

水性尺寸排阻色谱柱简介： TSKgel PW_{XL} 系列

目录

1. 简介	1
2. TSKgel PW _{XL} 色谱柱的特点	1
3. TSKgel PW _{XL} 色谱柱的基本特性	5
3-1 流速对理论塔板数的影响	5
3-2 离子特性	5
3-3 疏水性	6
3-4 对温度的稳定性	7
3-5 溶剂互溶性	8
4. 色谱柱的选择	10
4-1 在 PW 型与 SW 型之间选择色谱柱	10
4-2 在 PW 型色谱柱之间的选择色谱柱	14
5. TSKgel PW 型色谱柱产品线	14
6. 总结	16
6-1. 流动相条件	16
6-2. 色谱柱的保养	16



TOSOH BIOSCIENCE

TOSOH

1. 简介

当色谱技术应用于高效凝胶渗透色谱(通常称为 GFC, 水性尺寸排阻色谱或水性凝胶渗透色谱)时, 色谱技术取得了惊人的进展。关于这方面的一些优秀的综述¹⁻⁷也已出版。

TSKgel PW 型色谱柱无疑已经成为这个领域的主流产品之一。许多研究者发表了众多有关 TSKgel PW 型色谱柱聚合物表征⁸⁻¹³和应用的论文。这些重要应用的典范包括生物聚合物, 如多糖^{8,11,13-19}, 核酸^{20,21}, 大分子蛋白质^{14,22-31}, 多肽^{32,33}, 合成的水溶性聚合物^{8,13,14,34-37}, 以及低聚物^{2,13,38-44}。

新型 TSKgel PW 系列色谱柱, 包括 6 种 TSKgel PW_{XL} 色谱柱以及 2 种专用色谱柱 (TSKgel G-Oligo-PW 和 TSKgel G-DNA-PW) 已经投放市场, 大大提高了色谱分离度并减少分析时间。此外, 还增加了两种新的色谱柱规格, 以扩大 TSKgel PW 型产品线的应用范围。与传统色谱柱进行对比, 新系列色谱柱的主要特性及其改进总结如下:

(1) 更高的分离能力

TSKgel PW_{XL} 系列色谱柱的理论塔板数(单位色谱柱长度)几乎为传统色谱柱的两倍。因此, TSKgel PW_{XL} 系列色谱柱的分离能力约为等长的传统色谱柱的 1.4 倍。与传统色谱柱(60cm)相比, 使用 TSKgel PW_{XL} 系列色谱柱(30cm)可以缩短达 50% 的分析时间且不降低分离度。

(2) TSKgel GMPW_{XL} 色谱柱简介

TSKgel GMPW_{XL} 是一条新的色谱柱产品线, 在分子量为 5×10^2 至大于 1×10^7 的宽广范围内, 其校准曲线具有良好的线性。

(3) TSKgel G2500PW_{XL} 色谱柱简介

传统的 TSKgel PW 型色谱的一个缺点是具有小孔径等级 (TSKgel G1000PW 和 G2000PW) 和大孔径等级 (TSKgel G3000PW~G6000PW) 之间化学性质的差异。TSKgel G1000PW 和 G2000PW 色谱柱含有较多的离子基团(阳离子基与阴离子基均有), 而 TSKgel G3000PW~G6000PW 色谱柱则仅含有少量的弱阴离子基团。因此, 我们不建议将 TSKgel G2000PW 或 TSKgel G1000PW 与大孔径等级色谱柱联合使用。为改善这种情况, 我们在传统色谱柱与新型 PW_{XL} 系列色谱柱中均引入了 TSKgel G2500PW 规格的色谱柱。

TSKgel G2500PW 规格色谱柱几乎与大孔径规格色谱柱具有相同的化学性质, 并且可以与大孔径色

谱柱结合使用。另外, TSKgel G2500PW 色谱柱与 TSKgel G2000PW 色谱柱具有几乎相同的校准曲线。但应当指出的是, TSKgel G2500PW 色谱柱对小分子的分离在一定程度上不如 TSKgel G2000PW。

(4) TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱简介

为进一步改善对低聚物的分离度, 引入 TSKgel G-Oligo-PW 作为一种专用于非离子和阳离子低聚物(如寡糖、聚乙二醇等)分离的色谱柱。TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱的填料含有的阳离子与 TSKgel G2000PW 色谱柱的填料相同。因此, 不建议将 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱用于阴离子聚合物的分析。

(5) TSKgel G-DNA-PW 色谱柱简介

TSKgel G-DNA-PW 是一种新型的色谱柱, 专用于大分子核酸的分离(如含有 500~5000 碱基对的 DNA 片段)。TSKgel G-DNA-PW 色谱柱的特点是同时具有特大孔径(约 4000Å)和小粒径(10μm), 在 2~4 小时内几乎可以完全分离大小不一的大分子 DNA 片段, 且其分离度超过 2。

在本分离报告中, 将对新型 TSKgel PW 系列色谱柱的基本特征和性质进行说明, 并附有如何选择适合色谱柱的简要说明。对下列信息作详细说明: (1) 在新型 TSKgel PW_{XL} 色谱柱上分离水溶性低聚物; (2) 在新型 TSKgel PW_{XL} 色谱柱上分离水溶性多聚物; (3) 在 TSKgel G-DNA-PW 色谱柱上分离大的 DNA 片段。

2. TSKgel PW_{XL} 色谱柱的特性

表 1 列出了新系列色谱柱, 包括 6 种 TSKgel PW_{XL} 规格色谱柱, 1 种 TSKgel G-Oligo-PW 规格色谱柱和 1 种 TSKgel G-DNA-PW 规格色谱柱。表 1 也列出了由标准聚合物(聚环氧乙烷、葡聚糖和蛋白质)测得的排阻极限和使用 RI 检测器测量得到的每种色谱柱保证的理论塔板数。

表 2 表示 TSKgel PW_{XL} 系列色谱柱对 PEG 和 PEO 标准品的分离范围。

所有色谱柱具有相同的尺寸, 内径为 7.8mm, 长度为 30cm。

与相应的传统 TSKgel PW 色谱柱相比, 由于 TSKgel PW_{XL} 色谱柱粒径更小, 单位长度保证的理论塔板数提高了 2.8 倍, 如表 3 所示。

表 1 新型 TSKgel PW 系列色谱柱的特性

色谱柱	粒径 (μm)	最小理论塔板数 ¹ (理论塔板数/色谱柱)	排阻极限 ²			色谱柱尺寸 mm 内径×cm
			聚环氧乙烷 (PEO)	葡聚糖	蛋白质	
TSKgel G2500PW _{XL}	6	14,000	5×10 ³			7.8×30
TSKgel G3000PW _{XL}	6	14,000	8×10 ⁴	2×10 ⁵	8×10 ⁵	
TSKgel G4000PW _{XL}	10	10,000	4×10 ⁵	1×10 ⁶	(>4×10 ⁶)	
TSKgel G5000PW _{XL}	10	10,000	1×10 ⁶	(>2.5×10 ⁶)	(>1×10 ⁷)	
TSKgel G6000PW _{XL}	13	7,000	(2×10 ⁷)	(>5×10 ⁷)	(>2×10 ⁸)	
TSKgel GMPW _{XL}	13	7,000	(2×10 ⁷)	(>5×10 ⁷)	(>2×10 ⁸)	
TSKgel G-Oligo-PW	6	14,000	5×10 ³			7.8×30
TSKgel G-DNA-PW	10	10,000	2×10 ⁷			

¹ 理论塔板数的测量条件:

流动相: 蒸馏水

流速: 1.0mL/min

样品: 1% 乙二醇, 20μL

² 括号内的值为估算值。

表 2 新型 TSKgel PW 色谱柱对 PEG 和 PEO 标准品的分离范围

色谱柱	分离范围 (道尔顿)
TSKgel G2500PW _{XL}	< 3,000
TSKgel G3000PW _{XL}	< 40,000
TSKgel G4000PW _{XL}	2,000 - 300,000
TSKgel G5000PW _{XL}	4,000 - 800,000
TSKgel G6000PW _{XL}	40,000 - 8,000,000
TSKgel GMPW _{XL}	1,000 - 8,000,000
TSKgel G-Oligo-PW	< 3,000
TSKgel G-DNA-PW	40,000 - 8,000,000

表 3 TSKgel PW 系列色谱柱与 PW_{XL} 系列色谱柱最小理论塔板数的比较

等级	TSKgel PW 系列		TSKgel PW _{XL} 系列
	7.5mm ID × 60cm	7.5mm ID × 30cm	7.8mm ID × 30cm
TSKgel G2500PW	10,000	5,000	14,000
TSKgel G3000PW	10,000	5,000	14,000
TSKgel G4000PW	6,000	3,000	10,000
TSKgel G5000PW	6,000	3,000	10,000
TSKgel G6000PW	6,000	3,000	7,000
TSKgel GMPW	6,000	3,000	7,000

图 1 至图 3 表示用 PEG、PEO、葡聚糖和蛋白质标准品测量得到的 TSKgel PW_{XL} 色谱柱的校准曲线。

图 4 表示用聚乙二醇标准器测量得到的 TSKgel G-Oligo-PW (实线) 色谱柱和 TSKgel G2500PW_{XL} (虚线) 色谱柱的校准曲线。TSKgel G-DNA-PW 色谱柱测量双链 DNA 片段的校准曲线在别的文献中已经作了表述⁴²。

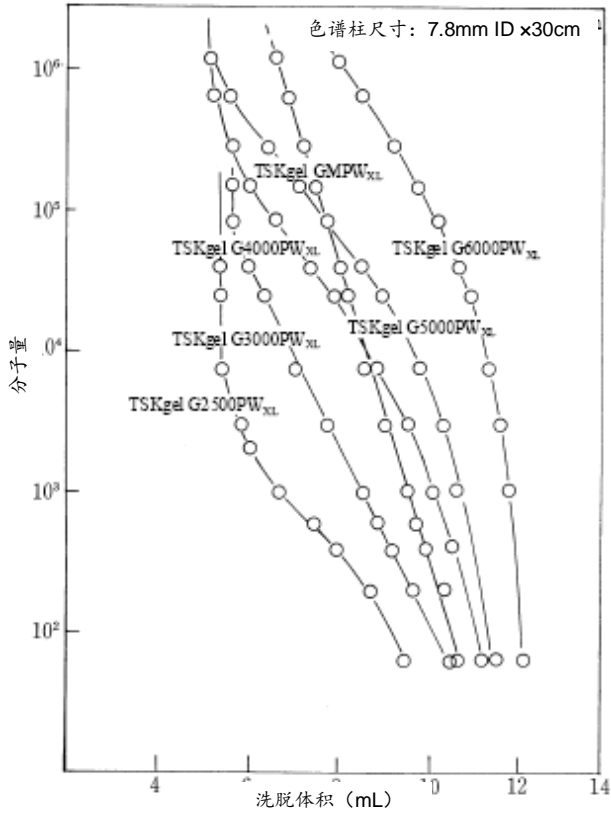


图 1. TSKgel PW_{XL} 分析 PEG 和 PEO 标准品的校准曲线。

样品: PEG 和 PEO 标准品
流动相: 蒸馏水
流速: 1.0mL/min

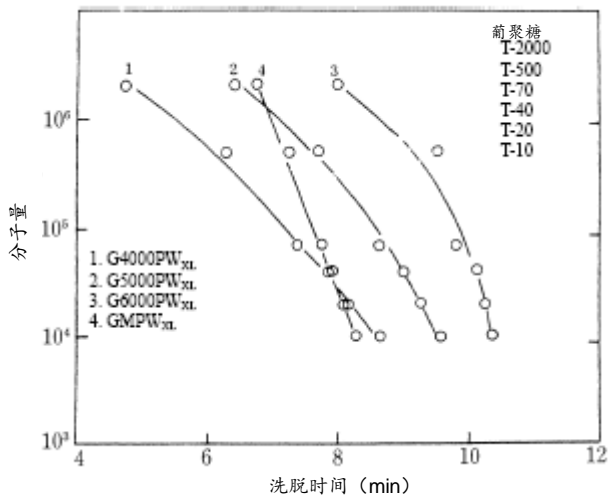


图 2. TSKgel PW_{XL} 分析葡聚糖标准品的校准曲线

洗脱液: 0.2M 磷酸缓冲液 (pH6.8)
流速: 1.0mL/min

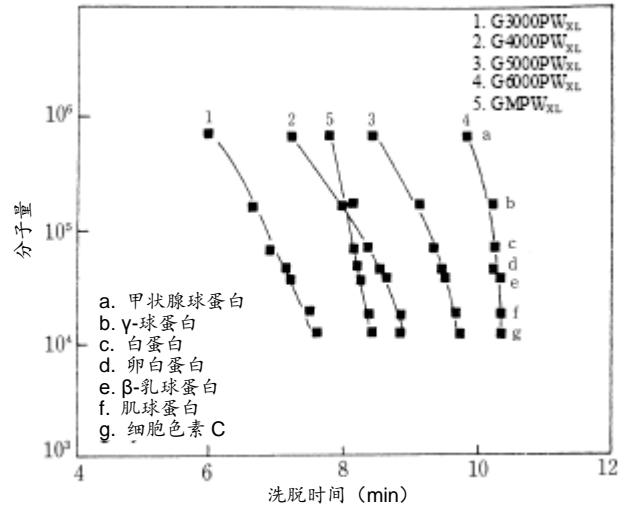


图 3. TSKgel PW_{XL} 色谱柱蛋白质校准曲线

流动相: 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8)
流速: 1.0mL/min

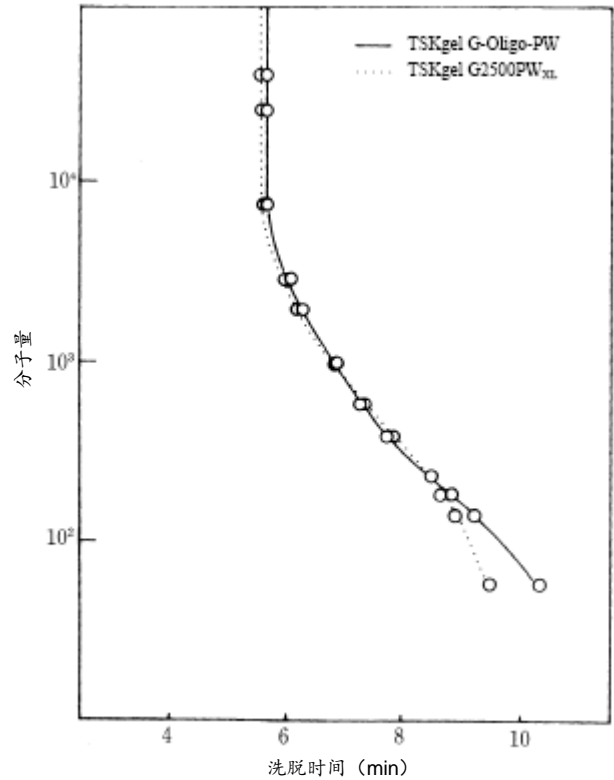


图 4. TSKgel G-Oligo-PW 和 TSKgel G2500PW_{XL} 色谱柱校准曲线

色谱柱尺寸: 7.8mm ID x30cm
样品: PEG 和 PEO 标准品
流动相: 蒸馏水
流速: 1.0mL/min

3. TSKgel PW_{XL} 色谱柱的基本特性

3-1. 流速对理论塔板数的影响

流速对理论塔板数的影响依赖于填料的粒径、样品分子大小、粘度和流动相的温度等因素。例如，图 5 表示在 TSKgel G2500PW_{XL} (6 μ m, TSKgel PW_{XL} 系列色谱柱中粒径最小的填料) 上测量乙二醇 (一种典型的小分子) 时理论塔板数随流速的影响情况与在 TSKgel G6000PW_{XL} (13 μ m, TSKgel PW_{XL} 系列色谱柱中填料粒径最大) 上测量 PEO 标准品 (一种常见的大分子) 时理论塔板数随流速的影响的比较。测量小分子量化合物时，填料粒径为 6 μ m 的色谱柱上理论塔板数几乎是恒定的；而测量 25,000 道尔顿的聚合物时，填料粒径为 13 μ m 色谱柱上的理论塔板数则随流速的增大而大大降低。

因此，我们建议对于大孔径填料的色谱柱，在测量大分子时，应当采用较低的流速。

3-2. 离子特性

TSKgel PW_{XL} 凝胶用 0.1N NaOH 滴定的滴定曲线表示在图 6 中。所有 TSKgel PW_{XL} 等级的色谱柱均含有少量的弱离子基团。当使用具有弱离子强度的流动相时，阴离子样品由于离子排斥作用受到排阻。结果，根据分子大小，阴离子样品的出峰时间比预期的要早。而阳离子样品由于离子的吸附作用而得以保留，出峰时间比理论预测的要晚。通常使用离子强度大于 0.1mol/L 的洗脱液以消除这种离子相互作用。

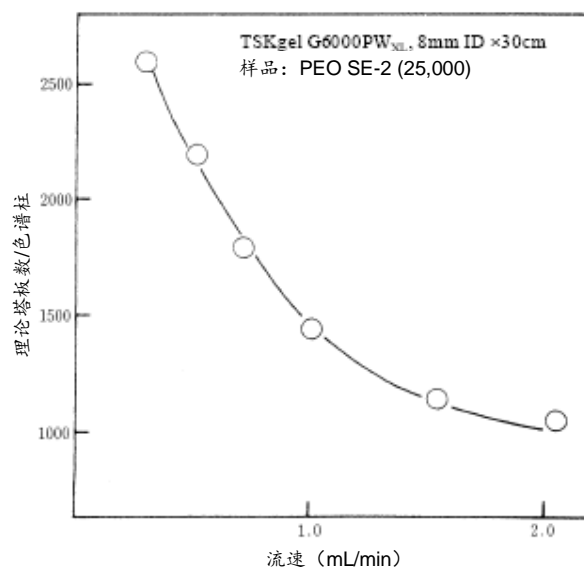
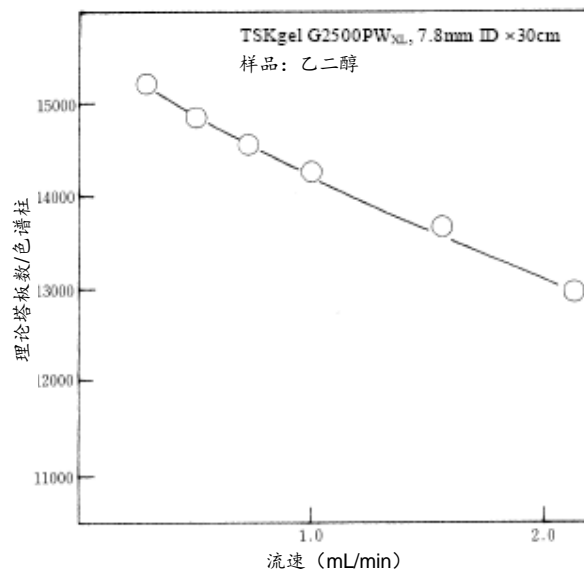


图 5. TSKgel G2500PW_{XL} 和 G6000PW_{XL} 色谱柱以流速表示的柱效

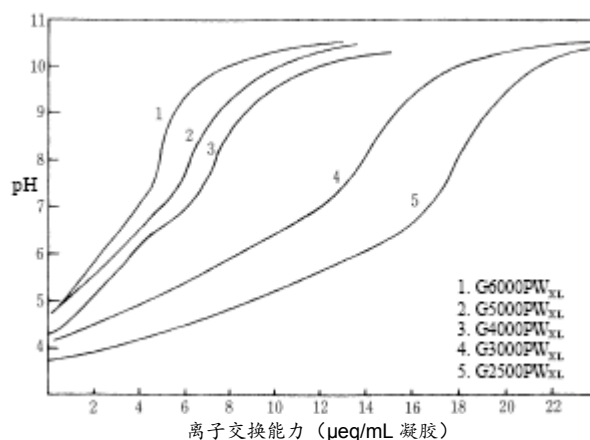


图 6. TSKgel PW_{XL} 凝胶的滴定曲线

图7表示 TSKgel G2000PW 和 G2500PW 填料的滴定曲线。从图中清楚地看到，TSKgel G2500PW 的离子交换容量小得多。TSKgel G-Oligo-PW 填料的滴定曲线与 TSKgel G2000PW 填料的滴定曲线十分相似。

图8表示在 TSKgel G2500PW_{XL} 和 G-Oligo-PW 色谱柱上 NaCl 浓度对单磷酸腺苷（一种常见的阴离子样品）洗脱体积的影响。很明显，单磷酸腺苷随着 NaCl 浓度的降低发生很强烈的保留作用。

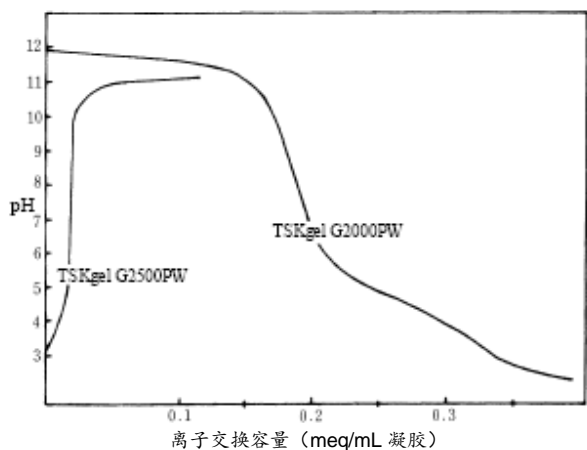


图7. TSKgel G2500PW 和 G2000PW 色谱柱凝胶滴定曲线的比较

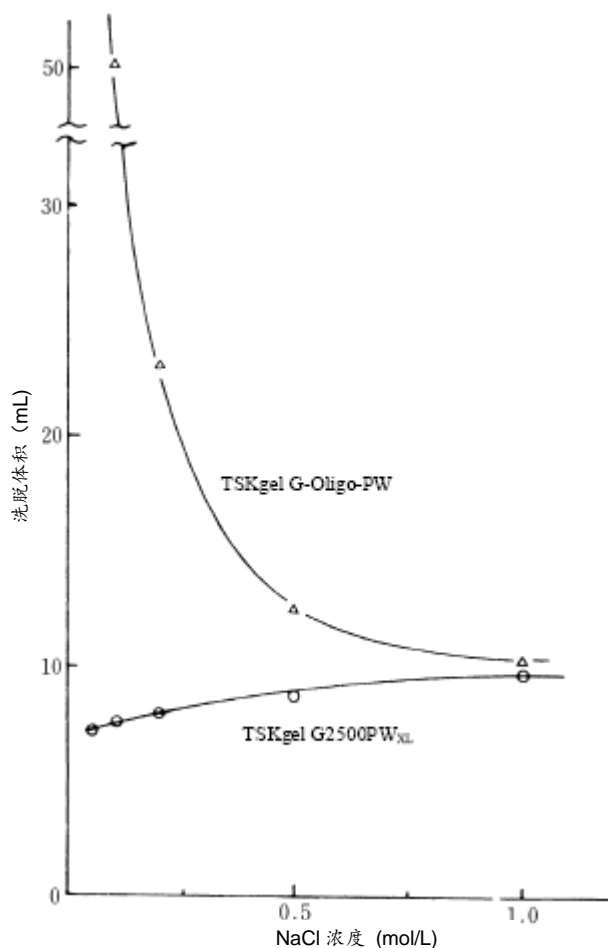


图8. 单磷酸腺苷的保留作用与盐浓度的函数关系
 色谱柱尺寸: 7.8mm ID ×30cm
 样品: 单磷酸腺苷
 洗脱液: 0.02mol/L 磷酸缓冲液(pH6.8)
 +0.05mol/L-1.0mol/L NaCl

3-3. 疏水性

TSKgel PW 型和 PW_{XL} 型凝胶比含有交联葡聚糖的多糖凝胶具有更强的疏水性。表 4 列出了几种样品在 TSKgel PW_{XL} 色谱柱上的容量因子。正如预期的一样，烷基链越长，疏水作用越强。同样，疏水作用随着盐浓度的增大而增大，而当流动相中加入有机溶剂时，疏水作用反而减小。氯化钠浓度对洗脱体积的影响见图 9。图 10 表示洗脱液浓度对 β-苯乙醇、腺嘌呤、腺苷以及色氨酸的影响。本实验中所使用的分析物一般都是常见的小分子水溶性化合物，它们与 TSKgel PW 凝胶产生强烈的作用。从图 10 中可以清楚看到，乙腈浓度为 50% 时，溶质几乎在正常的位置出峰。

通过升高色谱柱温度也可以减弱疏水作用，如图 11 所示。图 11 表示温度对 β-苯乙醇容量因子的影响程度。乙腈浓度 (0、10% 和 30%) 产生的效应也示于同一图中。

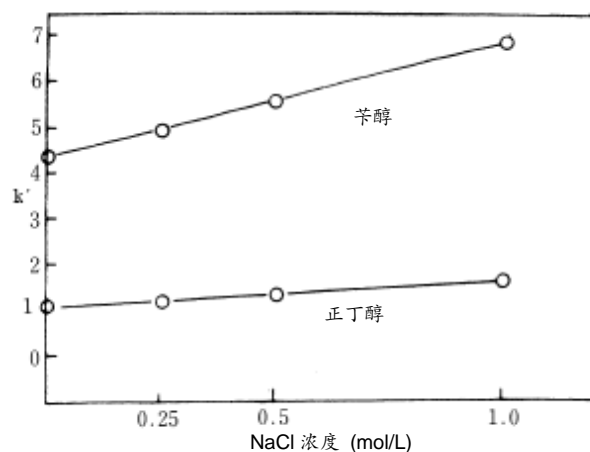


图 9. 辛醇和正丁醇的保留作用与 NaCl 浓度的函数关系

色谱柱: TSKgel G2500PW_{XL}, 7.8mm ID x 30cm

样品: (1) 辛醇
(2) 正丁醇

流速: 1.0mL/min

表 4 脂肪醇的容量因子

色谱柱	乙醇	异丙醇	正丁醇	β-苯乙醇
TSKgel G2500PW _{XL}	0.16	0.45	0.93	5.53
TSKgel G3000PW _{XL}	0.14	0.35	0.82	5.20
TSKgel G4000PW _{XL}	0.09	0.22	0.49	2.84
TSKgel G5000PW _{XL}	0.07	0.19	0.44	2.84
TSKgel G6000PW _{XL}	0.05	0.15	0.37	2.55

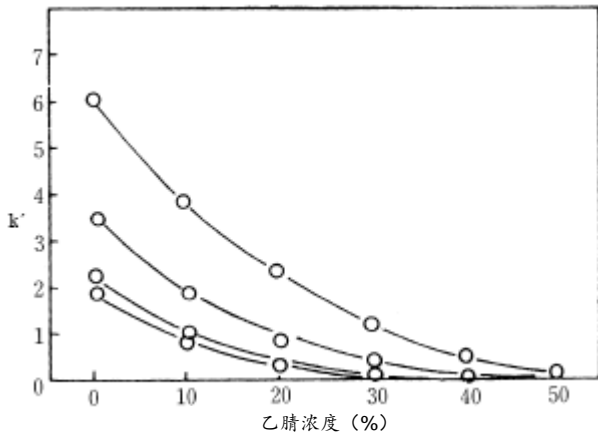


图 10. 乙腈浓度对 β -苯乙醇、腺嘌呤、腺苷和色氨酸容量因子的影响

色谱柱: TSKgel G2500PW_{XL}, 7.8mm ID x 30cm

- 样品:
- (a) β -苯乙醇
 - (b) 腺嘌呤
 - (c) 腺苷
 - (d) 色氨酸

流速: 1.0mL/min

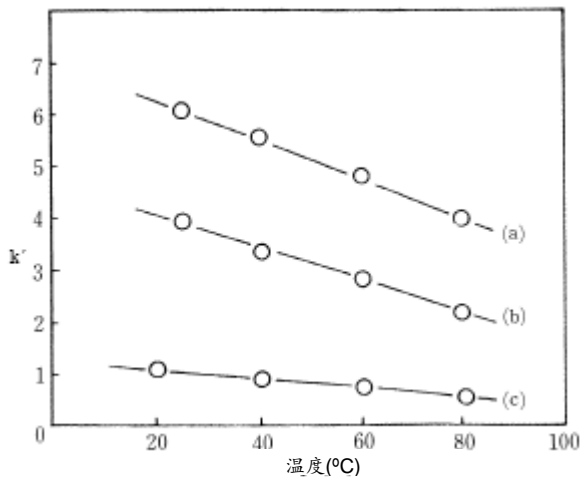


图 11. 温度对 β -苯乙醇容量因子的影响

色谱柱: TSKgel G2500PW_{XL}, 7.8mm ID x 30cm

样品: β -苯乙醇

- 洗脱液:
- (a) 水
 - (b) 10%的乙腈水溶液
 - (c) 30%的乙腈水溶液

流速: 1.0mL/min

3-4. 对温度的稳定性

TSKgel PW 凝胶在中性的水溶液中具有热稳定性, 且可以在 120°C 下高压加热。在常见的中性的水溶液中, 色谱柱可以在高达 80°C 的温度下使用。高 pH 或低 pH 的流动相不应在高温下使用。

图 12 表示在 60°C 的温度下测试 TSKgel GMPW_{XL}、TSKgel G2500PW_{XL} 和 TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱稳定性的实验。在三个月的时间, 理论塔板数和压降并未改变。

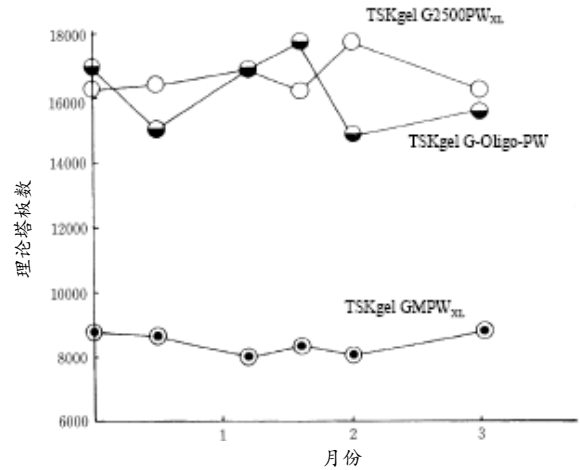


图 12. 60°C 下色谱柱寿命测试实例

色谱柱尺寸: 7.8mm ID x 30cm

样品: 乙二醇

处理条件:

流速: 1.2mL/min.

温度: 60°C

测定条件:

流速: 1.0mL/min

温度: 25°C

3-5. 溶剂互溶性

1) 有机溶剂

水溶性有机溶剂常用作改性剂，以削弱样品组份与 TSKgel PW_{XL} 色谱柱之间的疏水作用。一些常用的实例列于表 5 中。

所有 TSKgel PW 和 TSKgel PW_{XL} 型色谱柱(除 TSKgel G-DNA-PW 外)，都能与含有 20% 水溶性有机溶剂的流动相一起使用，如甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、甲酸、乙酸、二甲基甲酰胺、二甲亚砜、丙酮等。

表 5 有机溶剂用作改性剂的典型实例

编号	样品	TSKgel 色谱柱	洗脱液	参考文献
1	多肽	G3000PW	0.1% TFA (含 36-45%CH ₃ CN)	32, 33
2	聚乙烯吡咯烷酮	G5000PW + G3000PW	0.1mol/L 醋酸钠溶液 (含 20% CH ₃ CN)	14
3	聚苯乙烯磺酸酯	G6000PW + G3000PW	0.2mol/L 磷酸缓冲液 (含 10% CH ₃ CN)	14
4	聚二甲基氨基乙基丙烯酸酯	G6000PW + G3000PW	0.5mol/L 醋酸钠 (含 0.5mol/L 醋酸)	14
5	聚乙撑亚胺	G6000PW + G3000PW	0.5mol/L 醋酸钠 (含 0.5mol/L 醋酸)	14
6	壳聚糖	G6000PW + G3000PW	0.5mol/L 醋酸钠 (含 0.5mol/L 醋酸)	14
7	乙二醇壳聚糖	G5000PW + G3000PW	0.3mol/L 醋酸钠 (含 0.5mol/L 醋酸)	14
8	聚(4-乙烯基苜基三甲基氯化铵)	G5000PW + G3000PW	0.1mol/L 硫酸钠 (含 1~5%醋酸)	35
9	纤维素磷酸酯与 N-乙烯基-2-吡咯烷酮的反应产物	G4000PW + G3000PW	0.3%醋酸 (含 10%CH ₃ CN 和 0.1 三乙胺)	15

表 6 TSKgel PW_{XL} 色谱柱在使用高百分比选择有机溶剂中时的性能

	H ₂ O/MeOH50/50	H ₂ O/CH ₃ CN 50/50	H ₂ O/HCOOH 50/50	H ₂ O/DMSO 50/50
TSKgel G2500PW _{XL}	1) 15,200	1) 14,700	1) 15,600	1) 16,600
	2) 15,100	2) 15,200	2) 15,300	2) 18,000
	3) 14,800	3) 15,000	3) 14,200	3) 17,400
TSKgel G3000PW _{XL}	1) 17,200	1) 16,000	1) 18,300	1) 18,000
	2) 16,500	2) 16,500	2) 19,100	2) 18,500
	3) 16,200	3) 15,700	3) 18,600	3) 18,700
TSKgel G4000PW _{XL}	1) 13,100	1) 12,900	1) 12,600	1) 13,000
	2) 13,700	2) 12,700	2) 12,800	2) 12,700
	3) 13,300	3) 13,000	3) 12,500	3) 13,200
TSKgel G5000PW _{XL}	1) 12,400	1) 13,000	1) 12,400	1) 13,700
	2) 11,000	2) 12,500	2) 12,000	2) 13,700
	3) 11,800	3) 12,300	3) 11,800	3) 13,900
TSKgel G6000PW _{XL}	1) 7,800	1) 8,800	1) 8,000	1) 8,800
	2) 7,300	2) 8,100	2) 7,800	2) 8,800
	3) 8,200	3) 8,400	3) 7,800	3) 8,200
TSKgel GMPW _{XL}	1) 7,600	1) 7,700	1) 7,200	1) 7,400
	2) 6,900	2) 7,400	2) 8,100	2) 6,600
	3) 7,500	3) 7,800	3) 7,300	3) 7,600
TSKgel G-Oligo-PW	1) 16,200	1) 17,200	1) 16,400	1) 14,800
	2) 17,100	2) 17,400	2) 16,000	2) 15,200
	3) 16,900	3) 16,900	3) 16,100	3) 14,200

注:

- 1) 测定前测得的理论塔板数
 - 2) 换作第一种溶剂后测得的理论塔板数
 - 3) 换作第二种溶剂后测得的理论塔板数
- 测量条件与表 1 相同。

对几种更高浓度溶剂的适用性进行了确认, 如表 6 所示。从一种溶剂切换至另一种溶剂时, 流速要慢 (流速为 0.5mL/min), 并按照图 13 中所示方法的线性梯度进行。

溶剂切换过程中几种典型的色谱柱压降变化的实例见图 14。表 6 的数据说明, 当按照所述方法更换溶剂时, 所有的色谱柱都可以使用 50% 的甲醇、乙腈、甲酸和二甲亚砷水溶液。

(2) pH

室温下, TSKgel PW_{XL} 型色谱柱均可在高 pH 和低 pH 条件下使用。但是, 并不推荐在高温下使用碱溶液或酸溶液, 因为这样可能会导致色谱柱失效。

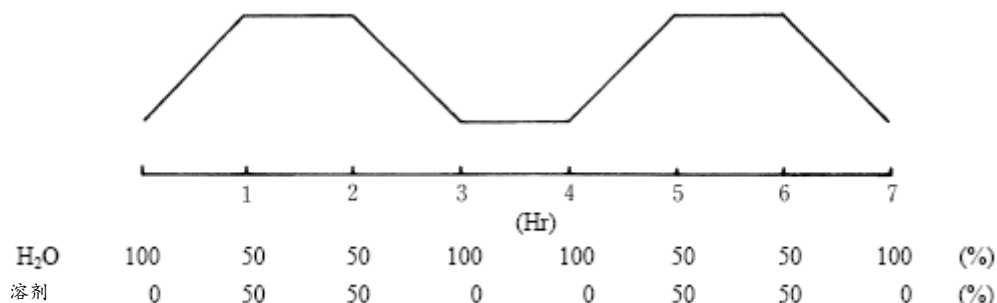


图 13 表 6 中实验的溶剂的更换方法

条件: 有机溶剂的水溶液, 60min。线性梯度
流速: 0.5mL/min

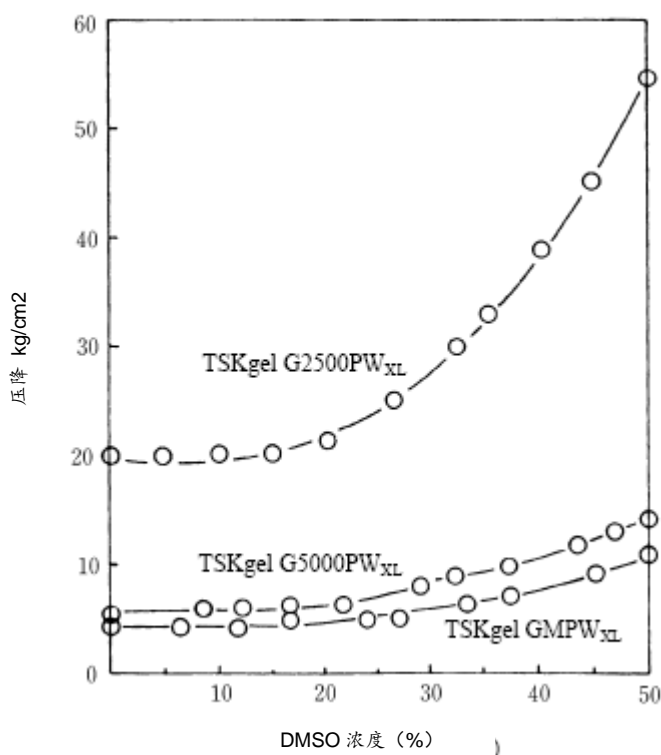


图 14. 流动相组成与压降的关系

色谱柱: (1) TSKgel G2500PW_{XL}
(2) TSKgel G5000PW_{XL}
(3) TSKgel GMPW_{XL}

色谱柱尺寸: 7.8mm ID x30cm

流速: 0.5mL/min

4. 色谱柱的选择

为了充分发挥 GFC 色谱柱的高性能，必须认真考虑色谱柱的选择问题。因为东曹公司生产的高效 TSKgel GFC 色谱柱共有 18 个规格，即 3 种 TSKgel SW 型色谱柱，7 种传统的 TSKgel PW 型色谱柱以及 8 种新型的 TSKgel PW_{XL} 型色谱柱。对每种用途，要选择最佳的色谱柱确实不是一件易事。

表 7 从日常分析的角度给出了选择适合色谱柱的总的指导原则。选择时，将各种因素考虑在内，如分离能力、分子量分离范围、校准曲线的线性、吸附特性以及分析的回收率、溶液相容性、色谱柱寿命、色谱柱载量等。

4-1. 在 PW 型与 SW 型之间选择色谱柱

一般而言，因其出色的分离能力，TSKgel SW 色谱柱适用于单分散生物聚合物（如蛋白质和核酸）的分离。TSKgel PW 色谱柱由于具有较大的排阻范围和良好的校准曲线线性，被选择用于多分散聚合物（如多糖和合成水溶性聚合物）的分离。

表 7 高效 GFC 色谱柱选择指南

样品		色谱柱的选择		选择标准	
		第一选择	第二选择		
糖类	多糖	TSKgel GMPW _{XL}	TSKgel G5000PW _{XL} + G3000PW _{XL}	孔径大 校准曲线线性	
	寡糖	TSKgel G-Oligo-PW	TSKgel G2500PW _{XL} TSKgel G2000PW	分离能力	
核酸	DNA 片段	大片段	TSKgel G-DNA-PW TSKgel G5000PW _{XL}	孔径大 分离能力	
		中等及小片段	TSKgel G4000SW TSKgel G3000SW	使用的孔径 分离能力	
	RNA	TSKgel G4000SW TSKgel G3000SW			
	寡核苷酸	TSKgel G2500PW _{XL}		孔径小 离子相互作用	
蛋白质	普通大小的蛋白质		TSKgel G3000SW TSKgel G4000SW TSKgel G2000SW	TSKgel G3000PW _{XL} TSKgel G4000PW _{XL}	分离能力
	大分子蛋白质	低密度脂蛋白	TSKgel G6000PW _{XL} TSKgel G5000PW _{XL}		孔径大 分离能力
		明胶	TSKgel GMPW _{XL}	TSKgel G5000PW _{XL} + G3000PW _{XL}	孔径大 校准曲线线性
多肽	大分子多肽		TSKgel G3000SW TSKgel G2000SW	TSKgel G3000PW _{XL}	
	小分子多肽		TSKgel G2500PW _{XL}	TSKgel G2000SW	校准曲线线性 分离能力
病毒		TSKgel G6000PW _{XL} TSKgel G5000PW _{XL}		孔径大 分离能力	
合成聚合物		TSKgel GMPW _{XL}	TSKgel G5000PW _{XL} + G3000PW _{XL}	孔径大 校准曲线线性 低吸附率	
合成低聚物	非离子型或阳离子型		TSKgel G-Oligo-PW	TSKgel G2500PW _{XL}	孔径小 分离能力 离子相互作用
	阴离子型		TSKgel G2500PW _{XL}		

多糖

非离子型多糖是一些使用 GFC 分析的最简单的化合物，因为它们很少在 TSKgel PW 和 SW 色谱柱上表现出非理想的体积排阻效应。由于非离子多糖通常具有范围广泛的分子量分布，TSKgel PW 色谱柱一般适用于这些多糖的测量。Alsop 等¹⁶证明，TSKgel PW 色谱柱系列（TSKgel G5000PW + G3000PW）对于临床葡聚糖样品的表征非常有帮助。对该方法良好的再现性和准确度与色谱柱的长期稳定性一起进行了确认。

Kato 等¹⁷使用串联的 TSKgel PW 色谱柱（TSKgel G5000PW + G3000PW）对胞外多糖进行了表征。Takagi 等¹⁹使用 TSKgel PW 色谱柱（TSKgel G6000PW + G4000PW + G3000PW）分离出了百合直链淀粉。洗脱的组分采用小角激光散射检测器和精密示差折射仪进行监测。据他们报道，与传统方法相比，该方法可以大大节省时间和样品。

Kato¹⁸等通过配备一个小角激光散射检测器的 GFC 色谱仪测定了片剂薄膜包衣中使用的羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素的分子量和分子量分布。

其它几种多糖（如硫酸软骨素、海藻酸、透明质酸、甘露聚糖、淀粉和羧甲基纤维素）的色谱图列在参考文献 14 中。

核酸

Kato 等²¹利用 TSKgel SW 色谱柱和 TSKgel G5000PW 色谱柱研究了 DNA 片段和 RNA 的 GFC 色谱中操作参数的影响。

虽然小分子核酸可以在 TSKgel SW 上进行分析，但大分子核酸（长度大于 250,000 碱基对的 DNA 片段和长度大于 1,200,000 核苷酸的 RNA）在大孔径 TSKgel PW 色谱柱（如 TSKgel G-DNA-PW 或 G5000PW_{XL} 色谱柱）分析效果最好。因为核酸是单分散分子，这种 TSKgel PW_{XL} 新系列色谱柱强大的分离能力比传统的 TSKgel PW 色谱柱的效果更佳。表 8 列出了分离双链 DNA 片段的最佳色谱柱。

图 15 则显示了在双色谱柱 TSKgel G5000PW 体系中流速如何改变 DNA 片段的理论塔板高度²¹。图 16 表示了 TSKgel G5000PW 双色谱柱体系中得出的洗脱流离子强度对洗脱体积的影响²¹。

表 8 分离双链 DNA 片段的推荐色谱柱

碱基对	推荐色谱柱
<80	TSKgel G2000SW、G3000SW
80 ~ 160	TSKgel G3000SW _{XL}
160 ~ 500	TSKgel G4000SW
500 ~ 1000	TSKgel G5000PW _{XL}
1000 ~ 7000	TSKgel G-DNA-PW

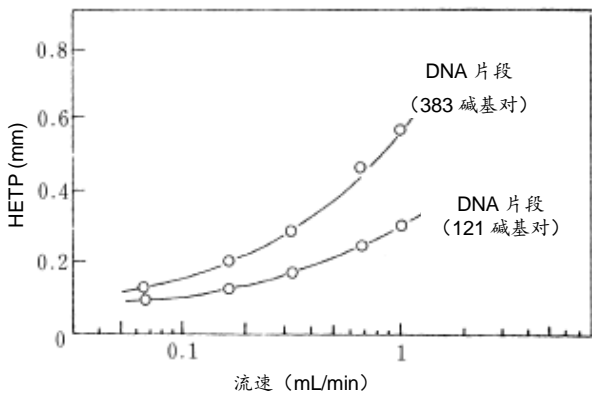


图 15. 流速对 DNA 片段理论塔板高度的影响
 色谱柱: TSKgel G5000PW, 7.5mm ID × 60cm × 2
 流动相: 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) + 0.1mol/L NaCl + 1mmol/L EDTA

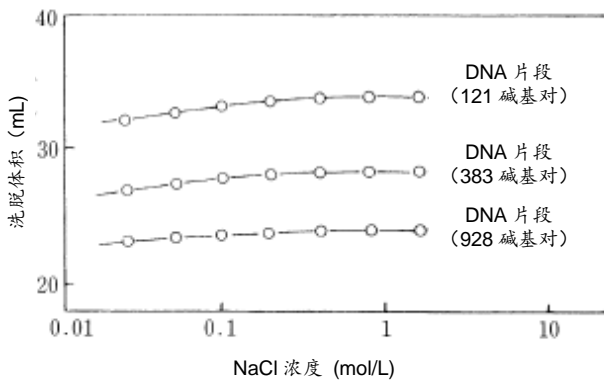


图 16. NaCl 浓度对 DNA 片段洗脱体积的影响
 色谱柱: TSKgel G5000PW, 7.5mm ID × 60cm × 2
 流动相: 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) + 0.025 - 1.6mol/L NaCl + 1mmol/L EDTA
 流速: 1.0mL/min

蛋白质和多肽

许多作者,包括 Kato 等¹¹, Alfredson 等¹², Watanabe 等⁴⁵指出了 TSKgel SW 色谱柱相对于 TSKgel PW 色谱柱在分离普通蛋白质上的优越性。尺寸排阻色谱的分离能力依赖于理论塔板数(而理论塔板数反过来主要由粒度决定)和校准曲线的斜率(主要由孔径、孔径分布和孔体积决定)。虽然 TSKgel PW_{XL} 色谱柱所含填料粒度与 TSKgel SW 色谱柱相同(甚至与 TSKgel G4000SW 相比时粒度更小),但它们对蛋白质的分离仍稍逊一筹,因为 TSKgel PW_{XL} 填料的孔径分布更宽,孔体积更小。但是,应当指出,在一些例外情况中,TSKgel PW_{XL} 色谱柱应取代 TSKgel SW 而作为首选。

这些例外情况是:

a) 在高 pH(大于 8)条件下操作时。应当选择 TSKgel PW_{XL} 色谱柱,而非 TSKgel SW 色谱柱。

b) 在分析分子量很大的蛋白质时,如脂蛋白(低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白)、明胶、海虫血绿蛋白等。这些物质甚至不能使用 TSKgel G4000SW 色谱柱分析,却能在大孔径 TSKgel 色谱柱上(如 TSKgel G5000 PW_{XL} 和 G6000PW_{XL})获得更好的分析效果。

Hara 等²²⁻²⁹研究了使用 TSKgel PW 色谱柱和 TSKgel SW 色谱柱对脂蛋白进行的分析。他研究了各种 TSKgel PW 和 SW 色谱柱系统。研究结果表示在图 17 中。

所用的最合适色谱柱系统根据具体应用而定。对于乳糜微粒的分析,东曹推荐使用 TSKgel G6000PW 色谱柱。由 TSKgel G5000PW 和 G3000SW 组成的双柱系统用于总图谱分析是最好的。如需要详细的高密度脂蛋白的数据,推荐使用 TSKgel G3000SW 双柱系统 Hara 等使用在线柱后反应检测器也建立了脂蛋白中脂肪(如胆固醇、磷脂和甘油三酯)的分析方法。由于脂蛋白几乎都是单分散聚合物,TSKgel PW_{XL} 色谱柱的高效能将最大限度地改进这一方法。

出于简单、稳定性和经济的原因,Carrell 等³⁰选择了单根 TSKgel G5000PW 色谱柱(7.5mm ID × 60cm),用于低密度脂蛋白的分析和制备性分离。通过使用 TSKgel G5000PW 制备色谱柱,Himmel 等³¹发现,从海虫 *Potamilla leptochaeta* 分离出来的有色的蛋白质色绿蛋白,用作水性尺寸排阻色谱优良的高分子标记物(2.9 × 10⁶)。pH 对 TSKgel G6000PW 和 G4000PW 双色谱柱系统上明胶的色谱图的影响在东曹公司发布的技术报告中进行了报道¹⁴。

c) 小分子多肽是最难用水性尺寸排阻色谱分离的化合物。离子的明显的非理想体积排阻效应和疏水性通常在 TSKgel PW 色谱柱和 TSKgel SW 色谱柱上均可观察到。

Yoshida 等⁴⁶通过 TSKgel SW、采用各种复杂的洗脱剂对此问题作了重要的研究工作。

Swergold 等³³研究出了一种很简单的洗脱液系统,用于在 TSKgel G3000PW 色谱柱上分离小分子多肽。通过使用含有 36%~45%乙腈和 0.1%三氟乙酸的水性洗脱液,他们利用尺寸排阻色谱能够将这些小分子多肽保留。该方法的一个特点是洗脱液是具有挥发性的。东曹利用 TSKgel G3000PW_{XL} 的色谱柱对该方法进行了确认,如图 18(典型色谱图)和图 19(校准曲线)所示。

合成水溶性聚合物

由于 TSKgel PW 相对于 TSKgel SW 色谱柱具有更宽的范围、更好的校准曲线线性、更低的吸附特性,通常被用于合成水溶性聚合物的分离。

Alfredson 等¹²人表示,TSKgel SW 型色谱柱对于线型聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸等)显示出很高的吸附性。这可能是由于 TSKgel SW 型色谱柱填料上残留的硅酸基与这种聚合物之间的相互作用引起的。从蛋白质中洗脱这些聚合物表现出的不同的洗脱行为可以解释为:柔性的线型聚合物可使通过化学键结合的有机层渗透到与硅醇基发生相互作用的位点上,而刚性的蛋白质则无法做到这一点。

Carole 等³⁴使用了由 TSKgel G5000PW 和 G3000PW 组成的双色谱柱系统,对聚乙烯醇进行表征。

Higo 等³⁵使用由 TSKgel G5000PW 和 G3000PW 色谱柱组成的双色谱柱系统表征了阳离子聚合电解质——聚(4-乙烯基苄基氯化铵)。他们研究了洗脱剂(尤其是加入有机溶剂)对洗脱图谱的影响并发现,当使用含有少量醋酸的 0.1mol/L 硫酸钠溶液作为洗脱剂时,可能得到正常的尺寸排阻色谱曲线。

Dubin 等^{36,37}报道,TSKgel G5000PW 和 G3000PW 色谱柱可成功用于阳离子聚合物(如聚乙烯亚胺、聚二甲基二烯丙基氯化铵、聚甲基丙烯酰氧乙基三甲基甲硫酸铵)的测量。

低聚物

对于分子量小于 3000 的样品，含有小孔径填料的 TSKgel PW 型色谱柱（如 TSKgel G-Oligo-PW 和 G2500PW_{XL}）的分离能力要优于 TSKgel G2000SW，因为具有更好的选择性和更高的理论塔板数。

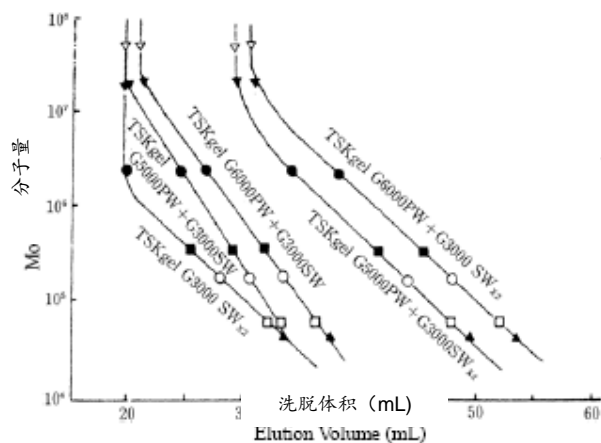


图 17. 联用 TSKgel GFC 色谱柱时脂蛋白分子量与洗脱体积的关系

色谱柱尺寸: 7.5mm ID × 60cm

样品: ▽: 乳糜微粒; ▼: 极低密度脂; ●: 低密度脂
■: 高密度脂 2; ○: 高密度脂 3; □: 白蛋白;
▲: 卵白蛋白

流动相: 0.1M Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)

流速: 1.0mL/min

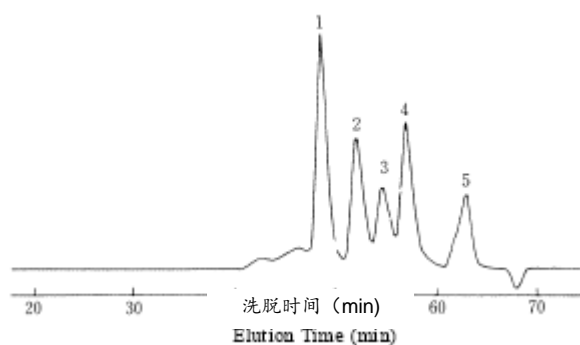


图 18. TSKgel G3000PW_{XL} 色谱柱多肽混合物的洗脱图谱

色谱柱: TSKgel G3000PW_{XL}, 7.8mm ID × 30cm × 2

样品: 多肽

1. 抑肽酶
2. 胰岛素 β 链
3. α-促黑激素
4. bradykinin potentiator C,
5. 谷胱甘肽

流动相: 0.1% TFA/45% CH₃CN

流速: 0.3mL/min

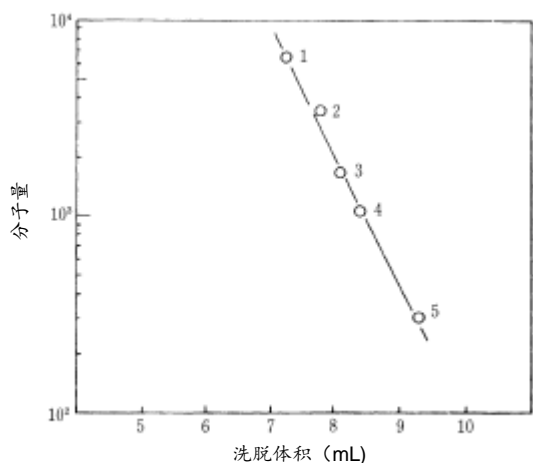


图 19. TSKgel G3000PW_{XL} 色谱柱的多肽校准曲线
 色谱柱: TSKgel G3000PW_{XL}, 7.8mm ID × 30cm
 样品: 1. 抑肽酶 (6500) 2. 胰岛素 β 链 (3400)
 3. α-促黑激素 (1665)
 4. bradykinin potentiator C (1052),
 5. 谷胱甘肽 (307)
 流动相: 0.1% TFA/45% CH₃CN
 流速: 1.0mL/min

4-2. TSKgel PW 型色谱柱之间的色谱柱选择

(1) TSKgel PW_{XL} 型色谱柱或 TSKgel PW 型色谱柱

出于不同分析的目的, 如 HPLC 系统的死体积很小, 我们推荐使用新型 TSKgel PW_{XL} 色谱柱。

对于制备性分离, 尤其是样品上样量大时, 由于 TSKgel PW 具有更大的柱容量, 我们推荐使用 TSKgel PW 色谱柱。

(2) 分析多分散聚合物时的色谱柱选择

混合填料线性柱, 如 TSKgel GMPW_{XL} 或 GMPW 的出现简化了用于分析未知聚合物样品的色谱柱的选择。通常, 分析人员首先会在混合填料线性柱 TSKgel GMPW 或 GMPW_{XL} 色谱柱上分析样品。再根据样品洗脱特性, 选择可涵盖所有样品分子量范围、具有特定孔径的色谱柱。因此, 我们建议准备至少一根用于分析未知聚合物的混合填料 TSKgel GMPW 或 GMPW_{XL} 色谱柱。虽然双色谱柱系统(如 TSKgel G6000PW 和 G4000PW, TSKgel G6000PW 和 G3000PW 或 TSKgel G5000PW 和 G3000PW) 可以在宽分子量范围内得到线性良好的校准曲线, 但相对于其它多色谱柱系统, 使用 TSKgel GMPW 或 GMPW_{XL} 色谱柱可以节约时间和成本。

(3) 分析低聚物时的色谱柱选择

对于小分子低聚物, TSKgel G-Oligo-PW 或 G2500PW_{XL} 色谱柱是上乘之选。这两种色谱的详细对比已经在别的文献中公开⁴⁷。

TSKgel G-Oligo-PW 色谱柱推荐用于非离子和阳离子低聚物的分析, 因为该色谱柱具有很强的分离能力, 而 TSKgel G2500PW_{XL} 则更适用于阴离子低聚物的分析。色谱柱的专业产品线 TSKgel PW_{XL}-CP, 于 2007 年开始被用于阳离子聚合物分析。可选的等级包括 TSKgel G3000PW_{XL}-CP、TSKgel G5000PW_{XL}-CP 和 TSKgel G6000PW_{XL}-CP。

5. TSKgel PW 型色谱柱产品线

表 9 列出了全部的 TSKgel PW 型色谱柱的产品线, 其中包括分析和制备色谱柱以及保护柱。

表 9 TSKgel PW 型和 TSKgel PW_{XL} 型色谱柱产品线

	TSKgel PW _{XL} 系列		TSKgel PW 系列					
	7.8mm ID x30cm		7.5mm ID x30cm		7.5mm ID x 60cm		21.5mm ID x60cm	
	粒度 (μm)	理论塔板/色谱柱	粒度 (μm)	理论塔板/色谱柱	粒度 (μm)	理论塔板/色谱柱	粒度 (μm)	理论塔板/色谱柱
TSKgel G2500PW	7	16,000	12	5,000	12	10,000	17	10,000
TSKgel G3000PW	7	16,000	12	5,000	12	10,000	17	10,000
TSKgel G4000PW	10	10,000	17	3,000	17	6,000	20	6,000
TSKgel G5000PW	10	10,000	17	3,000	17	6,000	20	6,000
TSKgel G6000PW	13	7,000	17	3,000	17	6,000	—	—
TSKgel GMPW	13	7,000	17	3,000	17	6,000	—	—
TSKgel G-Oligo-PW	7	14,000	—	—	—	—	—	—
TSKgel G-DNA-PW	10	10,000	—	—	—	—	—	—

保护柱	色谱柱系统	色谱柱尺寸
TSKguard Column PW _{XL}	TSKgel G2500PW _{XL} ~ GMPW _{XL}	6.0mm ID x4cm
TSKguard Column G-Oligo-PW	TSKgel G-Oligo-PW	6.0mm ID x4cm
TSKguard Column PW	TSKgel G2500PW ~ GMPW	7.5mm ID x7.5cm
TSKguard Column PW	TSKgel G2500PW ~ G5000PW	21.5mm IDx7.5cm

表 10 TSKgel PW_{XL} 型色谱柱的洗脱条件的范围

色谱柱	流速		最大压降	柱温	
	适合范围	最大值		适合范围	最大值
	mL/min	mL/min	kg/cm ²	°C	°C
TSKgel G2500PW _{XL}	0.5-0.8	1.0	40	10-60	80
TSKgel G3000PW _{XL}	0.5-0.8	1.0	40	10-60	80
TSKgel G4000PW _{XL}	0.3-0.6	1.0	20	10-60	80
TSKgel G5000PW _{XL}	0.3-0.6	1.0	20	10-60	80
TSKgel G6000PW _{XL}	0.3-0.6	1.0	20	10-60	80
TSKgel GMPW _{XL}	0.3-0.6	1.0	20	10-60	80
TSKgel G-Oligo-PW	0.5-0.8	1.0	40	10-60	80
TSKgel G-DNA-PW	0.2-0.5	0.6	20	10-60	80

6. 关于使用 TSKgel PW_{XL} 色谱柱的一些建议

每一根色谱柱都随着《操作条件与说明书》装运单(OCS)一起装运。其详细说明了如何使色谱柱处于良好的工作状态,包括色谱柱受到污染时和/或性能下降时所要做的

工作。

这里总结了一些需要考虑的问题。

6-1. 洗脱条件的范围

表 10 中列出了适宜的流速范围、最大流速、最大压力、适宜的温度范围以及最高温度。

所有的 TSKgel PW_{XL} 型色谱柱的 pH 范围为 2-12。

6-2. 色谱柱的保养

(1) 过滤流动相和样品溶液对于防止由柱床顶端的进液滤头堵塞而引起的压力升高和性能下降而言很重要。

(2) 建议使用保护柱保护分析柱。如出现任何异常现象,如压力上升和性能下降,应立即更换保护柱。

(3) 将流速保持在推荐的流速范围内,而不是最大流速运行。这将有助于避免柱床塌陷并延长色谱柱的寿命。

(4) 更换溶剂时,我们建议采用逐渐地、平缓地更换溶剂组成的方法,以保护柱床免受压迫。

参考文献

- 1) E. Pfannkoch, K.C. Lu, E. Regnier, and H.G. Barth, J. Chromatogr. Sci., 18, 430 (1980)
- 2) R.E. Majors, J. Chromatogr. Sci., 18, 488 (1980)
- 3) H.G. Barth, J. Chromatogr. Sci., 18, 409 (1980)
- 4) T. Takagi, Gel Permeation Chromatography of Macromolecules, 107 (1981)
- 5) P.L. Dubin, Separation and Purification Methods, 10(2), 287 (1981)
- 6) R.E. Majors, H.G. Barth, and C.H. Lochmüller, Anal. Chem., 56, 300R (1984)
- 7) B.G. Belenkii and L.Z. Vilenchik, J. Chromatogr., Library, 25, 327 (1983)
- 8) T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura, and Y. Kato, J. Poly. Sci. Poly. Phys. Ed., 16, 1789 (1978)
- 9) Y. Kato, H. Sasaki, M. Aiura, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 153, 546 (1978)
- 10) T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura, and Y. Kato, J. Chromatogr., 160, 301 (1978)
- 11) Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 193, 311 (1980)
- 12) T.V. Alfordson, C.T. Wher, L. Tallman, and F.E. Klink, J. Liquid Chromatogr., 5, 489-524 (1982)
- 13) Toyo Soda, TSKgel PW Type, Technical Data
- 14) Toyo Soda, HLC Separation Report No. 035
- 15) N. Inagaki and K. Katsura, J. Poly. Sci. Poly. Chem. Ed., 18, 441 (1980)
- 16) R.M. Alsop and G.J. Vlachogiannis, J. Chromatogr., 246, 227 (1982)
- 17) T. Kato, T. Okamoto, and T. Tokuya, Biopolymers, 21, 1623 (1981)
- 18) T. Kato, T. Tokuya, and A. Takahashi, Kobunshi Ronbunshu, 39, 293-298 (1982)
- 19) T. Takagi and S. Hizukuri, J. Biochem., 95, 1459 (1984)
- 20) M.E. Himmel, P.J. Perna, and M.W. Mcdnell, J. Chromatogr., 240, 155 (1982)
- 21) Y. Kato, M. Sasaki, and T. Hashimoto, J. Chromatogr., 266, 341 (1983)
- 22) I. Hara, M. Okazaki, and Y. Ohno, J. Biochem., 87, 1863 (1980)
- 23) M. Okazaki, Y. Ohno, and I. Hara, J. Chromatogr., 221, 257 (1980)
- 24) Y. Ohno, M. Okazaki, and I. Hara, J. Biochem., 88, 1215 (1980)
- 25) I. Hara, K. Shiraishi, and M. Okazaki, J. Chromatogr., 239, 549 (1982)
- 26) M. Okazaki, N. Hagiwara, and I. Hara, J. Biochem., 91, 1381 (1982)
- 27) M. Okazaki, I. Hara, and A. Tanaka, The New England J. Medicine, 304, 1608 (1981)
- 28) Toyo Soda, HLC Separation Report No. 019
- 29) Toyo Soda, HLC Separation Report No. 027
- 30) R.M. Carroll and L.L. Rudel, J. Lipid Research, 24, 200 (1983)
- 31) M.E. Himmel and P.G. Squire, J. Chromatogr., 210, 443 (1981)
- 32) G.D. Swergold, O.M. Rosen, and C.S. Rubin, J. Biol. Chem., 257(8), 4207 (1982)
- 33) G.D. Swergold and C.S. Rubin, Anal. Biochem., 131, 295 (1983)
- 34) C.M.L. Atkinson, R. Dietz, and M.A. Francis, Polymer, 21, 891 (1980)
- 35) Y. Higo, Y. Kato, M. Itoh, N. Kozuka, I. Noda, and M. Nagasawa, Polymer Journal, 14(10), 809 (1982)
- 36) I.J. Levy and P.L. Dubin, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 21, 59 (1982)
- 37) P.L. Dubin and I.J. Levy, J. Chromatogr., 235, 377 (1982)
- 38) H. Kondo, H. Nakatani, R. Matsuno, and K. Hiromi, J. Biochem., 87, 1053 (1980)
- 39) S. Hase, T. Ikenaka, and Y. Matsushima, J. Biochem., 90, 407 (1981)
- 40) T. Fukamizo and K. Hayashi, J. Biochem., 91, 619 (1982)
- 41) S. Kuhara, E. Ezaki, T. Fukamizo, and K. Hayashi, J. Biochem., 92, 121 (1982)
- 42) T. Fukamizo, T. Torikata, S. Kuhara, and K. Hayashi, J. Biochem., 92, 709 (1982)
- 43) T. Fukamizo, S. Kuhara, and K. Hayashi, J. Biochem., 92, 717 (1982)
- 44) K. Oh, J. Janssens, K. Grohmann, and M.E. Himmel, Biotechnology Letters, 4(7), 405 (1982)
- 45) H. Watanabe, M. Umino, and T. Sasagawa, Toyo Soda Kenkyuhokoku, 28, 1-20 (1984)
- 46) Y. Shiyoya, H. Yoshida, and T. Nakajima, J. Chromatogr., 240, 341-348 (1982)
- 47) Toyo Soda, HLC Separation Report No. 037