

TSKgel SW_{XL} 系列色谱柱

目录

1. 简介	2
2. 色谱柱特点	2
3. 基本特性	6
3-1 流速对 HETP 对流速的影响	6
3-2 离子特性	6
3-3 样品荷载量	7
3-4 蛋白质回收	7
4. 应用	8
5. 总结	9



1. 简介

由于高效液相色谱 (HPLC) 研究取得了巨大进展, 因此自然而然地将其运用于分离生物聚合物。直至 20 世纪 80 年代, 生物聚合物制备色谱领域一直被使用软凝胶低效色谱所占据。但是, 随着高速、高效色谱技术和设备的发展, HPLC 已经开始在该领域占据一席之地。从我们常见的经典分离模式开始, 凝胶过滤色谱 (GFC)、离子交换色谱 (IEC) 以及反相色谱 (RPC) 已经逐步成为 HPLC 分析中的常用方法。同样, 在疏水相互作用色谱 (HIC) 和亲和色谱 (AFC) 领域的研究也取得了快速发展。

Tosoh 提供了各种各样的色谱柱和填料, 促进了 HPLC 在这些领域的发展。尤其是在 GFC 色谱柱领域, TSKgel SW 型色谱柱的应用遍布全世界, 毫不夸张地说, 使用 TSKgel SW 色谱柱的 GFC 方法已经成为了一种标准的分析方法。

为了满足人们对 TSKgel GFC 色谱柱更细颗粒和更高性能的要求, Tosoh 公司于 1987 年开发了 TSKgel SW_{XL} 系列色谱柱, 其特点及基本特性将在本报告中进行讨论。本报告给出了几个应用实例。

2. 色谱柱特点

表 1 列出了 TSKgel SW_{XL} 系列色谱柱的规格。表 2 分别列出了应用于聚乙二醇 (PEG), 葡聚糖以及蛋白质的分离范围。TSKgel SW_{XL} 系列中所有色谱柱的尺寸均为 7.8mm ID x 30cm。由于填料比传统的 TSKgel SW 色谱柱的填料具有更小的粒度, 因此, 与 TSKgel SW 系列色谱柱相比, 保证理论塔板数增加近 1 倍, 如表 1 所示。

图 1 和图 2 显示了使用 TSKgel SW_{XL} 色谱柱分析上述样品的标准品时得到的校准曲线。图 3, 图 4 和图 5 表示使用 TSKgel SW_{XL} 和传统的 TSKgel SW 得到的标准蛋白的色谱图。表 3 表示由这些图谱计算得到的分离度 (Rs)。从表 3 可以清楚地看到, TSKgel SW_{XL} 色谱柱的分离性能与 60cm 的传统色谱柱的分离性能相当甚至更好。因此, 使用 TSKgel SW_{XL} 色谱柱可以将分析时间缩短至一半, 而分离性能不变。

图 6 表示分离度与蛋白质分子量的关系。这些色谱柱的最佳分离范围也在图中显示。一般来说, TSKgel G2000SW_{XL} 色谱柱适合于分离分子量为 70,000 或更小的蛋白质。TSKgel G3000SW_{XL} 则适合于分离分子量为 70,000 与 300,000 之间的蛋白质, 而 TSKgel G4000SW_{XL} 适合于分离分子量 300,000 以上的蛋白质。

表 1 TSKgel SW_{XL} 系列色谱柱规格

TSKgel 色谱柱	粒径 (μm)	保证的理论塔板数 (TP/30cm)	色谱柱尺寸
G2000SW _{XL}	5	20,000	7.8 mm ID x 30 cm
G3000SW _{XL}	5	20,000	
G4000SW _{XL}	8	16,000	

理论塔板数的检测条件:

溶剂: 0.1 mol/L Na₂SO₄+0.1 mol/L PB 缓冲液 (pH 6.7)

流速: 1mL/min

样品: 0.01% mg/mL PABA (对氨基苯甲酸), 20μL

表 2 TSKgel SW_{XL} 系列色谱柱分离的分子量范围

TSKgel 色谱柱	PEG/PEO	葡聚糖	蛋白质
G2000SW _{XL}	500~15,000	1,000~30,000	5,000~100,000
G3000SW _{XL}	1,000~35,000	2,000~70,000	10,000~500,000
G4000SW _{XL}	2,000~250,000	4,000~500,000	20,000~7,000,000

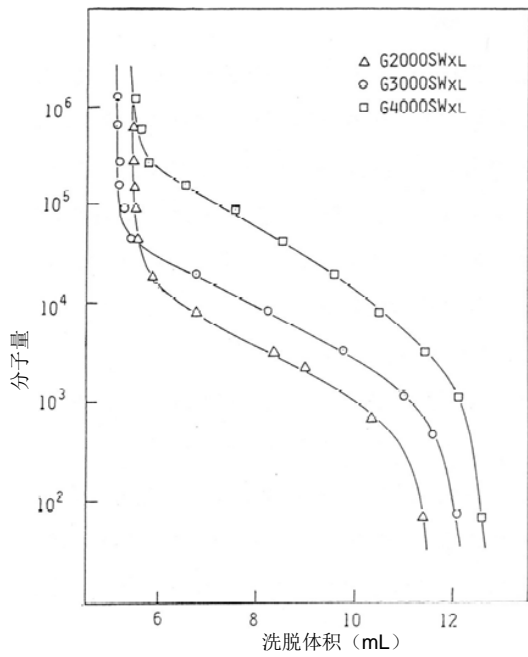


图1 使用 PEG 测得的校准曲线

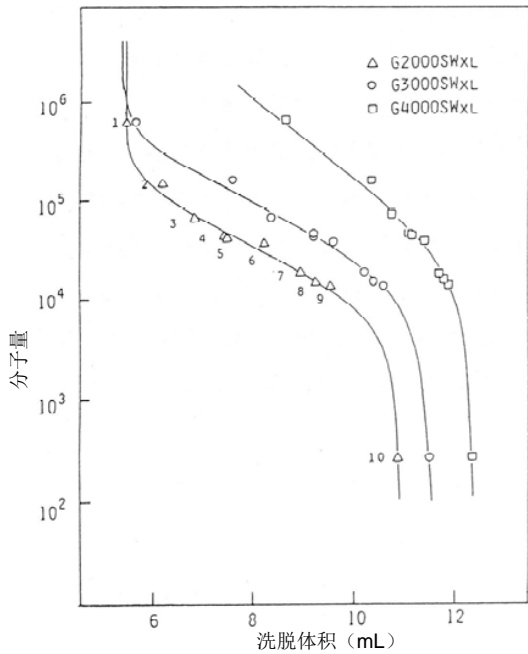


图2 蛋白质分析校准曲线

色谱柱: TSKgel SW_{xL} 系列, 7.8mm ID x 30cm
 流动相: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)+ 0.3mol/L NaCl
 流速: 1mL/min
 柱温: 25°C
 检测: UV@220 nm
 样品: 1.甲状腺球蛋白 (thyroglobulin) 5.过氧化物酶 (peroxidase)
 2.γ-球蛋白 (γ-globulin) 6.β-乳球蛋白 (β-lactoglobulin)
 3.牛血清白蛋白 (bovine serum albumin) 7.肌红蛋白 (myoglobin)
 4.卵白蛋白 (ovalbumin) 8.核糖核酸酶 (ribonuclease)
 9.细胞色素 C (cytochrome C)
 10.甘氨酸四聚物 (glycine tetramer)

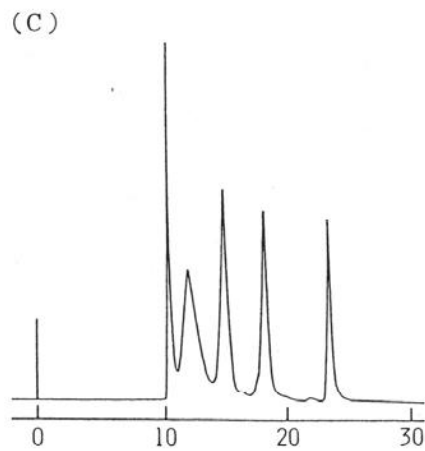
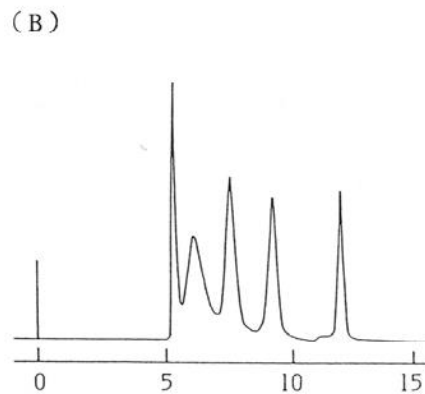
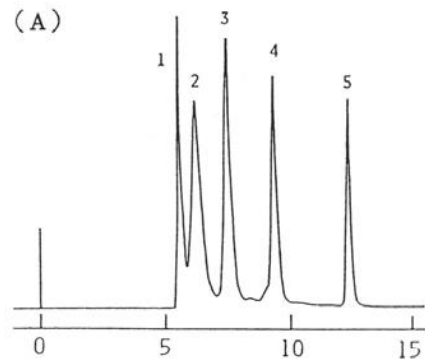
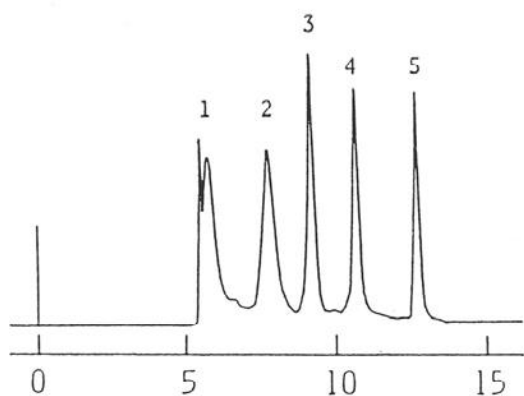


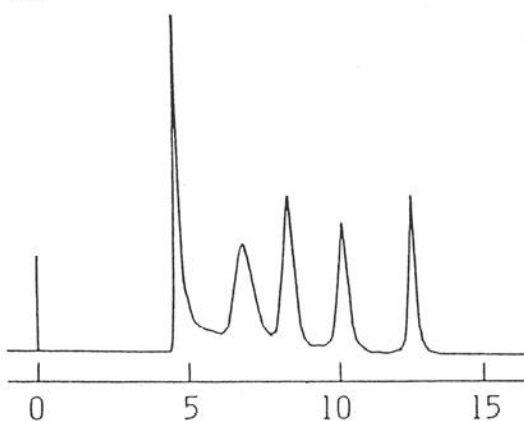
图3 SW_{xL} 色谱柱和 SW 色谱柱的对比 (1)

色谱柱: A: TSKgel G2000SW_{xL}, 7.8mm ID x 30cm
 B: TSKgel G2000SW, 7.5mm ID x 30cm
 C: TSKgel G2000SW, 7.5mm ID x 60cm
 流动相: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)
 + 0.3mol/L NaCl
 流速: 1mL/min
 柱温: 25°C
 检测: UV@220 nm
 样品: 1.甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)
 2.γ-球蛋白 (γ-globulin)
 3.卵白蛋白 (ovalbumin)
 4.核糖核酸酶 A (ribonuclease A)
 5.对氨基苯甲酸

(A)



(B)



(C)

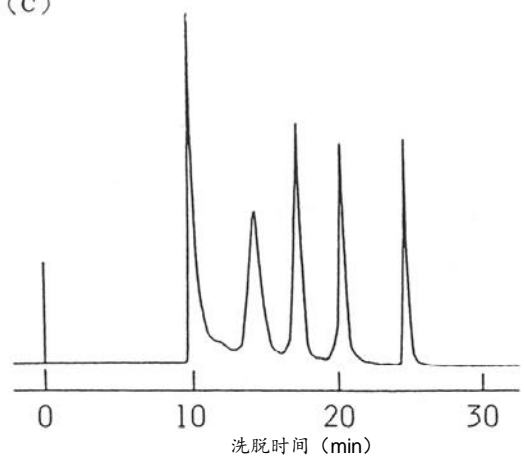
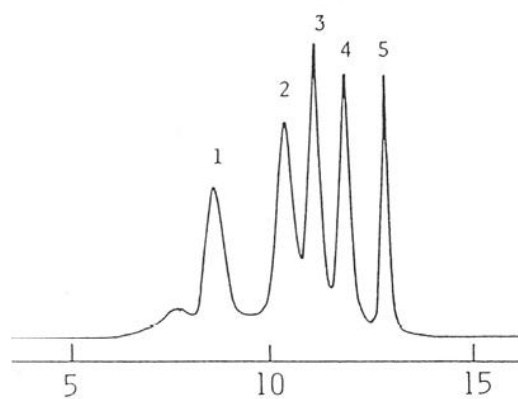


图4 SW_{xL} 色谱柱和 SW 色谱柱的对比 (2)

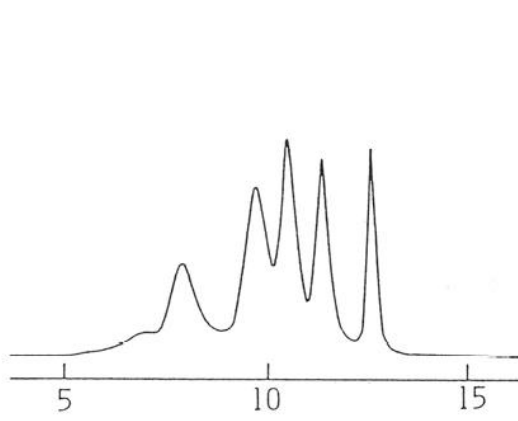
色谱柱: A: TSKgel G3000SW_{xL}, 7.8mm ID x 30cm
 B: TSKgel G3000SW, 7.5mm ID x 30cm
 C: TSKgel G3000SW, 7.5mm ID x 60cm

条件与图 3 相同。

(A)



(B)



(C)

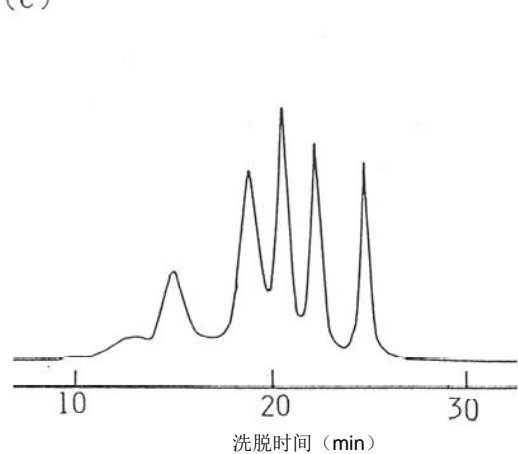


图5 SW_{xL} 色谱柱和 SW 色谱柱的对比 (3)

色谱柱: A: TSKgel G4000SW_{xL}, 7.8mm ID x 30cm
 B: TSKgel G4000SW, 7.5mm ID x 30cm
 C: TSKgel G4000SW, 7.5mm ID x 60cm

条件与图 3 相同。

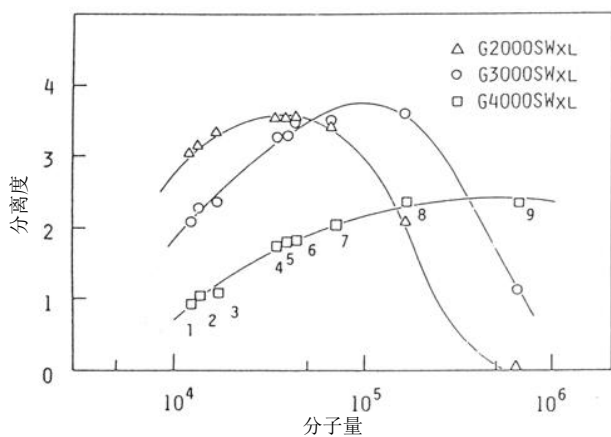


图6 分子量和分离度的关系

色谱柱: TSKgel SW_{XL} 系列, 7.8mm ID x 30cm
 溶剂: 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)+ 0.3mol/L NaCl
 流速: 1mL/min
 柱温: 25°C
 检测: UV@220nm
 样品:

1. 细胞色素 C (cytochrome C)
2. 核糖核酸酶 A (ribonuclease A)
3. 肌红蛋白 (myoglobin)
4. β-乳球蛋白 (β-lactoglobulin)
5. 过氧化物酶 (peroxidase)
6. 卵白蛋白 (ovalbumin)
7. 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)
8. γ-球蛋白 (γ-globulin)
9. 甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)

表3. SW_{XL} 和 SW 色谱柱分离度 (Rs) 的对比

样品	Rs		
	TSKgel G2000SW _{XL}	TSKgel G2000SW 30cm	TSKgel G2000SW 60cm
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)			
γ-球蛋白 (γ-globulin)	2.43	1.57	2.24
牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)	3.13	2.24	2.48
过氧化物酶 (peroxidase)	6.44	2.93	5.00
肌红蛋白 (myoglobin)	9.07	5.76	8.03
细胞色素 C (cytochrome C)	12.98	5.19	6.61
甘氨酸四聚物 (glycine tetramer)	2.89	1.50	2.23

样品	Rs		
	TSKgel G3000SW _{XL}	TSKgel G3000SW 30cm	TSKgel G3000SW 60cm
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)			
γ-球蛋白 (γ-globulin)	4.13	4.35	6.33
牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)	3.37	2.30	3.46
过氧化物酶 (peroxidase)	7.14	4.23	6.14
肌红蛋白 (myoglobin)	8.29	5.66	9.31
细胞色素 C (cytochrome C)	8.53	4.30	6.49
甘氨酸四聚物 (glycine tetramer)	1.68	1.34	2.46

样品	Rs		
	TSKgel G4000SW _{XL}	TSKgel G4000SW 30cm	TSKgel G4000SW 60cm
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)			
γ-球蛋白 (γ-globulin)	3.19	2.77	3.07
牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)	1.54	1.28	1.95
过氧化物酶 (peroxidase)	3.31	1.98	3.11
肌红蛋白 (myoglobin)	2.99	2.77	3.69
细胞色素 C (cytochrome C)	3.28	2.35	2.07
甘氨酸四聚物 (glycine tetramer)	0.69	0.70	0.75

3. 基本特性

3-1 流速对 HETP 的影响

流速对理论等板高度 (HETP) 的影响取决于填料的粒径、分子大小和流动相的粘度。以牛血清白蛋白和肌红蛋白为例, 图 7 显示了流速对 SW_{XL} 和传统 SW 色谱柱 HETP 的影响。

对于 TSKgel SW_{XL} 色谱柱, 流速增大时, HETP 变化甚小, 而对于 TSKgel SW 色谱柱, HETP 随流速的增加而明显升高。这是由 TSKgel SW_{XL} 使用的填料粒径小所致。小粒径填料减少了由对流引起的扩散 (涡流扩散) 和由流动相传质引起的扩散。

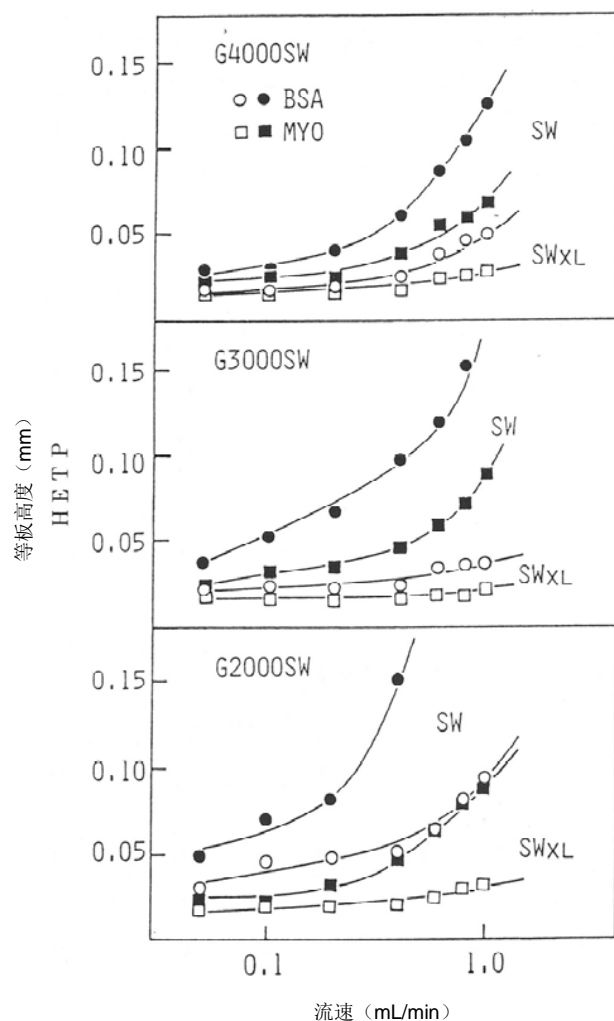


图 7 流速对理论塔板高度 (HETP) 的影响

色谱柱: TSKgel SW_{XL} 系列色谱柱

TSKgel SW 系列色谱柱

流动相: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)
+ 0.3 mol/L NaCl

样品: BSA: 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)
MYO: 肌红蛋白 (myoglobin)

3-2 离子特性

硅胶型填料包括硅醇基官能团。硅醇基为弱酸, 因此在中性溶液中具有负净电荷。从样品角度看, 碱性蛋白质在溶液中具有正电荷, 酸性蛋白质具有负电荷, 而中性蛋白质无电荷。结果, 填料与样品之间将产生离子相互作用。

图 8 表示盐浓度对蛋白质洗脱体积的影响。在 TSKgel SW_{XL} 色谱柱和传统的 TSKgel SW 色谱柱中, 盐浓度 $\leq 0.2 \text{ mol/L}$ 时, 细胞色素 (一种碱性蛋白质) 的洗脱体积 (保留体积) 增大, 说明了细胞色素 C 易与填料产生相互作用。另一方面, 当盐浓度降低时, 由于与填料表面硅醇基的排斥作用, 牛血清白蛋白和卵白蛋白 (均为酸性蛋白质) 的洗脱体积也随之减小。如所预期的一样, 肌红蛋白, 一种中性蛋白质, 在具有不同的盐浓度的洗脱液中不显电性。

因此, 在低盐浓度下, 填料与生物大分子 (如核酸和蛋白质) 之间会产生离子相互作用。结果, 为抵消该效应, 应在溶剂中加入 0.2 至 0.5 mol/L 的盐溶液, 以平衡离子间的相互作用。

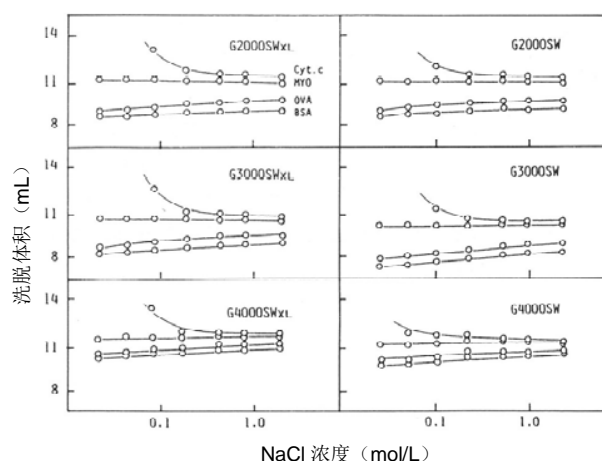


图 8 盐浓度对洗脱体积的影响

流动相: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) + NaCl

流速: 1 mL/min

样品: Cyt.C: 细胞色素 C (cytochrome C)

MYO: 肌红蛋白 (myoglobin)

OVA: 卵白蛋白 (ovalbumin)

BSA: 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)

3-3 上样量

图9表示上样量对牛血清白蛋白分离中HETP的影响。如此前图6所示,虽然TSKgel SW_{XL}色谱柱的整体HETP比传统的TSKgel SW低,但这两种色谱柱,在进样量达到约250 μg之前,两种色谱柱的样品荷载量变化很小。TSKgel SW_{XL}上的样品荷载量与传统的TSKgel SW上的样品荷载量相似。

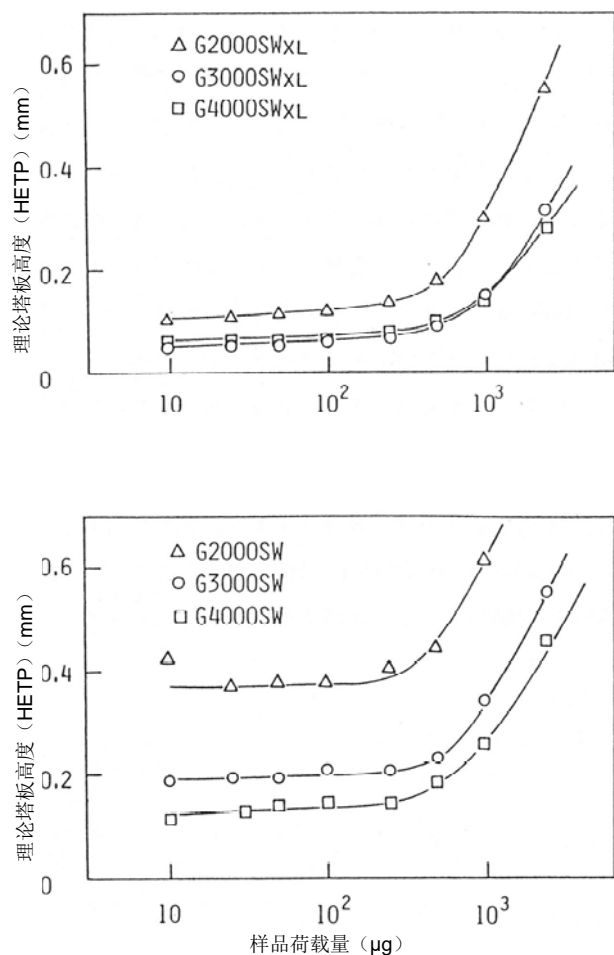


图9 样品荷载量(恒定进样体积)对HETP的影响

3-4 蛋白质的回收率

表4显示各种上样量时,蛋白质的回收率。对TSKgel G2000SW_{XL}和G3000SW_{XL}色谱柱,核糖核酸酶、甲状腺球蛋白和γ-球蛋白的回收实际上是定量的,无论注射的样品质量是多少。肌红蛋白、细胞色素C、糜蛋白酶原、溶菌酶和胰岛素抑制剂均被定量地回收。TSKgel G4000SW_{XL}色谱柱中,上述核糖核酸酶、γ-球蛋白及其它5种蛋白质均被定量回收。但是,对于甲状腺球蛋白,当上样量较小时(1 μg),回收率会降低。

在TSKgel SW_{XL}中,虽然大部分蛋白质的回收均是定量的,但是对于一些特殊的蛋白质,即使样品荷载量小,回收率并未降低。(采用传统TSKgel SW色谱柱也得到类似结果)。

表4 蛋白质回收率(%)

	上样量(μg)				
	1	5	10	50	100
TSKgel G2000SW_{XL}					
核糖核酸酶 A (ribonuclease A)	95	83	96	98	94
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)	107	92	101	-	-
γ-球蛋白 (γ-globulin)	103	109	116	98	107
TSKgel G3000SW_{XL}					
核糖核酸酶 A (ribonuclease A)	96	97	97	95	94
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)	92	97	101	99	91
γ-球蛋白 (γ-globulin)	106	103	97	97	108
TSKgel G4000SW_{XL}					
核糖核酸酶 A (ribonuclease A)	104	106	103	103	94
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)	78	90	91	102	101
γ-球蛋白 (γ-globulin)	91	90	107	97	104

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

条件与图2相同。

4. 应用

图 10 和图 11 是使用 TSKgel G2000SW_{XL} 分离大鼠肝脏粗提物以及分离多肽的实例。图 12 和图 13 是使用 TSKgel G3000SW_{XL} 对豚鼠胃粗提物和蓖麻凝集素 (RCA)

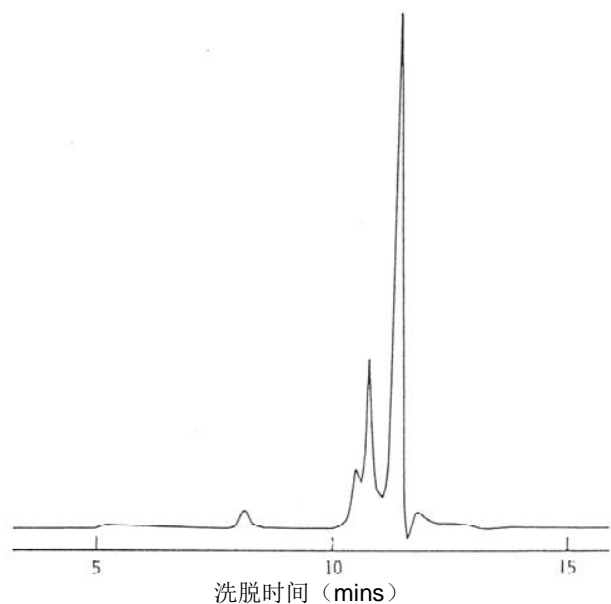


图 10 大鼠肝脏粗提物 (10 µL) 的分离
色谱柱: TSKgel G2000SW_{XL}, 7.8 mm ID x 30 cm
流动相: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) + 0.3 mol/L NaCl
流速: 1 mL/min
柱温: 25°C
检测: UV@220 nm

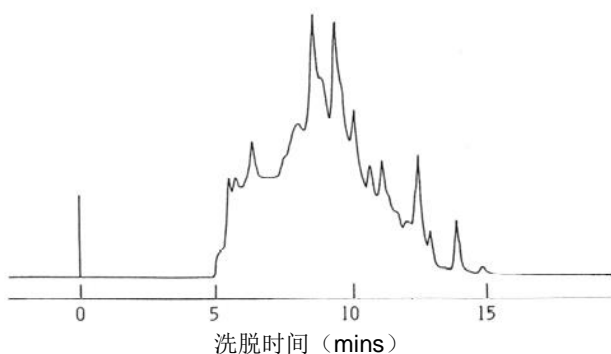


图 12 豚鼠 (士拔鼠) 胃粗提物 (25 µL) 的分离

除色谱柱不同外, 色谱条件与图 10 中相同。

色谱柱: TSKgel G3000SW_{XL}, 7.8 mm ID x 30 cm

粗提物进行分离的实例。图 14 和图 15 是使用 TSKgel G4000SW_{XL} 对菠菜叶粗提物和 øX174 RF DNA-Hae III 消化产物进行分离的实例。

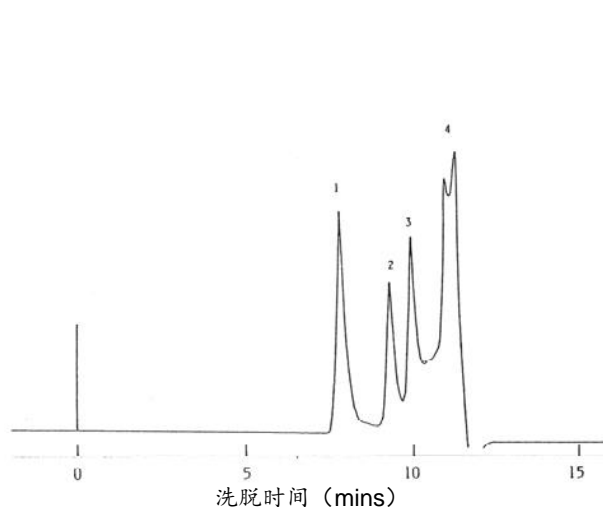


图 11 多肽的分离

色谱柱: TSKgel G2000SW_{XL}, 7.8mm ID x 30cm
流动相: 40% ACN+0.05% TFA (40%乙腈+0.05%三氟乙酸)
流速: 1 mL/min
柱温: 25°C
检测: UV@215 nm
样品: 1.细胞色素 C (cytochrome C)
2.胰岛素
3.α-内啡肽
4.亮内啡肽

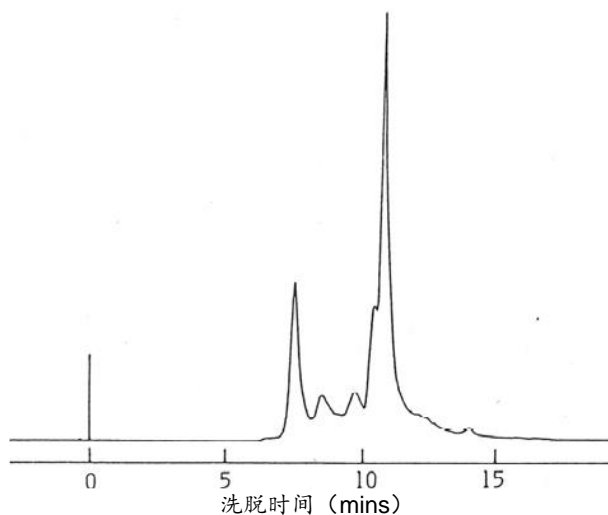


图 13 蓖麻凝集素 (RCA) (25 µL) 的分离

条件同图 12。

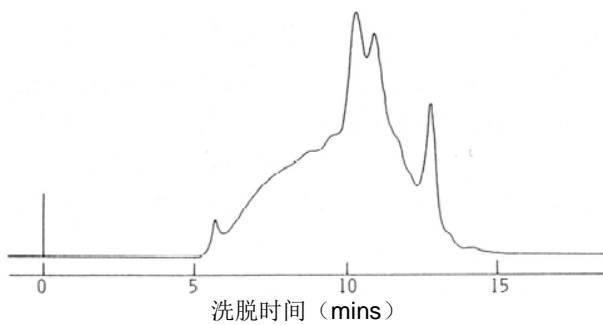


图 14 菠菜粗提物 (25 µL) 的分离

除色谱柱不同外，色谱条件与图 10 中相同。

色谱柱: TSKgel G4000SW_{XL}, 7.8 mm ID x 30 cm

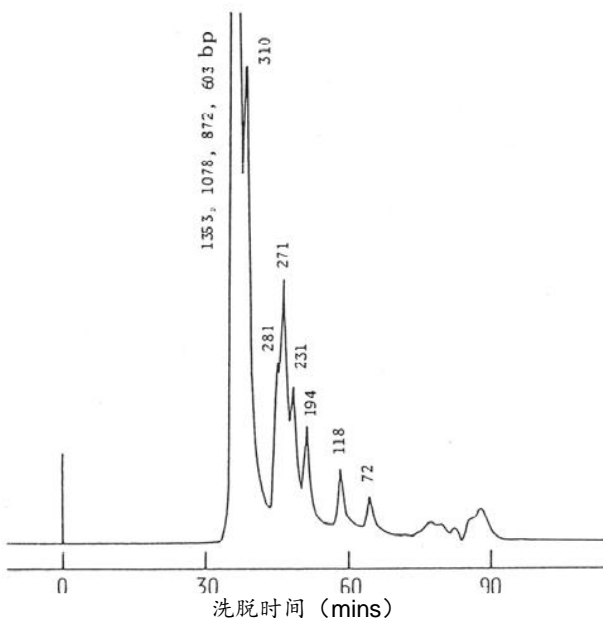


图 15 ϕ X174 RF DNA-Hae III 消化产物 (4.5 µg/50 µL) 的分离

色谱柱: TSKgel G4000SW_{XL}, 7.8mm ID x 30cm

溶剂: 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)+ 0.3 mol/L NaCl + 1 mmol/L EDTA

流速: 0.15mL/min

柱温: 25°C

检测: UV@260 nm

5. 总结

TSKgel SW_{XL} 色谱柱使用粒径更小的填料，与传统的 TSKgel SW 色谱柱相比，分离性能大大提高。本系列中 30 cm 的色谱柱提供的分离性能与传统的 60 cm TSKgel SW 色谱柱提供的分离性能相当，甚至更高。这使其具有几方面的优势，如分析时间和溶剂用量均减半。同时，由于无样品荷载量的变化，样品的稀释可以保持最小。

当初，TSKgel SW_{XL} 色谱柱才刚刚问世没多久，就凭借其性能的优势，在 GFC 领域中成为了生物聚合物分析的黄金标准。

有关 TSKgel SW_{XL} 和 4 微米 Super SW 用于更高效凝胶过滤色谱 (GFC) 的更多信息，我们建议您阅读后续的其他分离报告，此类报告可登录网站 www.separations.asia.tosohbioscience.com 获取：

SR062: 利用 TSKgel G3000SW_{XL} 色谱柱通过高效凝胶过滤色谱 (GFC) 分离 IgG 和白蛋白

SR095: TSKgel SuperSW 系列色谱柱



TOSOH

TOSOH BIOSCIENCE

东曹（上海）生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区虹梅路 1801 号 A 座 10F, 1001 室

电话：+86-21-34610856 传真：+86-21-34610858

电子邮件：info@tosoh.com.cn

网址：www.separations.asia.tosohbioscience.com