

亲和色谱柱

**TSKgel Chelate-5PW**

# 使用说明书





东曹株式会社

TOSOH

## 安全注意事项

为防止财产损失、确保个人安全，请在使用本产品之前，仔细通读本说明书。

### [注意标签]

标签	说明
 <b>警告</b>	警告用户可能存在严重受伤或死亡的危险。
 <b>注意</b>	警告用户可能存在设备损坏或受伤的危险。

### **警告**

#### ■ 远离火源

使用易燃溶剂时，请务必小心。否则可能会导致火灾、爆炸或中毒。

### **注意**

#### ■ 使用环境必须通风良好

如果通风不良，易燃或有毒溶剂可能会导致火灾、爆炸或中毒。

#### ■ 请勿喷洒溶剂

溶剂发生喷洒或泄漏可能会导致火灾、触电、中毒、受伤以及腐蚀。  
清除漏出的溶剂时，请佩戴合适的护具。

#### ■ 请佩戴护目镜和防护手套

有机溶剂和酸属于有害物质，切勿直接接触皮肤。

#### ■ 请小心处理包装

处理不当可能会导致产品破裂或溶剂飞溅。

#### ■ 请勿将本产品用于其他目的

本产品仅可用于分离和提纯，请勿用于其他用途。

#### ■ 请确认化合物的安全性

请确认分离和提纯后的化合物和溶剂安全可靠。

#### ■ 正确废弃

请根据当地法律法规正确废弃。

### **注**

#### ■ 请妥善保管本说明书，以便日后参阅。

## 目 录

1. 简介 .....	1
2. 打开包装 .....	1
3. 色谱柱部件 .....	1
4. 安装及安全注意事项 .....	2
5. 保存色谱柱 .....	3
6. 溶剂 .....	4
7. 操作方法 .....	5
8. 流速 .....	7
9. 使用温度 .....	7
10. 保护柱 .....	8
11. 准备样品溶液 .....	8
12. 测定柱效 .....	9
13. 故障排除 .....	10
14. 质量标准和质量保证 .....	11

## 1. 简介

TSKgel Chelate-5PW 是金属螯合型亲和色谱柱，适用于高分辨率分析。本说明书详细记载了有关如何正确使用和保存该类色谱柱的重要信息，以便充分发挥产品的性能。

## 2. 打开包装

请先确认包装外观及色谱柱是否完整。



图 1 包装外观

然后确认色谱柱配有以下文件：

使用说明书	1 份
检测报告（Inspection Data）	1 份

## 3. 色谱柱部件

### A) 不锈钢色谱柱

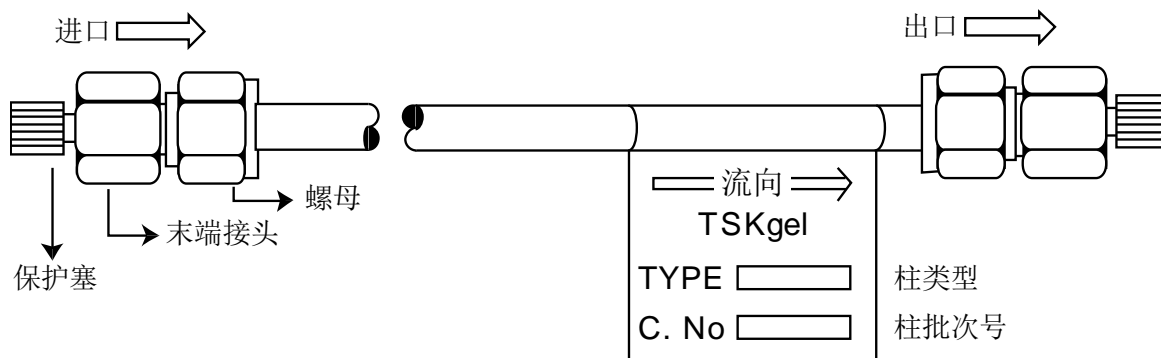


图 2 不锈钢色谱柱

## B) 玻璃色谱柱

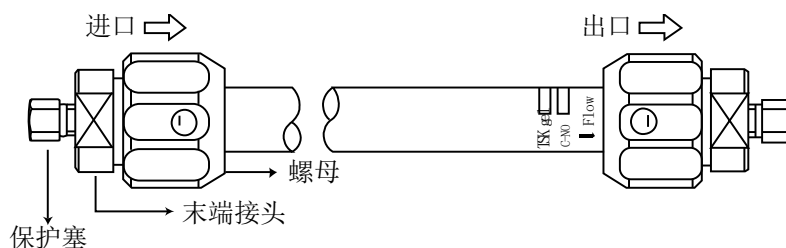


图 3 玻璃色谱柱

## 4. 安装及安全注意事项

### 4-1 连接

不锈钢色谱柱的连接方式为内锁型，而玻璃色谱柱的连接方式为 1/4-28UNF 法兰型连接。不锈钢色谱柱可使用 1/16 英寸的不锈钢管路，而玻璃色谱柱可使用 1/16 英寸的 Teflon 管路。

### 4-2 进液方向

请按图 2 和 3 上标签所示的箭头方向使用色谱柱。长时间反向使用色谱柱会降低色谱柱的性能。

### 4-3 防止气泡

在设备上安装或取下色谱柱时，注意不要在色谱柱内混入气泡。安装色谱柱之前，请务必清除所有管路中的气泡。如果在色谱柱中混入了气泡，则会形成沟槽而降低色谱柱的性能。

### 4-4 安装

取下保护塞，确认色谱柱进口侧的末端接头上有溶剂漏出。确认漏出后，请将色谱柱连接到设备。没有确认到溶剂漏出时，请将色谱柱反向连接到设备。然后，以正常流速一半以下的速度注入溶剂，防止降低柱效。确认漏出的溶剂中没有气泡后，请按正确的流向连接色谱柱。

### 4-5 避免脉动式进液

本款色谱柱很容易受到溶剂脉动式进液的影响。请使用没有脉冲的泵。如果必须使用脉动式泵，请在泵的出口侧连接脉冲阻尼器（抵抗管），抵消脉动。所用阻尼器必须具有较高的耐腐蚀性。

#### **4-6 测定**

避免压力和进液流速剧烈变化，防止柱效降低。在高温条件下进行测定时，请勿在测定后立刻停泵。请继续注入溶剂，直至柱温降至室温为止。如果在柱温较高时停泵，则可能会由于溶剂收缩，导致空气被吸入色谱柱。

#### **4-7 长期保存**

如果短期内不再使用色谱柱，请用含 0.02 %叠氮化钠的中性缓冲溶液保存色谱柱。请从设备上取下色谱柱，并使用保护塞封住色谱柱。

### **5. 保存色谱柱**

#### **5-6 保存方法**

请参阅 4-7 节。

#### **5-2 保存温度**

将色谱柱保存在 2~8 °C 的冰箱。请勿将色谱柱保存在 0 °C 以下环境中，以免冷冻色谱柱，降低柱效。

#### **5-3 暴露于阳光直射**

请勿将色谱柱直接暴露在阳光下。

#### **5-4 腐蚀性气体**

色谱柱的保存位置应避免腐蚀性气体。

## 6. 溶剂

### 6-1 替换溶剂

色谱柱的出厂溶剂是 10 mmol/L 的乙酸盐缓冲溶液。请先用超纯水清洗色谱柱，然后使用其他溶剂替换超纯水。TSKgel Chelate-5PW 采用的是多孔聚合物填料，请避免频繁替换有机溶剂。

### 6-2 pH 值范围

请在 pH 值 2.0~12.0 之间使用。

### 6-3 粘度

使用高粘度溶剂时，压降会升高，容易导致色谱柱、泵和管路等发生故障。

### 6-4 沸点

色谱柱的使用温度高于室温（25 °C）时，请留意溶剂的沸点。

### 6-5 杂质

请尽量使用高纯度溶剂，溶剂中的杂质可能会导致鬼峰。

### 6-6 过滤

分析前，请使用 HPLC 专用溶剂或使用约 0.5  $\mu\text{m}$  的过滤器过滤溶剂防止堵塞，并延长色谱柱寿命。真空过滤或超声处理可以有效去除溶剂中溶解的气体，防止色谱柱混入气泡。

### 6-7 盐浓度

平衡溶液的盐浓度应小于 3 mol/L。

### 6-7 有机溶剂水溶液

建议不要使用浓度超过 20 % 的有机溶剂水溶液。

## 6-8 脱气

替换溶剂时可能会产生气泡（尤其是切换至含有有机溶剂的系统时）。使用前，应将溶剂充分脱气，防止形成气泡。

## 7. 操作方法

### 7-1 选择金属离子

TSKgel Chelate-5PW 色谱柱使用前需要添加金属离子。常用的金属离子为  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$ 。 $\text{Cu}^{2+}$  对蛋白质具有很强的亲和性，有些样品虽然与金属离子的反应较弱，却依然可以与  $\text{Cu}^{2+}$  结合。 $\text{Zn}^{2+}$  的结合力弱于  $\text{Cu}^{2+}$ ，可选择性的结合样品。也可以使用  $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$ 。

### 7-2 添加金属离子

一根 TSKgel Chelate-5PW 色谱柱可以吸收约 60  $\mu\text{mol}$  的金属离子。请将金属离子溶于超纯水，通过样品环注入，使色谱柱中充满金属离子。如果分析时，发生金属离子的干扰（如，UV 检测器检测出金属离子而干扰了分析结果），请注入约 30  $\mu\text{mol}$ （色谱柱金属离子容量的 50%）的金属离子。

### 7-3 选择溶液和 pH 值

添加金属离子后，请使用平衡溶液平衡色谱柱。大部分蛋白质会在 pH 值 7~9 时与金属离子结合，所以可以使用 Tris 和磷酸缓冲溶液。注意不要混入螯合剂，如 EDTA 或柠檬酸。向平衡溶液中添加 0.5~1.0 mol/L NaCl，降低非特异离子性吸附。

### 7-4 洗脱方法

#### 1) pH 梯度洗脱方法

低 pH 值条件下，金属离子和蛋白质的结合力会减弱，所以可以采用 pH 梯度洗脱方法（pH 7.0 到 pH 3.0）洗脱样品。



## 2) 亲和洗脱方法

使用甘氨酸、组胺、咪唑或氯化铵梯度洗脱样品。推荐的盐浓度范围如下：

盐	浓度范围
甘氨酸	0~0.2 mol/L
咪唑	0~20 mmol/L
组胺	0~0.2 mol/L
氯化铵	0~0.5 mol/L

使用咪唑洗脱蛋白质时，金属离子的脱落很少，所以可多次重复进行分析，不需要频繁进行金属离子的还原操作。

## 3) 螯合剂

使用螯合剂，如 EDTA 或 EGTA 洗脱样品。螯合剂会使金属离子脱离基质，和蛋白质结合在一起被洗脱，两者很难分离。

以上三种方法中，亲和洗脱方法效果最好。

以下为典型用例，可采用线性梯度或阶梯梯度的洗脱方法：

(A) 平衡溶液：20 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 + 0.5 mol/L NaCl (pH 8.0)

洗脱溶液：20 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 + 0.5 mol/L NaCl + 0.2~0.5 M 甘氨酸 (pH 8.0)

(B) 平衡溶液：20 mmol/L 磷酸缓冲溶液 + 0.5 mol/L NaCl (pH 7.0)

洗脱溶液：20 mmol/L 磷酸缓冲溶液 + 0.5 mol/L NaCl + 20 mmol/L 咪唑 (pH 7.0)

## 7-5 还原

还原色谱柱，请先用含 50 mmol/L EDTA 和 0.5 mol/L NaCl 水溶液清除金属离子，然后再添加新的金属离子。

## 8. 流速

### 8-1 选择流速

选择流速时，应充分考虑分辨率、分析时间以及色谱柱的寿命。流速越高，分析时间越短。相反，较低的流速更有利于延长色谱柱的寿命，防止柱头塌陷。

### 8-2 推荐流速

如表 1 所示，请使用推荐的流速，请勿超过表 1 中限定的最大流速和压降。

### 8-3 选择粘度

溶剂的粘度越低，可以选择较高的流速。如果使用的溶剂粘度较高，请降低流速。

表 1 推荐流速

产品名称	货号	色谱柱尺寸 mm (I.D.) × cm (L)	推荐流速 (mL/min)	最大流速 (mL/min)	最大压降 (MPa)
TSKgel Chelate-5PW	0008645	7.5 × 7.5	0.5 ~ 1.0	1.2	1.0
	0008646	21.5 × 15.0	4.0 ~ 6.0	8.0	1.5
TSKgel Chelate-5PW Glass	0014440	5.0 × 5.0	0.5 ~ 0.8	1.0	2.0
	0014441	8.0 × 7.5	0.5 ~ 1.0	2.0	1.5

注：超纯水的粘度可以实现以上流速。

## 9. 使用温度

### 9-1 最佳使用温度

本色谱柱的最佳使用温度为 45 °C 以下。

### 9-2 高温条件下测定

使用前，请将溶剂充分脱气。高温条件下的测定结束后，请根据 4-6 项中的内容进行操作。

### 9-3 高温条件下测定的优点

- 1) 提升溶剂的温度可以降低粘度。
- 2) 与室温测定相比，提高了理论塔板数和分辨率。

### 9-4 低温条件下测定

由于溶剂或样品的粘度变大，因此调节流速低于室温操作时的流速。

## 10. 保护柱

最好使用在线过滤器和保护柱保护分析柱。进样 30~40 次后或色谱峰形变差时，应替换保护柱中的填料。保护柱为 TSKgel guardgel Chelate-5PW（货号为 0008647），含有柱套、10 个过滤器和填料。

## 11. 准备样品溶液

### 11-1 准备样品溶液

尽量将样品溶于平衡溶液。

### 11-2 样品前处理

请使用离心法或微孔过滤法预处理样品溶液。即使在样品溶液中看不到任何杂质，也可能存在不溶物质。

### 11-3 样品溶液的成分

请将样品溶液的 pH 值以及盐和有机溶剂的浓度尽可能配制得与平衡溶液一致。样品溶液的进样量较大时，最好将样品稀释或者溶于平衡溶液。如果样品与平衡溶液混合时产生不溶物，则不能使用平衡溶液来稀释或溶解样品。

## 12. 测定柱效

理论塔板数 (N)，不对称因子 (As) 及其色谱分析条件如检测报告所示。

### 12-1 理论塔板数的计算方法

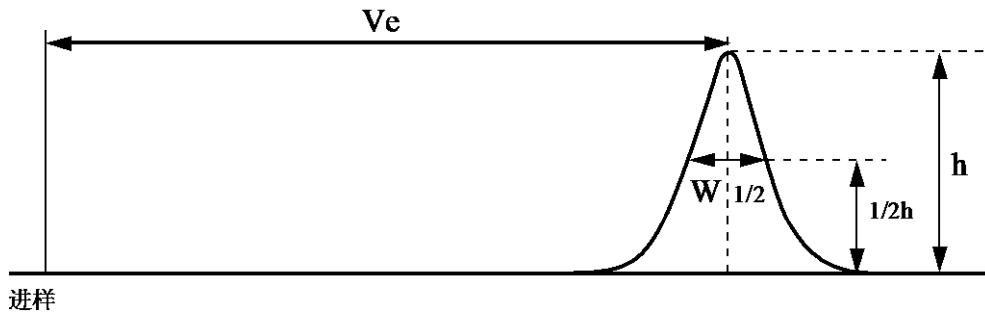


图 4 理论塔板数的计算方法

如图 4 中所示，通过半峰宽法计算色谱柱的理论塔板数 (N)。

$$N = 5.54 (Ve/W_{1/2})^2$$

Ve : 洗脱时间

$W_{1/2}$  : 半峰宽

h : 峰高

### 12-2 不对称因子的计算方法

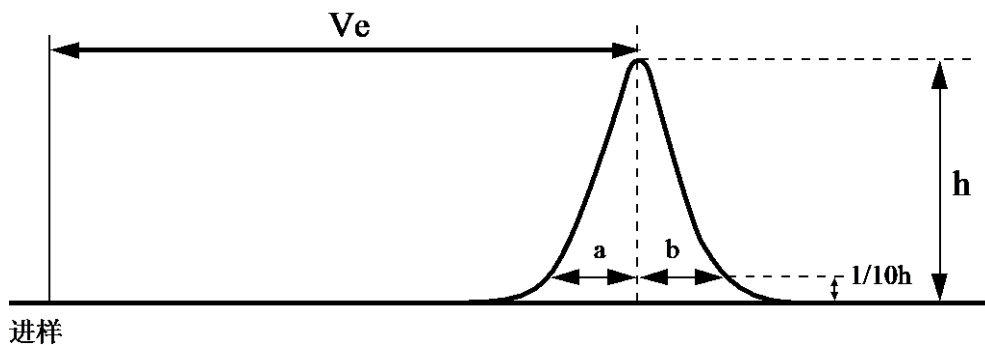


图 5 不对称因子的计算方法

通过 1/10 h 法计算色谱柱的不对称因子 (As)。

$$As = b/a$$

### 12-3 死体积

如果仪器的死体积或样品的进样量过大，则理论塔板数可能会降低。

## 13. 故障排除

使用 TSKgel 色谱柱时，按照以下说明可以避免某些问题的发生。但是，有些问题（如由色谱柱寿命、吸附物质、产生的气泡、填料干燥或溶剂凝固等引发的问题）一旦发生就无法清除，因此使用色谱柱时应非常小心。

### 13-1 玻璃色谱柱中的溶剂泄漏

请使用扳手以  $3\text{ N}\cdot\text{m}$  以下的扭矩拧紧色谱柱上的末端接头和螺母。

### 13-2 末端接头堵塞

如果压降增加，请从色谱柱逆向进液清洗末端接头。如果无法清除堵塞，则必须替换新的接头。请使用新的末端接头替换旧的接头，注意替换时请勿碰到下方的填料。替换后，请参照 4-4 节清除进口侧的空气，确认理论塔板数和不对称因子。

### 13-3 清洗色谱柱

长时间重复使用色谱柱后，洗脱时间有时会发生剧烈变化。此时，选择清洗溶液清洗色谱柱比较有效。

以下为典型的清洗溶液：

- a) 0.1~0.2 N NaOH 溶液
- b) 20~40 %乙酸溶液
- c) 含有有机溶剂的缓冲溶液
- d) 含有尿素和中性表面活性剂的缓冲溶液

请按 (a) 到 (d) 的顺序清洗色谱柱。清洗后，请确认柱效。一般而言，使用 (a) 或 (b) 溶液就可以将色谱柱清洗干净。

## 14. 质量标准和质量保证

### 14-1 检测报告

有关检测条件和检测结果的内容，请参见检测报告。其中，理论塔板数是指单根色谱柱的值。

### 14-2 质量标准

色谱柱的出厂规格如表 2 所示。

表 2 质量标准

产品名称	货号	色谱柱尺寸 mm (I.D.) × cm (L)	理论塔板数 (TP/Column)	不对称因子
TSKgel Chelate-5PW	0008645	7.5×7.5	≧ 1,300	0.8~1.6
	0008646	21.5×15.0	≧ 2,500	0.8~1.6
TSKgel Chelate-5PW Glass	0014440	5.0×5.0	≧ 500	0.7~1.6
	0014441	8.0×7.5	≧ 1,300	0.7~1.6

### 14-3 质量保证

收到产品后，请立即确认色谱柱的外观并检查其性能。如果产品无法达到表 2 中所记载的性能，请在两周内联系东曹销售代表或相关代理店。

注：色谱柱的寿命不属于保修范围。

未经许可，禁止将任何色谱柱寄回东曹（上海）生物科技有限公司。

本书中的内容如有更改，恕不另行通知。

东曹（上海）生物科技有限公司  
上海市徐汇区虹梅路 1801 号 A 区

凯科国际大厦 1001 室

电话：021-3461-0856

传真：021-3461-0858

E-mail: info@tosoh.com.cn

网址: <http://www.separations.asia.tosohbioscience.com/home-cn>

TSKgel, TSKgel SuperMultipore, TSKgel STAT, BioAssist, Lipopropak, TOYOPEARL, ToyoScreen, TOYOPEARL GigaCap, TOYOPEARL

MegaCap, TOYOPAK 以及 EcoSEC 是东曹株式会社在日本, 中国, 美国, 欧盟等的注册商标。

HLC 是东曹株式会社在日本和中国的注册商标。

未经东曹株式会社的书面许可, 禁止影印或复印本书的全部或部分内容。

本书中的内容如有更改, 恕不另行通知。