

## 色谱柱简介

HALO® 90 Å Glycan 是一种基于 **Fused-Core®** 技术的快速、高效型液相色谱柱。Fused-Core® 颗粒由薄的高纯多孔硅胶壳层围绕着实心硅胶核组成，传质只发生在壳层内。HALO 90 Å Glycan 是一种高极性固定相，通过创新的专有化学键合技术，将五羟基配体键合到硅胶的多孔壳层。这种高性能材料的色谱柱可用于亲水作用色谱 (HILIC)，以常规反相溶剂为流动相，分离低聚糖，尤其是蛋白质连接的聚糖。

## 色谱柱特征

每支色谱柱都通过了有机小分子的 QC 测试，柱盒内附检测报告，其中包含色谱柱的出厂检测色谱图以及数据，请妥善保存。另外，每一批 HALO 90 Å Glycan 填料都经过严格的 QA 测试，分离普鲁卡因胺还原端标记的 2-25 个葡萄糖单元的梯度聚糖，5 和 10 个葡萄糖单元的峰必须满足保留和峰宽的严格限制，才能用于 Glycan 柱。QA 色谱图在检测报告的背面。

该核壳颗粒的表面积 135 m<sup>2</sup>/g，平均孔径为 90 Å。由于实心核的密度大，核壳颗粒会比全孔型颗粒重 30%-50%。因此，单支色谱柱的有效表面积与表面积在 225-300 m<sup>2</sup>/g 的全孔型色谱柱相似。

## 注意事项

- 流向已标注于柱管标签，反向冲洗可用于尝试去除入口堵塞或污染物。
- 新色谱柱保存于 90% 乙腈 10% 水，初次使用需注意溶剂互溶及防止盐析。
- HALO® 90 Å Glycan 色谱柱兼容水及常用有机溶剂。
- 初次使用前建议用低浓度乙腈 (水 > 50%) 平衡。
- HALO® 90 Å Glycan 色谱柱温度上限 65°C，pH 范围 2-9。
- HALO® 90 Å Glycan 色谱柱至少耐压 600 bar (9000 psi)，也有用 1000 bar (14500 psi)。

## 色谱柱维护

为获得最佳柱寿命，需确保样品及流动相中无颗粒物，推荐使用保护柱。当柱压突然高出正常值时，可尝试反冲色谱柱，以去除筛板上的颗粒污染物。为去除强保留污染物，可使用非常强的溶剂清洗色谱柱，如 10/90 甲醇水。个别情况需要使用更强的溶剂，如流动相中 100% 的极性组分，一般是水。

## 色谱柱保存

硅胶基质色谱柱的长时间保存建议使用 100% 乙腈，短期 (3-4 天) 也可保存于常规流动相。然而，当用到缓冲盐的时候，为保护色谱柱和仪器，一定要用等比例不含盐流动相冲洗色谱柱 (比如流动相为 90/10 的乙腈/缓冲盐，则用 90/10 的乙腈/水冲洗)，以防止盐析出或腐蚀，最后再用 100% 乙腈冲洗色谱柱，保存。保存色谱柱之前，需用原厂柱堵头拧紧密封。在 100% 乙腈中保存很长时间后，填料有可能脱水，需要进行补水处理。我们推荐 50% 乙腈水，室温，低流速过夜。

## 安全提示

- 色谱柱仅供实验室使用，不可用于药物、家庭或其他。
- 色谱柱使用者应了解流动相的毒性和可燃性，并采取预防措施，避免接触和泄漏。
- 色谱柱应在通风良好的环境中使用，以降低空气中的挥发溶剂。
- 稳定的保留需要在高极性固定相表面保持稳定的水层，所以建议使用前或平常乙腈浓度 ≥ 90% 时，使用 > 50% 水相的溶剂冲洗色谱柱。

## 色谱柱应用

HILIC 是一种非常有用而且与反相色谱 (RPC) 互补的方法，尤其适用于在 RPC 下化合物保留差、需要高水流动相的样品。HILIC 的保留机理尚不完全清楚，主要是亲水、离子交换和反相作用的结合。HILIC 颗粒表面的亲水层促进了与极性溶质的相互作用，流动相在 HILIC 柱上的保留与 RPC 正好相反，水为强洗脱相，有机溶剂为弱洗脱相。

蛋白 N-连接和 O-连接的聚糖研究中，HILIC 分离方法<sup>1,2</sup>非常有效。蛋白连接的聚糖被多种化学或酶法释放，然后用几种方法从蛋白和反应物中分离出来，常用凝胶过滤、HILIC 或反相固相萃取、或选择性溶剂沉淀。HILIC 的聚糖解决方案可用于天然聚糖，连接 MS 检测器 (负离子)；也可以将发色团或荧光团连接于聚糖的还原端，使用紫外或荧光检测器。还原胺标记经常<sup>3,4</sup>用于 HALO® 90 Å Glycan 的 QA 测试，普鲁卡因胺通过席夫碱反应用于末端醛糖醇标记。普鲁卡因胺可用于 MS (正离子)、荧光 (例如 330 nm/380 nm) 和紫外检测 (300 nm)。

HALO® 90 Å Glycan 分离聚糖一般使用乙腈和甲酸铵水 (50mM, pH 4.4)，洗脱过程中增加水相比例。配置水相时先加入 50mM 甲酸铵溶液，甲酸调节 pH，然后再定容。通常使用 50-60 °C 柱温，继续升高对分离度的影响有限。可以通过柱长、流速、初始梯度、梯度程序时间和最终梯度比例来调节聚糖混合物的分离。更长的色谱柱和梯度时间可以获得最高分离度。2.1 mm 内径色谱柱的推荐流速为 0.2-0.6 ml/min，其他规格可以依此换算。蛋白连接的简单聚糖混合物的测试方法可以参照 QA 测试图，但用于糖化实验的复杂混合物或复杂的糖蛋白样品，则可能需要降低流速、延长洗脱时间、增加色谱柱长度。小的聚糖样品，初始乙腈浓度建议在 80% (20% 水) 或更高；大的聚糖 (20 个以上的葡萄糖单元) 的最终乙腈浓度可能需要低于 60% (水 > 40%)，缓梯度能增加相邻两个峰的分选选择性。

**高水、大体积进样可能导致峰形差，出峰快，甚至在死时间出峰。**

然而，低聚糖在高有机相里溶解度差，跟样品浓度和温度有关 (低温加速沉淀)，合理适中的方法是室温下将样品溶解于 50-65% 乙腈，然后再进样，需要注意的是浓的低聚糖 (任何碳水化合物) 在高于 50% 乙腈溶液中容易沉淀。

## 小体积色谱柱 (快速柱) 使用指南

小体积色谱柱 (柱长更短，内径 < 3 mm) 越来越多用于快速分离，尤其针对一些特殊检测器，如质谱。小体积色谱柱色谱峰的体积肯定比普通 HPLC 色谱柱 (如 4.6 mm x 150 mm) 要小很多，所以小体积色谱柱的分离效果更依赖于 HPLC 仪器是否具有最小的谱带展宽。按以下条件优化仪器，小体积色谱柱即可获得最佳效果：

- 检测器 — 使用小体积流通池 (最好 < 2 µl)。
- 检测器 — 为准确显示从小体积色谱柱快速洗脱出来的色谱峰，检测器响应时间应设置到最快水平 (~ 0.1 秒)，以允许软件在最窄峰上采集到至少 20 个点。
- 进样器 — 进样系统应采用小体积设计 (如 Rheodyne 8125)。普通液相的自动进样器经常会导致小体积色谱柱谱带展宽、柱效降低，但可能为了通用性和使用方便。
- 管路 — 应使用尽可能短的窄径管路 (最粗 0.005 英寸, 0.12 mm ID)，将色谱柱连接到进样器和检测器。管路必须切割平整，必要时使用零死体积连接件。
- 保留时间 — 随着保留时间的增加，峰体积也增加，仪器对谱带展宽的影响降低。
- 样品溶剂 — 等度条件下，样品应溶解在流动相或比流动相更弱 (极性更弱) 的溶剂中；梯度条件下，则应溶解在初始流动相或明显弱于梯度最高点的溶剂中。
- 进样体积 — 等度条件下，进样体积应尽可能小 (< 2 µl)，样品溶剂比流动相更弱。梯度条件下，进样体积不是很关键，特别是样品溶解于弱溶剂的时候。

参考文献：

1. Anamula, K.R. and Dhume, S.T. (1998) *Glycobiol.* 8, 685-694.
2. Wada, et al., (2007) *Glycobiol.* 17, 411-422.
3. Harvey, D.J. (2011) *J. Chromatogr. B* 879, 1196-1225.
4. Klapoetke, S., Zhang, J., Becht, S., Gu, X., and Ding, X. (2010) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53, 315-324.
5. *Practical HPLC Method Development*, Second Edition, L.R. Snyder, J.L. Glajch, and J.J. Kirkland, (John Wiley & Sons, 1997), Chapters 6, 7, 8, and 11.

HALO® and Fused-Core® are registered trademarks of  
Advanced Materials Technology, Inc.

