DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.s1.009

使用Vit-X-648填料时流动相问题

韩吉华（化学教研室） 陈兆珍（仪器中心）

提 要 据文献[1][2]报导：Vit-X-648是用于分子大小排斥色谱的填料，是经过特殊方法处理后，已消除了任何不可逆吸附作用的刚性高硅胶玻璃，流动相既可用有机溶剂，又可用水溶液。但当我们检查它的渗透极限和排斥极限时，发现这种填料仍存在一定的吸附作用，而且对某些化合物的吸附作用还相当强（如罗丹明B被强烈吸附），因此使样品在选定条件下，保留值与理论相反，分子量小于渗透极限的样品，在保留值上有差异。为了克服这种现象，我们选用了几种不同的流动相，结果以用甲醇（MeOH）或含有5%以上的MeOH溶液作流动相时，效果较好。

关键词 填料；流动相；渗透极限；排斥极限；排斥色谱

据文献[2]报导：Vit-X-648填料经去活性后，从理论上讲已消除了吸附作用。但根据一些人的实验发现：这类填料仍存在一定的吸附作用，要克服这种现象，就必须注意流动相的选择。为此我们对该填料的性能做了一些检查。

材料与方法

色谱仪 P-E公司 Series 3+Lc-65T（紫外-可见波长检测器），灵敏度0.01AUFS；记录仪：361型，量程10mV；Rheodyne 7105进样阀；色谱柱：250×2.6 mmID不锈钢柱；填料：P-E公司生产的Vit-X-648，36-44 μm，分离范围650～48 000；填充方法：用敲击法干装。

试剂 重蒸馏水；MeOH：分析纯，并重蒸馏一次；其它试剂均为分析纯。

样品 牛血清（生物制剂），蓝葡聚糖，丙酮，丁酮，青霉素G、K（药用），Vc，萘和蒽等。

结 果

我们用水作流动相，用3—4根Vit-X-648柱串联，分别进入丙酮（分子量58）和丁酮（分子量72），Vc（分子量176.1）和青霉素G、K（分子量372.4）来检查Vit-X-648的渗透极限时，发现丙酮和丁酮，Vc和青霉素G、K，不仅保留值有差别，而且分子量小的保留值反而小（见图1、2）。为了克服这种现象，我们采用了几种不同的流动相（1）纯MeOH（2）MeOH:H_2O（3）0.000$_4$ N H_2SO_4溶液（4）磷酸盐缓冲液（pH=7，μ=0.15）（5）Tris-H_3PO_4缓冲液（pH=7～8），结果见表1—3，图3—7。

表1 小于渗透极限的样品用MeOH作流动相时的分析结果

样品	流速	t_R(min)	Ve(ml)	备注
萘	0.5ml/min	14.38	7.19	色谱柱及检测条件见图3
蒽		14.50	7.25	
萘-蒽		14.75	7.38	
丙酮-丁酮		14.50	7.25	
丁酮	1 ml/min	7.50	7.50	色谱柱及检测条件见图4
丙酮		7.62	7.62	
丙酮-丁酮		7.22	7.22	

注：t_R为保留时间，Ve为保留体积

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2 丙酮和丁酮混合液用MeOH:H_2O作流动相时的分析结果

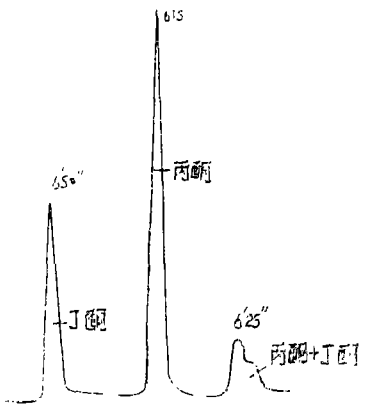
MeOH:H_2O 100:20	流 速	t_R(分min)	Ve(ml)	备 注
100: 0	0.5ml/min	18.17	9.09	色谱柱及检测条件见图5
80:20	〃	19.50	9.75	
70:30	〃	19.67	9.84	
30:70	〃	19.83	9.92	
20:80	〃	19.67	9.84	色谱柱及检测条件见图6
10:90	〃	*	*	
5 :95	〃	*	*	
2 :98	〃	20.00	10.00	
0 :100	〃	(1)20.17 (2)22.17	(1)10.08 (2)11.08	色谱柱及检测条件见图7

* t_R漏记

表3 牛血清和蓝葡聚糖*在下列流动相下分析结果

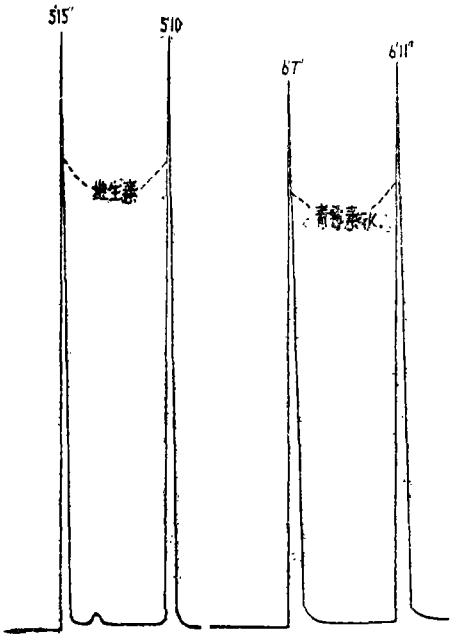
样 品	流动相	流 速	t_R(min)	Ve(ml)	备 注
牛血清	H_2O	0.5ml/min	5.83	2.92	色谱柱及检测条件见图9
蓝葡聚糖			5.75	2.88	
牛血清	Tris-H_3PO_4 缓冲液pH7～8	0.5ml/min	5.63	2.82	色谱柱及检测条件见图8
蓝葡聚糖			5.47	2.74	

* 蓝葡聚糖分子量约2×10^6



色谱柱：Vit-X-648四根柱串联
流动相：H_2O
流 速：1ml/min
检测器：UV254nm，衰减16
温度：室温

图1



色谱柱：Vit-X-648四根柱串联
流动相：H_2O
流 速：0.5ml/min
检测器：UV254nm，衰弱16
温 度：室温
进样量：Vc8μl，青霉素G、K4μl

图2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

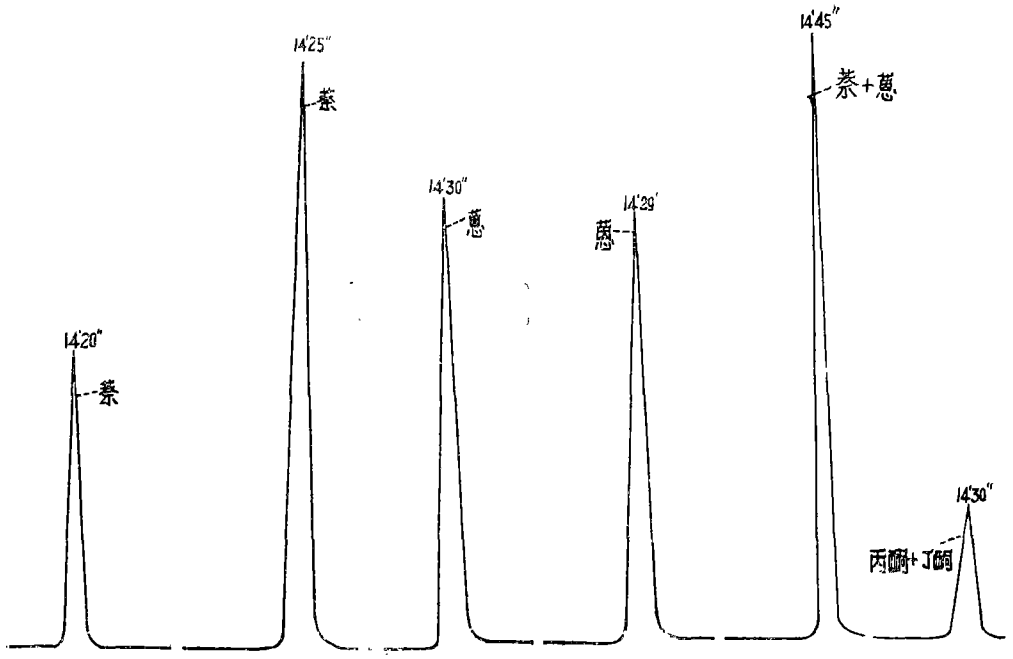


图 3　色谱柱：Vit-X-648三根柱串联；流动相：MeOH；流速：0.5ml/min；检测器：UV254nm；衰减32；温度：室温；进样量：蒽2μl，萘(1)0.4μl、(2)0.6μl(10mg/ml)，丙酮-丁酮10μl（各含5μl/ml），萘-蒽6μl

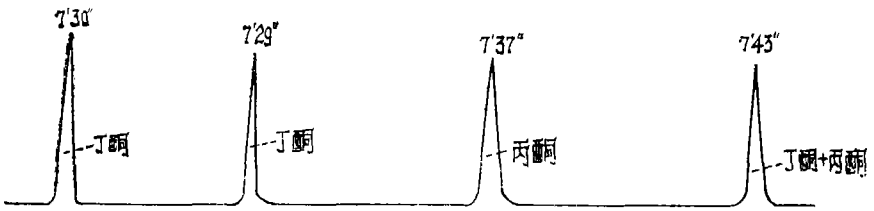


图 4　色谱柱：Vit-X-648四根柱串联；流动相：MeOH；流速：1ml/ml；检测器：UV254nm，衰弱16；温度：室温；进样量：10μl(10μl/ml)，丙酮＋丁酮10μl（各含5μl/ml）

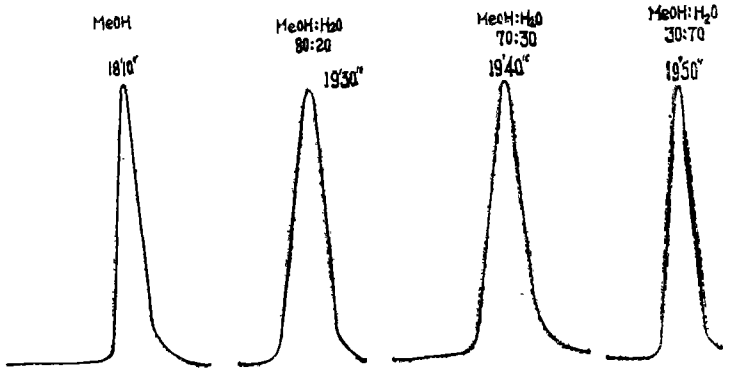


图 5　色谱柱：Vit-X-648四根柱串联；流动相：MeOH：H_2O；流速：0.5ml/min；检测器：UV254nm，衰减16；温度：室温；进样量6μl（丙酮和丁酮的混合液各含12.5μl/ml）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

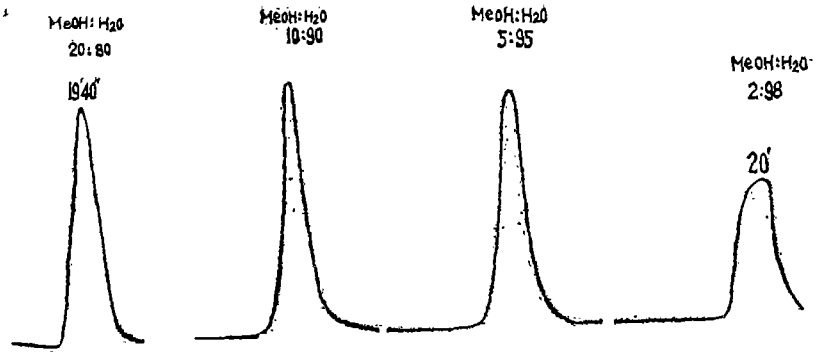


图 6　色谱条件同图 5

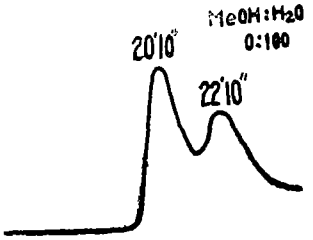


图 7　色谱条件同图 5

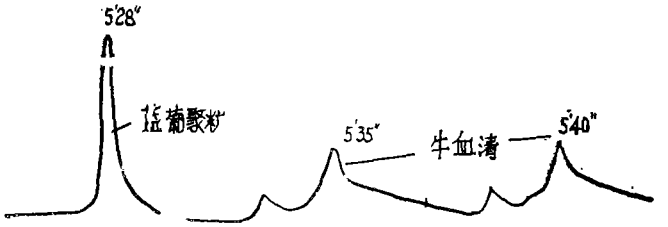


图 8　色谱柱：Vit-X-648三根柱串联；流动相：Tris-H_3PO_4 缓冲液pH7～8；流速：0.5ml/min；检测器：UV255nm 衰减16；温度：室温；进样量：10μl

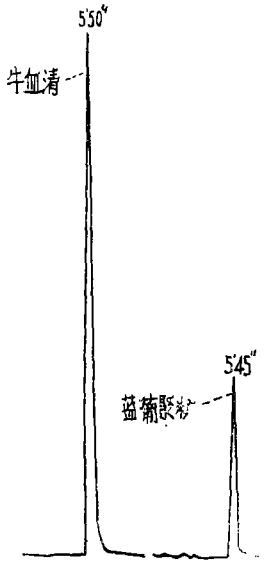


图 9　色谱柱：Vit-X-648三根柱串联；流动相：H_2O；流速：0.5ml/min 检测器：UV254nm，衰减16；温度：室温；进样量：牛血清4μl，蓝葡聚糖10μl

结 果 和 讨 论

1．实验结果表明：Vit-X-648 填料虽然已经用类似于六甲基二氮硅烷（hexamethylsilazane）去活性[1][2]，但单纯用水溶液作流动相时，仍存在一定的吸附作用。这种吸附作用与样品的疏水性有关，疏水性较大，被吸附也较强。例如丁酮比丙酮的疏水性要强些，因而丁酮的保留值大于丙酮。

2．从所用的几种流动相看：只有用MeOH或含有5％以上的MeOH 水溶液作流动相，才能消除填料的吸附性。说明这种填料不宜用单纯水溶液（即不含有机溶剂）作流动相。Kirkland JJ等[5][6]也已指出。

3．Vit-X-648 填料这种作用产生的原因，可能是由于硅烷化以后，表面的烃基增加，降低了固定相的亲水性，因而导致了反相作用。MeOH能抑制样品与固定相之间的疏水作用，故而可降低甚或消除固定相对样

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

品的反相作用。这种结论与 Barth HG 等[3][4][7]的实验结论是一致的。

4. 由于反相作用，分子量小于650(渗透极限）的样品，经 Vit-X-648填料，能否全部在同一时间内出峰，流动相的选择具有决定意义[8]。不过这种反相作用对分子量大于排斥极限（分子量大于48 000）的样品影响较小（见表 3 和图 8 — 9）。

5. 对处于分离范围内样品，能否按分子量大小次序出峰，除选好流动相外[8]，还需要考虑样品的分子结构。

参 考 文 献

1. 〔英〕CF 辛普森主编，许征帆译。实用高效液相色谱法。第一版，北京：中国建筑出版社出版 1981:183
2. Michael J Telepchak. New Use of Molecular-Size-Exclusion Chromatography. J Chromatogr 1973; 83:125
3. Barth HG. High-Performance Size-Exclusion Chromatography of Hydrolyzed Plant proteins. In: High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides: Edited by MTW Hearn et al. Academic Press, INC. New York, 1983; 55～63
4. Buytenhuys FA and Van Der Madend FPB. Gel Permeation Chromatography on Unmodified Silica Using Aeqeous Solvents. J Chromatogr 1978; 149:489
5. Kirkland JJ. Microparticles with Bonded Hydrocarbon Phase of High-Performance Reverse-Phase Liquid Chromatography. J Chromatographia 1975; 8:661
6. Kirkland JJ. Porous Silica Microspheres for High-Performance Size Exclusion Chromatography. J Chromatogr 1976:125:231
7. Muller D, Ndoume-Nze M and Jonefonvicz. High Pressure Size-Exclusion Chromatography of Anticoagulant Materials. J chromatogr 1984; 297:351
8. Kirkland JJ and Antle PE. High-Performance Size-Exclusion Chromatography of Small Molecules with Column of Porous Silica Microspheres. J Chromatogr Sci 1977; 15:137

A Study on the Fluidic Phase of Vit-X-648 Packing

Han Chihua (Department of Chemistry, Third Military Medical College)

Chen Zhaozhen (Centre of Instruments, Third Military Medical Colkge)

Vit-X-648 packing is used for the high-speed molecular-size exclusion chromatography. This packing consists of rigid high silica glass with a network of interconnected pores of narrow pore-size distribution. The packing has been deactivated to eliminate any irreversible adsorption. The column packed with Vit-X-648 may be sued with either aqueous or organic solvent.

When the permeation and exclusion limits of the packing were examined, it was found that its adsorption still existed to some extent. For instance, the adsorption of EX Rhoadmine B was so strong thatits retention value appeared abnormal. Similarily, substances with a molecular weight quite under the permeation limit would appear different in their retention values. In order to overcome this weakness, several forms of fluidic phase were tried. It was found that methanol or an aqueous solution with more than 5% of methanol was most suitable.

Key words: Packing; Fluidic phase; Permeation limit; Exclusion limit; Exclusion Chromatography

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net