

葡聚糖凝LH20胶柱使用说明

1 Sephadex G型葡聚糖凝胶只适合在水中使用，Sephadex G-25羟丙化后就是Sephadex LH-20。其既有分子筛作用，在由极性与非极性溶剂组成的溶剂中还有反相层析效果。虽然价位很高，但由于性能颇佳，可再生利用，所以倍受亲睐。此外上柱样品损失很少，对处理小样品较好，这也是我们实验室常用的原因之一。

2 Sephadex LH20 的原理。

Sephadex LH20的分离原理主要有两方面：以凝胶过滤作用为主，兼具反相分配的作用（在反相溶剂中）。因为凝胶过滤作用，所以大分子的化合物保留弱，先被洗脱下来，小分子的化合物保留强，最后出柱。如果使用反相溶剂洗脱，Sephadex LH20对化合物还起反相分配的作用，所以极性大的化合物保留弱，先被洗脱下来，极性小的化合物保留强，后出柱。如果使用正相溶剂洗脱，这主要靠凝胶过滤作用来分离。

3 Sephadex LH20 洗脱溶剂。

看完第2点后，就应该清楚Sephadex LH20 洗脱溶剂因分为两类：反相和正相两种。用得最多的是反相溶剂洗脱，以甲醇—水系统最为常见，先用水，逐渐增加甲醇比例，最后用100%甲醇冲柱。正相系统以氯仿—甲醇最为常见，先用50%氯仿—甲醇，逐渐增加甲醇比例，最后用100%甲醇冲柱。

4 Sephadex LH20 样品的处理和洗脱溶剂的选择。

如果样品极性大，这选用反相溶剂洗脱（甲醇—水），样品用最少体积的甲醇—水（尽可能甲醇少一些）溶解，过滤后，湿法上样（一定要滤喔！要是把Sephadex LH20 堵啦，就得将Sephadex LH20 的柱头部分弃去，很心痛呀）。如果样品极性小，这选用正相溶剂洗脱（氯仿—甲醇），样品用最少体积的氯仿—甲醇溶解，过滤后，湿法上样。

5 Sephadex LH-20的步骤。

(1) 选择条件：

梯度洗脱在Sephadex使用中并不象在正相柱层析中那么重要。首先你的样品须要能溶解在尽量少量的洗脱剂中。极性在的用甲醇水系统；极性小者一般用不含水的系统。我们实验室常用正己烷二氯甲烷甲醇系统，用了很多年，效果较好。

(2) 饱和层析柱：

用洗脱剂将凝胶摇匀，直立柱身，让其自然沉降，此时要防止气泡留在其中。至少半小时打开开关，流出几个柱体种的洗脱剂，目的是使其膨胀在正确比例的洗脱剂中。

- (3) 样品处理：用尽量少的洗脱剂溶解样品，常压过滤。
- (4) 湿法上柱。这也是要有技巧的步骤。
- (5) 洗脱：控制流速，一般1drop/s以下，可参见厂家的一些参数；必要时更改极性（很多时一个极性就可以将样品洗脱完毕）。

再生以备下次使用。

6 分离的技巧，最后说说我的使用心得

- (1) 流速不可太快，切切不可新急，所谓欲速则不达。
- (2) 柱子尽可能长，Sephadex LH20 柱长的增加将极大地改善分离，所不要吝惜填料，宁可将填料全装在一根大柱子中，不要将填料装成几根小柱。所谓集中优势兵力，打击敌人。
- (3) 馏分一定要接的细，可1 / 10，或1 / 20 个保留体积接成一馏分。
- (4) 洗脱体积一般为2-3个保留体积，对特殊保留强的化合物，可洗脱5个保留体积。
- (5) 鞣质成分死吸附严重，如不在乎填料者，可用Sephadex LH20 分鞣质。
- (6) Sephadex LH20 对黄酮类成分的分离效果极佳，方法很成型，有大量文献参考。
- (7) 填料反复使用，每次用完，一般可用甲醇将柱子洗干净，然后用下一次分离的起步溶剂将甲醇替换出来，待用。

Sephadex LH-20是由葡聚糖G-25羟丙基化加工而成，属于分子筛凝胶，尤其适用于天然产物在有机溶剂中的纯化。例如：类固醇、萜类、脂类以及小分子多肽等，Pharmadex LH-20同时适用于分子类别非常相似的物质分离和工业规模的制备，既可用于初步纯化步骤，也可用于最终精制步骤，如非对映同分异构体的分离。

1. 装柱

装填的重要原则之一就是需要形成一个稳定均一的柱床。胶颗粒越均一（粒径分布越窄），越容易获得稳定均一的柱床。但是对于Sephadex LH-20而言，25~100 μm 的粒径范围相对于许多用于制备色谱的填料而言，不能说分布均一，也就是说其粒径分布较宽。然而当胶溶胀后就相对容易得到均一的柱床。这对于长柱（最高至250cm）而言也是同样的。在装柱前，层析柱和储槽都必须进行彻底的清洗。

Sephadex LH-20在使用之前必须进行溶胀。在溶胀的过程中，要尽量避免过分搅拌，否则会破坏球形胶粒，且要避免使用磁力搅拌器。

在室温下，将凝胶溶胀于层析溶剂中至少三小时，溶胀后胶体积的大小决定于所使用的溶剂系统，请参考后页

之干胶溶胀表计算特定柱体积所需要干胶的量。使溶胀胶体积沉淀之后占总体积的75%，上层溶剂占25%，这时，悬浮液从一个容器倒入另一容器时胶粒可移动。将溶胀后的凝胶根据装柱要求均匀倒入柱内，在保证胶粒不变形的前提下，应在尽可能高的压力下装柱，反压不要超过1.5ba。

2. 平衡

上样前，用洗脱液平衡层析柱至少两个柱体积直到基线变得平稳为止，如改变溶剂应该注意凝胶在新溶剂中的溶胀性质，并根据性质确定柱高调节器的位置，如使用相同的溶剂，在以后的层析中柱平衡可以省略。

3. 洗脱液

为确保延长层析柱的使用寿命，所有的缓冲液都应该离心或经过0.45um的膜过滤以除去杂质。

4. 样品

样品体积应该占柱总体积的1-2%，同样在使用之前样品应该离心或经过0.45um的膜过滤。

5. 洗脱

洗脱流速应根据情况而定，最大线性流速约12cm/min（反压1.5ba），建议流速为1-10cm/h。总体来说，较低的流速，具有较高的分辨率。

6. 再生

凝胶再生通常是先用2-3个柱体积的洗脱液进行清洗，如更换洗脱液，则需要重新平衡。

7. 体积流速与线性流速的关系

线性流速=体积流速/横截面积

8. 溶胀体积

由于Sephadex LH-20的溶胀体积依赖于溶剂，所以对于不同直径的柱可根据比例增加或减少旧柱体积以便计算出新体积。

新体积=旧体积×（新柱体积/旧柱体积）

9. 胶的性质

Sephadex LH-20同时具备亲水和亲脂双重性质，且被分离物质的极性在分离过程中起着重要作用。

10. 排阻极限 4-5KD（与所用溶剂有关）

11. 上样量

吸附模式 取决于所需分辨率

分子量大小 小于总体积的20%

正相分配 小于总体积的1%

12. 其他

胶粒形状 球形，多孔

颗粒大小（干） 18-111um（直径）

颗粒大小中间值（干） 70um（直径）