



TSKGEL 色谱柱使用中的常见问题及故障排除

东曹（上海）生物科技有限公司
Tosoh Bioscience Shanghai Co., Ltd.
2010.10

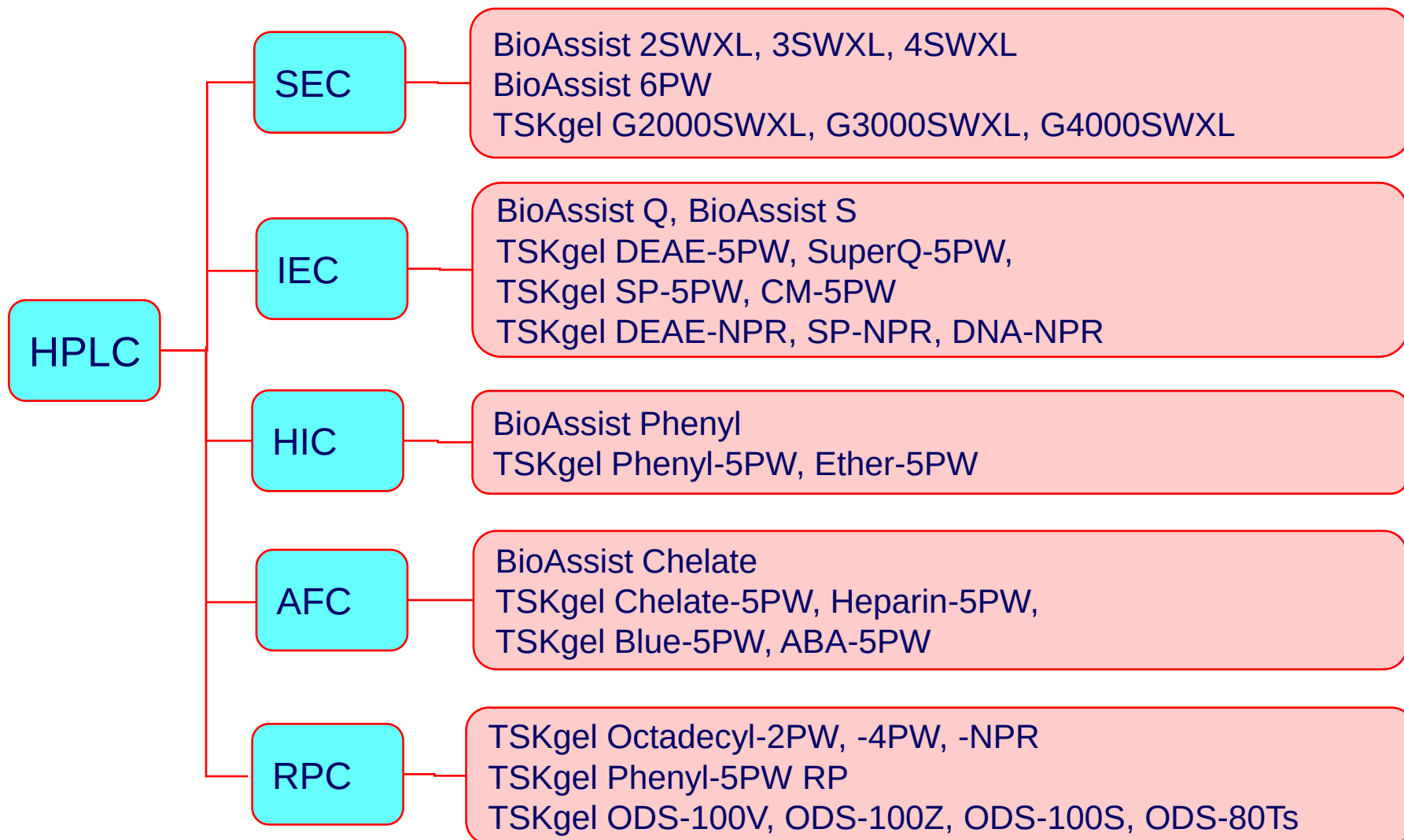


内容概要

- 尺寸排阻色谱 (SEC/SW)
- 离子交换色谱 (IEC)
- 疏水反应色谱 (HIC)
- 亲和色谱 (AFC)
- 反相色谱 (RPC)
- 正相色谱 (NPC/HILIC)
- 保护柱
- FAQ



生物分离色谱柱-TSK-GEL BioAssist 系列及其他





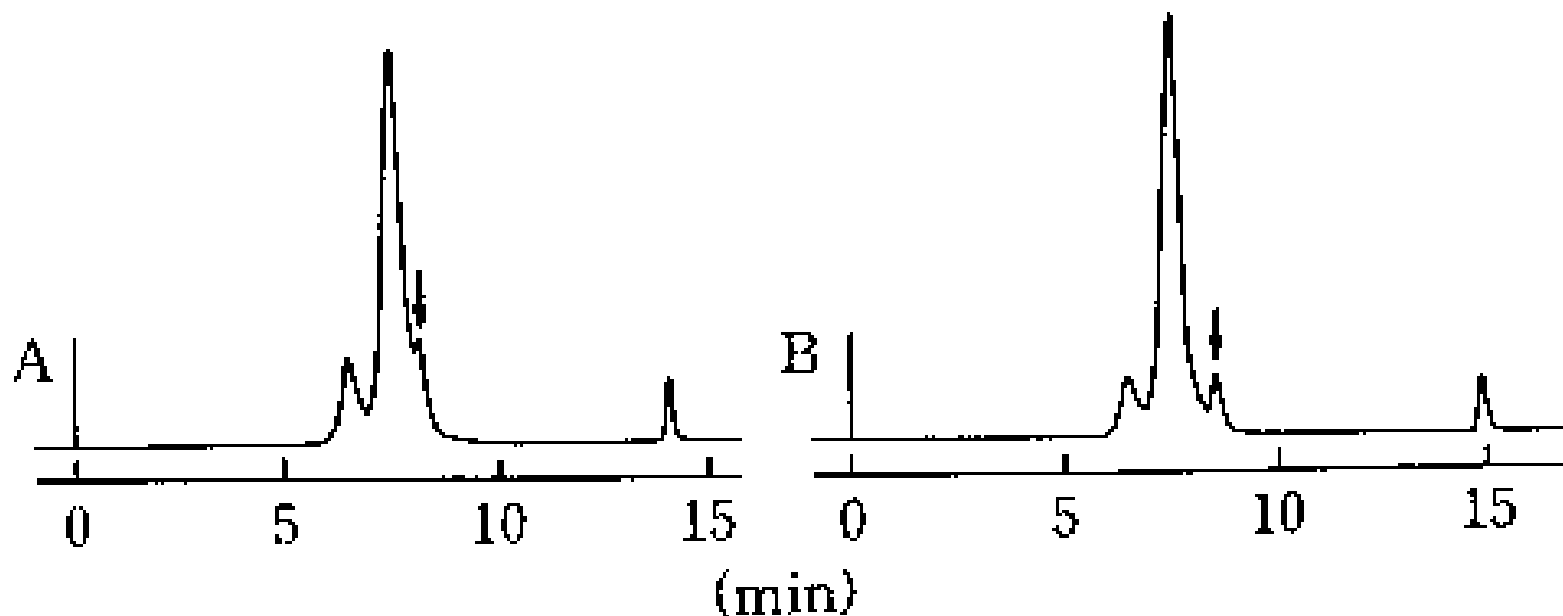
故障排除：尺寸排阻色谱柱 (SW)

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 0.3 (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）有可能发生非特异性吸附（疏水）。 (a) 在实际分析之前先进样数次（总共上样约1mg左右，如：质粒样品） 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）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

注; PW 系列的色谱柱有时也会和SW系列一样发生疏水性吸附的问题。



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



故障排除：离子交换色谱 (IEC)

问题		原因和解决方法	
1	样品吸附不够充分	1	样品溶液中的离子强度太高 (a) 通过透析或用缓冲液（非盐缓冲液）来对样品溶液脱盐处理 特别是在下一步中将会使用疏水模式的样品应该按照以上方法处理
		2	样品溶液的pH值与缓冲液的不同 (a) 通过透析来对样品溶液脱盐处理
2	进样若干次后对样品的吸附能力逐渐下降	1	样品中的疏水性杂质吸附在填料上干扰了正常的结合 (a)使用酸性溶液或碱性溶液进行清洗 (b)使用有机溶剂清洗
3	当上样量放大后，回收率变低了	1	长时间的上样过程中，样品发生变性或疏水性吸附 这种情况发生在使用低盐缓冲液上样过程超过1个小时的时候 (a) 浓缩样品缩短上样时间 (b)添加不会干扰结合的盐(0.05-0.1 M NaCl)
4	pH在入口和出口处不同，即很难平衡 (重现性非常不好)	1	缓冲液中的离子与填料基质结合形成了离子对。 (a) 按照离子交换填料的官能团选择合适的缓冲液 (匹配的; DEAE-5PW/amine-buffer, 不匹配的; DEAE-5PW/phosphate or acetate) (b) pH 梯度应该在由不同pH缓冲范围的缓冲液组成的混合液中进行
5	在线性梯度的同一洗脱位置重复出现鬼峰	1	流动相中的离子性杂质聚集并被洗出。 (a) 使用高纯度的溶剂（phosphate, Tris, Guanidine/HCl等） 鬼峰甚至重复出现在空白梯度的同一洗脱位置。 峰高取决于平衡时间(杂质含量) 另一方面，不稳定的（非重复的）鬼峰与仪器的不稳定有关系。



选择合适的缓冲体系

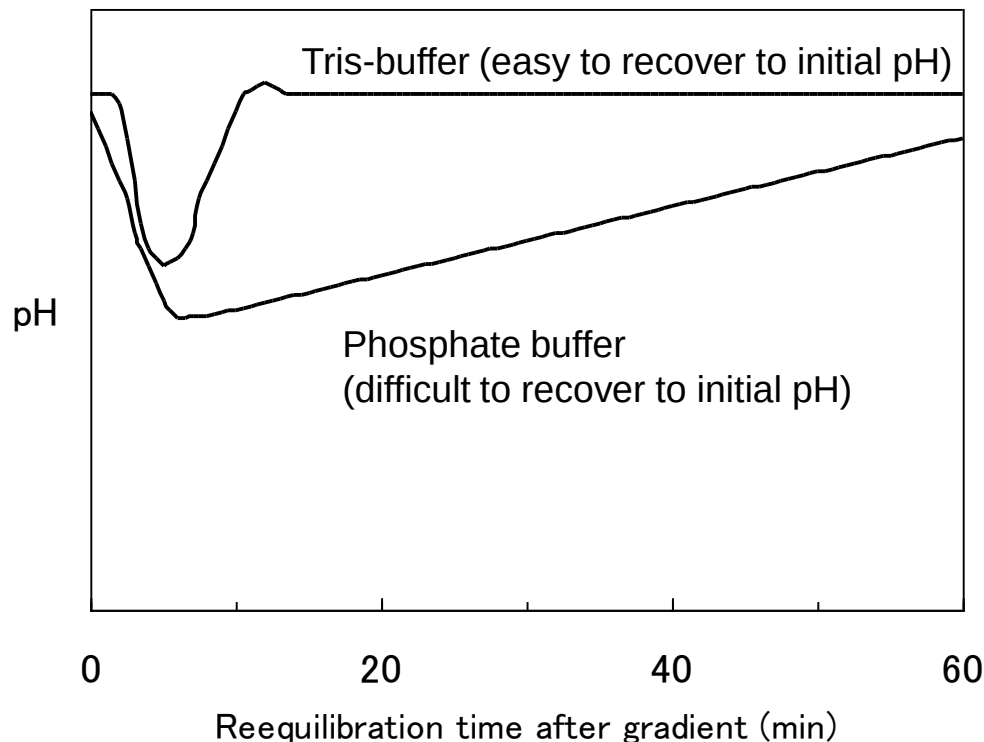
阴离子交换填料 (DEAE-, Q-Type)		阳离子交换填料 (CM-, SP-Type)	
Buffer (阳离子性)	pH range	Buffer (阴离子性)	pH range
N-methylpiperadine	4.5 - 5.0	Formate	3.8 - 4.3
Histidine	5.5 - 6.4	Citorate	3.6 - 6.5
bis-Tris	5.8 - 6.4	Acetate	3.5 - 5.5
Imidazol	6.5 - 7.7	MES	5.5 - 6.7
Tris - ethanolamine	7.3 - 9.0	Phosphate	5.5 - 8.0
Tris	7.5 - 9.0	HEPES	7.6 - 8.2
1,3-diaminopropane	8.5 - 10.3	BICINE	8.2 - 8.7

* 避免使用会与离子交换填料上的功能基团结合的缓冲液
(如: DEAE-5PW /phosphate or acetate)



在离子交换填料的洗脱出口处不稳定的pH值

不匹配的离子交换填料与缓冲液



DEAE-5PW: positive charges

Tris : positive charges

Phosphate : negative charges

Column ; TSKgel DEAE-5PW (7.5mm I.D. × 7.5cm)

Eluent; A: 20mmol/l Tris-HCl buffer

B: 20mmol/l Phosphate buffer

A → A + 0.5mol/l NaCl (60min linear gradient)

B → B + 0.5mol/l NaCl

Flow rate ; 1.0mL/min

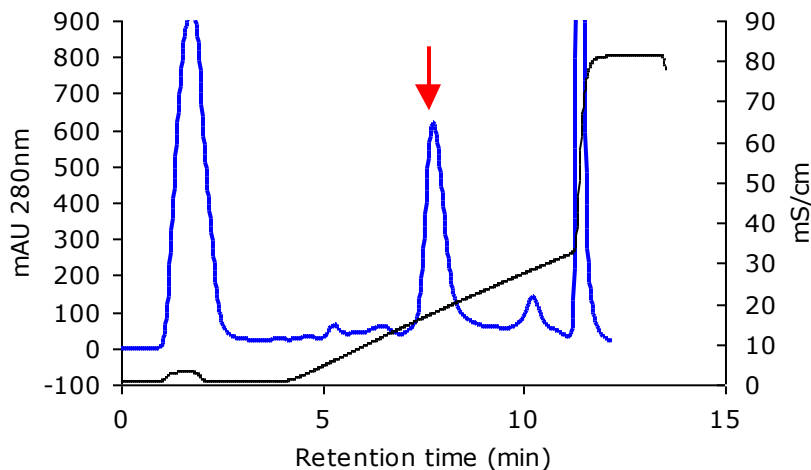
Temperature ; Ambient Detection ; pH monitor



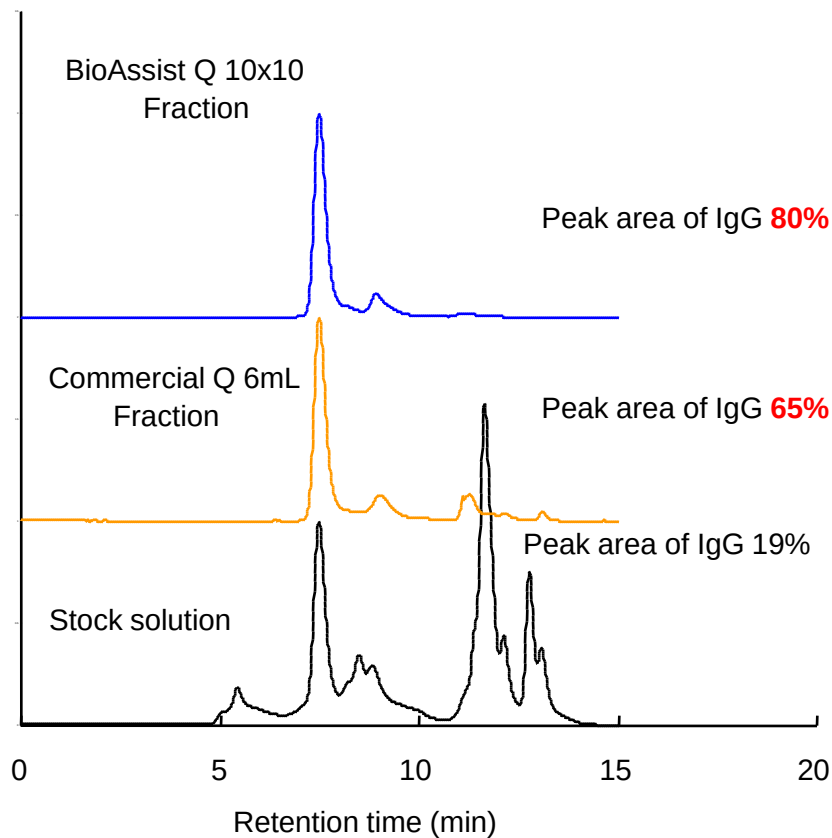
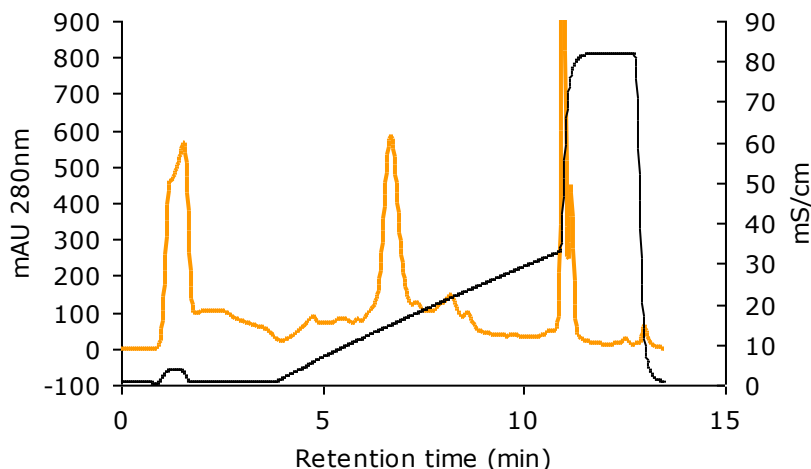
使用大孔径的IEC色谱柱纯化蛋白质

单抗的分辨率大大改进

BioAssist Q 10x10 Methacrylate type



Commercial Q type 6mL Styrene type



Purity check of Mab Samples on TSKgel
G3000SWXL



AIEC模式下样品上样量的经验值一览

避免过载

AIEC	Binding capacity*	Column size(mm I.D. x mm Height)							
		2 x 75	4.6 x 35	5 x 50	7.8 x 50	8 x 75	10 x 100	21.5 x 150	22 x 200
Column volume (ml)	(mg/ml gel)	0.2	0.6	1	2	4	8	54	76
DEAE-NPR	3	—	0.6	—	—	—	—	—	—
BioAssist Q	84	—	—	28	-	—	221	—	—
DEAE-5PW	30	2	—	10	-	38	—	540	—
SuperQ-5PW	93	7	—	31	-	118	—	1,674	—
DEAE-Toyopearl	30	—	—	10	24	38	79	540	760
SuperQ-Toyopearl 650	130	—	—	43	104	165	342	2,340	3,293
QAE-Toyopearl 550C	70	—	—	23	56	89	184	1,260	1,773

结合载量是通过溶菌酶来计算的

BioAssist S ; 4.6 mmID x 50 mm

降低上样量可以提高分离度

样品载量会因为杂质含量的不同而有所区别

蓝色标注的是商品化的色谱柱规格



CIEC模式下样品上样量的经验值一览

避免过载

CIEC	Binding capacity*	Column size (mm I.D. x mm Height)							
		2 x 75	4.6 x 35	5 x 50	7.8 x 50	8 x 75	10 x 100	21.5 x 150	22 x 200
Column volume (ml)	(mg/ml gel)	0.2	0.6	1	2	4	8	54	76
SP-NPR	5	—	1	—	—	—	—	—	—
BioAssist S	90	—	—	30	-	—	237	—	—
SP-5PW	54	4	—	18	-	68	—	972	—
CM-5PW	48	4	—	16	-	61	—	864	—
SP-Toyopearl 650	50	—	—	17	40	63	132	900	1,267
SP-Toyopearl 550C	100	—	—	33	80	127	263	1,800	2,533
MegaCap SP-550EC	108	—	—	36	86	137	284	1,944	2,736
CM-Toyopearl 650	40	—	—	13	32	51	105	720	1,013

结合载量是通过溶菌酶来计算的

BioAssist S ; 4.6 mmID x 50 mm

降低上样量可以提高分离度

样品载量会因为杂质含量的不同而有所区别

蓝色标注的是商品化的色谱柱规格



故障排除：疏水反应色谱 (HIC)

问题		原因和解决办法	
1	样品未被洗脱（吸附太强）	1	样品与填料间的反应太过强烈。 (a) 使用疏水性相对较弱的柱子 (如：Ether-5PW替代Phenyl-5PW) (b) 添加5 %的有机溶剂（异丙醇、乙醇等）或2 M 尿素于流动相中
		2	样品在进样前发生沉淀。 (a) 将硫酸铵的浓度降低到0.5M来确认样品的溶解性
2	样品较早溶出并且峰形很宽	1	样品溶液中的硫酸铵浓度太低。 (a) 将样品中的硫酸铵浓度增加到至少1M (将等体积的样品溶液与硫酸铵溶液混合)
3	基线不稳 (出现鬼峰)	1	缓冲液试剂中的杂质被梯度洗脱。 (a) 使用高纯度的试剂 (酶纯化级别的试剂). 鬼峰甚至重复出现在空白梯度的同一洗脱位置。 峰高取决于平衡时间 (杂质含量) 另一方面，不稳定的（非重复的）鬼峰与仪器的不稳定有关系。

注：第一次尝试时推荐首选 Phenyl-5PW 色谱柱（可在较宽范围内吸附蛋白样品）

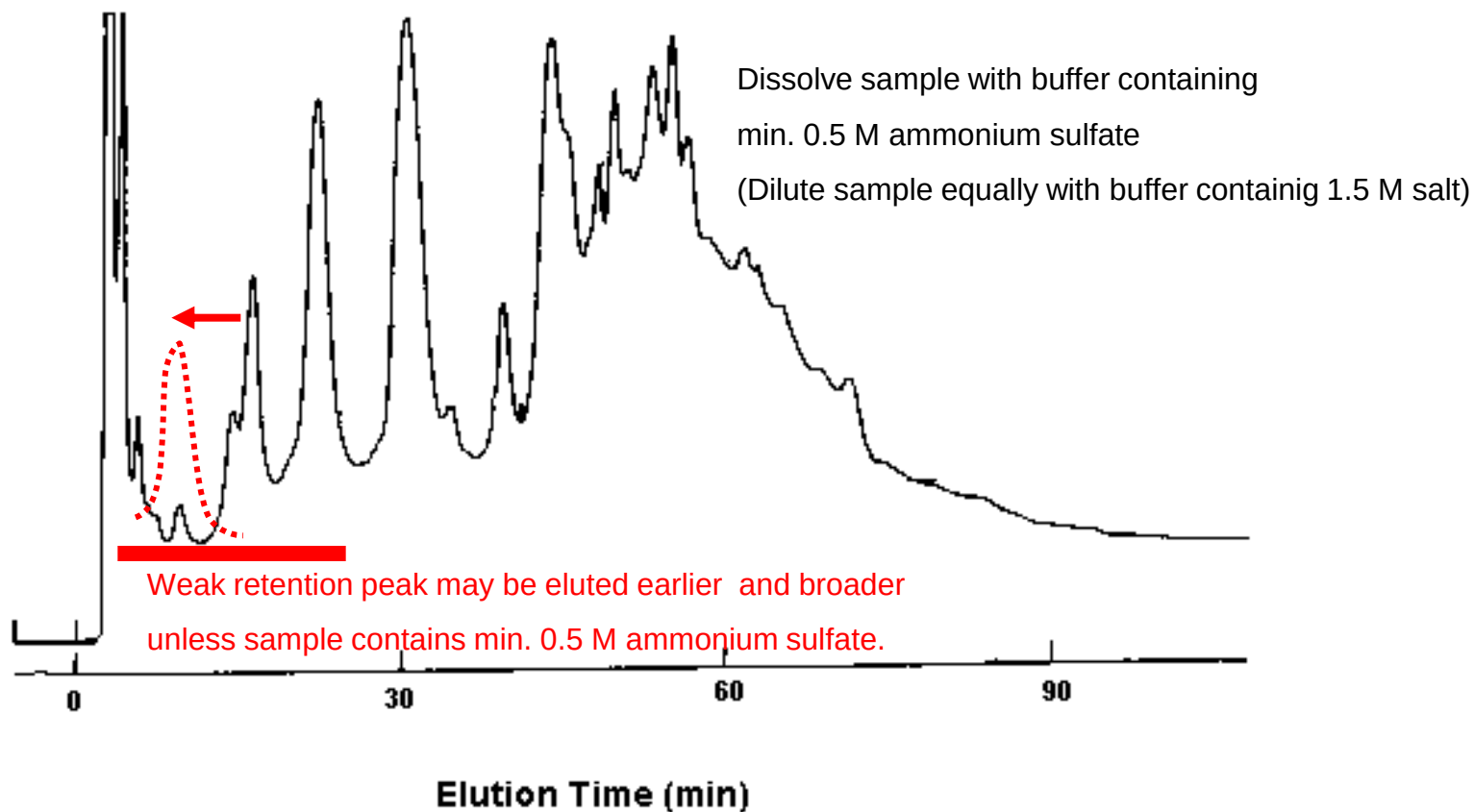
有些蛋白因为填料的疏水性太弱而不能被 Ether-5PW 吸附。

对于 HIC，在使用前可以先将流动相过滤，因为有时试剂中会含有一些沉淀物。



峰形展宽

HIC对样品的分离效果



Column; TSKgel Phenyl-5PW 7.5 mmI.D. x 7.5 cm

Elution; A 60 min linear gradient of ammonium sulfate from 1.5 M to 0 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)
at a flow rate of 1.0 ml/min, detected by UV absorbance at 280 nm



HIC模式下样品上样量的经验值一览

避免过载

HIC	Binding capacity*	Column size (mm I.D. x mm Height)							
		2 x 75	4.6 x 35	5 x 50	7.8 x 50	8 x 75	10 x 100	21.5 x 150	22 x 200
Column volume (ml)	(mg/ml gel)	0.2	0.6	1	2	4	8	54	76
Butyl-NPR	5	—	1	—	—	—	—	—	—
Ether-5PW	20	1.6	—	7	—	25	—	360	—
BioAssist Phenyl-5PW	25	2	—	8	20	32	66	450	—
Ether-Toyopearl 650	31	—	—	10	25	39	—	558	785
PPG-Toyopearl 600	35	—	—	12	28	44	92	630	887
Phenyl-Toyopearl 650	39	—	—	13	31	49	103	702	988
Butyl-Toyopearl 650	40	—	—	13	32	51	105	720	1,013
SuperButyl-Toyopearl 550C	52	—	—	17	42	66	137	936	1,317
Hexyl-Toyopearl 650	40	—	—	13	32	51	105	720	1,013

BioAssist Phenyl ; 4.6 mmID x 50 mm

降低上样量可以提高分离度

样品载量会因为杂质含量的不同而有所区别

蓝色标注的是商品化的色谱柱规格



故障排除：亲和色谱 (AFC)

色谱柱	问题	原因和解决办法
Chelate-5PW	1 样品的吸附很弱	1 金属离子键合量过低或键合了不匹配的金属离子。 (a) 注入用蒸馏水溶解后的金属离子。 (b) 使用铜离子(Cu ²⁺) 来代替锌离子(Zn ²⁺)。
	2 样品的吸附逐渐变弱	1 分离时金属离子脱落。 (a) 对于锌离子，每次上样后都要使用EDTA来清洗和再生。 (b) 对于铜离子，每上5次样后都要使用EDTA来清洗和再生。
		2 流动相缓冲液与填料上的金属离子发生螯合。 (a) 避免使用氨衍生缓冲液如Tris、柠檬酸盐缓冲液。
	3 样品吸附太强	1 金属离子与样品间的相互作用太强。 (a) 使用螯合能力相对较弱的金属离子，如：锌或镍 (b) 具有很强吸附能力的样品可以使用 20 mM EDTA + 0.5 M NaCl来稀释。
		2 样品发生了离子交换作用而不是螯合作用。 (a) 向流动相缓冲液中加入盐(0.5 M NaCl)。
Boronate-5PW	1 样品的吸附很弱	1 推测可能是二硫键不够稳定。 (a) 向吸附缓冲液中添加10 mM的MgCl ₂ 。
Tresyl-5PW	目标分子的吸附载量与通过固定配体含量来预测的数字相比，显得特别低	1 配体蛋白变性，不能按照正常的AFC多位点吸附来进行。 (a) 缩短配对时间。 (b) 使用高浓度的配体溶液来配对。



故障排除：反相色谱 (RPC)-(1)

问题		原因和解决办法	
1	基线不稳定 (出现鬼峰)	1	由水中或试剂中的有机杂质所引起。 (a) 使用超纯蒸馏水或HPLC级别的蒸馏水。 (b) 在使用前先将流动相在ODS柱上流过滤。
		2	脱气不充分 (与设备相关) (a) 在使用前脱气或使用脱气溶剂。TFA 在脱气后加入。
		3	流动相中的TFA发生降解。 (a) 在分析前现配TFA溶液。
2	即使使用空白梯度，在线性梯度的同一洗脱位置重复出现鬼峰	1	流动相中的疏水性杂质富集并被洗脱。 (a) 使用高纯度的试剂，（如磷酸、硫酸盐、TFA等） 鬼峰面积随着平衡时间的增加，杂质富集而增加。 另一方面，不稳定的（非重复的）鬼峰与仪器的不稳定有关系。
3	样品在高碳含量的ODS柱中保留不好	1	固定相在低有机溶剂浓度(<50%)的环境中作用并不是很充分。（流动相含水量高） (a) 使用单层键合含碳量较低的(15%) 的ODS柱，如： ODS-80Ts。 (b) 使用正相色谱来代替。
4	离子性样品洗脱的重现性不好	1	流动相的pH值与离子性样品的pKa值很接近。 (a) 使用与样品pKa值相差1.5以上的流动相pH值。
5	样品的保留不好 (样品洗脱呈2个峰但峰形很宽)	1	样品用有机溶剂溶解后加速了洗脱。 (a) 至少使用与洗脱液开始浓度的有机溶剂、或与其浓度相仿的有机溶剂来溶解样品。



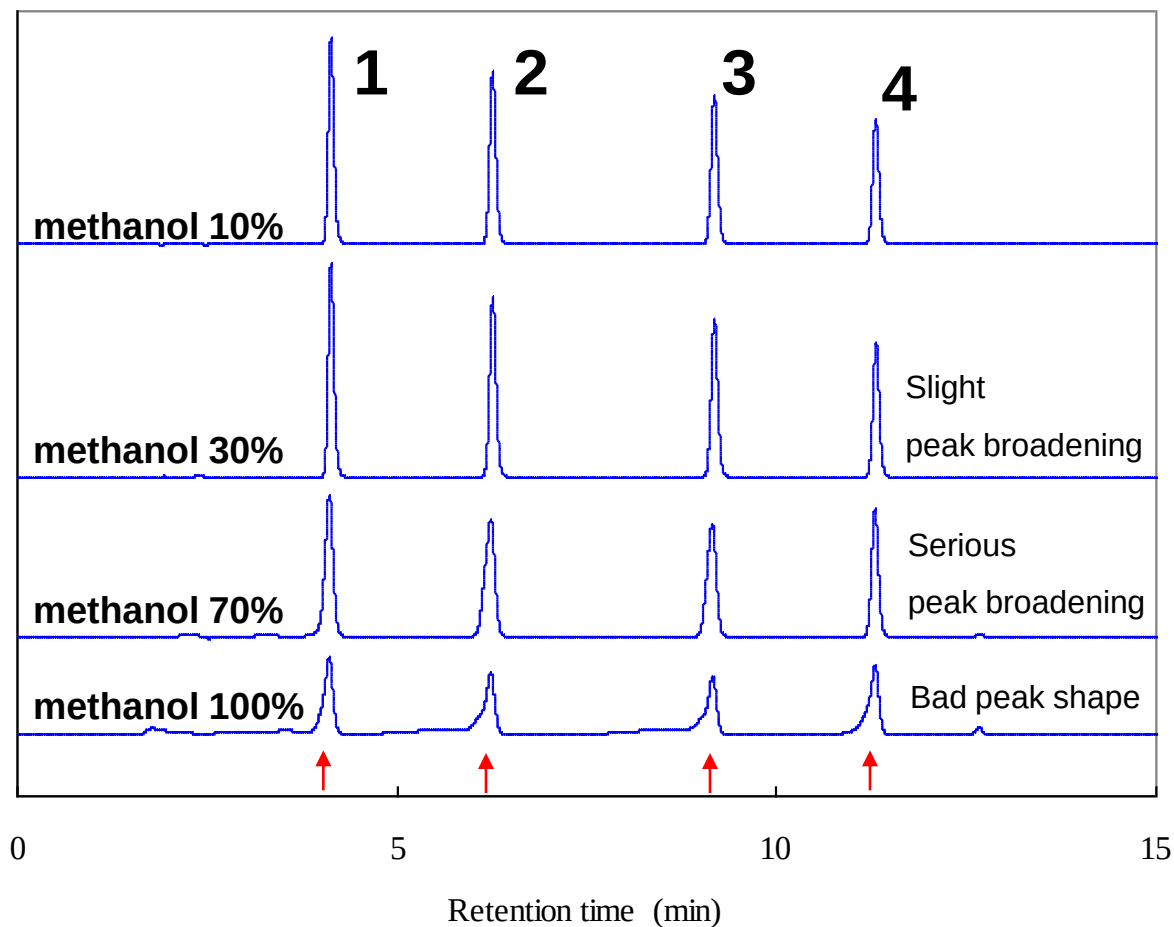
故障排除：反相色谱 (RPC)-(2)

问题		原因和解决办法	
6	多肽样品保留不好	1	填料的疏水性太弱。 (a) 使用硅胶基质的ODS柱代替树脂基质的反相柱。 (b) 添加离子对试剂，如：TFA (0.2 %)
	(出峰太快)	2	流动相的重新平衡不充分 (a) 使用不含有机溶剂的流动相来平衡至少需要1个小时来得到重复性好的谱图。即使使用分析柱时也一样。
7	蛋白质样品的吸附很弱	1	样品溶液中的蛋白质变性不充分。 (a) 用最初的流动相 (如：0.05 % TFA) 来溶解或稀释蛋白样品并促成蛋白变性。 (b) 增加离子对试剂的浓度，如：大于 0.05 %的TFA
8	蛋白或多肽样品不能充分洗脱 (吸附太强)	1	填料与样品的作用太强了。 (a) 降低离子对试剂的浓度，如：低于 0.02 %的TFA (b) 提高流动相的 pH值。(根据 pH 的变化，选择性也会发生变化) 对于ODS柱，用 50 mM 的磷酸缓冲液将pH提高到7.0 对于树脂基质的柱子，用50 mM的Na ₂ HPO ₄ 将pH提高到9.5
	(蛋白或多肽的回收率很低)	2	色谱柱填料的孔径太小了 (或疏水性太强) (a) 使用更大孔径的柱子，如：TSKgel Phenyl-5PW RP



峰形展宽 (1)

RPC下样品溶液中不同浓度有机溶剂的影响比较



Column: TSKgel ODS-100V
(4.6mm I.D. x 15cm)

Eluent:

A; 10mM

NaH₂PO₄/CH₃CN=85/15 B;

10mM NaH₂PO₄/CH₃CN=30/70

Gradient:

0min(B ; 0%)→15min(B ; 75%)

Flow rate: 1.0mL/min

Detector: UV (265nm)

Injection vol.: 20μL

Concentration: 10μg/L

Column temp.: 40°C

1: sulfisomidine

2: sulfamerazine

3: sulfamethoxazole

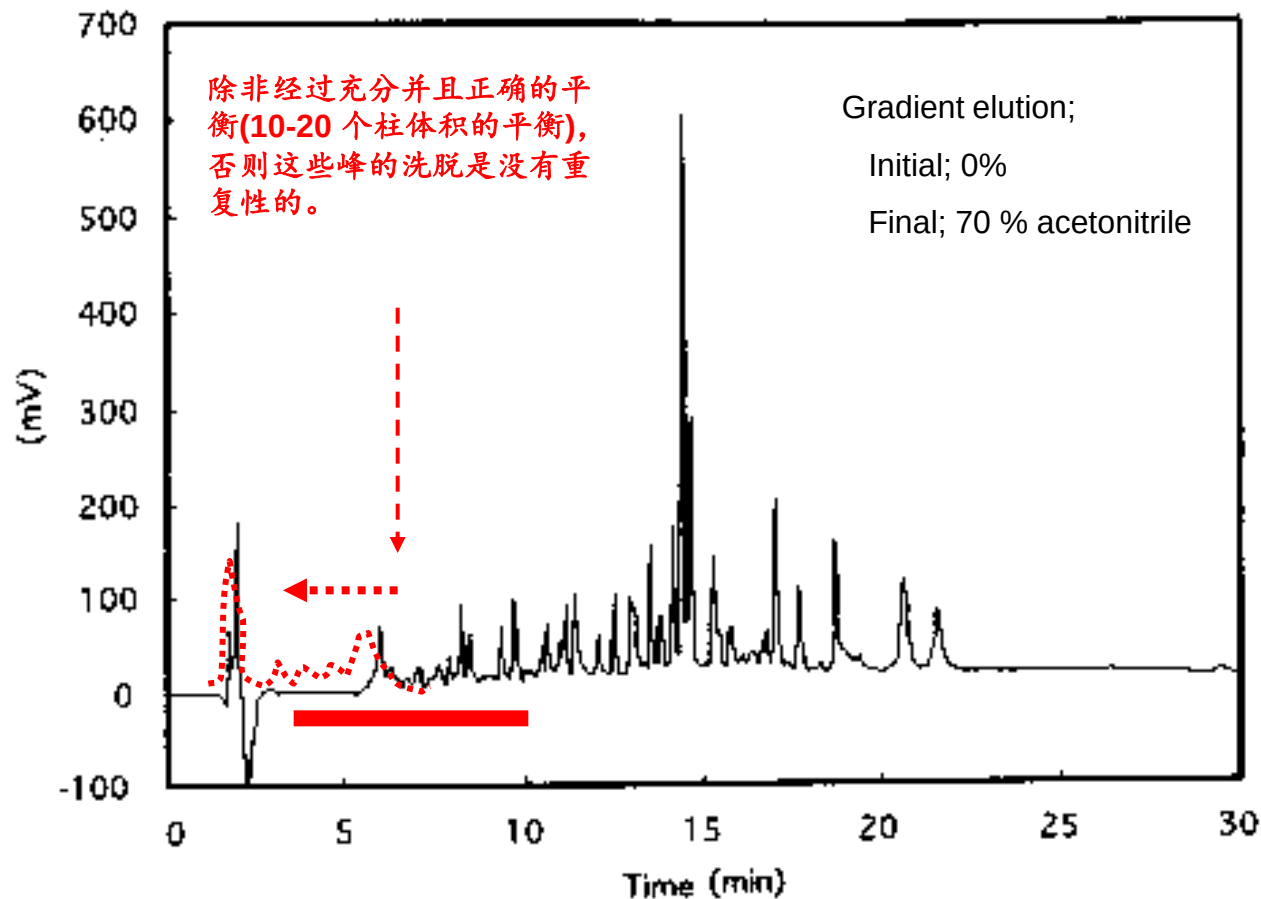
4: sulfaquinoxaline

样品溶液中的有机溶剂浓度应当不高于初始流动相中有机溶剂的浓度



峰形展宽 (2)

RPC下重现性良好的多肽消化物的分离



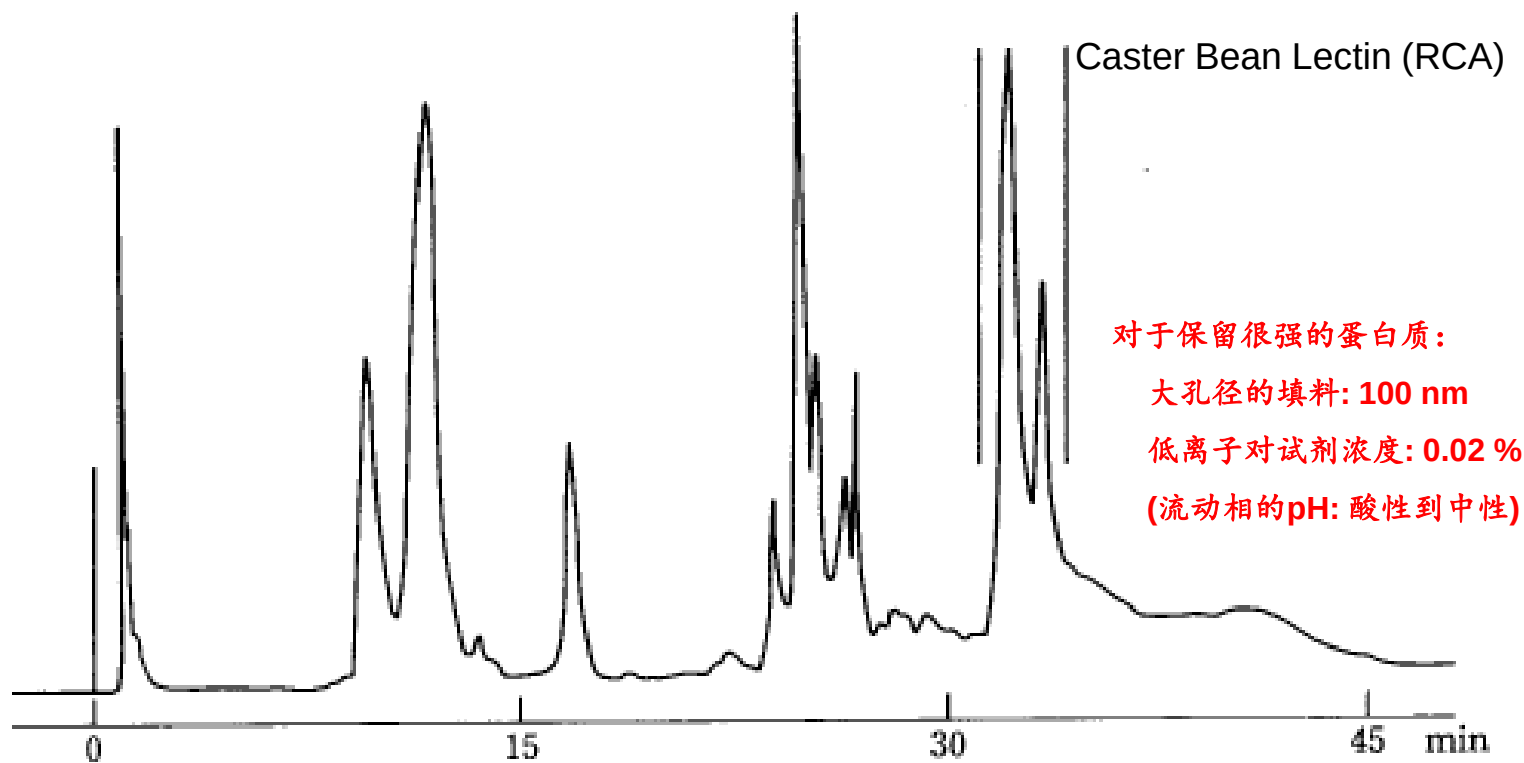
Column; TSKgel ODS-80Ts (2 mm I.D. x 15 cm)

Elution; A 30 min linear gradient of acetonitrile from 0 to 70 % in 0.1 % TFA at a flow rate of 0.2 ml/min, detected by UV absorbance at 215 nm.



RPC保留太强、回收率很低

大孔径填料和离子对试剂的影响



Column; TSKgel Phenyl-5PW RP 4.6 mm I.D. x 7.5 cm

Elution: A 44 min linear gradient of acetonitrile from 5% to 60 % in 0.02 % TFA

at a flow rate of 1.0 ml/min, detected by UV absorbance at 220 nm



故障排除：正相色谱 (NPC, HILIC)

问题		原因和解决办法	
1	样品的吸附不充分	1	有机溶剂浓度太低（流速太快）。 (a) 用含有高浓度有机溶剂的溶液来溶解样品。 但是，要注意防止样品在溶液中发生沉淀。 (b) 减少样品的进样量。
		2	进样量太大。 (a) 进样量小于50微升（小于 200微克）。
2	在Amide-80柱上，同一样品洗脱出2个峰	1	在Amide型色谱柱上分离出了样品的异构体 (Amide-80)。 (a) 在 80℃下进行分析以消除异构体的影响。 (b) 添加100 mM的三乙胺。（不需要升高分析温度） (c) 使用NH2 型色谱柱。
3	使用NH2型色谱柱时，还原性多糖的回收率很低	1	样品与填料基质上的Shiff's碱发生作用。 (a) 使用Amide型色谱柱(Amide-80)。



保护柱

更换保护柱

- 1 使用保护柱或保护胶来保护分析柱。
- 2 发生时，检查一下是否可以通过更换保护柱来解决问题。
- 3 用高纯度（过滤后的）标准品来验证柱效，检查有无保护柱时谱图是否发生变化。
- 4 如果问题的发生仅是因为保护柱，那么更换保护柱后，柱效问题就能得到修复。

更换保护柱外的故障排除

症状	原因	故障排除
正常峰形， 但柱压升高很多	不溶物堵住了柱子入口处。	更换或清洗接口
峰形变宽，柱压升高	柱头处的填料柱床发生塌陷。	柱子已经劣化了，更换柱子
柱压正常，但峰形发生变化	柱头处由于发生吸附作用填料被污染 (有时是接口处吸附并累计不溶物所造成的)	根据操作说明清洗柱子
峰开叉	柱中填料间出现缝隙（形成多流路）	柱子已经劣化了，更换柱子



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。我该怎样修复？	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。



FAQ:分子尺寸排阻色谱 (GPC)

问题	回答
我想用DMF作为流动相来进行SEC分析，应该使用哪种聚合物标准品，聚乙烯还是聚苯乙烯？	疏水型苯乙烯基质的色谱柱(H type)，可以使用环氧苯乙烯 (PEO) 和 聚乙二醇 (PEG) 作为标准品。 亲水型甲基丙烯酸基质的色谱柱 (Alpha type)，可以使用聚苯乙烯 (PS)。 苯乙烯基质的色谱柱可以用PS作为分子量较高的标准品，而不能使PEO。
使用有机溶剂的SEC分析为什么需要使用参比色谱柱？	SEC分析一般采用双流路的示差 (RI) 检测，样品流路和对照流路同时有流动相流过。 在对照流路安装参比色谱柱可以抑制RI检测器基线的漂移，使基线更稳定。
我在做SEC分析时，使用了含有胺类或酸类的流动相，我还可以使用该色谱柱分析其他流动相中不含此类添加剂的样品吗？	推荐将流动相中添加了此类物质的色谱柱作为专用柱。 此色谱柱再做其它样品时峰型可能会发生很大变化。



FAQ:对于小分子化合物 (RPC, NPC, IEC)

问题	回答
TSKgel ODS-80TM和TSKgel ODS-80Ts有什么不同?	两者的基本特性是相同的。但是 TSKgel ODS-80Ts 的封端处理比 TSKgel ODS-80TM做得更好。另外, 推荐使用TSKgel ODS-80Ts 来分离碱性化合物 (特别是带正电荷的)。
用反相来分析多肽样品时, 离子对试剂TFA的浓度应该如何控制?	通常使用0.05%到0.1%的TFA。但是, 多肽样品分子越大, 保留越强回收率越低。因此, 需要使用较低浓度的 (如: 0.02-0.05%) TFA。
TSKgel Amide-80 可以使用什么流动相?	流动相中的水低于55 % (v/v)。TSKgel Amide-80典型的流动相比例有 乙腈/水 (v/v)= 90/10到 45/55。
我发现 TSKgel Amide-80 将一个纯的多糖样品分离成两个峰, 这是怎么回事, 如何才能洗脱成一个峰?	具有还原性末端的多糖会形成异构体, 从而分出两个峰。可以通过将温度升至80度或者向流动相中添加三乙胺之类的胺类化合物来避免这种异构体的分离。

问题	回答
分离多糖和有机酸样品可以选择哪种色谱柱?	TSKgel SCX (H+) 可被用来分离非离子性的单糖与二糖以及离子性有机酸, 流动相采用 0.1 %的磷酸。 多糖可以采用SEC模式, 有机酸可以采用离子交换模式来分离。 样品的预处理推荐使用TOYOPAK IC-SP cartridge色谱柱来去除阳离子或疏水化合物, 这样可以延长HPLC色谱柱的使用寿命。
使用TSKgel OApak-A做有机酸分析时, 是否总是要安装TSKguardcolumn OApak-P?	TSKguardcolumn OApak-P可以保护分析柱, 并可以去除样品溶液中的阳离子 (如: 钠离子) 和疏水化合物。