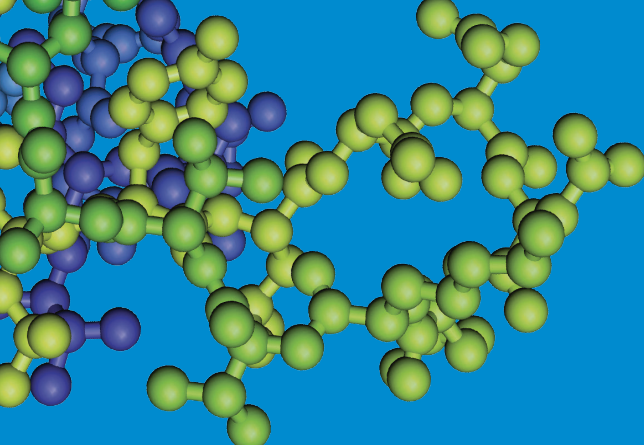
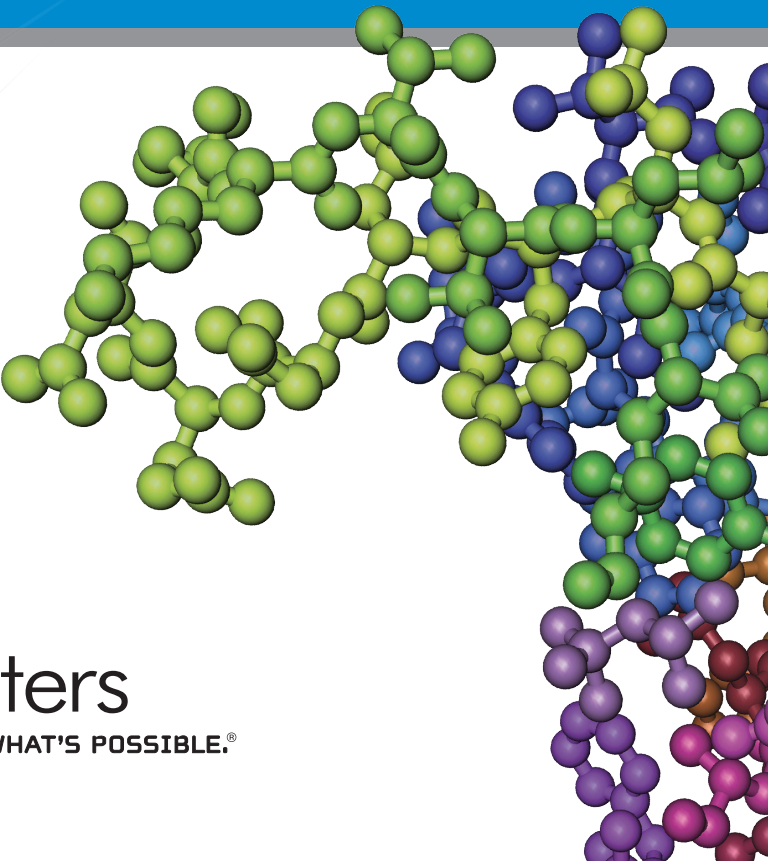
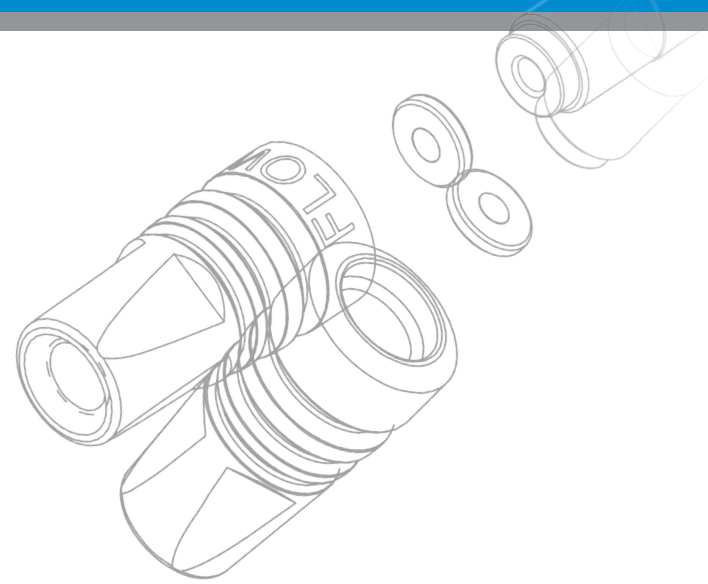


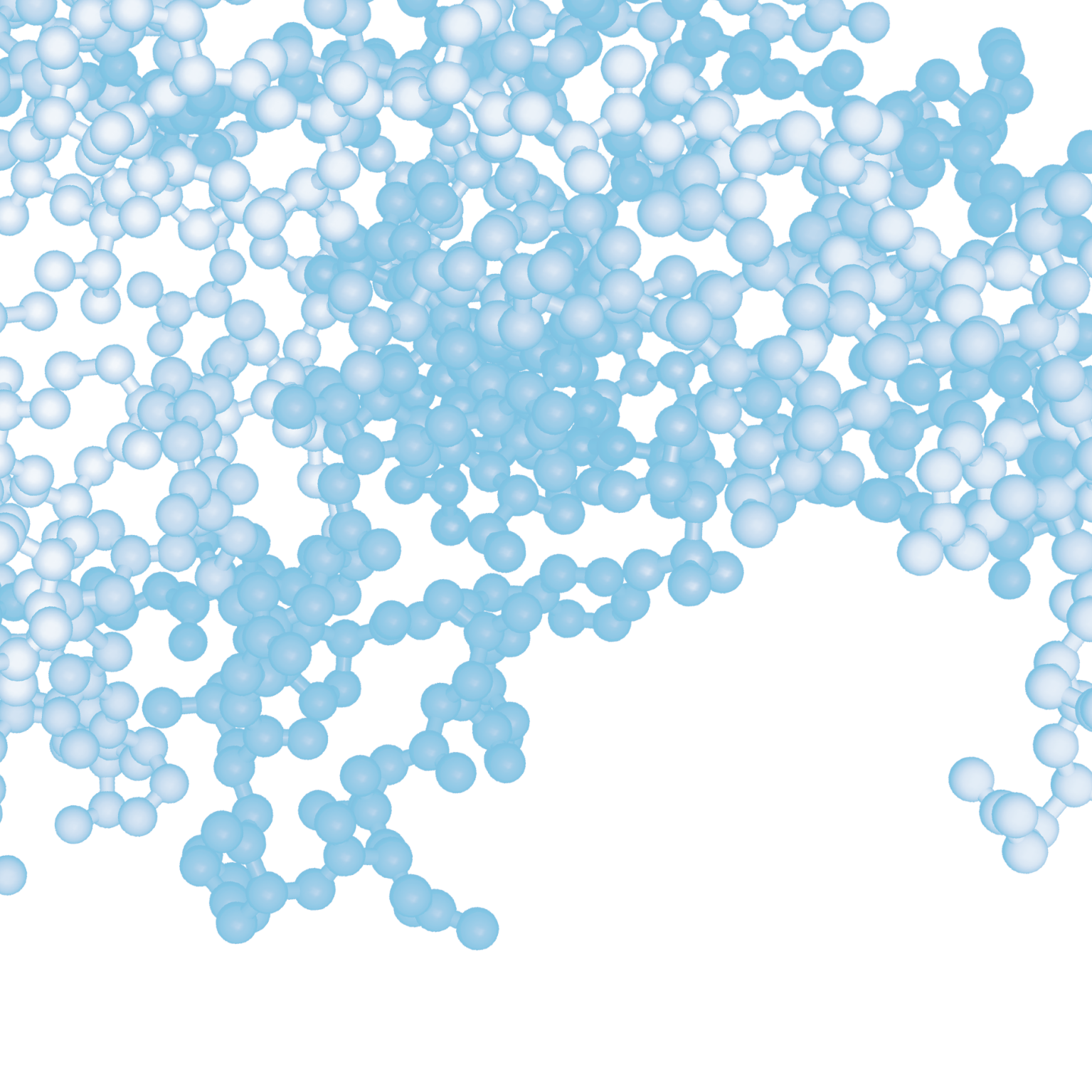


体积排阻色谱(SEC)使用维护指南



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®



目录

I. 简介

II. 使用ACQUITY UPLC仪器进行SEC分析的注意事项

III. 开发稳定的UPLC SEC方法的重要性

- a. 选择合适的ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱
- b. 方法开发

IV. SEC分离发生拖尾和/或分离度降低时的注意事项

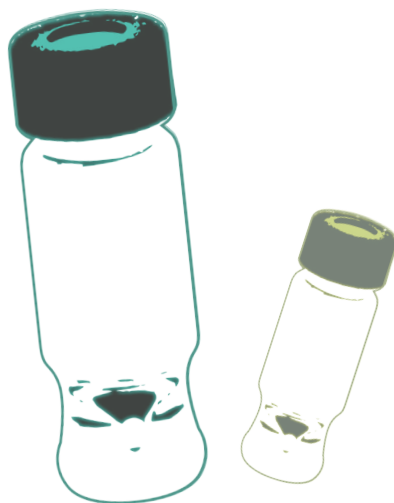
- a. 将ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱连接到ACQUITY UPLC系统
- b. UPLC SEC分离的系统扩散效应
- c. 确定系统扩散体积

V. 延长ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱的使用寿命

- a. 流动相的制备与使用
- b. 避免溶剂输送系统的微生物污染
- c. 清洗ACQUITY UPLC系统
- d. 最大程度减少BEH SEC蛋白分析专用柱被样品颗粒物污染
- e. 避免BEH SEC蛋白分析专用柱被样品制剂成分污染
- f. 色谱柱存放

VI. 总结和参考文献

VII. 订购信息



I. 简介

体积排阻色谱(SEC)是一种在生物治疗性蛋白质的开发和商业化过程中常用的分析技术。传统HPLC的SEC方法使用颗粒直径大于3 μm的色谱柱，颗粒内部的孔径分布适中，可用于分离不同流体动力学体积(即斯托克斯半径)的蛋白质。理想情况下，蛋白质将根据其在溶液中的相对大小进行分离。要顺利实现此分离，蛋白质与SEC颗粒之间不应存在次级相互作用(例如，疏水作用或离子作用)。

2010年，沃特世(Waters®)公司首创性推出颗粒直径小于3 μm的SEC色谱柱，该色谱柱能有效提高组分分离度并缩短分析时间。在经过合理设计的UPLC®系统中，这一色谱柱能够在8 min内分离并定量大于300,000 Da的单克隆抗体聚合物、150,000 Da的单克隆抗体和小于100,000 Da的单克隆抗体片段(见图1)。本文档将详细介绍仪器、方法和色谱柱使用方面的注意事项，这些信息对于尽可能延长色谱柱使用寿命以及获取稳定的UPLC SEC蛋白质分离方法十分重要。

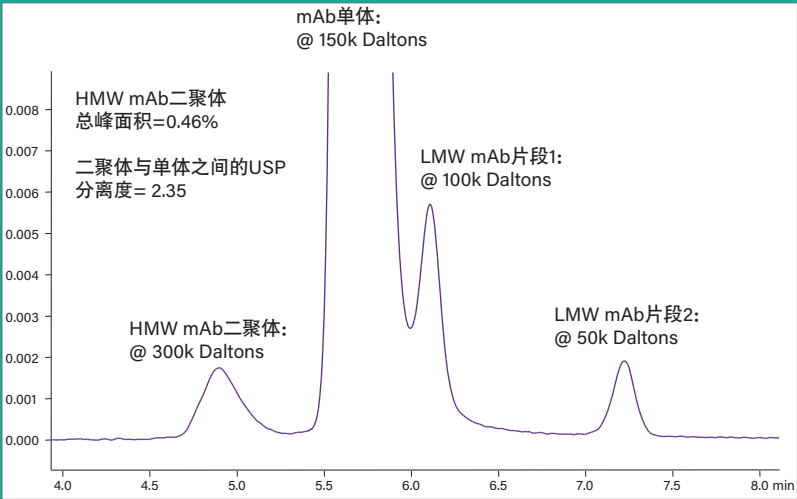


图1. 使用ACQUITY® UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱分离单克隆抗体(mAb)。

条件

系统: ACQUITY UPLC H-Class Bio

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm(部件号 [186005226](#))

进样体积: 5 μL

SEC洗脱液: 25 mM磷酸钠, 含150 mM氯化钠, pH 6.8

流速: 0.4 mL/min

柱温: 30 °C

UV检测: 280 nm

II. 使用ACQUITY UPLC仪器进行SEC分析的注意事项

要想使用UPLC实现高质量、可重现的蛋白质SEC分离，需要考虑诸多因素。其中，选择配置完好的沃特世UPLC仪器并正确接入SEC色谱柱是顺利完成色谱分析的主要因素。

表1列出了推荐用于SEC分离(通常使用有机溶剂比例较低的含盐流动相进行分离)的沃特世UPLC系统组件。如图2所示，使用不匹配的ACQUITY UPLC系统组件会对SEC分离造成极大的负面影响。有关详细信息，请参阅《超高效体积排阻及离子交换色谱系统的日常使用与维护指南》，部件号：[720004182en\(www.waters.com\)](http://www.waters.com)。

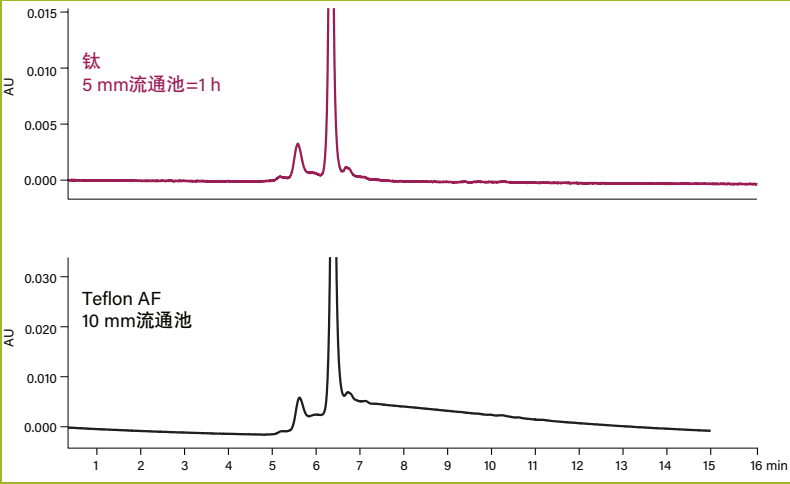


图2. 使用ACQUITY UPLC BEH SEC 200Å蛋白分析专用柱和ACQUITY UPLC光电二极管阵列检测器分析牛血清白蛋白(BSA)的色谱图，由图可见流通池材料对峰形产生了负面影响。使用Teflon AF材质的流通池时，BSA单体表现出严重的峰拖尾。

条件

系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio	SEC洗脱液:	25 mM磷酸钠，含150 mM氯化钠，pH 6.8
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm(部件号: 186005226)	流速:	0.4 mL/min
样品:	5 mg/mL牛血清白蛋白水溶液	柱温:	30 °C
进样体积:	4 μL	UV检测:	280 nm

表1.推荐用于体积排阻色谱(SEC)应用的ACQUITY UPLC系统。

系统类型	系统概述	关于SEC溶剂输送的建议	关于SEC样品管理器的建议
 ACQUITY UPLC 系统	使用连接自动进样器的二元溶剂管理器(BSM)。	BSM包括溶剂脱气、切换、混合和输送组件。对于SEC应用，建议柱塞杆清洗频率提高至10倍。	■ 样品管理器包括样品输送装置、样品控温装置和进样流路。在固定定量环或部分定量环模式下进样，进样体积为0.1~250 µL。对于粘性较大的样品，需降低注射器吸取速率。 ■ 沃特世不建议在进样针清洗溶剂中使用浓度高于500 mM的非挥发性缓冲液。 ■ 对于SEC应用，沃特世建议使用90%水相/10%有机相混合溶液作为密封清洗溶液。
 ACQUITY UPLC H-Class系统	采用灵活的四元溶剂混合系统和Auto-Blend Plus™ 技术。	四元溶剂管理器(QSM)可以同时输送四种溶剂(A、B、C和D)。对于SEC应用，建议柱塞杆清洗频率提高至10倍。	■ 样品管理器-FTN采用Flow Through Needle样品吸取技术。对于SEC应用，请按照沃特世服务指南中的方法去除盐沉积物，以及对样品注射器进行常规维护。对于粘性较大的样品，需降低注射器吸取速率。 ■ 沃特世不建议在进样针清洗溶剂中使用浓度高于500 mM的非挥发性缓冲液。 ■ 对于SEC应用，沃特世建议使用90%水相/10%有机相混合溶液作为密封清洗溶液。
 ACQUITY UPLC H-Class Bio系统	采用灵活的四元溶剂混合系统和Auto-Blend plus™ 技术，具有直接自动进样功能。专为生物分子分离而设计。系统流路采用非不锈钢材料，最大程度提高系统稳定性。	Bio四元溶剂管理器由生物惰性材料制成，专门针对生物制药应用中的高离子强度水性溶剂设计。用于SEC应用时无需改变NaCl浓度。(请参阅 www.waters.com 上的技术简报: Size Exclusion Using ACQUITY UPLC H-Class Bio System (《使用ACQUITY UPLC H-Class Bio系统进行体积排阻色谱分析》)，部件号: 720003602en)	■ BioSM-FTN采用Flow Through Needle样品吸取技术。其生物相容性进样针由MP35N材料制成，将样品注入色谱柱时，进样针将作为进样流路的一部分。 ■ 沃特世不建议在进样针清洗溶剂中使用浓度高于500 mM的非挥发性缓冲液。 ■ 对于SEC应用，沃特世建议使用90%水相/10%有机相混合溶液作为密封清洗溶液。
 ACQUITY UPLC I-Class系统	配备二元溶剂管理器(BSM)和FL/FTN的样品管理器。该系统的系统扩散体积和样品残留极低，适用于苛刻的LC-MS应用。	BSM能够同时泵送和混合两种溶剂(A1或A2与B1或B2)。BSM利用两条平行运行的串联溶剂输送流路，实现自动化的线性和非线性梯度曲线。对于SEC应用，建议柱塞杆清洗频率提高至10倍。	■ 样品管理器-FTN采用Flow Through Needle技术吸取样品并将样品保持在进样针中，然后将其进样至色谱柱。标准配置支持0.1~10 µL的进样体积。使用peltier技术可在4~40 °C范围内调节样品温度。对于粘性较大的样品，需降低注射器吸取速率。 ■ 沃特世不建议在进样针清洗溶剂中使用浓度高于500 mM的非挥发性缓冲液。 ■ 对于SEC应用，沃特世建议使用90%水相/10%有机相混合溶液作为密封清洗溶液。

适用于SEC的柱温箱	推荐用于SEC的紫外可见光检测器及流通池	典型UPLC系统扩散 体积：无柱温箱
■ 可容纳1根色谱柱，长20~150 mm，内径(I.D.) 1.0~4.6 mm。 ■ 30-CHC：可容纳多根色谱柱，支持串联连接的色谱柱(最多6根)；长20~300 mm，内径(I.D.) 2.1~7.8 mm，配备1根保护柱或1个在线过滤器(最长20 mm)。	■ ACQUITY UPLC TUV检测器：500 nL(分析型流通池体积)；对于在水性条件下进行的SEC应用，沃特世建议使用钛(1.5 µL，光程5 mm)或不锈钢光学流通池(1.5 µL，光程5 mm)。其它材质的流通池(例如Teflon®)可能导致峰拖尾。 ■ ACQUITY示差折光检测器：1.3 µL(流通池体积)。 ■ ACQUITY PDA检测器：沃特世建议在SEC应用中使用TaperSlit™流通池。	10~15 µL
■ CH-A：可容纳单根色谱柱，最大内径(I.D.) 4.6 mm，最长150 mm(带过滤器或保护柱)。 ■ CH-30A：可容纳单根色谱柱，最大内径(I.D.) 4.6 mm，最长300 mm(带过滤器或保护柱) ■ 30-CHC：可容纳多根色谱柱，支持串联连接的色谱柱(最多6根)；长20~300 mm，内径(I.D.) 2.1~7.8 mm，配备1根保护柱或1个在线过滤器(最长20 mm)。	■ ACQUITY UPLC TUV检测器：500 nL(分析型流通池体积)；对于在水性条件下进行的SEC应用，沃特世建议使用钛(1.5 µL，光程5 mm)或不锈钢光学流通池(1.5 µL，光程5 mm)。其它材质的流通池(例如Teflon®)可能导致峰拖尾。 ■ ACQUITY示差折光检测器：1.3 µL(流通池体积)。 ■ ACQUITY PDA检测器：沃特世建议在SEC应用中使用TaperSlit™流通池。	10~15 µL
■ CH-A：可容纳单根色谱柱，最大内径(I.D.) 4.6 mm，最长150 mm(带过滤器或保护柱)。 ■ CH-30A：可容纳单根色谱柱，最大内径(I.D.) 4.6 mm，最长300 mm(带过滤器或保护柱) ■ 30-CHC：可容纳多根色谱柱，支持串联连接的色谱柱(最多6根)；长20~300 mm，内径(I.D.) 2.1~7.8 mm，配备1根保护柱或1个在线过滤器(最长20 mm)。	■ ACQUITY UPLC TUV检测器：500 nL(分析型流通池体积)；对于在水性条件下进行的SEC应用，沃特世建议使用钛(1.5 µL，光程5 mm)或不锈钢光学流通池(1.5 µL，光程5 mm)。其它材质的流通池(例如Teflon®)可能导致峰拖尾。 ■ ACQUITY示差折光检测器：1.3 µL(流通池体积)。 ■ ACQUITY PDA检测器：沃特世建议在SEC应用中使用TaperSlit™流通池。	10~15 µL
■ CH-A：可容纳单根色谱柱，最大内径(I.D.) 4.6 mm，最长150 mm(带过滤器或保护柱)	■ ACQUITY UPLC TUV检测器：500 nL(分析型流通池体积)；对于在水性条件下进行的SEC应用，沃特世建议使用钛(1.5 µL，光程5 mm)或不锈钢光学流通池(1.5 µL，光程5 mm)。其它材质的流通池(例如Teflon®)可能导致峰拖尾。 ■ ACQUITY示差折光检测器：1.3 µL(流通池体积)。 ■ ACQUITY PDA检测器：沃特世建议在SEC应用中使用TaperSlit™流通池。	10~15 µL

III. 使用UPLC系统和BEH色谱柱开发稳定SEC方法的注意事项

a. 选择合适的ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱

要想开发出能够可靠分离并准确定量蛋白质样品中各种成分的UPLC BEH SEC分离方法，需要评估多个因素。SEC主要根据化合物在溶液中的相对大小对其进行分离。图3所示为使用不同孔径ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱分析分子量已知的蛋白质和肽得到的校准曲线。在使用适当配置的Waters ACQUITY UPLC系统执行特定应用时，色谱工作者可根据这些数据选择最合适的BEH SEC蛋白分析专用柱。

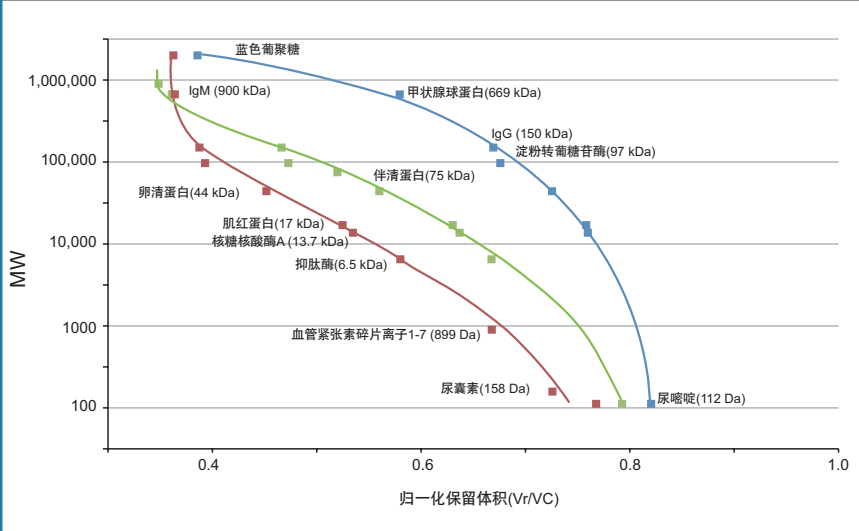


图3. ACQUITY UPLC BEH SEC 125Å、200Å和450Å蛋白分析专用柱的校准曲线。

- ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱
125Å, 1.7 μm: 1kDa~80kDa
- ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱
200Å, 1.7 μm: 10kDa~450kDa
- ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱
450Å, 2.5 μm: 100kDa~1500kDa

b. 方法开发

开发SEC方法时，需评估多个因素。理想情况下，SEC基于溶液中天然蛋白质的大小差异对其进行分离。鉴于此，生物分子的体积排阻色谱分离通常在水相条件下进行，使得生物分子处于“生理”状态。然而，可能发生的次级相互作用会影响体积排阻分离和已分离物质的准确定量。为了最大限度减少次级相互作用，需对流动相和分离条件进行评估。应当注意，SEC分离条件可能会改变蛋白质的结构和状态。所用的盐浓度、盐的种类以及流动相pH都会影响蛋白质三维构象和蛋白质之间的相互作用。因此，应使用实际要分析的样品来评估SEC方法。（有关详细信息，请参阅www.waters.com上的Method Development for Size-Exclusion Chromatography of Monoclonal Antibodies and Higher Order Aggregates（《单克隆抗体及其高聚体的体积排阻色谱分析方法开发》），部件号：[720004076en](#)）。

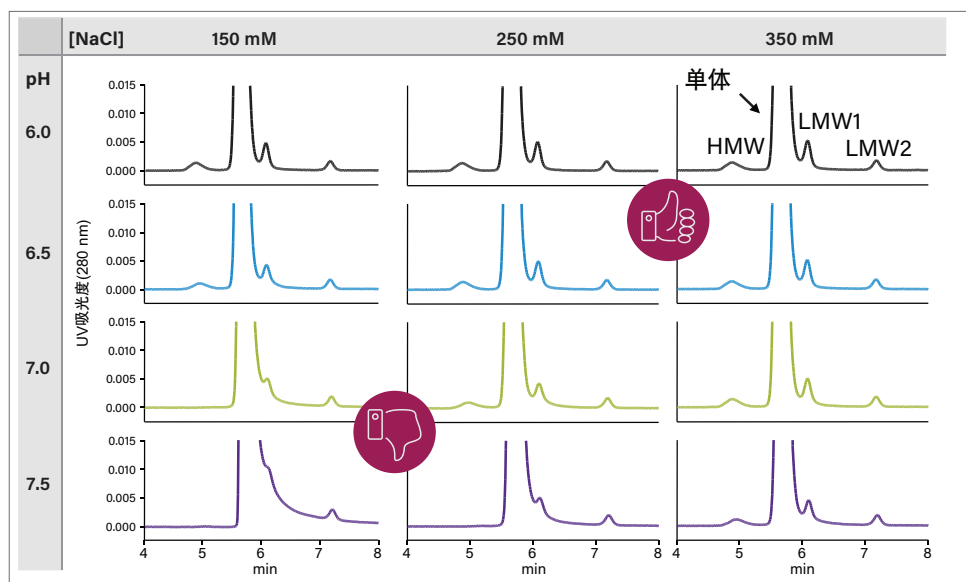


图4. 使用ACQUITY UPLC BEH SEC 200Å, 1.7 μm, 4.6 × 300 mm蛋白分析专用柱分离单克隆抗体时，pH和离子强度对分离结果的影响。

IV. SEC分离发生拖尾和/或分离度降低时的注意事项

a. 将ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱连接到ACQUITY UPLC系统

将ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱正确安装到UPLC系统中非常重要。图5详细介绍了正确和不正确的色谱柱连接对色谱分析性能的影响。强烈建议您每次在UPLC系统中安装ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱时，重新连接色谱柱入口和出口。

►► 有关正确连接色谱柱的更多信息，请访问www.waters.com观看视频：

[如何在配备色谱柱主动预热器的ACQUITY UPLC系统中安装UPLC色谱柱](#)

[如何将ACQUITY UPLC色谱柱连接至ACQUITY UPLC系统](#)

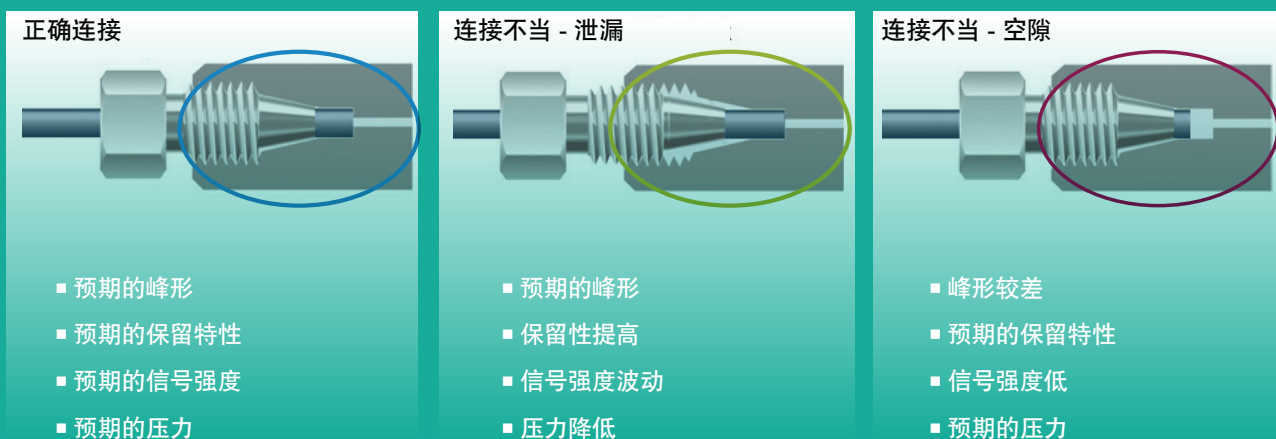


图5. 色谱柱-LC系统间的连接对色谱分析性能的影响。

在ACQUITY UPLC系统溶剂管路与BEH SEC色谱柱入口之间特别增加600 μ L死体积对色谱分离造成的影响如图6所示。该体积差略微加重了峰拖尾情况，对于在较大的单克隆抗体单体峰之后作为拖尾峰洗脱的低水平LMW1峰来说，这可能会使其积分面积发生变化。HMW和LMW2峰未受影响，因为它们与单体峰之间实现了基线分离。

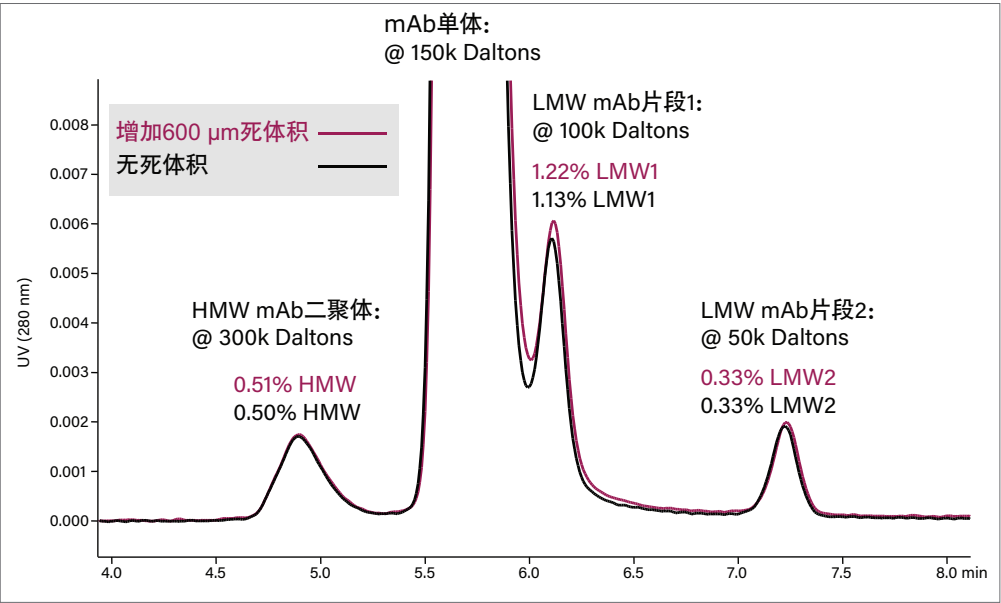


图6. 不正确的色谱柱-系统连接对单克隆抗体分离的影响。

条件

系统:	配备可变波长紫外(TUV)检测器的 ACQUITY UPLC H-Class Bio	SEC洗脱液: 25 mM磷酸钠, 含150 mM氯化钠, pH 6.8
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å, 1.7 μ m, 4.6 $\times$ 300 mm (部件号: 186005226)	流速: 0.4 mL/min
样品:	3 mg/mL mAb, 溶于SEC流动相中	柱温: 30 $^{\circ}$ C
进样体积:	5 μ L	UV检测: 280 nm

b. 使用Waters ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱进行分离时的系统扩散效应

在SEC分离中，分析物将在一个柱体积内通过等度分离洗脱。因此，包括进样器、管路和检测器体积在内的LC系统总体积会影响分离效果，认识到这一点非常重要。通常，与柱体积相关的LC系统总扩散体积越低，峰形就越窄(如图7和图8所示)。对于难分离的邻近洗脱峰(例如单克隆抗体单体与低分子量单克隆抗体片段1)，LC系统扩散体积对其分离性能的影响更大，如图8所示。使用ACQUITY UPLC BEH蛋白分析专用柱进行SEC分离时，通常建议将UPLC系统的总扩散体积控制在15 μ L以下。

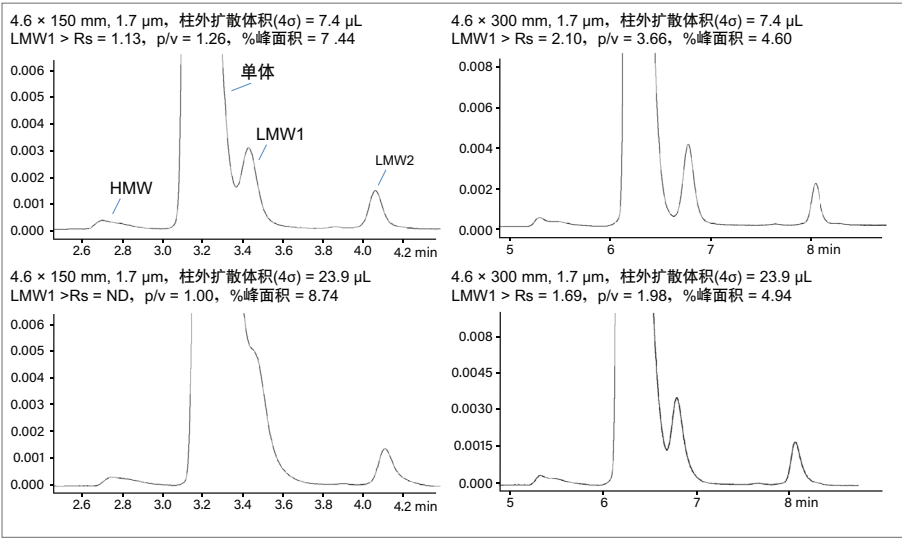


图7. UPLC系统扩散和SEC色谱柱柱长对单克隆抗体组分分离的影响。

条件

系统:	配备可变波长紫外(TUV)检测器的ACQUITY UPLC H-Class Bio	进样体积:	对于单根4.6 $\times$ 150 mm色谱柱, 1 μ L; 对于4.6 $\times$ 300 mm色谱柱(即两根串联的4.6 $\times$ 150 mm色谱柱), 2 μ L
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm (部件号: 186005225)	SEC洗脱液:	20 mM磷酸钠, 含350 mM氯化钠, pH 6.8
样品:	2 mg/mL mAb IgG1 (英夫利昔单抗)	流速:	0.35 mL/min
		柱温:	30 $^{\circ}$ C
		UV检测:	280 nm

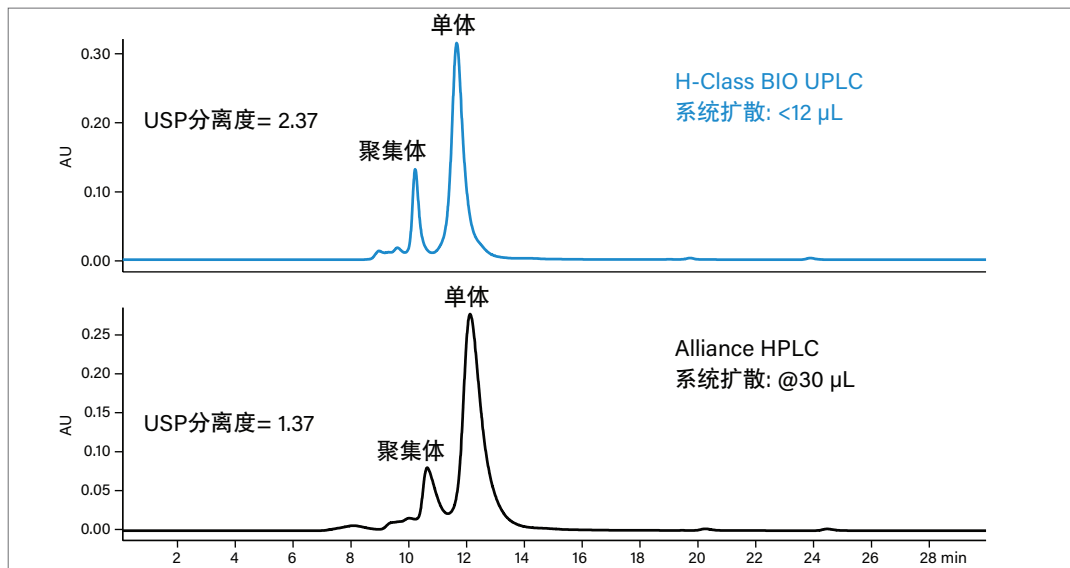


图8. 使用ACQUITY UPLC BEH SEC 200Å, 1.7 μ m蛋白分析专用柱分离人多克隆IgG抗体时, LC系统扩散体积对分离效果的影响。

条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH SEC
蛋白分析专用柱, 200Å, 1.7 μ m,
4.6 $\times$ 300 mm(部件号: [186005226](#))

样品: 人源性多克隆IgG, 3 mg/mL,
溶于流动相中

进样体积: 5 μ L

流动相: 25 mM磷酸钠, 含150 mM氯化钠, pH 6.8

流速: 0.2 mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

UV检测: 280 nm

注: 与图1、4、6和7中所用的单克隆抗体样品不同, 该分析所用的样品不含低分子量片段1(100,000 Da)和低分子量片段2(50,000 Da)。

c. 确定系统扩散体积

1. 将色谱柱替换为零死体积接头 (部件号: [700002636](#))。LC管路内径应为0.005”。
2. 依次用水和50/50水/乙腈溶液冲洗溶剂管路、洗针管路和灌注管路。
3. 将检测器设置为273 nm并以每秒40个数据点以上的速率采集数据。
4. 流速: 0.5 mL/min。
5. 运行时间: 1 min。
6. 样品: 咖啡因溶于水/乙腈(50:50), 浓度0.16 mg/mL。
7. 进样体积: 0.5 μ L。
8. 进样三次流动相空白溶液后, 进样五次咖啡因样品。
9. LC系统体积计算方法:
 - 测定4.4%峰高处的咖啡因峰宽 (单位: min)。
 - 用峰宽乘以流速, 以确定峰量 (单位: mL)。
 - 用峰量 (单位: mL) 乘以1000, 确定以 μ L为单位的峰量。

注: 采用4-Sigma方法测定ACQUITY UPLC H-Class系统的平均扩散体积时, 若使用CH-A柱温箱, 平均值应为10.0 μ L; 若使用CM-A柱温箱, 应为12 μ L; 若使用30CH-A柱温箱, 应小于22.0 μ L。如果测得结果大于上述值, 请找出造成不良的额外峰扩散体积的原因并修正。

V. 延长ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱的使用寿命

若制备和处理SEC流动相和样品时操作得当，ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱可在1000次以上的进样分析中保持性能稳定(图9)。但如果进入色谱柱的样品和/或流动相中含有颗粒，会对ACQUITY UPLC BEH SEC色谱柱的性能和使用寿命造成不利影响。

要最大限度延长色谱柱使用寿命，应使用高品质且经过过滤的水(例如经Milli-Q® Millipak 0.22 µm过滤的水)，并且流动相缓冲液应使用< 0.2 µm的滤膜过滤。建议使用一次性无菌过滤器过滤流动相缓冲液。另外，建议过滤流动相时不要使用烧制玻璃过滤器，因为这类装置有可能引入会改变色谱柱性能的硅酸盐。建议使用无菌的0.2 µm过滤装置。

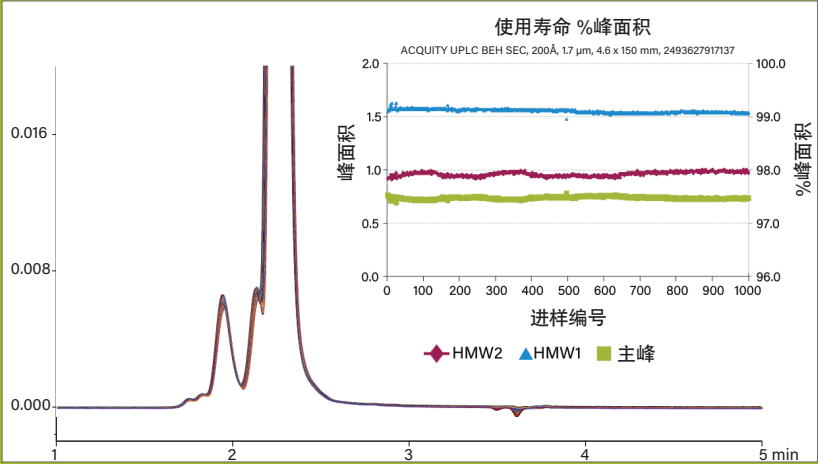


图9. 在Waters ACQUITY UPLC BEH SEC 200Å, 1.7 µm, 4.6 × 150 mm蛋白分析专用柱上重复进样1000次市售Vectibix®单克隆抗体制剂，其中100次进样的重叠色谱图。

条件

系统:	配备可变波长紫外(TUV)检测器的ACQUITY UPLC H-Class Bio	流动相:	0.1 M磷酸钠，含100 mM氯化钠，pH 7.0
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å, 1.7 µm, 4.6 × 150 mm(部件号: 186005225)	流速:	0.5 mL/min
		柱温:	30 °C
		UV检测:	280 nm
样品:	Vectibix, 10 mg/mL，用水按1:1稀释		
进样体积:	3.5 µL		

a. 流动相的配制与使用

不含有机溶剂且pH在生理范围内的流动相容易滋生微生物。进行以下操作有助于最大限度减少微生物污染，从而避免色谱柱过早发生故障。

- 正确清洁实验室玻璃器皿并在 $>170^{\circ}\text{C}$ 的条件下干燥1 h以上，避免残留水滴滋生微生物。建议使用无菌容器。
- 仅使用高纯度水(18.2 M Ω cm)制备SEC流动相。如果使用瓶装水，应即开即用。
- 务必使用0.22 μm 或更小孔径的滤膜过滤流动相。另外，建议使用无菌过滤器和容器。
- 切勿向流动相瓶中“直接添加”新配制的流动相。更换流动相时务必同时更换或清洗流动相瓶。
- 离子强度低的流动相(<150 mM)应每隔2~3天更换一次。
- 离子强度高的流动相(>150 mM)应每隔两周更换一次。间隔时间之所以更长，是因为高浓度盐可抑制微生物生长。
- 应每天目视检查所有流动相瓶中是否有微生物生长和/或颗粒。微生物生长时可能在液体表面形成菌膜，通过摇动瓶体可观察到。
- **强烈建议**在使用100%水性流动相执行SEC分析时取出(不使用)Waters ACQUITY UPLC流动相管路滤头，因为该组件可能被污染，进而污染新配制且经过过滤的流动相溶液。

注：对于取出了UPLC流动相管路滤头的实验室，只要客户的SOP声明所有SEC流动相必须经过过滤并存放在无菌玻璃器皿内，沃特世公司仍将履行现有服务合同。

- 如果观察到有微生物生长，请立即停止SEC分析并执行LC清洗步骤(详见本文档后面部分)。

其它注意事项:

- 取下SEC色谱柱并按推荐方法存放后, 为防止流动相缓冲液在LC系统中产生沉淀, 良好实验室规范建议让流动相保持低流速(例如0.1 mL/min)流经系统。
- 如果UPLC系统将空闲2天以上, 取下SEC色谱柱并按推荐方法存放后, 请用高纯度水以1 mL/min的流速灌注各流动相管路15 min, 然后使用70/30异丙醇(IPA)/水溶液冲洗并储存在管路中, 以防止微生物生长。

b. 避免溶剂输送系统的微生物污染

UPLC系统发生微生物污染可能会导致BEH SEC色谱柱被污染, 进而产生很差的分离结果(图10)。此外, 柱压也会明显升高。请注意, 向任何HPLC或UPLC色谱柱中含含有颗粒(例如微生物)的样品都会导致其过早发生故障。而对于粒径小于3 μm 的色谱柱, 发生故障的速度可能更快。如果流动相容器被微生物污染, 则微生物会进入溶剂输送管路, 进而可能污染新制流动相。流动相管路滤头通常是藏匿微生物的位置之一。

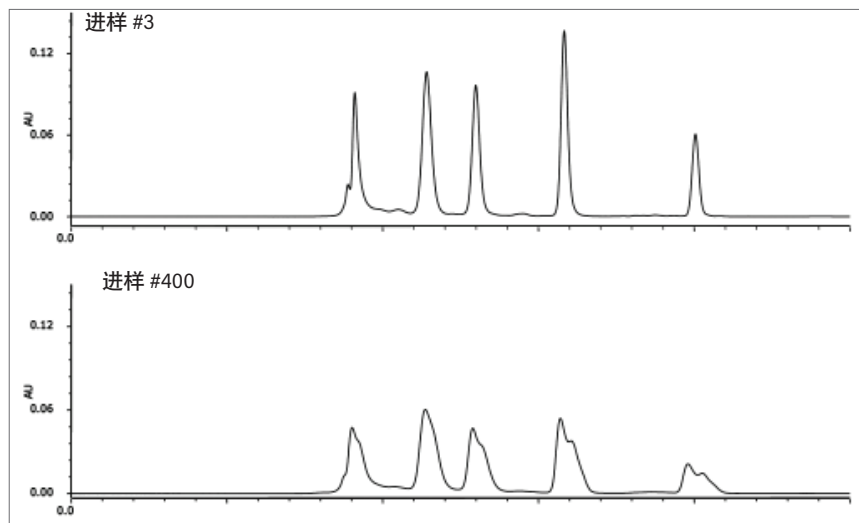


图10. SEC色谱柱被UPLC系统污染前后的蛋白分析结果比较。

► 有关样品和分离条件的详细信息, 请参阅www.waters.com上的Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Columns and Standards Care and Use Manual (《Waters ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱及标准品维护和使用手册》, 部件号: [720003385en](#))。

ACQUITY UPLC蛋白分析专用柱中滋生微生物后，对BEH200 SEC蛋白质混标(部件号: [186006519](#))的SEC分离造成的影响。通过检查色谱柱入口筛板确证了污染(图11和图12)。

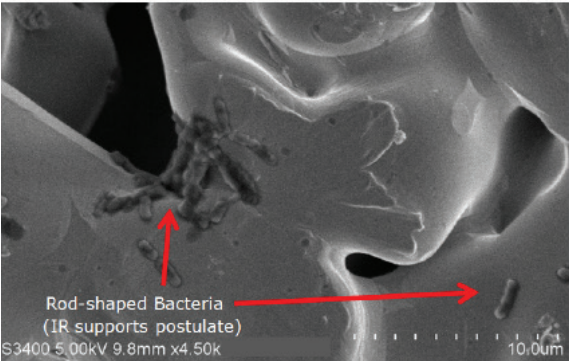


图11. 被细菌污染的ACQUITY UPLC BEH SEC 200Å, 1.7 μm蛋白分析专用柱入口筛板的电镜扫描图。

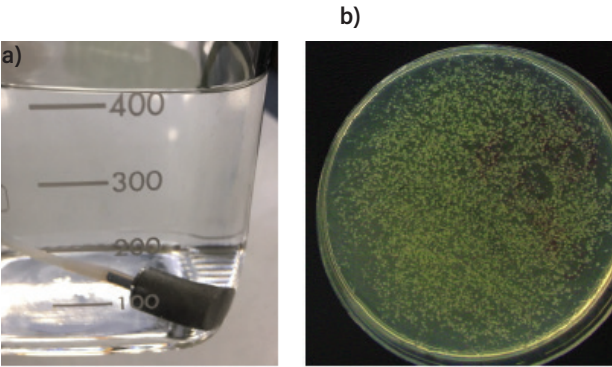


图12. 被微生物污染的SEC流动相瓶中的流动相管路滤头(图a)。采用无菌操作取出滤头，将其悬浮于无菌PBS中，然后取500 μL接种到支持微生物生长的琼脂平板上。图b证明取出的SEC流动相管路滤头中的确含有微生物。

c. 清洗ACQUITY UPLC系统

要清洗使用100%水性SEC方法的ACQUITY UPLC系统，应将标准UPLC清洗方案所使用的100% IPA替换为具有杀菌功能的70% 异丙醇(IPA)或70%乙醇(EtOH)。100% IPA或EtOH无法穿透细菌的细胞壁，因此并不是有效的杀菌剂，含甲醇的溶液同样如此(参考文献3)。沃特世曾遇到过如下情况：即使使用的是新制备且经过过滤的流动相，“被微生物污染的流动相过滤器”也使得全新ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱中迅速产生了颗粒污垢。这正是我们在前文中建议您不要在此类SEC应用中使用流动相滤头的原因。

有三种不同的ACQUITY UPLC系统清洁/冲洗方案可供选择，分别适用于不同的情况。

1. 对于使用无菌过滤流动相连续运行的系统：

在常规应用中，使用缓冲液的最佳做法首先是使用新的流动相瓶来盛放新制流动相(切勿直接添加)。配制好新流动相之后，若前一天使用过系统，只需湿灌注(Empower®软件功能)缓冲液管路

4 min。如果前一天未使用过系统，则湿灌注所有管路6~10 min。使用系统启动功能，根据需要更改灌注时间即可完成此操作。该功能还可以灌注密封清洗液、灌注溶液和洗针液溶剂管路。请记住，对ACQUITY UPLC系统进行湿灌注之后，在ACQUITY UPLC控制台的控制下，色谱柱会保留在系统中，与泵和检测器连接。Empower的溶剂灌注功能会将灌注溶剂直接转移至废液。这使得用流动相或下文所述的其它溶剂序列冲洗管路的操作变得非常简单。这一操作需要更换溶剂管路，如果该过程引入了气泡，湿灌注命令可将其排出。

2. 对于已空闲2~3天以上的系统：

如果系统已在有/无流速的缓冲液环境中放置2~5天，按以下方法湿灌注所有缓冲液管路将对色谱柱使用寿命有益：用水灌注4 min，然后使用70% IPA灌注6~10 min，接下来继续用水灌注4 min，开始其它分析之前再用缓冲液灌注4 min。此外，我们还建议在不使用系统时，(用水灌注缓冲液管路后)以70% IPA充满系统。重新启用时，请使用70% IPA湿灌注系统3~4 min，然后先用水灌注4 min，再用目标缓冲液湿灌注系统。

3. 作为预防性维护措施或系统被污染后的的常规清洗方案：

表2是清洗方案和执行该方案所需的试剂汇总，可定期(每3~6个月)执行清洗方案作为预防性维护措施。

- a. 断开色谱柱并在色谱柱入口和出口管路处安装V-Detail零死体积接头(部件号: [700002636](#))。
- b. 执行清洗方案的各个步骤时请监测系统压力, 使其保持1000 psi以下, 以防破坏检测器流通池。如有必要, 可将背压装置更换为大口径废液管路。
- c. 如果系统近期使用过流动相缓冲液或含盐溶液, 则应先使用100%高纯度水彻底冲洗系统, 再引入有机溶剂。
- d. 将A、B、C、D、密封清洗液、样品清洗液和灌注管路放入盛有70%异丙醇(作为清洗溶剂)的洁净容器瓶中。

注: 如果流动相或洗针溶剂与70%异丙醇不兼容, 请先用合适的过渡溶液冲洗以确保兼容性。

- e. Prime溶剂管路A、B、C和D各5 min。Empower的Prime命令能够以4 mL/min的速度驱动溶剂流过管路和系统, 以协助清洗过程。
- f. Prime密封清洗液。
- g. Prime洗针溶剂200 s, 然后灌注溶剂40个循环。
- h. 使用25% A、25% B、25% C和25% D以0.2 mL/min的流速灌注系统10 min。
- i. 使用100%甲醇作为清洗溶剂重复步骤d至h, 步骤h采用1.0 mL/min的流速。
- j. 使用100%高纯度水作为清洗溶剂重复步骤d至h, 步骤h采用1.0 mL/min的流速。

注意: 如果系统连接有喷雾式检测器 (MS或ELSD), 请在执行步骤k之前先使其离线。
将接头出口排出的液流直接导入废液。

- k. 使用10%磷酸水溶液作为清洗溶剂重复步骤d至h, 步骤h采用0.2 mL/min的流速。

注意: 为避免造成损坏, 请勿将密封清洗液管路置于此溶液中。请将密封清洗液管路置于高纯度水中。

- l. 使用100%高纯度水作为清洗溶剂重复步骤d至h, 步骤h采用1.0 mL/min的流速。
- m. 重新连接MS或ELS检测器(如果适用)。
- n. 使用100%甲醇重复步骤d至h, 步骤h采用1.0 mL/min的流速。

表2. ACQUITY UPLC系统清洁方案汇总。步骤完成后请打勾(✓)。

洗脱液	流速	Prime管路 A、B、C、D (各5 min)	Prime洗针溶 剂(200 s)	Prime灌注溶剂 (40个循环)	灌注密封 清洗液	清除A/B/C/D 25/25/25/25 (10 min)
IPA	0.2 mL/min					
甲醇	1 mL/min					
高纯度水	1 mL/min					
请将密封清洗液管路置于高纯度水中。如需使用，请移除流路中的喷雾式检测器(MS或ELSD)。						
10%磷酸水溶液	0.2 mL/min					
高纯度水	1 mL/min					
如需使用，请将喷雾式检测器重新装入流路中。						
甲醇	1 mL/min					

所需的清洗溶剂	
100%高纯度水	Milli-Q水或同等产品
100%甲醇	Fisher甲醇，Optima™ #A454-4或同等产品
70% (v/v)异丙醇(IPA)溶于高纯度水中	Fisher 2-丙醇，Optima #A464-4或同等产品
10%磷酸(水溶液)	使用HPLC级85%磷酸和高纯度水配制10% (v/v)的磷酸水溶液

d. 最大程度减少BEH SEC蛋白分析专用柱被样品颗粒物污染

颗粒累积会影响ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱的性能和使用寿命。上述颗粒包括进样的样品中所含的不可溶蛋白质聚集体。因此，建议使用低蛋白质结合力的0.2 μm无菌注射过滤器过滤所有蛋白样品。或者，也可将装有样品的ACQUITY UPLC样品瓶离心，使得所有不可溶颗粒在样品瓶底部形成沉淀物。

注：务必调节ACQUITY UPLC进样针深度，以防止采样时吸入离心样品瓶底部的颗粒。有关进样针深度设置和样品瓶最小体积的详细信息，请参阅www.waters.com上的Sample Vials and Accessories(《样品瓶及附件》，部件号：[720001818en](#))。

e. 避免BEH SEC蛋白分析专用柱被样品制剂成分污染

研究表明，多种化学和物理条件都可使生物治疗性蛋白质形成聚集体。为了最大限度避免这种情况，通常会向生物治疗性蛋白制剂中添加辅料。

然而，辅料会改变蛋白质的保留时间、峰形或分离度，因此会影响SEC定量的准确性。尽管可以采用多种SEC色谱柱清洗方案来恢复色谱柱性能，但它们都非常耗时，以致于效率低下。最后的解决办法通常是更换色谱柱，而这会增加成本并延迟项目。如图13所示，使用保护柱可保护BEH SEC蛋白分析专用柱免受污染的不利影响。

▶▶ 有关详细信息，请参阅www.waters.com上的Improving the Lifetime of UPLC Size-Exclusion Chromatography Columns Using Short Guard Columns(《使用短保护柱延长UPLC体积排阻色谱柱的使用寿命》，部件号：[720004034en](#))。

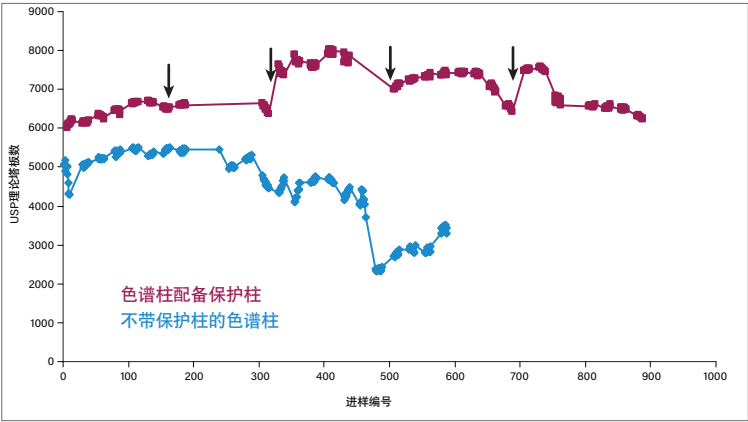


图13. ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析保护柱(4.6 × 30 mm)对柱效的保护效果。箭头指示了更换保护柱的时间点，由图可见，相较于未使用保护柱的对照组(下方/蓝色)，色谱柱使用寿命显著延长(上方/红色)。

f. 色谱柱存放

将SEC色谱柱从系统中取出并进行存放时，为防止其滋生微生物，我们建议执行以下操作：

1. 首先选择一条已经注入了100%水的溶剂管路。使用该管路，以大约20倍柱体积（例如，如果是4.6 x 150 mm色谱柱，则使用50 mL）经过过滤的HPLC级水冲洗出色谱柱中现有的流动相，从而清除SEC色谱柱中的所有缓冲液和盐。
2. 根据需要准备好UPLC系统后，使用大约20倍柱体积经过过滤的20%甲醇/80%水溶液冲洗SEC色谱柱，以防止细菌生长。随后即可在室温下安全存放色谱柱。

注：在存放于20%甲醇中之前，务必要将BEH SEC色谱柱中的所有盐和/或蛋白质冲洗干净，这一点非常重要。未去除的盐和/或蛋白质接触到储存时所用的20%有机溶剂时，可能导致色谱柱内产生沉淀。

VI. 总结和参考文献

总结

遵循本文所述的操作规范，可使用ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱实现可靠的分析，相较于基于HPLC的传统SEC方法，分离速度更快、分离度更高。要最大限度延长ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱的使用寿命，重点是避免流动相滋生微生物以及确保进样的样品中不含颗粒。BEH SEC保护柱可有效保护SEC分析柱免于因上述各种破坏因素而性能下降。

参考文献

1. Hong, P.; Koza, S.M.; Bouvier, E.S.P. A Review: Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* **2012**, *35*(20), 2923-2950.
2. Bouvier, E.S.P.; Koza, S.M. Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *Trends Analyt. Chem.* **2014**, *63*, 85-94.
3. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008, William A. Rutala, David J. Weber, M.D., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. US CDC, Atlanta, Georgia. (https://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf)

其他应用文献

1. 单克隆抗体及其高聚体的体积排阻色谱分析方法开发, 720004076ZH
2. Size-Exclusion Ultra Performance Liquid Chromatography Method Development for the Analysis of the Degradation Products of the Trastuzumab Antibody, 720004416EN
3. Successful Transfer of Size-Exclusion Separations Between HPLC and UPLC, 720005214EN
4. Improving the Lifetime of UPLC Size-Exclusion Chromatography Columns using Short Guard Columns, 720004034EN

VII. 订购信息

ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱和保护套件

说明	配置	粒径	规格	部件号
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 450Å	色谱柱	2.5 µm	4.6 x 150 mm	186006851
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 450Å	色谱柱	2.5 µm	4.6 x 300 mm	186006852
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 450Å	保护套件	2.5 µm	4.6 x 30 mm	186006850
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 200Å	色谱柱	1.7 µm	2.1 x 150 mm	186008471
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 200Å	色谱柱	1.7 µm	4.6 x 150 mm	186005225
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 200Å	色谱柱	1.7 µm	4.6 x 300 mm	186005226
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 200Å	保护套件	1.7 µm	4.6 x 30 mm	186005793
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 125Å	色谱柱	1.7 µm	4.6 x 150 mm	186006505
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 125Å	色谱柱	1.7 µm	4.6 x 300 mm	186006506
ACQUITY UPLC SEC蛋白分析专用柱, 125Å	保护套件	1.7 µm	4.6 x 30 mm	186006504

注: 体积排阻色谱可能要求对现有ACQUITY UPLC系统进行调整。请参阅www.waters.com上的Size-Exclusion and Ion-Exchange Chromatography of Proteins using the ACQUITY UPLC System(《使用ACQUITY UPLC系统进行蛋白质体积排阻色谱和离子交换色谱分析》, 部件号: 715002147)或Size Exclusion and Ion-Exchange Chromatography of Proteins using the ACQUITY UPLC H-Class System(《使用ACQUITY UPLC H-Class系统进行蛋白质体积排阻色谱和离子交换色谱分析》, 部件号: 715002909)获取详细信息。

XBridge BEH SEC蛋白分析专用HPLC色谱柱和UHPLC色谱柱

说明	配置	粒径	规格	部件号
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 125Å	保护柱	3.5 µm	7.8 x 30 mm	186007635
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 125Å	色谱柱	3.5 µm	7.8 x 150 mm	186007636
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 125Å	色谱柱	3.5 µm	7.8 x 300 mm	186007637
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å	保护柱	3.5 µm	7.8 x 30 mm	186007638
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å	色谱柱	3.5 µm	7.8 x 150 mm	186007639
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 200Å	色谱柱	3.5 µm	7.8 x 300 mm	186007640
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 450Å	保护柱	3.5 µm	7.8 x 30 mm	186007641
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 450Å	色谱柱	3.5 µm	7.8 x 150 mm	186007642
XBridge BEH SEC蛋白分析专用柱, 450Å	色谱柱	3.5 µm	7.8 x 300 mm	186007643

ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白质标准品

说明	部件号
BEH125 SEC蛋白质混标	186006519
BEH200 SEC蛋白质混标	186008476
BEH450 SEC蛋白质混标	186008475





扫一扫，关注沃特世微信

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

©2017年 沃特世公司。Waters、The Science of What's Possible、ACQUITY、UPLC、Alliance和 Empower是沃特世公司的注册商标。Auto-Blend Plus是沃特世公司的商标。Teflon是The Chemours Company的注册商标。Vectibix是Amgen的注册商标。Milli-Q是EMD Millipore Corporation的注册商标。Optima是Fisher Chemical的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

2018年2月 720006067ZH KP.2Cool