



TSK-GEL SW色谱柱使用中的注意事项 常见问题及故障排除



内容概要

- TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱分类
 - TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数
 - 硅胶基质尺寸排阻色谱柱使用前注意事项
 - 硅胶基质尺寸排阻色谱柱柱效测定模板
 - 样品溶液的配置
 - 保护柱的作用
 - 硅胶基质尺寸排阻色谱柱的清洗
 - 硅胶基质尺寸排阻色谱柱的保存
 - 硅胶基质尺寸排阻色谱柱的故障排除
-



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱分类

- **SW系列色谱柱：** 粒径**10um**（2000/3000）
粒径 **13um**（4000）
 - **SWXL系列色谱柱：** 粒径**5um**（2000/3000）
粒径 **8um**（4000）
 - **SuperSW系列色谱柱：** 粒径**4um**（2000/3000）
 - 用于**mAb**分离的**SW**色谱柱： 粒径**4um**（HR/HTP）
粒径**3um**（Ultra SW Aggregate）
 - **UP-SW3000**： 粒径**2 um**（HPLC &UHPLC）
-



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

SW系列 (7.5mm 内径)

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂比例%
G2000SW	30	2	1.2	0.5-1.0	100
	60	4			
G3000SW	30	2.5			
	60	5			
G4000SW	30	1.5			
	60	3			



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

SW系列 (21.5mm 内径)

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂比例%
G2000SW	30	1	8	3.0-6.0	100
	60	2			
G3000SW	30	1.5			
	60	3			
G4000SW	30	1			
	60	2			



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

SW系列 (玻璃柱)

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂比例%
G2000SW 8mm 内径	30	2	0.8	0.4-0.8	100
G3000SW 8mm 内径	30	2	0.8	0.4-0.8	
G3000SW 20mm 内径	30	0.8	8.0	4.0-6.0	
G4000SW 8mm 内径	30	2	0.8	0.4-0.8	



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

SW_{XL}系列 (7.5mm 内径)

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂比例%
G2000SW _{XL}	30	7	1.2	0.5-1.0	100
G3000SW _{XL}	30	7			
G4000SW _{XL}	30	3.5			



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

Super SW 系列

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂比例%
Super SW2000 4.6mm内径	30	12	0.4	0.1-0.35	100
Super SW3000 4.6mm内径					
Super SW3000 2.0mm内径	30	12	0.075	0.065	100
Super SW3000 1.0mm内径			0.020	0.016	



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

用于mAb 分离的SW系列

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂 比例%
SuperSW mAb HR (7.8mm内径)	30	12	1	0.5-1.0	20
SuperSW mAb HTP (4.6mm内径)	15	8	0.5	0.1-0.35	
Ultra SW Aggregate (7.8mm内径)	30	12	1	0.5-1.0	



TOSOH硅胶基质尺寸排阻色谱柱的关键参数

UP-SW系列

名称	柱长 (cm)	最大耐压 (MPa)	最大流速 (mL/min)	建议流速 (mL/min)	极性有机溶剂比例%
UP-SW3000 (4.6mm)	15	25	0.5	0.1-0.35	30
	30	34	0.35	0.1-0.35	



硅胶基质尺寸排阻色谱柱使用前注意事项

- 请先确认整个色谱系统是否正常，（可以通过1ml/min的流速下，系统压力值进行判定）
 - 系统确认良好的状态下，先将系统中的有机相置换成纯水相后再进行SW系列色谱柱的柱效评估
 - 流动相现配现用，配好后使用0.45um的水相滤膜过滤后再超声脱气。
 - 参考OCS数据中的压力范围设置限压保护，G2000SWXL/G3000SWXL/G4000SWXL的耐受压力是7MPa，所以要在仪器上设定限压保护7MPa+系统压力值，
 - 初次拿到柱子后，参照柱盒中的Inspection data的方法评估柱效后再使用
 - 当天使用完成后，如果流动相PH在2.5-7.5之间，可以挂在系统上明日再用
 - 当天使用完成后如果隔几日再用最好使用加入NaN₃到流动相中，浓度为0.05%
-



硅胶基质尺寸排阻色谱柱柱效测定模板



柱效测定模板-1.p
df



样品溶液的配置

- 请先确认样品是溶液的状态（澄清，透明）
 - 如果是液态样品，0.45um 或者0.22um的滤膜过滤后才能进样
滤膜的选择根据样品溶解性
 - 如果样品的溶剂与流动相不同，要先用流动相稀释样品，检查样品在流动相状态下是否会沉淀或者变性
 - 如果样品是固体状态，尽量考虑使用流动相溶解样品，样品过滤后再进样分析。
 - 如果样品是非溶液状态，就必须通过适当的前处理技术（溶剂萃取，柱预处理等等），使目标组分充分溶解在溶剂中。
-



保护柱的作用

- 防止分析柱被一些微粒物质堵塞。
 - 在色谱柱上强吸附组分在色谱柱上吸附。
 - 防止突然高流速下分析柱柱床塌陷。
-



硅胶基质尺寸排阻色谱柱的清洗 (7.8mmX30cm)

- 100%纯水以0.2mL/min的流速冲洗1.5小时.
- 如果是疏水性吸附, 以20%或更多比例乙腈的(或其他极性有机溶剂)水溶液为流动相(用0.45um的有机相滤膜过滤), 采用0.2mL/min的流速冲洗1.5小时.
- 100%纯水以0.2mL/min的流速冲洗1.5小时.
- 如果是离子性物质的吸附, 以0.1mol/LPB (0.05mol/LNaH₂PO₄+0.05mol/LNa₂HPO₄) 缓冲液+0.1mol/LNa₂SO₄或更高盐浓度溶液为流动相(用0.45um的水相滤膜过滤), 采用0.2mL/min的流速冲洗1.5小时后, 再以0.01g/LPABA(对氨基苯甲酸)为标准品, 进样量为20uL, 在UV280nm下, 以0.1mol/LPB (0.05mol/LNaH₂PO₄+0.05mol/LNa₂HPO₄) +0.1mol/LNa₂SO₄缓冲液为流动相检测柱效,。
- 如果是碱性物质的吸附, 以0.05mol/L的磷酸二氢钠溶液(用磷酸调整pH2.5)为流动相(用0.45um的水相滤膜过滤), 采用0.2mL/min的流速冲洗1.5小时。



硅胶基质尺寸排阻色谱柱的清洗 (7.8mmX30cm)

- 如果上述处理后仍未能解决问题可能是氢键的吸附，在淋洗液中添加6-8mol/L的尿素或者0.2%-0.3%的中性界面活性剂（Triton、Tween）（用0.45um的水相滤膜过滤）后以0.2mL/min的流速冲洗1.5小时。但需要注意尿素和表面活性剂会在柱中残留。一般不建议此项操作。
- 冲洗完成后，使用0.1mol/LPB（0.05mol/LNaH₂PO₄+0.05mol/LNa₂HPO₄+0.1mol/LNa₂SO₄）缓冲液为流动相（0.45um水相滤膜过滤），0.01g/LPABA(对氨基苯甲酸)为标准品，进样量为20uL, 在280nm检测柱效。
- 对于60cm的柱子，相应的清洗时间延长1倍就可以了。



硅胶基质尺寸排阻色谱柱的保存

- 短期保存（2-3天后还要使用）

在使用的流动相条件下，拧好堵头后，常温保存

- 长期保存（超过3天以上不用）

为了防止生菌和腐蚀，使用含有0.05%叠氮化钠的水溶液或者缓冲液保存柱子。置换时建议在使用流速一半以下进行。堵好堵头后常温保存。



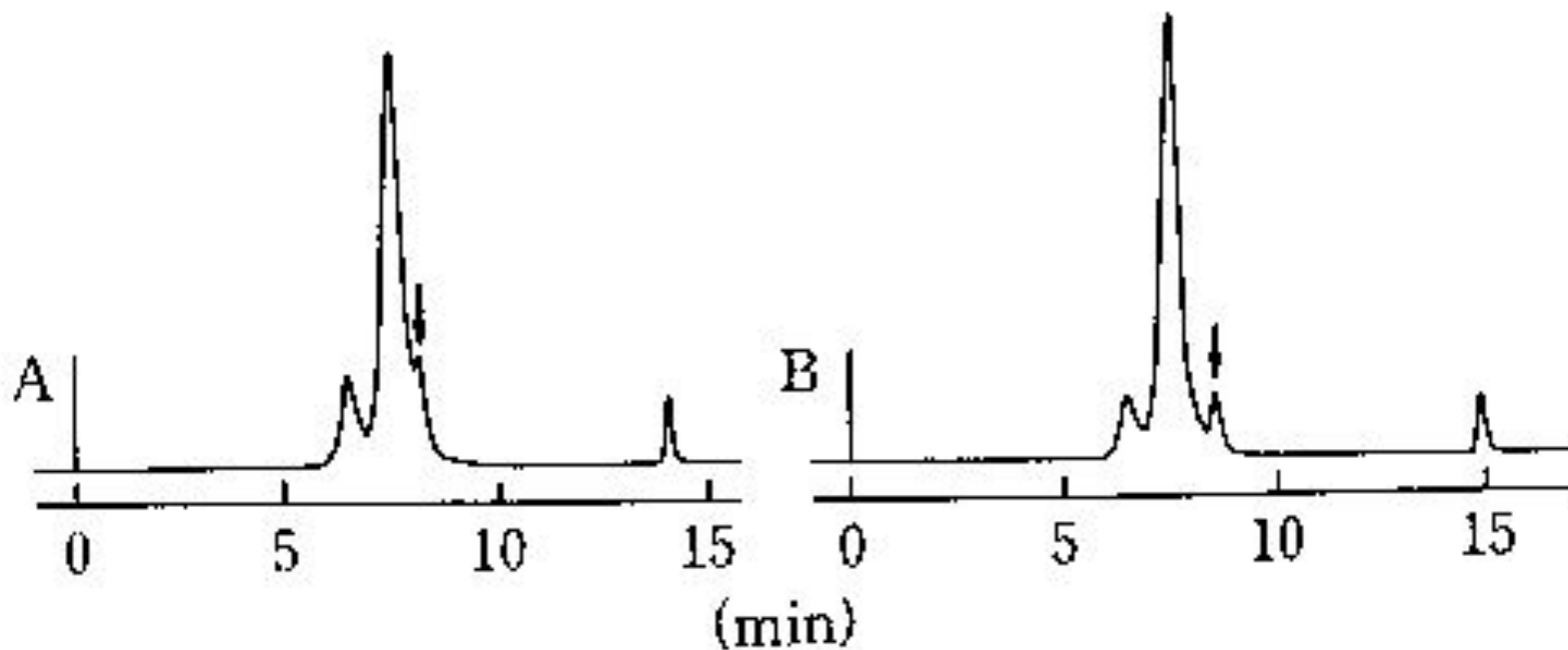
硅胶基质尺寸排阻色谱柱的故障排除

问题	原因和解决办法
1 样品吸附太强难以被洗脱	1 样品与色谱柱填料上的硅羟基发生离子性相互作用。 (a) 将缓冲液中的离子强度增加至 0.3mol (如;含有 0.3 M NaCl的 50 mM 磷酸钠缓冲液 ,pH 6.8) (b) 将pH值减少到5.5左右 (如;含有 0.1 M Na2SO4的 50 mM 磷酸钠缓冲液 ,pH 5.5)
	2 分子量大于 300K 的蛋白质（或多聚体及二聚体）有可能发生特异性吸附。 (a) 在实际分析之前先进样数次（总共上样约1mg左右。） 这种现象会发生在第一次使用新柱子时。
	3 疏水分子（如多肽）与色谱柱填料之间发生疏水相互作用。 (a) 在流动相中添加一些有机溶剂，如：乙腈 (低于 50 %) (如;含有 40%乙腈的 50 mM 磷酸钠缓冲液 ,pH 6.8)
2 样品的洗脱越来越迟缓	1 在劣化的色谱柱填料上发生了离子相互作用。 (a)将缓冲液中的离子强度增加至 0.5 (0.5 M NaCl), 或降低缓冲液的pH值。 完全恢复色谱柱的功能是不可能的。使用pH值小于7的缓冲液。
	2 发生疏水性吸附的杂质造成色谱柱堵塞。 (a) 参照操作手册添加有机溶剂清洗色谱柱 (b) 安装保护柱并适时更换



SEC分离中的改进的分辨率

流动相的影响 (pH)



Conditions

Column: TSKgel G3000SW_{XL} (7.8 mm I.D. x 30 cm)

Eluent: A; 0.3 mol/L NaCl in 50 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 6.7

B; 0.1 mol/L Na₂SO₄ in 50 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 5.0

Flow rate: 1.0 mL/min Temperature: 25 C Detection: UV (280nm)

* Allows indicate albumin peaks



FAQ:分子尺寸排阻色谱 (生物分子)

问题	回答
我在使用 TSKgel G3000SWXL 色谱柱时，发现柱头处的柱床有空隙。我该如何修复？	参考操作说明使用 Top-off gel 来充填。 空隙不大时可以通过这个方法来解决。
使用 TSK-GEL SW(XL) 色谱柱来分离水溶性蛋白质时的典型流动相是什么？	含有 0.3 M NaCl 的 50mM 的磷酸缓冲液 (pH 6.8)。
使用 TSKgel G3000SWXL 来分离膜蛋白时，可以使用什么条件？	通常，可以使用含有 0.2mol/L NaCl 的 50 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.0)， 20% 丙三醇 和去垢剂 (e.g. 0.2% Triton X-100)。 图谱会因为使用去垢剂的种类和浓度不同而发生变化。 参考我们的 Separation Report No. 50。
我在使用 TSKgel G3000SWXL 时，流动相中加入了去垢剂。我是否需要换成不含去垢剂的流动相？	只有在专用色谱柱时才推荐流动相中有去垢剂。去垢剂很难被彻底除去， 即使清洗色谱柱。
使用 TSKgel G3000SWXL 时能否使用含有 guanidine-HCl 或尿素之类变性剂的流动相？	可以使用含有 6 M guanidine-HCl 或 8 M urea 的流动相。 但是，在使用前需要先过滤除去流动相中的不溶物，或安装过滤头。 由于变性剂会使流动相的粘度升高，从而使柱压升高，因此分离分析时的流速需要控制地低一些。此色谱柱需要用作使用变性剂的专用柱。
TSKgel G-Oligo-PW 一般用于分离什么样品？	中性低聚糖或者非离子型的合成低聚物。 对于离子型低聚物和水溶性聚合物，可以使用 TSKgel G6000PWXL, G5000PWXL, G4000PWXL, G3000PWXL 或 G2500PWXL 色谱柱。