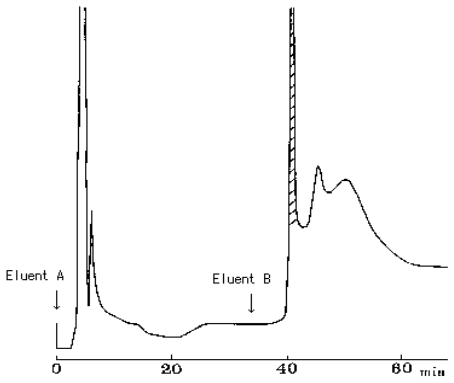
3-5-2. Shodex 产品介绍

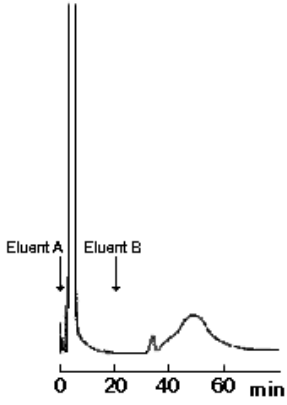
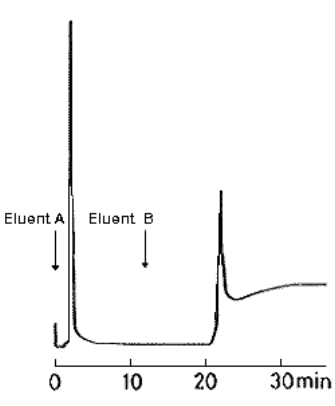
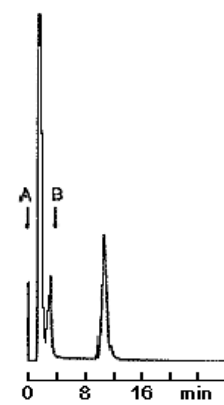
Shodex AFpak 填充剂采用的是硬质多孔性聚合物凝胶，键合了各种配位体。因此有以下几个优点。

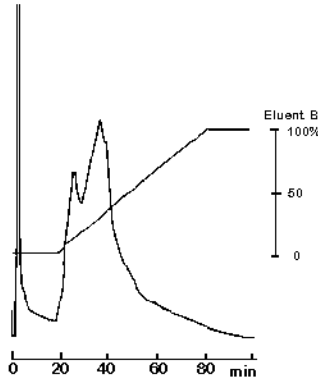
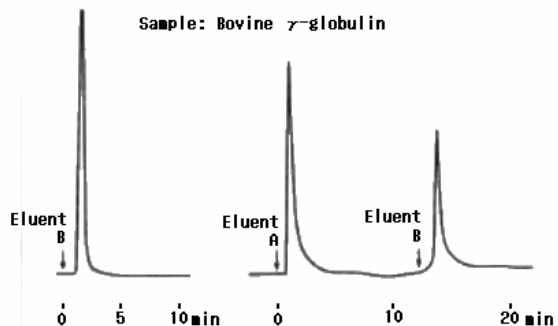
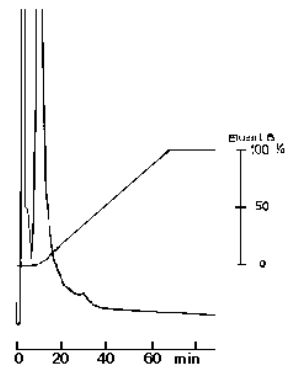
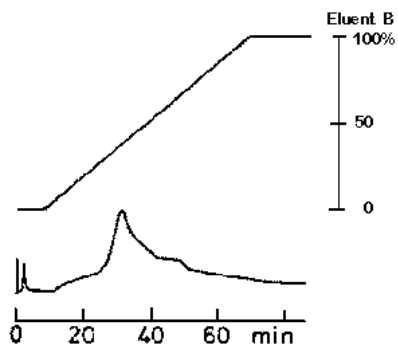
- ① 耐高速、高压(5~10MPa)。
- ② 不存在配位体的脱落，分析再现性高。
- ③ 可以重复使用几百次。
- ④ 身边的 HPLC 装置就可简单实现分析。

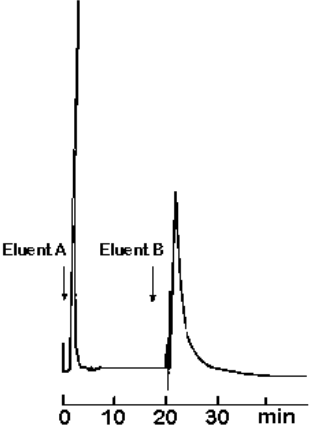
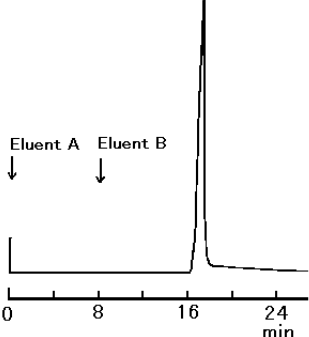
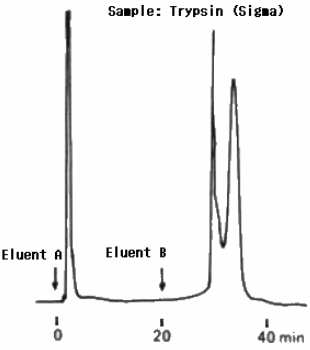
以下是各亲和色谱柱的分析实例。

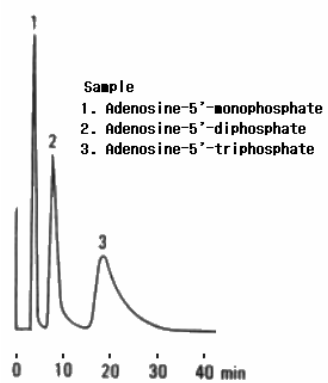
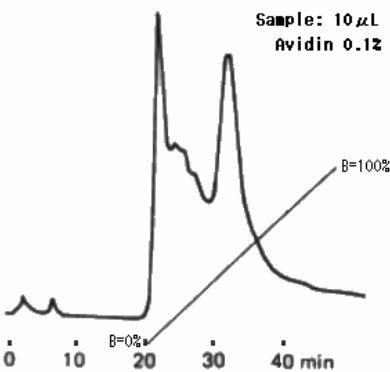
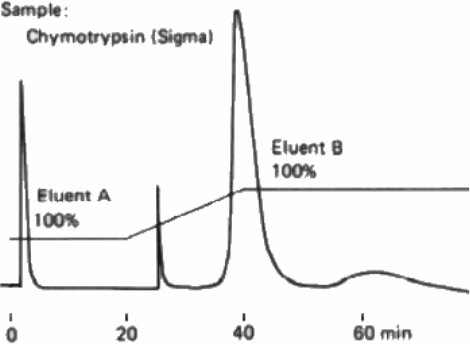
Chromatogram	Analytical conditions
<p>图 2 8 : Ovalbumin</p> 	<p>Column : Shodex AFpak ACA-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent: (A) : 0.02M Tris-HCl buffer (pH7.4) + 0.5M NaCl (B) : (A) + 0.05M α-Methyl-D(+)-glucoside</p> <p>Linear gradient: (A) to (B) for 60min</p> <p>Flow rate: 0.3mL/min</p> <p>Detector: UV (280nm)</p> <p>Column temp.: Room temp.</p>
<p>图 2 9 : α1 Antitrypsin</p> 	<p>Column: Shodex AFpak ADS-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent:</p> <p>(A) : 0.02M Tris-HCl (pH7.4)</p> <p>(B) : (A) + 1.0M NaCl</p> <p>Linear gradient: (A) to (B) for 60min</p> <p>Flow rate: 1.0mL/min</p> <p>Detector: UV (280nm)</p> <p>Column temp.: Room temp.</p>
<p>图 3 0 : Bovine serum albumin</p> 	<p>Column: Shodex AFpak ACB-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent:</p> <p>(A) : 0.1M Potassium phosphate buffer (pH5.0)</p> <p>(B) : 0.1M Potassium phosphate buffer (pH7.5) + 1.5M KCl</p> <p>Step gradient: (A) to (B)</p> <p>Flow rate : 1.0mL/min</p> <p>Detector : UV (280nm)</p> <p>Column temp. : Room temp.</p>

<p>图 3 1 : Ovalbumin / Conalbumin / Lysozyme</p> 	<p>Column: Shodex AFpak AHR-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A): 0.01M Tris-HCl (pH7.5) + 0.01M NaCl (B): (A) + 0.3M NaCl Linear gradient: (A) to (B) Flow rate : 0.5mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : 25°C</p>
<p>图 3 2 : Glutathione S-transferase</p> 	<p>Column: Shodex AFpak AGT-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A): 22mM Phosphate buffer (pH7.0) (B): 50mM Tris buffer (pH9.6) + 5mM Glutathione Step gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 3 3 : L-lactate dehydrogenase</p> 	<p>Column: Shodex AFpak ANA-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A): 0.01M Potassium phosphate buffer (pH7.0) (B): (A) + 0.5M KCl Step gradient: (A) to (B) Flow rate: 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 3 4 : Super oxide dismutase</p> 	<p>Column: Shodex AFpak AIA-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A): 0.1M Sodium acetate buffer (pH7.7) + 0.5M NaCl (B): 0.05M Tris-HCl (pH8.0) + 0.15M NH₄Cl Step gradient: (A) to (B) Flow rate : 0.5mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>

<p>图 3 5 : Fibrinogen (Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak ALC-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent: (A); 0.05M Tris-HCl (pH7.4) + 0.15M NaCl + 0.5mM CaCl₂ + 0.5mM MnCl₂ (B); (A) + 0.1M Methyl mannoside</p> <p>Step gradient: (A) to (B)</p> <p>Flow rate : 0.5mL/min</p> <p>Detector : UV (280nm)</p> <p>Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 3 6 : Plasminogen (from bovine plasma, Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak ALS-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent: (A); 0.1M Sodium acetate (pH7.4) (B); 0.1M Sodium acetate + 0.2M 6-aminohexanoic acid (pH4.0)</p> <p>Step gradient: (A) to (B)</p> <p>Flow rate : 1.0mL/min</p> <p>Detector : UV (280nm)</p> <p>Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 3 7 : Human serum</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APG-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent: (A); 0.2M Sodium phosphate buffer (pH4.0) (B); 0.1M Sodium citrate buffer (pH2.5)</p> <p>Step gradient: (A) to (B)</p> <p>Flow rate : 1.0mL/min</p> <p>Detector : UV (280nm)</p> <p>Column temp. : Room temp.</p>

<p>图 3 8 : Globulin Bovine γ-globulin (Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APR-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A); 0.01M Sodium phosphate buffer (pH6.5) (B); (A) + 1.0M NaCl Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 3 9 : Bovine γ-globulin Globulin</p> <p>Sample: Bovine γ-globulin</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APA-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A); 0.1M Sodium phosphate buffer (pH4.5) (B); 0.1M Sodium phosphate buffer (pH3.0) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 0 : Globulin Human γ-globulin (Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APR-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A); 0.01M Sodium phosphate buffer (pH6.5) (B); (A) + 1.0M NaCl Linear gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 1 : Human IgM (Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APR-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A); 0.02M Sodium phosphate buffer (pH6.5) (B); (A) + 1.0M NaCl Linear gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>

<p>图 4 2: Human serum albumin (Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APD-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A); 0.02M Tris-HCl buffer (pH5.0) (B); (A) + 2.0M KCl Step gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 3: C-Reactive protein (Sigma)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak APE-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A); Tris-HCl (pH7.0) + 0.15M NaCl + 1mM CaCl₂ (B); (A) + 0.2M Phosphorylcholine Step gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 4: Trypsin</p> 	<p>Column: Shodex AFpak AAB-894 (8.0mmID*50mm) Eluent : (A): 0.1M Sodium acetate buffer (pH7.0) + 0.5M NaCl (B): 0.1M Sodium acetate buffer (pH2.8) + 0.5M NaCl Step gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV(280nm) Column temp. : Room temp.</p>

<p>图 4 5 : Adenosin phosphate</p>  <p>Sample</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Adenosine-5'-monophosphate 2. Adenosine-5'-diphosphate 3. Adenosine-5'-triphosphate 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adenosin-5'-monophosphate, AMP 2. Adenosin-5'-diphosphate, ADP 3. Adenosine-5'-triphosphate, ATP <p>Column: :</p> <p>Shodex AFpak AAF-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent : 0.1M Ethylmorpholine-acetate buffer (pH7.0)</p> <p>Flow rate : 1.0mL/min</p> <p>Detector : UV (260nm)</p> <p>Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 6 : 0.1% Avidin, 10μL</p>  <p>Sample: 10μL Avidin 0.1%</p> <p>B=100%</p> <p>B=0%</p>	<p>Column :</p> <p>Shodex AFpak ABT-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent: (A); 0.01M Sodium phosphate buffer (pH7.0)</p> <p>(B); (A) + 1.0M NaCl</p> <p>Linear gradient: 0min to 20min, (A), 20min to 50min, (A) to (B)</p> <p>Flow rate: 0.5mL/min</p> <p>Detector: UV (230nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 7 : Chymotrypsin</p>  <p>Sample: Chymotrypsin (Sigma)</p> <p>Eluent A 100%</p> <p>Eluent B 100%</p>	<p>Column :</p> <p>Shodex AFpak AST-894 (8.0mmID*50mm)</p> <p>Eluent :</p> <p>(A); 0.1M Sodium acetate buffer (pH7.7) + 0.5M NaCl</p> <p>(B); 0.1M Sodium acetate buffer (pH2.8) + 0.5M NaCl</p> <p>Linear gradient: 0min to 20min, (A), 20min to 40min, (A) to (B), after 40min, (B)</p> <p>Flow rate: 1.0mL/min Detector: UV (280nm)</p> <p>Column temp. : Room temp.</p>

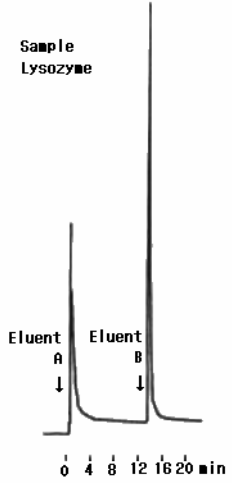
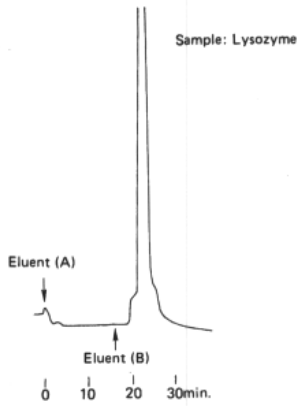
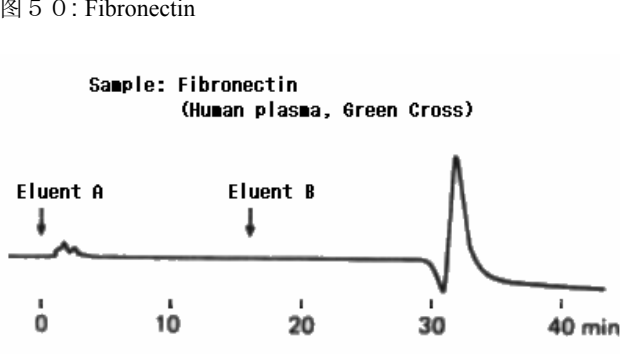
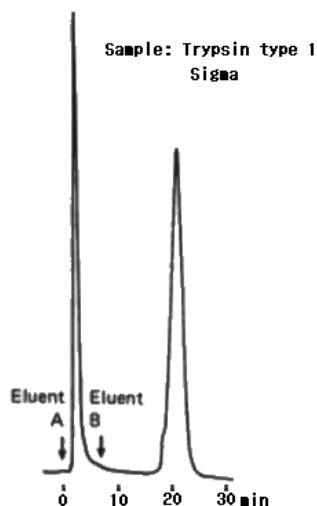
<p>图 4 8 : Lysozyme</p> 	<p>Column : Shodex AFpak AGA-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A) : 0.01M Tris-HCl buffer (pH7.5) + 0.01M NaCl (B) : 0.01M Tris-HCl buffer (pH7.5) + 0.5M NaCl Step gradient: (A) to (B) Flow rate: 0.5mL/min Detector : UV (280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 4 9 : Lysozyme</p> 	<p>Column : Shodex AFpak AHR-894 (8.0mmID*50mm) Eluent : (A) ; 0.01M Tris-HCl buffer (pH7.5) + 0.01M NaCl (B) ; 0.01M Tris-HCl buffer (pH7.5) + 0.3M NaCl Step gradient: (A) to (B) Flow rate : 1.0mL/min Detector : UV (280nm) Column temp. : Room temp.</p>
<p>图 5 0 : Fibronectin</p> <p>Sample: Fibronectin (Human plasma, Green Cross)</p> 	<p>Column: Shodex AFpak AGE-894 (8.0mmID*50mm) Eluent: (A) ; 50mM Tris-HCl buffer (pH7.4) + 0.01M NaCl (B) ; (A) + 4M Urea Step gradient: (A) to (B) Flow rate: 0.3mL/min Detector: UV (280nm) Column temp. : Room temp.</p>

图 5 1 : :Trypsin (type I)



Column:

Shodex AFpak AOV-894 (8.0mmID*50mm)

Eluent:

(A); 0.1M Sodium acetate buffer (pH7.7) + 0.5M NaCl

(B); 0.1M Sodium acetate buffer (pH2.8) + 0.5M NaCl

Step gradient: (A) to (B)

Flow rate : 1.0mL/min

Detector : UV (280nm)

Column temp. : Room temp.

Shodex AFpak (色谱柱尺寸: I. D. 8.0mm × L 50mm)

Product AFpak	Ligand	Application	Ligand load /gel(g)	Capacity	Particle Size (μm)
AAB-894	Aminobenzamidine	Serine protease	100 μmol	—	18
AAF-894	Acriflavine	RNA, DNA, Vitamines	10 μmol	ATP Na 1.8mg/column	18
AAM-894	5'AMP	NAD, ATP dependent enzymes	10 μmol	Lactic dehydronase 1.5mg/g	18
AAP-894	Aprotinin	Serine proteases	5 mg	Trypsin 3mg/g	18
AAV-894	Avidin	Biotin derivatives	5 mg	Biotin 8 μg/column	18
ABA-894	Bovine serum albumin (BSA)	Chiral Separation(amino acid derivatives)	20 mg	—	6
ABT-894	Biotin	Avidin	—	Avidin 9mg/g	18
ACA-894	Concanavalin A (ConA)	Glycoprotein, polysaccharides	15 mg	—	18
ACB-894	Cibacron Blue	Albumin, NDA dependent enzymes	40 μmol	BSA 20mg/column	18
ADS-894	Dextran sulfate	Lipoproteins, blood coagulation factors	30 mg	LDL 5mg/g	18
AED-894	Ethylenediamine diacetic acid	Nucleic acids, serum proteins	30 μmol	—	18
AGA-894	N-acetyl -glucosamine	Lectins, carbohydrate metabolizing enzymes	—	Lysozyme 0.6mg	18
AGE-894	Gelatin	Fibronectin	30 mg	Fibronectin 150mg/g	18

AGT-894	Glutathione	Enzymes related to glutathione	50 μ mol	—	18
AHR-894	Heparin	Lipoproteins, blood coagulation factors	5 mg	Lysozyme 4mg/column	18
AIA-894	Iminodiacetic acid	Interferon, serum proteins	70 μ mol	BSA 70mg/column	18
ALC-894	Lentil lectin	Glycoproteins, polysaccharides	6-7 mg	—	18
ALS-894	Lysine (LCA)	Plasminogen, plasminogen activator, RNA, DNA	—	Plasminogen 54 μ g/g	18
ANA-894	NAD	NAD-Dependent dehydrogenase	10 μ mol	Lactic dehydronase 1.4mg/g	18
AOV-894	Ovomucoid	Trypsin-like protease	10 mg	Trypin 100mg/g	18
APA-894	Protein A	Human IgG, immune complexes	4 mg	IgG Human 20mg/g	18
APB-894	Aminophenyl boronic acid	Nucleic acids and catecholamines	800 μ mol	Sorbitol 0.2mg/column	10
APD-894	Procion red	NAD, NADP, interferon enzymes	40-60 μ mol	BSA 72mg/g	18
APE-894	Phosphorylethanolamine	C-reactive protein, enzymes	—	C-reactive protein 0.91mg/g	18
APG-894	Protein G	IgG immune complex	4-5 mg	IgG Humnan 10mg/g	18
APH-894	Phenyl alanine	Subtilisin Carlsberg	50 μ mol	Subtilisin Carlsberg 9mg/g	18
APR-894	Proteamine	IgM	4-5 mg	IgM Human 1.9mg/column	18
ARC-894	RCA-I	Glycoproteins, polysaccharides	20 mg	—	18
AST-894	Soybean trypsin inhibitor	Trypsin-like proteases	20 mg	Trypin 100mg/g	18
AWG-894	Wheat germ agglutinin (WGA)	Glycoproteins, polysaccharides	14 mg	—	18
ACH-494	Choline oxydase, acetylcholine esterase	Choline, acetylcholine	—	—	18
AGO-494	Glucose oxydase	Glucose	—	—	18

我们也备有下面的半微型／微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

3-6. 复合模式

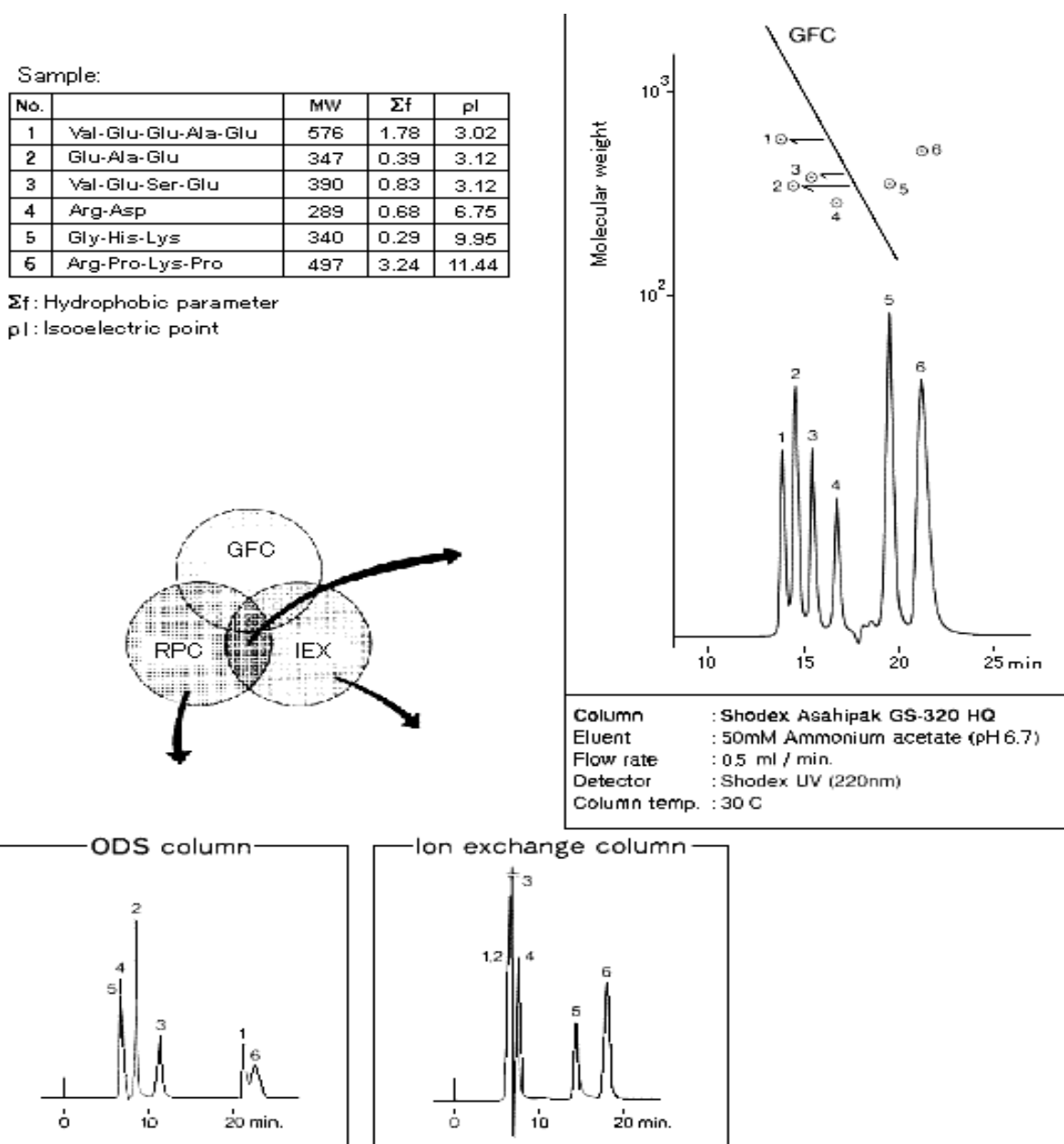
3-6-1. 分离原理

复合模式色谱法是几种分离模式同时使用的分离方法。单一模式分离不充分时采用复合模式来得到有效的分离。因为是几种分离模式，改变流动相组成，对某种特定的分离模式的影响会很强。

3-6-2. Shodex 产品介绍

Shodex Asahipak GS-HQ 系列基本上是尺寸排阻模式，与反相模式和离子交换模式相结合的复合色谱柱，可以实现一些以前无法分离的分析。可以对亲水性多肽，尤其是酸性多肽和碱性多肽进行相互分离。还有聚合物系色谱柱可以使用的PH范围宽，可在碱性条件下清洗，色谱柱的耐久性好等优点。

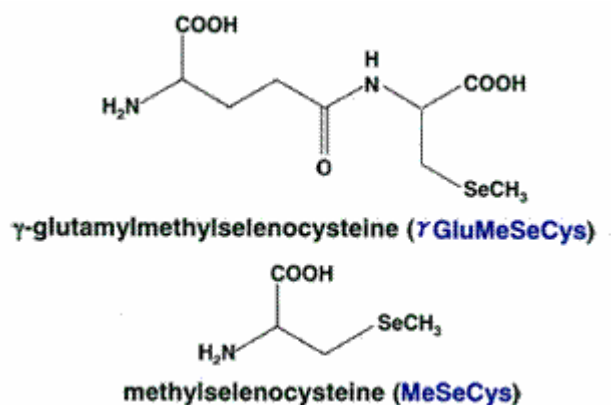
图 5 2 :



Column : Shodex Asahipak GS-320 HQ (7.5mmID*300mm)
Eluent : 50mM Ammonium acetate buffer (pH6.7)
Flow rate : 0.5mL/min
Detector : UV (220nm)
Column temp. : 30°C

利用复合模式可以对含有金属的氨基酸进行分离。下图复合模式色谱柱 **Asahipak GS-320 HQ** 的微型色谱柱 **GS320A-M5D (0.5mmID*150mm)**和 **ICP-MS** 的高灵敏度分析实例。

图 5 3 :



Sample : 100nL

1. γ-Glutamylmethylselenocysteine, γGluMeSeCys
2. Methylselenocysteine, MeSeCys

Column : Shodex GS320A-M5D (0.5mmID*150mm)

Eluent : 50mM CH₃COONH₄ buffer (pH6.5)

Flow rate : 2.0 μL/min

Detector : ICP-MS (Se at m/z=82)

Courtesy of Dr. Yasumitsu Ogra, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Asahipak series	Size (mm) I.D.×L	Plate Number (TP/column)	Exclusion Limit (Pullulan)	Particle Size (μm)	Pore Size (\AA)		Usable pH range
					Max.	Avg	
GS-220 HQ	7.5×300	> 19,000	3,000	6	150		2 to 9
GS-320 HQ	7.5×300	> 19,000	40,000	6	400		2 to 12
GS-520 HQ	7.5×300	> 18,000	300,000	7	2,000		2 to 12
GS-620 HQ	7.5×300	>18,000	2,000,000	7	7,000		2 to 12
GS-2G 7B	7.5×50	(Guard column)	—	9	—		2 to 12

Max. usable organic solvent concentration:

GS-320 HQ, GS-520 HQ, GS-620 HQ : 100% (Methanol), 50% (Acetonitrile)

GS-220 HQ : 30% (Methanol), 50% (Acetonitrile)

我们还备有下面的半微型微型色谱柱。

内径: 2.0mm, 1.0mm, 0.8mm, 0.5mm, 0.3mm 长度: 250mm, 150mm, 50mm

Shodex 主页

<http://www.shodex.com/>

Shodex 主页上介绍了各产品的规格、应用数据以及 HPLC 发生故障时的处理方法等，详情请参考我们的主页。

[注意]

1. 请在使用前仔细阅读产品附带的操作手册。
2. 由于产品的升级换代，某些规格会有变化，恕不另行通知。
3. 本产品目录中的数字仅作参考之用，并不是保证值。
4. 如果操作手册中没有安全方面的内容，处理试剂和其他化学品时请务必按相关规定小心谨慎。
5. 本手册中所述产品不能用于临床实践。

昭和电工科学仪器（上海）有限公司

上海市静安区石门一路 211 号旺旺大厦 18F

邮 编：200241

电 话：021-6217-6111 传真：021-6217-9879

销售邮箱：sales@shodexchina.com

技术支持：support@shodexchina.com

公司网站：www.shodex.com