

半制备型色谱柱与色谱饼性能的比较

李 翔, 张养军, 耿信笃

(西北大学现代分离科学研究所, 陕西 西安 710069)

摘要 通过比较具有相同柱几何体积的半制备色谱柱和色谱饼的性能,发现在同样的色谱条件下,用液相色谱方法分离生物大分子时,在分离效率和蛋白活性回收方面,色谱饼和色谱柱的差异不大;由于色谱饼中的填料较色谱柱中的装填更为紧密和均匀,当流动相流速增加时,色谱饼不仅反向压力上升慢,而且质量和体积负载也比色谱柱高。该结果表明使用色谱饼的色谱分离不仅具有可与高效液相色谱(HPLC)媲美的分离效率,而且还具有中、低压色谱分离的高柱负载,这有利于蛋白保持高的生物活性,为色谱饼的工业化应用奠定了基础。

关键词 液相色谱;半制备色谱柱;半制备色谱饼;蛋白复性

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2002)02-0133-04

Comparison of the Separation Performances between Semi-Preparative Chromatographic Column and Chromatographic Pie

LI Xiang, ZHANG Yang-jun, GENG Xin-du

(Institute of Modern Separation Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: By comparing the resolution and recoveries of proteins between semi-preparative chromatographic column and chromatographic pie (pie-like column) having the same geometric volume under the same chromatographic conditions, the result from the former was found to have the almost same as that from the latter. However, the back pressure of the chromatographic pie rose slower than that of the chromatographic column with the increase of flow rate. Furthermore, the mass and volume loads for the chromatographic pie were higher than those for the chromatographic column. The results indicated that the chromatographic pie had more advantages than the chromatographic column in their performances, and this lay a foundation of the applications of the chromatographic pie in industry.

Key words: liquid chromatography; semi-preparative chromatographic column; semi-preparative chromatographic pie; protein renaturation

在利用高效液相色谱(HPLC)分离生物大分子的过程中,许多色谱工作者发现生物大分子的色谱保留行为主要由流动相中置换剂的浓度决定,而分离度受色谱柱长度的影响不大,并用溶质计量置换模型(SDM-R)对此进行了定性说明^[1~3]。Tennikov等人^[4]还依据SDM-R,提出了生物大分子在高效液相色谱上保留的“开关”机理(on-off mechanism),并预计由此可发展一类全新的膜色谱固定相。他们还成功地从合成的连续阴离子交换棒上切下2 mm厚的离子交换薄片或膜用于蛋白质分离,并且认为灌注色谱固定相更好地体现了这种“开关”机理。所有这些工作均表明分离生物大分子可以采用较短的色谱柱,这为可以装填小颗粒填料的半制备柱的应用

奠定了基础。为了能在较低的压力条件下进行大流量洗脱,一般的半制备柱装填的是大颗粒填料。但是为了满足必要的分离度要求,又不得不维持一定的色谱柱长度,这不仅使分离时间延长,而且降低产率,使生产成本升高^[5]。在半制备柱中装填小颗粒填料虽然很容易满足分离度的要求,并具有较强的柱负载量,但在此条件下,色谱系统呈现很高的压力,因而妨碍其应用。在生物大分子的色谱分离中,生物大分子的分离度受柱的长度影响不大的特性有利于解决在半制备色谱柱中使用小颗粒填料的问题。对色谱柱几何体积相同而柱长和柱内径相差较大的色谱柱的性能的比较未见报道,本文对这一问题进行了研究。

收稿日期 2001-09-27

作者简介 李 翔,男,1977年生,硕士研究生。

通讯联系人 耿信笃,男,教授,博士生导师,电话(029)8303817, E-mail: xdgeng@nwu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(批准号 2967017, 39880003)

1 实验部分

1.1 仪器

HPLC 系统包括两台 LC-10ATVP 型泵、一台 SCL-10AVP 系统控制器、SPD-10AVP 型 UV-VIS 检测器、DGU-12A 型除气装置、CTO-10ASVP 柱温箱、色谱专用工作站,以及测定活性所用仪器 UV-1601PC 型紫外-可见分光光度计和专用软件均为日本岛津公司产品。用 CGY-100 高压气动泵(北京市西助技术服务中心)以匀浆法在 40 MPa 压力下分别向规格为 200 mm × 7.9 mm i.d. 不锈钢管和 5 mm × 50 mm i.d. 不锈钢管(饼形)内装填本所合成的粒度为 $(5 \pm 1) \mu\text{m}$ 的疏水填料,得到自制的色谱柱和色谱饼(饼形色谱柱)。实验所用超纯水由 Barnstead E-Pure 净水器(美国,Barnstead Co. Ltd)制备。

1.2 试剂

细胞色素-C(Cyt-C,来源于马心)、肌红蛋白(Myo,来源于马心)、核糖核酸酶 A(RNase A,来源于牛胰脏)、溶菌酶(Lys,来源于鸡蛋清)、 α 淀粉酶(α -Amy,来源于枯草杆菌)和胰岛素(Ins,来源于牛胰脏)均购自美国 Sigma 公司,并用超纯水配制成所需浓度的溶液。将适量的溶菌酶溶于 8.0 mol/L 脲溶液(或 7.0 mol/L 盐酸胍溶液)配成质量浓度为 5.0 g/L 的溶液,并将其置于 25 °C 柱温箱中放置 24 h,得到变性溶菌酶溶液。测定活性所用的溶壁球菌由本所发酵制备。pH 6.2 的磷酸缓冲液用磷酸二氢钠和磷酸氢二钠配制。流动相由 A 液和 B 液组成,A 液为 3.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.050 mol/L KH_2PO_4 (pH 7.0),B 液为 0.050 mol/L KH_2PO_4 (pH 7.0)。所有试剂皆为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

将色谱柱和色谱饼分别安装于色谱系统中,在每次色谱分离之前,先用约 15 倍柱体积的 A 液在选定的流速下平衡色谱系统,然后在设定的流速、线性梯度下进行色谱分离和测定。检测波长为 280 nm,检测灵敏度为 0.08 AUFS。

为了比较具有相同柱几何体积的色谱柱和色谱饼分离蛋白时分离度的差异,采用自制的色谱饼和色谱柱(几何体积为 $(9.9 \pm 0.2) \text{ mL}$),在相同进样量和 4.0 mL/min 流速的色谱条件下,对 6 种蛋白进行分离。

1.3.2 柱负载的测定

用 5.0 g/L 牛血清蛋白(BSA)溶液分别测定色谱柱和色谱饼的体积负载,用 12.5 g/L BSA 溶液分别测定它们的质量负载。

体积负载的测定:在流动相流速为 2.0 mL/min 下,用 A 液平衡色谱柱 30 min。固定 BSA 的质量,分别进不同浓度的 BSA 溶液 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL 和 1.2 mL,收集溶剂峰,并用电泳方法检测 BSA 的含量。测定色谱饼体积负载时,在流速为 5.0 mL/min 条件下,用 A 液平衡色谱饼 30 min,其他操作步骤同色谱柱的测定。

质量负载的测定:在流动相流速为 2.0 mL/min 的条件下,用 A 液平衡色谱柱约 30 min,然后用 A 泵继续进 A 液,用 B 泵进样品。进样时,使 A 液与样品溶液的体积比保持为 9:1。当记录曲线出现“S”形的另一平台时,停止进样。用 A 液冲洗色谱柱,当紫外检测器的吸光度值减小并维持一恒定值后,梯度洗脱色谱柱,并收集洗脱液以测定柱对 BSA 的负载。线性梯度为:100% A $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 100% B。梯度洗脱完毕后,继续用 100% 的 B 液进行冲洗,直到紫外检测器的吸光度值减小并维持一恒定值,停止收集洗脱液。准确测量所收集的洗脱液的体积,在 280 nm 条件下,用紫外分光光度法测定收集液中蛋白质的浓度,计算出蛋白质的总量。色谱柱中填料质量的测定方法是用去离子水将测定完毕的色谱柱充分冲洗后,将填料打出,在 105 °C 温度下烘干后称重。用测定的蛋白总量除以填料质量,计算得出色谱柱的质量负载。测定色谱饼的质量负载时,流动相的流速为 5.0 mL/min,用 A 液平衡色谱饼约 30 min,其他操作步骤同色谱柱的测定。

1.3.3 电泳法测定 BSA 的含量

在样品中加入三氯乙酸,使其质量浓度为 100 g/L,在 18 000 r/min 转速下,离心 20 min,弃去上清液,然后再加入 10 mL 去离子水,重复上述操作 3 次。最后加入 10 mL 丙酮洗涤并离心,离心速度为 18 000 r/min,时间为 15 min,重复 3 次。弃去丙酮,加入电泳缓冲液,再放入沸水浴中加热 3 min 至 5 min。取上清液按文献[6]的方法做电泳,用蓝染方法检查收集液中 BSA 的含量。

1.3.4 活性测定

溶菌酶活性的测定按文献[7]方法进行。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离性能的比较

如图 1 所示,色谱饼和色谱柱对 6 种蛋白的色谱分离度基本相同,但色谱柱的长度为色谱饼的 40 倍。虽然用色谱饼所得分离峰形没有色谱柱的尖锐,这对于分析型色谱来讲,会影响检测灵敏度,但对制备规模的色谱而言,不会带来多大影响。这些

结果表明在几何体积相同的情况下 ,直径大、柱长短 的色谱饼用于蛋白分离时分离度也能满足要求。

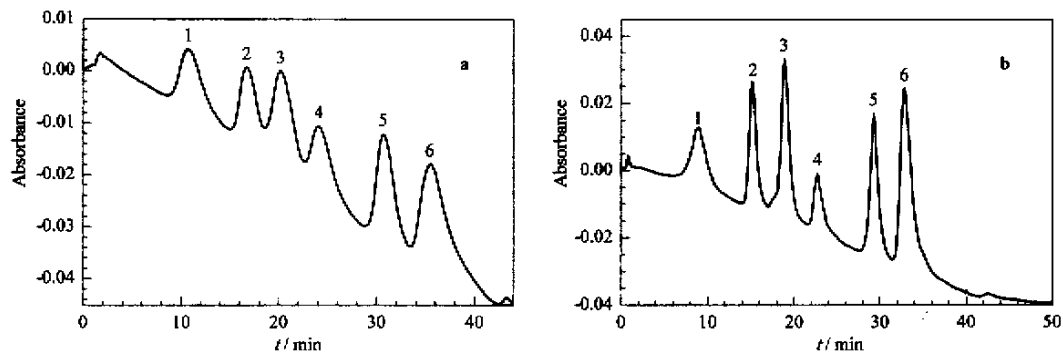


图 1 色谱饼与色谱柱分离性能的比较

Fig.1 Comparison of separation performance between chromatographic pie and chromatographic column

Chromatographic conditions : flow rate , 4.0 mL/min ; linear gradient , from 100% A to 100% B in 40 min ; detection wavelength , 280 nm .
a. chromatographic pie , size : 5 mm × 50 mm i. d . ; b. chromatographic column , size : 200 mm × 7.9 mm i. d . .

1. Cyt-C ; 2. Myo ; 3. RNase A ; 4. Lys ; 5. α-Amy ; 6. Ins .

2.2 压力-流速曲线比较

将新装填的色谱柱和色谱饼分别接入色谱系统中 ,测定其柱压随流动相流速变化的曲线。当色谱柱和色谱饼各使用大约 30 次后 ,再分别测定它们的柱压随流动相流速的变化曲线。如图 2 所示 ,色谱饼在使用前和使用后的两种压力-流速曲线皆明显低于色谱柱的两种压力-流速曲线 ,说明在相同柱几何体积条件下 ,色谱饼比色谱柱更具有优势。特别是在它们使用了一段时间后 ,其优势更加显著。这是由于在进样过程中 ,有些蛋白溶液与疏水流动相相遇时会产生少许沉淀 ,这些沉淀不易被通常的疏水流动相溶解 ,因而除去这些沉淀较困难。由于色谱饼的柱头过滤片面积比所用色谱柱横截面积大 40 倍 ,因此 ,产生的少许沉淀对色谱饼的柱压影响不大 ,但对柱头面积较小的色谱柱而言 ,沉积在其上的蛋白等物质较厚 ,因此 ,色谱系统的压力升高幅度较大。而且 ,在同样的流速下 ,大直径的色谱饼上的

压力小于小直径的色谱柱上的压力 ,因此 ,色谱饼可在更高的流速下进行分离。它具有灌注色谱的这一特征 ,意味着使用色谱饼可以缩短分离周期 ,降低分离成本 ,更适合于需要在中、低压力下进行的色谱分离纯化工艺。

2.3 质量负载和体积负载的比较

由表 1 看出 ,尽管色谱柱和色谱饼内部几何体积近似相同(9.9 ± 0.2) mL ,但在同样装柱条件下装填的填料量却有差异 ,色谱柱中的填料量为 4.6 g ,而色谱饼中的填料量为 6.0 g ,为色谱柱装填质量的 1.3 倍。换句话讲 ,色谱饼中填料颗粒间的空隙要比通常色谱柱的小许多。这是由于在装填色谱填料时 ,色谱饼中压力梯度小于色谱柱中的压力梯度 ,所以前者可以使填料装填得更均匀 ,更紧密。另外 ,由表 1 还可看出 ,色谱饼的体积负载约为所用色谱柱的 1.6 倍 ,质量负载约为 1.2 倍 ,体积和质量负载均比色谱柱高。这是因为在色谱饼入口端装有径向流分布器 ,可使流动相在色谱饼进口端就能均匀地分布在大面积的填料上 ,降低了流动相的线速 ,从动力学角度上讲更有利于色谱填料对 BSA 的完全吸附。综上所述 ,在体积负载和质量负载方面色谱饼比色谱柱更具优势。

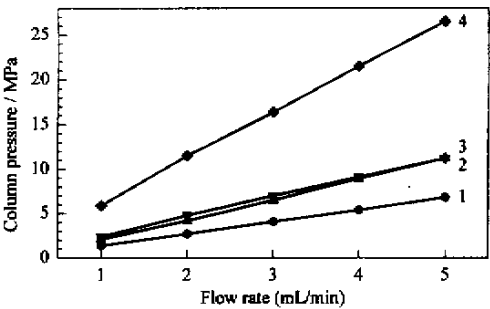


图 2 色谱饼与色谱柱的压力-流速曲线的比较

Fig.2 Comparison of pressure-flow rate curves between chromatographic column and chromatographic pie

1. chromatographic pie ; 2. chromatographic pie after using 30 times ; 3. chromatographic column ; 4. chromatographic column after using 30 times .

表 1 色谱饼和色谱柱体积负载和质量负载的比较

Table 1 Comparison of volume load and mass load between chromatographic column and chromatographic pie

Size (mm × mm i. d .)	Amount of packing(g)	Volume load(mL/g)	Mass load (mg/g)
5 × 50(pie)	6.0	0.067	28.65
200 × 7.9(column)	4.6	0.043	23.46

2.4 活性回收率的比较

自从疏水色谱首次用于变性蛋白复性以来^[8], 色谱已经成为一种重要的复性工具^[9]。因此, 在柱几何体积不变的情况下, 改变柱长与柱径比, 使色谱柱变成大直径的色谱饼对复性效率的影响必然会引起人们的重视。所以, 我们选用溶菌酶为研究对象, 进行了溶菌酶在 8.0 mol/L 脲中变性以及色谱复性试验, 其结果是色谱柱的活性回收率为 101.6%, 而色谱饼的活性回收率为 102.9%, 两者没有显著的差异, 该结论与文献 [10] 报道的结果一致。表明色谱方法复性效率与色谱柱的几何形状没有直接的关系。另外, 有许多蛋白在高的柱压力条件下容易聚合, 使蛋白形成二聚体, 甚至多聚体, 从而使蛋白失活, 而色谱饼比色谱柱具有更低的压力, 有利于活性蛋白的稳定^[11, 12]。所以, 大直径色谱饼可以用于变性蛋白的复性。

3 结论

用 BSA 对相同几何体积的半制备色谱柱和色谱饼的性能进行了评价。实验结果表明, 在同样色谱条件下, 用液相色谱法对生物大分子进行分离时, 在分离效率和蛋白活性回收率方面, 色谱饼和色谱柱差异不大, 但在柱压与流速关系、质量负载和体积负载方面, 色谱饼比色谱柱具有优势。表明色谱饼不仅具有 HPLC 那样高的分离效率, 而且还具有中、低压色谱那样高的柱负荷, 用其分离蛋白时有利

于蛋白保持高的生物活性, 同时可以用高流速的流动相进行洗脱。本实验结果为色谱饼的工业化应用奠定了基础。当然, 这一结论仍需用更多的实验数据来进一步证实。

参考文献:

- [1] Moore R M, Walters R R. *J Chromatogr*, 1984, 317: 119
- [2] Tennikova T B, Belenkii B G, Svec F. *J Liq Chromatogr*, 1990, 13(1): 63
- [3] Geng X D, Regnier F E. *J Chromatogr*, 1984, 296: 15
- [4] Tennikov M B, Gazdina N V, Tennikova T B, *et al.* *J Chromatogr A*, 1998, 798(1+2): 55
- [5] Guiochon G, Katti A. *Chromatographia*, 1987, 24: 165
- [6] Laemmi U K. *Nature*, 1970, 227: 680
- [7] Withka J, Moncuse P, Baziotis A, *et al.* *J Chromatogr*, 1987, 398: 175
- [8] Geng X, Chang X. *J Chromatogr*, 1992, 599: 185
- [9] GUO Li-an, GENG Xin-du. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(6): 661
郭立安, 耿信笃. *生物工程学报*, 2000, 16(6): 661
- [10] Liu T, Geng X D. *Chinese Chemical Letters*, 1999, 10(3): 219
- [11] Samarasinghe S D, Campbell D M, Jonas A, *et al.* *Biochemistry*, 1992, 31(34): 7 773
- [12] Zhang J, Peng X, Jonas A, *et al.* *Biochemistry*, 1995, 34(27): 8 631

《色谱》消息

《色谱》编辑部 2002 年的新举措

- 为了减少作者的投稿手续, 方便作者投稿, 2002 年本刊免收注册费。
- 为了能够及时报道国内色谱学科的最新进展, 对评为“研究快报”和“研究报告”的稿件, 本刊将采取有效措施, 在收到修改稿后 3 个月内发表。
- 为了鼓励科研工作者向本刊提交创新性强、学术水平高、发展前景好的稿件, 对评为“研究快报”和“研究报告”的稿件, 本刊免收版面费, 稿酬支付标准不变。