

XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱和标准品

目录

I. 引言

II. 用于SEC蛋白质分离的系统因素

- 启动
- 色谱柱安装
- 色谱柱平衡
- 用于标定LC系统和XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱的功能性测试

III. 色谱柱指标与用途

- SEC洗脱液与针洗液的制备
- 样品制备
- 色谱柱规格

IV. 故障排除

V. 色谱柱清洗、再生与储存

- 清洗与再生
- 储存

I. 引言

沃特世XBridge® BEH SEC 125Å、200Å和450Å 3.5/2.5 μm 蛋白分析专用柱，设计用于补充现有基于UPLC®的SEC应用，配合传统HPLC系统按SEC方法检测肽或蛋白。这些新的HPLC型SEC填料，基于沃特世亚乙基桥杂化(BEH)颗粒技术及其表面覆盖的二醇基键合相，与已经得到成功运用的UPLC SEC柱系列的色谱填料化学性质完全一致。这为了色谱技术人员提供了更多选择，能够基于实验室仪器平台与样品组分分离度情况或样品分析通量需求轻松转换。

所有基于BEH的SEC色谱柱，都是在通过cGMP(现行GMP)和ISO9001认证的工厂里采用超纯试剂生产而得。生产出的每个批次填料，经过一系列标准QC测试(例如，粒径与孔径分布)，之后使用合适的肽和蛋白混标进行特定应用测试。然后，对每一批获得批准放行的填料所装填出的每一根SEC色谱柱，再进行柱效测试。通过这样的质控过程，来确保在研发或对高要求的验证方法提供批与批间、柱与柱间的重现性。



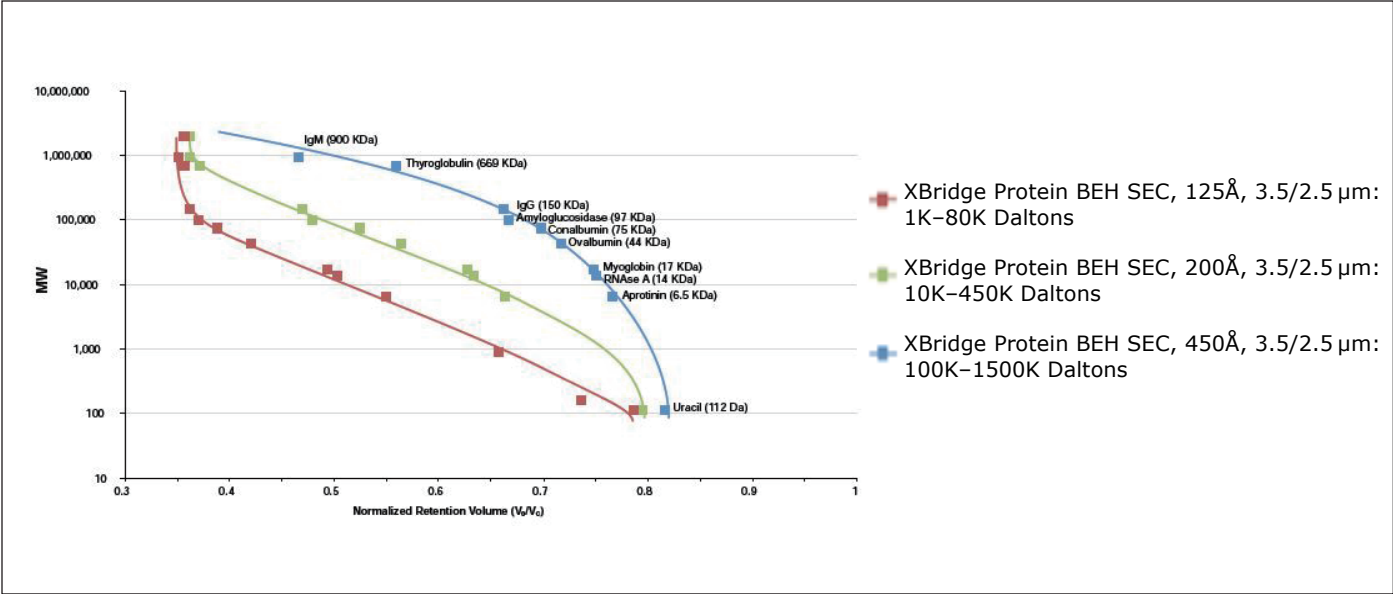


图1. 在XBridge BEH SEC 125Å、200Å和450Å蛋白分析专用柱上的标准曲线。

II. 用于SEC蛋白质分离的系统因素

a.启动

为了获得沃特世 XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱的最佳性能，正确配置您的LC系统很重要。我们建议只使用预切管路，且所有连接管的内径为0.005”或更小，以达到最佳色谱性能。

对于既有LC系统，要进行SEC分析，可能需要进行一些改造。请参考“使用ACQUITY UPLC系统进行分子排阻色谱和离子交换色谱分析蛋白质”(索引号：715002147A)，以获得具体建议，该文献可在 www.waters.com/chemc 查到。

所采用的样品环也可能影响您的分离性能。理想情况下，选择应用所需的最低容量的样品环。不建议使用大于20 µL的样品环。

b.色谱柱的安装

1. 将色谱柱接入系统之前，清除溶剂输送系统中的任何有机溶剂或与水不互溶的流动相。连接色谱柱时，按照色谱柱入口端侧面上指示正确溶剂流向的箭头方向，安装色谱柱。

2. 用新鲜配制的100% Milli-Q水，以0.2 mL/min的流速冲洗色谱柱。
3. 确保流动相从色谱柱出口端顺利流出。用内径为0.004”的管路([部件号430001562](#))，将色谱柱出口端连接至检测器。监视系统压力，确保色谱柱处于其压力限度以内。
4. 逐渐提高流速，每次步进不超过0.1mL/min，如第2步所述。
5. 一旦系统压力稳定了，确保无论是色谱柱进口端还是出口端都没有漏液。

c. 色谱柱的平衡

XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱，保存在20%的甲醇水溶液中装运。在将其转化到不同的流动相体系之前，确保流动相兼容性是至关重要的。最少用10倍柱体积的缓冲液来平衡色谱柱(有关色谱柱体积，请参阅表1)。

色谱柱规格	近似体积
7.8 x 150 mm	7 mL
7.8 x 300 mm	14 mL

表1. 空色谱柱体积(单位: mL)(乘以10即为冲洗溶剂体积)。

d. 用于标定LC系统和XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱的功能测试

沃特世建议，您在收到色谱柱后以及在柱的整个使用寿命周期内，都要进行标定测试。通过用适当的方法对常规蛋白质进行分离，您可以：

- 收货后就确定色谱柱的性能。
- 监测色谱柱状态，以延长使用期。
- 对可能发生的分离问题进行故障排查。

沃特世BEH125 SEC蛋白质混标([部件号186006519](#))、BEH200 SEC蛋白质混标([部件号186008476](#))和BEH450 SEC蛋白质混标([部件号186008475](#))即专门为此目所设计的产品，经仔细选择的蛋白质和/或肽，可以很好地代表目标应用。

如下信息详尽描述了如何配制和使用BEH SEC蛋白质混标来进行系统基准化或故障排查。图2和3提供了分离条件和预期您应该获得的结果。

流动相配制

化学品：

- 单水合磷酸二氢钠
- 无水磷酸氢二钠
- HPLC级别水

配制100mM磷酸钠缓冲液(500mL)：

1. 量取500±0.02g水至500mL烧杯
2. 量取3.55±0.02g磷酸氢二钠，放入500mL烧杯
3. 量取3.45±0.02g磷酸二氢钠，放入500mL烧杯
4. 搅拌至少30分钟，然后用0.2um膜过滤
5. 测量pH值并记录以参考(pH值约为：6.8)

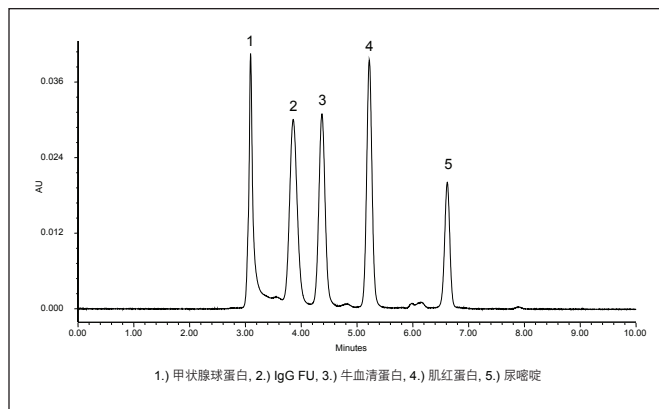


图2.在XBridge BEH SEC 200, 3.5 μ m, 7.8x150蛋白分析专用柱上进行蛋白质混标分离。

分析物	pI	MW
1. 甲状腺球蛋白 (Thyroglobulin), 3 mg/mL	4.6	669,000
2. IgG, 2 mg/mL	6.7	150,000
3.牛血清蛋白(BSA), 5 mg/mL	4.6	66,400
4. 肌红蛋白(Myoglobin), 2 mg/mL	6.8, 7.2	17,000
5. 尿嘧啶(Uracil), 0.1 mg/mL	N/A	112

表2. BEH200 SEC测试混标。

条件：

仪器：	ACQUITY UPLC系统，配TUV检测器
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 200Å, 3.5 μ m, 7.8 x 150mm
样品：	BEH200 SEC蛋白质混标 (部件号186008476)
流动相：	100 mM磷酸钠，pH 6.8
弱针洗：	100%的Milli-Q 水
强针洗：	100%的Milli-Q 水
密封垫冲洗：	90/10水/甲醇
进样类型：	满定量环
进样量：	2 μ L
流速：	0.86mL/min
柱温：	室温
检测：	UV@280nm

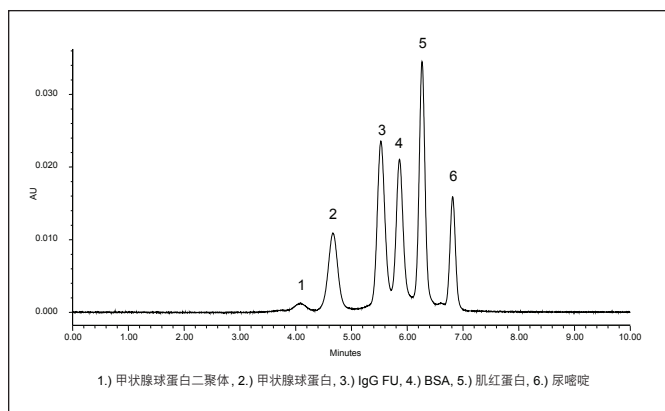


图3. 在XBridge BEH SEC 450, 3.5 μ m, 7.8 x150mm蛋白分析专用柱上进行蛋白质混标分离。

分析物	pI	MW
1. 甲状腺球蛋白(Thyroglobulin)二聚体, 0.1 mg/mL	4.6	669,000
2. 甲状腺球蛋白(Thyroglobulin), 约3mg/mL	4.6	669,000
3. IgG, 2 mg/mL	6.7	150,000
4. BSA, 5 mg/mL	4.6	66,400
5. 肌红蛋白(Myoglobin), 2 mg/mL	6.8, 7.2	17,000
6.尿嘧啶(Uracil), 0.1 mg/mL	N/A	112

表3. BEH450 SEC测试混标。

条件:

仪器:	ACQUITY UPLC系统, 配TUV检测器
色谱柱:	XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 450Å, 3.5 μ m, 7.8 x 150mm
样品:	BEH200 SEC蛋白质混标 (部件号186008476)
流动相:	100 mM磷酸钠, pH 6.8
弱针洗:	100%的Milli-Q 水
强针洗:	100%的Milli-Q 水
密封垫冲洗:	90/10水/甲醇
进样类型:	满定量环
进样量:	2 μ L
流速:	0.86mL/min
柱温:	室温
检测:	UV@280nm

III. 色谱柱指标与使用

为确保XBridge BEH SEC 3.5/2.5 μ m蛋白分析专用柱持久的高性能, 请遵守以下操作规范:

a. SEC洗脱液与针洗液的制备

- 如果可能, 请使用HPLC级的缓冲液、水和有机溶剂。
- 使用0.2 μ m或更小孔径的滤膜过滤溶液。对于可以滋生微生物的缓冲液, 推荐使用无菌过滤装置。
- 容易滋生微生物的溶液应定期更换, 以避免色谱柱污染。不要把新配制流动相又倒入旧的SEC流动相样品瓶中。新鲜配制的SEC流动相, 应该使用新的溶剂瓶。
- 选择与所用溶液兼容的溶剂进样口过滤器。当使用容易滋生微生物的溶液时, 要定期清洗或更换过滤器。

b. 样品制备

- 在进样到SEC色谱柱上之前, 确保样品中没有微粒。如果样品出现雾状或浑浊, 就不能进样, 因为这会导致柱压升高。可以的话, 使用过滤或离心方式制备样品。
- 如果样品不能溶解于流动相, 请确保样品、样品溶剂和流动相可以互溶, 以避免样品和/或缓冲盐沉淀。

c. 色谱柱指标

- 柱装运溶剂: 20%的甲醇水溶液
- 推荐最大背压:
 - XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 3.5 μ m: 3000 psi
 - XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 2.5 μ m: 5000 psi

- **样品质量载量:** < 300 µg(对于7.8x150mm)
- **样品体积载量:** < 60 µL(对于7.8x 150 mm)
- **推荐的pH值范围:** 2~8。色谱柱使用寿命会随操作温度以及所用缓冲液的类型和浓度的不同而有所不同。
- **推荐的盐浓度:** 小于或等于0.5 M
- **推荐的有机相浓度:** < 20% 乙腈
(警告: 许多蛋白质在高比例有机相中不可溶。进行色谱分析前, 进行测试以确保样品在拟用于色谱分析的有机相浓度下不会发生沉淀。此外, 如果色谱柱在蛋白变性条件(大于10%的有机相)下运行, 之后在100%水相条件下使用时色谱柱性能可能会受到影响。
- **推荐温度:** 4 – 60°C。低温(例如10°C)下操作时要降低流速, 以免柱压过大。
- **推荐储存:** 若要隔夜储存, 用流动相以10-20%的最大推荐流速持续冲洗色谱柱。若打算在24小时内使用, 可将柱保存于HPLC级纯水中; 或放在10-20%的甲醇中进行长期储存。

注: 在极端压力、pH值和/或温度下操作时, 会致使色谱柱使用寿命变短。

IV. 故障排查

系统性故障排查的第一步, 是将色谱柱当前状态下的性能与正常工作时的性能进行比较。用蛋白质混标进行功能测试, 可揭示柱填料表面化学的微妙变化对应用的影响。

有几种常见的色谱柱变化症状:

1. 压力升高通常与应用中的性能下降联系在一起。诊断的第一步是确保压力升高发生在色谱柱中, 而不是在系统中的其他地方。这可通过从出口端到进口端逐一断开连接并同时监测系统压力情况来确定。如果系统被堵塞, 则应查明堵塞处并排除堵塞。如果增高压力发生在色谱柱中, 了解问题是与单次进样有关还是发生在一系列进样后会很有帮助。如果压力是逐渐形成的, 则很可能需要按第五节所述对色谱柱进行清洗。如果是一个样品造成的压力上升, 则很可能表示有颗粒或不可溶的成分, 如脂类或较高阶聚合物。清洗仍然是一种选择, 但要采用更激烈的方式。如果样品溶液出现雾状或浑浊, 就不能进样, 因为它会导致压力升高。可以进行样品制备例如过滤或离心, 但首先应检查是否会影响结果。

2. 微生物污染会造成分离度损失和峰拖尾增加。重要的是, 遵循良好的标准实验室操作规范以预防微生物污染, 包括经常更换缓冲液溶剂瓶、使用高纯度水、使用无菌过滤装置、以及在建议的条件下保存系统和色谱柱。如果已经发生微生物污染, 清洗色谱柱不会影响性能。改变流速时, 请按0.1 mL/min的步进速度缓慢增加, 避免流速增加时大于0.1 mL/min步进。
3. 峰拖尾增加, 可能是由于管路连接不当, 或是由于色谱柱进样端筛板上的物质积聚。在继续进行诊断或采取纠正措施前, 请检查所有的管路连接、流动相是否制备得当、并选择了正确的方法。然后重复蛋白质标准测试。如果蛋白质标准品都呈现峰拖尾增加, 则很可能在色谱柱入口端有显著的物质累积问题, 需要更换色谱柱。
4. 残留是指一次进样的样品组分出现在下一次分析谱图中。在SEC中, 残留一般是由系统部件或不正确的清洗溶剂造成的。进行一次空白进样。如果蛋白质峰值仅出现在进样时, 则它们很可能源于系统部件或清洗溶剂不足。系统部件中的吸附最可能发生在进样环或针中。在这些情况下, 可能需要更换部件。

注: 在HPLC Columns Theory, Technology and Practice, U.D. Neue(Wiley-VCH, 1997)、Waters HPLC Troubleshooting Guide(文献编号: 720000181EN)以及沃特世网站www.waters.com上都能找到有用的色谱柱故障排查问题方面的常用信息。

V. 色谱柱清洗、再生与储存

a. 清洗与再生

峰形的变化，如增加拖尾、肩峰、保留时间改变、分离度变化、鬼峰或柱背压升高，都可能表示色谱柱被污染了。选择一种有望解决疑似污染的清洗方法。

按该色谱柱所采用的典型流速的一半来执行清洗程序可能有用。用这种方式，降低了高背压事件的发生概率。

推荐的清洗溶剂：

- 低pH值的高浓度盐溶液(如：0.5 M Na_2SO_4 , pH 2.7)
- 低浓度甲醇(如：20%)溶于HPLC级的水中。
- 如果色谱柱随后要用于分析天然形态的蛋白质，应避免使用离子型洗涤剂和其他表面活性剂。

注：根据样品的性质选择清洗溶剂，如：用(a)去除碱性蛋白，用(b)去除疏水性蛋白。消泡剂(Chaotropic agents)通过干扰氢键作用使强烈吸附的蛋白质溶剂化。

作为最后的手段，可以尝试在低流速(如0.1 mL/min)下进行倒流或反冲洗。然而，这种方法可能会进一步损害色谱柱，或者只能提供短暂的性能改进。

b. 储存

若要隔夜储存，用流动相以10~20%的最大推荐速度持续冲洗色谱柱。若打算在24小时内使用，将色谱柱储存在HPLC级的纯水中；或放在20%的甲醇中作为长期储存。

注：在极端压力、pH和/或温度条件下操作，会缩短色谱柱使用寿命。



扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, The Science of What's Possible, XBridge和UPLC沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2019 年 沃特世公司 印制于中国 2019年9月 720005206ZH AW-PDF

Tips

为了确保SEC的使用顺畅，建议在启用前先对仪器进行彻底的冲洗，具体的清洗顺序如下：

一. 用二通代替色谱柱

二. 对于Waters系统：

依次Prime四个溶剂通道并运行“Seal Wash”5min

“Wash Solvent”即进样针外壁清洗150秒

“Purge Solvent”50 cycles

备注：目的是让仪器的所有管路都充盈液体，确保清洗彻底。

三. 按如下顺序用不同溶剂清洗系统：

- 水清洗：按第二步所述方法冲洗所有通道。然后系统运行30分钟，流速1 mL/min，四个溶剂通道各占比例25%。
- 70% IPA清洗：此步开始前先拔掉四个流动相溶剂过滤头，断开检测器。按第二步所述冲洗四个溶剂通道。然后做30次进样：每次进样10 μL @70%IPA，运行2分钟，流速1 mL/min，四个溶剂通道各25%。
- 水清洗：按第二步所述冲洗四个溶剂通道。然后做10次进样：每次进样10 μL @水，运行2分钟，流速1 mL/min，四个溶剂通道各25%。
- 30%磷酸水溶液清洗：此步开始前先拔掉四个流动相溶剂过滤头，断开检测器。按第二步所述清洗四个溶剂通道，然后做30次进样：每次进样10 μL @30%磷酸，运行2分钟，流速1 mL/min，四个溶剂通道各25%。
- 水清洗：按第二步所述冲洗四个溶剂通道。然后做10次进样：每次进样10 μL @水，运行2分钟，流速1 mL/min，四个溶剂通道各25%。
- 10%甲醇清洗：按第二步所述冲洗四个溶剂通道。然后做30次进样：每次进样10 μL @10%甲醇，运行2分钟，流速1 mL/min，四个溶剂通道各25%。最后保持0.1 mL/min过夜。

注意：异丙醇和30%磷酸水只冲洗四个管路，务必拔掉溶剂过滤头，断开检测器。

沃特世中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com