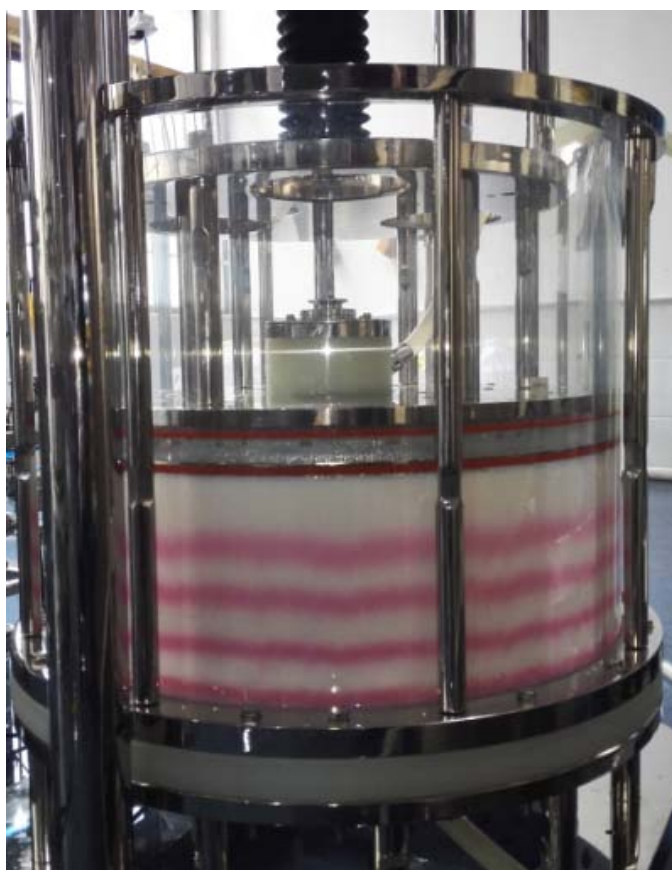


慧德易电子期刊

H&E Electronic Journal

第 115 期

层析分离，是否一定要评价柱效？



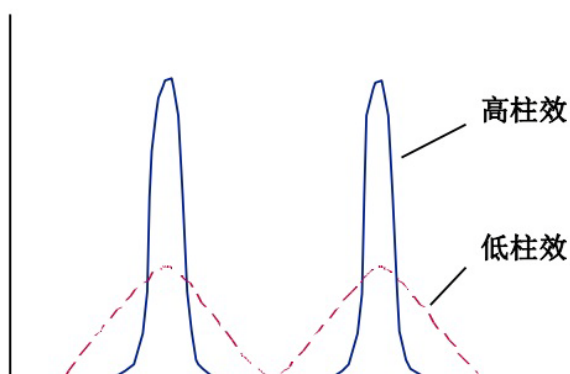
2019 年 1 月

第 115 期 层析分离，是否一定要评价柱效？

有人问到：“我的工艺是流穿模式，是否需要评价柱效？”还有人问到：“我的工艺是亲和层析，单梯度洗脱，不用担心拖尾，是否需要评价柱效？”今天，小编为大家进行统一解答。

什么是柱效？

柱效 (column efficiency)，是指层析柱保留某一物质而不使其扩散的能力。柱效越高，则分离度越高。



塔板理论及柱效评价标准

马丁 (Martin) 和欣革 (Syngé) 最早提出塔板理论，将层析柱比作蒸馏塔，把一根层析柱设想成由许多小段组成。在每一小段内，一部分空间为固定相占据，另一部分空间充满流动相。组分随流动相进入层析柱后，就在两相间进行分配。并假定在每一小段内组分可以很快地在两相中达到分配平衡，这样一个小段称作一个理论塔板 (theoretical plate)。经过多次分配平衡，分配系数小的组分先离开蒸馏塔，分配系数大的组分后离开蒸馏塔。

理论塔板数 (N) 计算公式：

$$N = 5.54 (V_e / W_{1/2})^2$$

该公式中的 V_e ，必须从进样时起算。

每米理论塔板数 (N/m) = 理论塔板数 (N) ÷ 柱床高度。

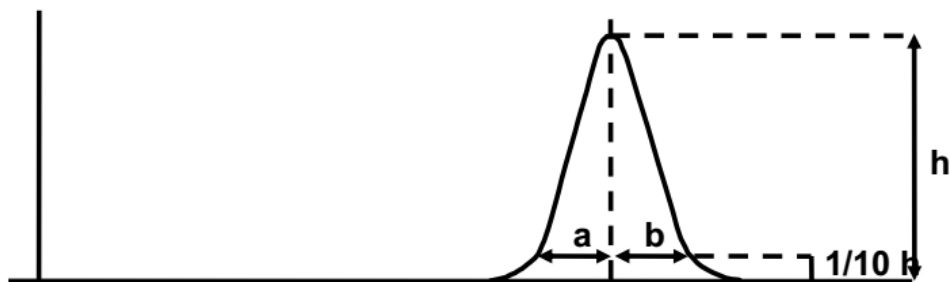
HETP (height equivalent of theoretical plate)，理论塔板等量高度，即每一层理论塔板的高度。

简单来说，每米理论塔板数，是指每米有多少层；HETP，是指每一层有多高。可以说两者是互为

倒数的关系。

评价标准：一般情况下，认为 $HETP < 4$ 倍粒径大小即为比较理想的柱效。比如装填平均粒径 $90\ \mu\text{m}$ 的 Sepharose 填料，则要求 $HETP < 360\ \mu\text{m}$ ，通过计算，要求每米理论塔板数 > 2778 。或可根据实际情况，将柱效标准定为每米理论塔板数 ≥ 3000 。

对称性，也称峰不对称因子（Asymmetry, As），用来评价层析柱装填的均匀程度。



$As = b/a$ 。 $As > 1$ ，说明装填偏松，表现为峰拖尾； $As < 1$ ，说明装填偏紧，表现为峰前沿。若对分离度有较高要求，可把标准定为 $0.8 < As < 1.2$ ；若对分离度要求并不高，可把标准定为 $0.8 < As < 1.5$ ，甚至更宽的范围。

是否一定要评价柱效？

总体来说，还是建议进行柱效评价的，但柱效评价标准不能一概而论。

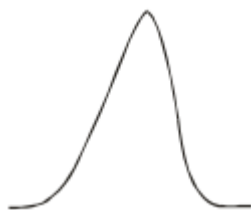
高标准：1) 分子筛层析；2) 反相层析；3) 疏水层析；4) 采用阶性梯度或线性梯度洗脱的离子交换层析。此类层析对分离度有较高要求，有些需要采用多梯度洗脱或线性洗脱，如果柱效不佳，往往会造成峰扩散或拖尾，会对纯化效果产生很大影响。建议标准： $HETP < 4$ 倍粒径， $0.8 < As < 1.2$ 。

低标准：1) 亲和层析；2) 采用单梯度洗脱的离子交换层析。此类层析仅需采用单梯度洗脱，有时在产物洗脱下来后，还要立即进行稀释，以防产物聚集，因此对分离度要求较低。然而，过于严重的峰扩散和拖尾，也是会影响纯化效率的，因此柱效测定也必不可少。建议标准： $HETP < 5$ 倍粒径， $0.8 < As < 1.5$ 。

仅要求峰型及对称性：流穿模式。此类模式为目标产物流穿，杂质被吸附，如果填料装填不均匀，或者过于松散，仍会导致吸附不均而影响载量 and 处理量。因此，评估柱效时建议观察一下峰型及对称性，如果峰型平滑，且对称性良好，即可接受。建议标准： $0.8 < As < 1.5$ 。当然，如果装填工艺稳定，甚至进行了工艺验证，该模式也可以不进行柱效评价。

柱效评价的常见问题及处理

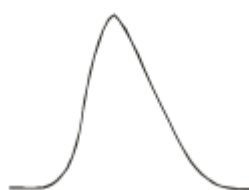
前沿峰



可能原因：压缩过紧。

解决办法：重新装填。

拖尾峰



可能原因：1) 压缩过松；2) 管路过粗，或检测器流通池体积过大，造成稀释效应。

解决办法：1) 重新装填；2) 检查管路及检测器流通池规格是否匹配。

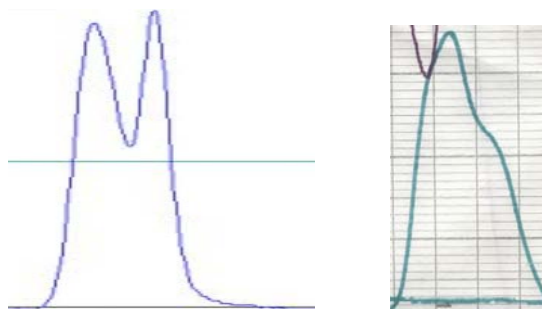
低柱效



可能原因：1) 沉降不均匀；2) 碎填料过多；3) 检测器或泵故障。

解决办法：1) 降低匀浆浓度，确保搅拌均匀后一次性缓慢倒入层析柱；2) 去除碎填料；3) 检查检测器及泵是否正常；4) 考虑更换为粒径更细的填料以提高柱效，如 TOSOH 聚合物基材填料 (<http://www.prep-hplc.com/brand/view/1.html>)。

峰型不佳



可能原因：1) 柱床中心凹陷，或柱床与筛网之间存有气泡，导致样品流动不均匀（样品需要绕过

凹陷区或气泡); 2) 装填不均匀, 甚至内部有裂缝; 3) 筛网堵塞, 导致样品流动不均匀; 4) 层析柱无分配器, 或分配器设计不佳, 导致偏流。

解决办法: 1) 重新装柱, 优化装柱策略; 2) 拆卸、清洗筛网, 并确认筛网孔径是否合适; 3) 采用具有合理分配器设计的层析柱。

分享

慧德易 QuikSep 层析柱分配器及色带实验:



层析柱分配器



北京慧德易专注于层析领域十余年, 已形成完善的层析设备产品线, 可为广大客户提供多种类型的层析系统及层析柱, 以及专业的服务指导及售后支持! 慧德易真诚期待与您的合作!



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