

BioResolve SEC mAb分析专用柱和保护柱

目录

- I. 简介
- II. 单克隆IgG抗体聚集体、单体和片段的SEC分析
 - a. 注意事项
 - b. 确定LC系统柱外扩散
 - c. 选择合适的BioResolve SEC mAb分析专用柱
- III. 色谱柱使用注意事项
 - a. SEC缓冲液制备
 - b. 色谱柱安装
 - c. 色谱柱平衡
 - d. 确认色谱柱性能
 - e. BioResolve SEC mAb保护柱
- IV. 色谱柱性能范围
- V. 故障排除
- VI. 色谱柱清洗、再生和储存
 - a. 清洗与再生
 - b. 储存
- VII. 注意事项

I. 简介

Waters™ BioResolve™ SEC mAb分析专用柱和BioResolve SEC mAb保护柱采用专门的生产工艺生产并经过质控测试，能够准确、高度重现地定量分析单克隆抗体(mAb)、mAb高分子量聚集体($\geq 300,000$ Da)以及低分子量片段($\leq 100,000$ Da)。该系列色谱柱有多种尺寸供用户灵活选用，能在多种色谱平台上进行性能优化，全面涵盖高扩散体积的HPLC系统到低扩散体积的UPLC™系统。

此外，该系列产品还包括保护柱，可有效捕获样品和/或洗脱溶液中有时可能存在的不可溶颗粒及辅料，从而延长分析柱使用寿命。

BioResolve SEC mAb分析专用柱和保护柱均由通过cGMP和ISO 9001认证的工厂使用严格的生产方案和超纯试剂生产。每批固定相都必须通过一系列严格的QC测试。色谱柱均独立包装，先接受柱效测试，再采用Waters mAb分子大小变异体标准品进行mAb性能测试，旨在确保色谱柱在这类棘手应用中保持每根色谱柱的性能一致。每根色谱柱的包装盒中都随附mAb分子大小变异体标准品分离测试结果和尿嘧啶柱效测试结果。

有关延长SEC色谱柱使用寿命的重要信息，请参见第III节e部分。



II. 单克隆IgG抗体聚集体、单体和片段的SEC分析

a. 注意事项

过去，在评估重组蛋白生物治疗药物中的非共价蛋白质聚集体（高分子量物质[HMWS]）时，体积排阻色谱(SEC)曾是应用非常广泛的方法。不过近年来，随着SEC色谱柱和LC系统性能不断提升，在未变性条件下使用SEC分析这类样品中的蛋白质片段（即低分子量物质[LMWS1&2（约100 kDa）、LMWS3（约50 kDa）和LMWS4（约50 kDa）]），也越来越受到人们的关注（图1）。其中，人们尤为关注分析较链区水解产生的高分子量IgG mAb片段(LMWS1)的方法。mAb主要LMWS1片段的分子量是单体分子量的三分之二（约100 kDa），相较于分离单体（约150 kDa）与二聚体和更高分子量HMWS(≥ 300 kDa)的传统方法，分离单体与LMWS1片段的难度更大。这是因为相较于单体与HMWS蛋白质，单体与LMWS1的大小（流体动力学半径）更加接近。此外，在洗脱各种源于mAb的蛋白质时，低丰度LMWS1峰会作为主峰（mAb单体）的肩峰拖尾洗脱，这进一步加大了分离难度（图1）。

Waters mAb分子大小变异体标准品随附每个成品批次的COA报告。该产品中含有NISTmAb参比物质(RM) 8671（一种人源单克隆抗体）以及未还原的IdeS (Fabricator®)酶解NISTmAb片段LMWS2（约100,000 Da）和LMWS3（约50,000 Da），这两种mAb片段的分子量分别与LMWS1和LMWS4接近。Waters mAb分子大小变异体标准品中含有以上四种LMWS。NISTmAb RM中只含水解降解片段（LMWS1和LMWS4）。有关Waters mAb分子大小变异体标准品的更多信息，请访问waters.com网站，搜索P/N: [720006811EN](#)。

注：图1所示为NISTmAb样品和Waters mAb分子大小变异体标准品在完整单体和分子大小变异体方面的差别。具体而言，NIST mAb样品和其他mAb一样，水解片段(Fab/c)略大于IdeS酶解片段，尽管它们的分子量相近。

与之相比，IdeS酶解片段(Fc/2)2的大小约为50 kDa，比水解片段（约50 kDa）大，这很可能是由于缺少较链区，导致含糖基区域周围有部分扩展。

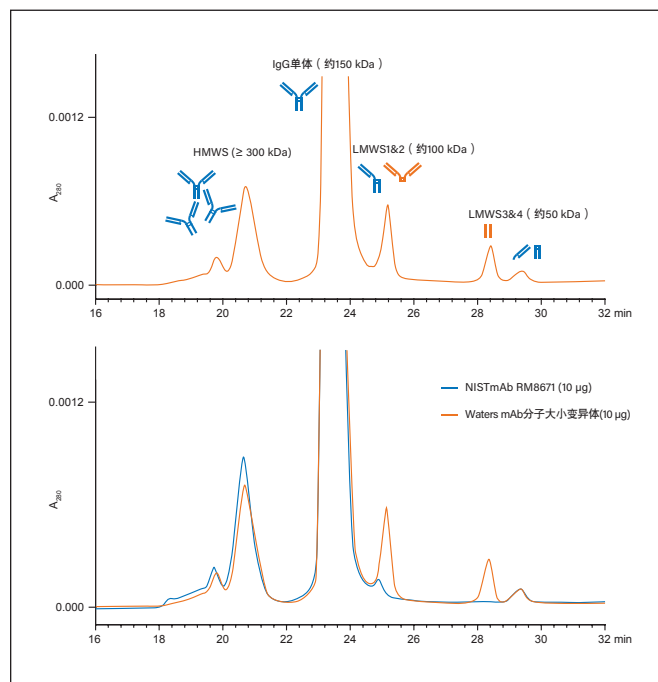


图1. 使用Waters BioResolve SEC mAb分析专用柱, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 x 300 mm分离NISTmAb RM 8671和Waters mAb分子大小变异体标准品中的mAb聚集体、单体和片段。LMWS: IdeS片段（橙色）；水解降解片段（蓝色）。条件：环境温度，流速0.3 mL/min。

为特定mAb分离选择合适的BioResolve SEC mAb分析专用柱尺寸时，扩散是一个非常重要的考量因素。谱带展宽小的系统，柱效和片段分离度更好，使用较短的色谱柱时更是如此。色谱柱填料颗粒越小（例如2 µm），扩散越大，分离度则越低。不过，即便使用谱带展宽较大的HPLC和UHPLC系统，只要增大色谱柱柱长和内径（例如BioResolve SEC mAb分析专用柱，2.5 µm，内径7.8 mm/4.6 mm x 柱长300 mm），仍然可以获得非常不错的结果。

柱外扩散会导致样品体积（相对于进样体积）增加。造成这一现象的原因是样品通过了LC系统中除色谱柱之外的流路。更多信息请参阅沃特世应用纪要《LC系统扩散对单克隆IgG抗体聚集体和片段体积排阻色谱分析的影响：基于方法选择理想色谱柱规格》（沃特世P/N: [720006336ZH](#)）。

b. 确定LC系统柱外扩散

在SEC分离中，分析物将在一个SEC柱体积内通过等度分离洗脱。在不连接SEC色谱柱的情况下确定LC系统扩散体积非常关键。这个体积包括系统进样器、进样器后的管路以及检测器流通池的体积。这些组件之间的连接质量以及锥箍是否正确安装，对于系统性能而言意义重大。掌握这些信息有助于选用合适的BioResolve SEC mAb分析专用柱。

以下流程可用于确定LC系统扩散体积，通常被称为5-sigma谱带展宽：

1. 将色谱柱替换为零死体积接头（P/N: [700002636](#)）。
LC管路尺寸应为内径0.0025英寸x长8.5英寸（P/N: [700009971](#)）。检查锥箍是否放置到正确的深度，确保没有因连接不良而产生额外的死体积。
2. 依次用水和50:50水/乙腈溶液冲洗所有LC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，滤光器设置为无。
4. 流速：0.5 mL/min，平衡系统时间10 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：
 - a. 测定咖啡因4.4%峰高处的峰宽，以min为单位（即5-Sigma法）。
 - b. 用峰宽乘以流速，得到峰体积（单位：mL）。
 - c. 用峰体积（单位：mL）乘以1000，得到以 μ L为单位的峰体积。

注：采用5-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，平均值应小于12 μ L；若使用CM-A柱温箱，应小于16 μ L；若使用30-CH-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。

c. 选择合适的BioResolve SEC mAb分析专用柱

下表根据LC系统扩散体积和mAb组分分离的难度给出了推荐的色谱柱尺寸。有关开发稳定mAb SEC分离方法的更多信息，请参阅沃特世应用纪要《单克隆抗体及其高聚集体的体积排阻色谱分析方法开发》（P/N: [720004076ZH](#)）。

表1. 基于具体应用和LC系统扩散体积的BioResolve SEC mAb分析专用柱选用建议

分离类型	LC系统扩散体积	BioResolve SEC mAb分析专用柱选用建议
分离聚集集中的mAb单体	$\leq 20 \mu\text{L}$	4.6 x 150 mm
	$> 20 \mu\text{L}$	7.8 x 150 mm
分离聚集体和片段中的mAb单体	$\leq 20 \mu\text{L}$	4.6 x 300 mm
	$> 20 \mu\text{L}$	7.8 x 300 mm

注：使用7.8 x 300 mm色谱柱时分离非常稳定。

III. 色谱柱使用注意事项

a. SEC缓冲液制备指南

只可使用高品质且经过过滤的水（例如经Milli-Q Millipak 0.22 μ m过滤的水）制备SEC流动相。过滤时应使用 $< 0.22 \mu\text{m}$ 的过滤器。已证明带0.2 μ m尼龙过滤器的无菌装置（即Fisher Scientific目录号09-740-46）可成功实现过滤目的。应定期替换易滋生微生物的溶液，以免色谱柱被污染。切勿将新配制的洗脱溶液直接注入半满的SEC洗脱溶液储液瓶，因为这会导致新配制的流动相中迅速滋生微生物。正确的做法是用新的储液瓶盛装新配制的SEC洗脱溶液。

溶剂入口过滤器（又称吸滤头）是常见的细菌污染源，强烈建议不要使用。另外，过滤pH 6.8以上的流动相时，不建议使用硅基烧结玻璃过滤器，因为这类过滤器可能会向SEC洗脱溶液中引入可溶和/或不可溶硅酸盐，进而改变色谱柱性能。

b. 色谱柱安装

1. 将色谱柱安装到系统之前，请先清除系统中的任何有机相或不与水混溶的流动相。安装色谱柱之前，务必灌注经过检测器的整条流路并排至废液，确保冲洗出的残留物不会沉积在色谱柱头。连接色谱柱入口时，方向应与色谱柱入口侧箭头和色谱柱标签所示的方向一致。检查锥箍是否已调整到合适的深度，确保没有因连接不良而产生额外的死体积。
2. BioResolve SEC mAb分析专用柱(200 Å)出厂时保存于含有10%乙腈/90% 25 mM磷酸钠(pH 7.0) + 100 mM氯化钾的溶液中。
3. 在更换为其他流动相体系之前，务必确保流动相的兼容性。如果存在兼容性问题，可以使用按1:5稀释的缓冲液或水来代替保存溶剂。内径4.6 mm的色谱柱采用0.2 mL/min的流速，内径7.8 mm的色谱柱采用0.5 mL/min的流速，以0.1 mL/min为增量缓慢增加，运行3个柱体积以清除色谱柱中的原有溶剂（柱体积和压力限值参见表2）。使用稀释的缓冲液可更快达到色谱柱平衡，同时更好地保持色谱柱活化。
注：不建议使用100%水或100%缓冲液储存色谱柱，此类溶液可能会降低色谱柱性能并滋生微生物。强烈建议使用10%乙腈/90% 25 mM磷酸钠(pH 7.0) + 100 mM氯化钾对保护柱或色谱柱进行长期保存。
4. 确保流动相从色谱柱出口自由流出。停止液流，使用内径0.0025英寸x长8.5英寸的PEEK管路（P/N: [700009971](#)）、内径0.004英寸x长8.5英寸的PEEK管路（P/N: [700009972](#)）或内径0.005英寸x长25英寸的MP35N管路（P/N: [430002575](#)）将色谱柱出口连接至检测器。缓慢恢复液流，监测系统压力以确保色谱柱在其压力限制范围内工作。
5. 继续以所需流速使用缓冲液平衡色谱柱，以0.1 mL/min的增量逐渐增加流速，使用前平衡至少10个柱体积，直至基线和柱压稳定。监测系统压力以确保色谱柱在其压力限制范围内工作。
6. 系统压力稳定后，确保色谱柱入口或出口均无渗漏。

c. 色谱柱平衡

BioResolve SEC mAb分析专用柱和保护柱出厂时保存于含有10%乙腈/90% 25 mM磷酸钠(pH 7.0) + 100 mM氯化钾的溶液中。

在更换为其他流动相体系之前，务必确保流动相的兼容性。如果怀疑有兼容性问题，可以使用按1:5稀释的缓冲液或水作为过渡流动相。详细信息请参阅“色谱柱安装”章节。使用之后要在分析中使用的缓冲液平衡色谱柱，运行至少10个柱体积。

表2.空分析柱体积（单位：mL*）和柱压限值

(*乘以10得到平衡溶剂体积)

色谱柱尺寸	近似体积	压力限值
4.6 x 150 mm	2.5 mL	4500 psi (310 bar)
4.6 x 300 mm	5.0 mL	6500 psi (448 bar)
7.8 x 150 mm	7.0 mL	4500 psi (310 bar)
7.8 x 300 mm	14.0 mL	6500 psi (448 bar)

上表所列的压力上限未考虑系统因素，仅指柱压。如果运行压力高于推荐值，可能影响色谱柱使用寿命。

d. 确认色谱柱性能

沃特世建议您在收到新的BioResolve SEC色谱柱后以及色谱柱的整个使用寿命期间执行基准测试。使用Waters mAb分子大小变异体标准品（P/N: [186009284](#)），您可以：

- 在收到色谱柱后验证其性能。
- 在各种应用中监测色谱柱条件。
- 解决可能出现的分离或峰形难题。

可使用缓冲液制备0.1 mg/mL尿嘧啶溶液代替mAb分子大小变异体标准品，在色谱柱测试报告中提供的条件下进样分析，对色谱柱性能进行基准测试。色谱柱测试报告给出了尿嘧啶保留时间、5-Sigma法柱效、USP拖尾因子和柱压数据，可以很方便地用作基准测试参考。根据系统扩散情况，结果可能不同。更多信息请参见下图。

注：色谱柱测试报告中分析mAb和尿嘧啶所用的流速都针对mAb分离进行了优化。出于这个原因，尿嘧啶的数据与XBridge™ BEH SEC蛋白分析专用柱的报告数据不具可比性。

以下章节详细介绍了如何正确制备和使用其中的Waters mAb分子大小变异体标准品进行基准测试或故障排除。请注意，本标准品中不含尿嘧啶。分离条件请参阅III节(e)部分，图3-7是使用不同LC系统分离Waters mAb分子大小变异体标准品应该得到的结果。

Waters mAb分子大小变异体标准品及其制备和使用

每瓶Waters mAb分子大小变异体标准品（P/N：[186009284](#)）含160 µg经稳定和冻干处理的NISTmAb RM 8671，其中分别添加了2 µg经过纯化的未还原IdeS酶解NISTmAb片段。选择NISTmAb的原因在于，这是一种经过全面表征的基准物质，常用于评价分析方法测定样品理化和生物物理属性的性能。FabRICATOR® IdeS蛋白酶是一种特殊的酶，可以酶解IgG铰链区下方的特定位点，在非变性天然SEC法条件下生成F(ab')₂和(Fc/2)₂片段。

收到标准品后，在复溶之前请保留标准品的原包装并将其储存在-20 °C下，直至取出制备或达到标示的有效期。复溶后，建议在24小时内使用标准品，储存时间过长会导致mAb分子大小变异体浓度水平发生变化，另请注意，本标准品不适用于mAb组分的定量分析。

如果需要，可以在-80 °C下冷冻保存复溶后的标准品并稍后解冻使用，但请注意，mAb聚集体和片段的相对含量可能与新鲜配制后立即使用的标准品有差别。有关Waters mAb分子大小变异体标准品的更多信息，请参阅维护和使用手册（P/N：[720006811EN](#)）。

建议使用18.2 MΩ水溶解标准品，得到浓度为1–2 mg/mL的溶液，然后使用标准台式涡旋装置充分混合溶液。为确保完全溶解，建议以瓶口朝上和倒置位置各旋涡混合5 s，然后恢复瓶口朝上位置再次混合。使用mAb分子大小变异体标准品(1–2 µg/µL)进行标准分析时，建议采用以下进样体积：

Diameter (mm)	Length (mm)	Injection Volume (µL)
4.6	150	1.8–5
	300	3.5–5
7.8	150	5
	300	10

您可以增大进样体积，但是单体与片段间的分离度可能会略有下降。如果单体和片段都需要进行相对定量，则建议使用7.8 x 300 mm色谱柱。可以直接使用产品随附的样品瓶盛装复溶样品进样分析。

注：由于瓶中的样品体积较小，建议将进样针深度设置为距离样品瓶底部1 mm。如果进样后得到空白色谱图，请检查进样针深度。

下图是NISTmAb样品和Waters mAb分子大小变异体标准品在完整单体和分子大小变异体方面的差别。NISTmAb样品和其他mAb一样，水解降解片段(Fab/c)大于IdeS酶解片段，尽管它们的分子量相近。

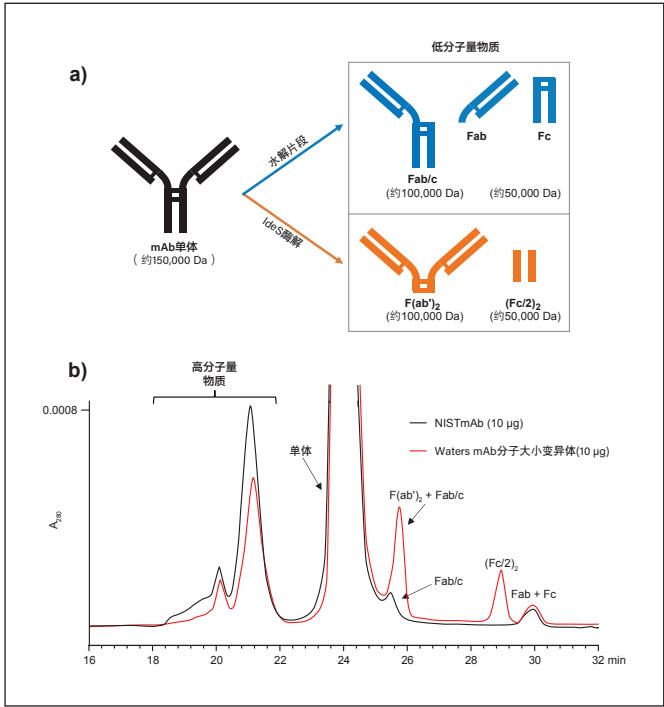


图2. a) mAb图解，图中显示了NISTmAb RM 8671和Waters mAb分子大小变异体标准品在完整单体和片段方面的差别。b) NISTmAb（黑色迹线）和经过改良的Waters mAb分子大小变异体标准品（红色迹线）的代表性A280 SEC色谱图，该色谱图经过剪裁，除单体外，还显示了高分子量物质和低分子量物质。由于水解半径相近，F(ab')₂和Fab/c未能分离。数据是使用BioResolve SEC mAb分析专用柱，200 Å，2.5 µm，7.8 x 300 mm在280 nm处测得的吸光度数据。

e. 系统扩散的影响系统扩散的影响

要为分析方法选择理想的色谱柱配置，具体取决于您的LC系统扩散情况。第II节b部分提供了简单易操作的方法。为了说明中等扩散和低扩散系统对Waters mAb分子大小变体标准品SEC分离的影响，我们在ACQUITY UPLC Arc™ Bio系统和ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上使用配置不同的四根BioResolve SEC mAb分析专用柱进行了分析。

在两种系统上使用相同的样品和流动相。分析条件如下所示，图3、图4、图5和图6分别为使用4.6 x 150 mm色谱柱、4.6 x 300 mm色谱柱、7.8 x 150 mm色谱柱和7.8 x 300 mm色谱柱得到的SEC色谱图。

在这些数据中，图7清楚地表明，如果需要分离并准确定量mAb单体（约150 kDa）和分子量与之很接近的低分子量片段（约100 kDa），优选配备7.8 x 300 mm色谱柱的“高扩散（Alliance™）LC系统”。

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio， 5-Sigma法系统扩散 = 10 μL (图3-图6)； ACQUITY Arc Bio，5-Sigma法 系统扩散 = 30 μL (图3-图6)； Alliance HPLC系统，5-Sigma法 系统扩散 = 49 μL (图7)
色谱柱:	BioResolve SEC mAb分析专用柱， 200 Å, 2.5 μm, 4.6 x 150 mm (P/N: 176004592*) 4.6 x 300 mm (P/N: 176004593*) 7.8 x 150 mm (P/N: 176004594*) 7.8 x 300 mm (P/N: 176004595*) *包含色谱柱和一瓶mAb分子大小 变体标准品
柱温:	35 °C，采用主动预加热 CH-A (H-Class)、CH-30A (H-Class)和 30-cm CH/C (Arc)
流动相:	50 mM磷酸钠(pH 7.0)，200 mM KCl
流速:	0.200 mL/min (4.6 mm内径) / 0.575 mL/min (7.8 mm内径)
样品管理器 温度:	8 °C

检测器:	ACQUITY UPLC H-Class Bio系统使用配备 5 mm钛流通池的可变波长紫外(TUV)检测器， ACQUITY Arc Bio and Alliance系统使用配备 10 mm生物惰性流通池的2489 UV/Vis检测器
UV检测:	280 nm，10 Hz，快速滤光器
密封清洗液:	10% HPLC级甲醇/90% 18.2 M Ω水(v/v)
样品管理器 清洗:	18.2 M Ω水
复溶:	70 μL 18.2 M Ω水
样品:	2.28 mg/mL Waters mAb分子大小变体 标准品
进样体积:	不同进样体积: 1.8、3.5、5或10 μL， 取决于色谱柱配置

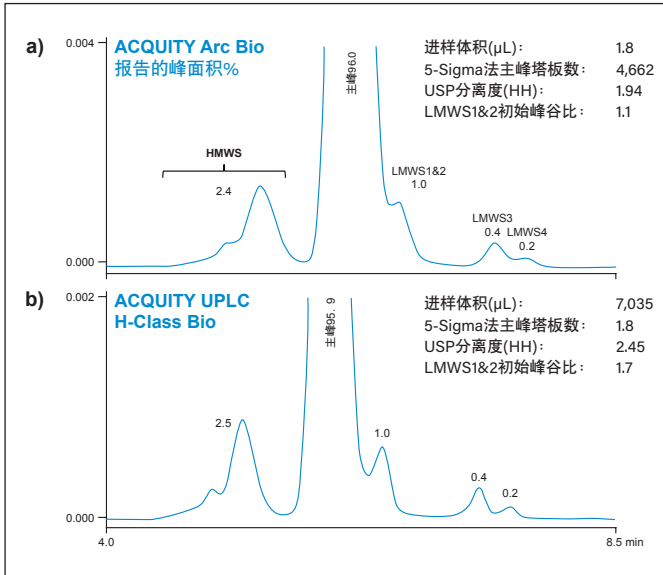


图3.分别在系统扩散体积为30 μL (ACQUITY Arc)和10 μL (ACQUITY UPLC H-Class)的LC系统上使用BioResolve SEC mAb分析专用柱，4.6 x 150 mm分离Waters mAb分子大小变体标准品。

由图3中的色谱图明显可知，由于单体主峰展宽，100 kDa的“片段”在高扩散系统上仅显示为肩峰。尽管足以对HMWS进行定量分析，但效果不理想，因为二聚体与单体在半峰高处的USP分离度(R_s [USP, HH])小于2。另一根4.6 x 150 mm色谱柱上二聚体与单体间的 R_s (USP, HH)非常不错，但要稳定地定量mAb片段，这样的分离度还不够理想。在大多数情况下，要实现稳定、准确的定量分析，初始峰谷比必须大于2。

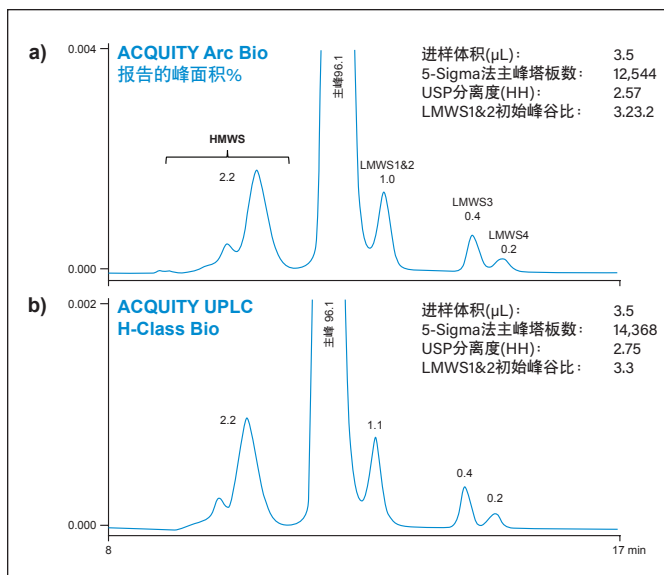


图4. 分别在系统扩散体积为30 μL (ACQUITY Arc)和10 μL (ACQUITY UPLC H-Class)的LC系统上使用BioResolve SEC mAb分析专用柱, 4.6 x 300 mm分离Waters mAb分子大小变异性标准品。

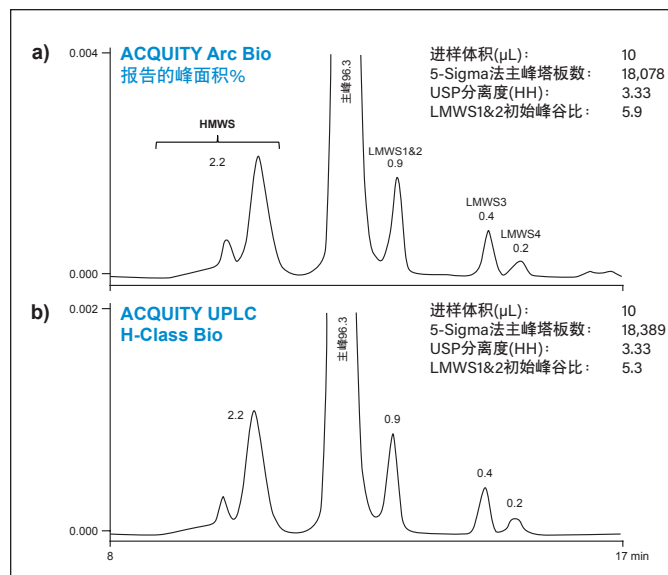


图6. 分别在系统扩散体积为30 μL (ACQUITY Arc)和10 μL (ACQUITY UPLC H-Class)的LC系统上使用BioResolve SEC mAb分析专用柱, 7.8 x 300 mm分离Waters mAb分子大小变异性标准品。

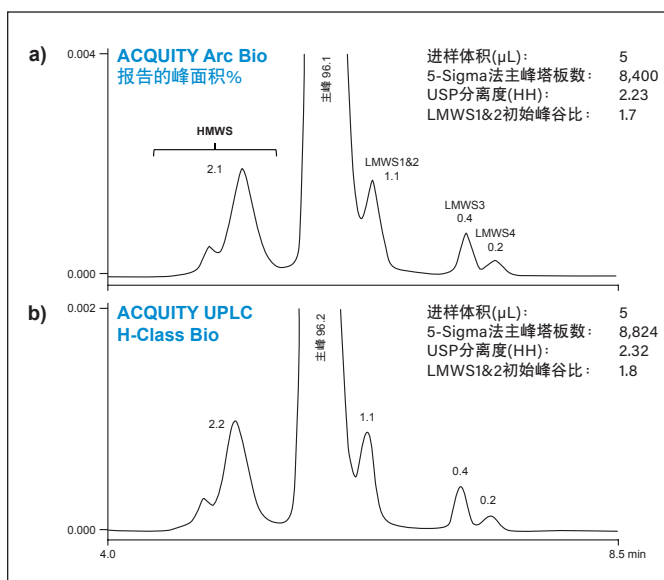


图5. 分别在系统扩散体积为30 μL (ACQUITY Arc)和10 μL (ACQUITY UPLC H-Class)的LC系统上使用BioResolve SEC mAb分析专用柱, 7.8 x 150 mm分离Waters mAb分子大小变异性标准品。

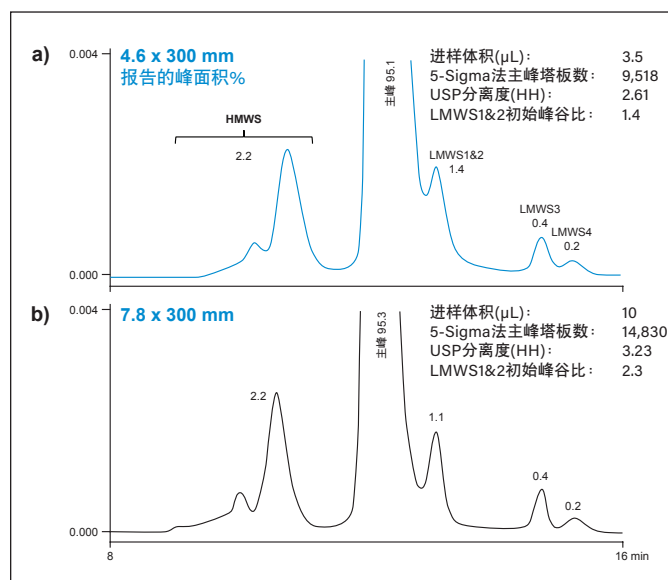


图7. 在系统扩散体积为49 μL (Alliance)的LC系统上, 分别使用 4.6 x 300 mm和7.8 x 300 mm的BioResolve SEC mAb分析专用柱分离 Waters mAb分子大小变异性标准品。

e. BioResolve SEC mAb保护柱

使用沃特世专门开发的BioResolve SEC mAb保护柱能有效延长分析柱使用寿命。保护柱的使用寿命受多方面因素影响，包括：

- 流动相洁净度/微生物污染
- 样品沉淀/聚集
- 样品配方中的辅料
- 在pH、温度和/或压力限值下运行

如果观察到以下情况，可能需要更换保护柱：

- 柱压显著增大
- 出现宽拖尾峰或分叉峰

如果进样至SEC色谱柱的mAb样品基质中含有颗粒物或辅料，可能会缩短色谱柱使用寿命，详细信息请参阅《体积排阻色谱(SEC)优化指南》(P/N: [720006067ZH](#))。

因此，向SEC色谱柱进样之前，请务必确保样品中不含颗粒物质。如果样品浑浊或有絮凝物，不得进样，因为这会导致柱压增加。如果适用，可以进行过滤或离心等样品前处理。

为了延长BioResolve SEC mAb分析专用柱的运行寿命，沃特世专门设计了BioResolve SEC mAb分析保护柱，能在不影响150 kDa mAb单体与100 kDa片段充分分离的前提下(图8)，防止样品或洗脱溶液中的颗粒物质以及样品中的某些辅料影响分析柱性能。

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
色谱柱:	BioResolve SEC mAb分析专用柱, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 x 300 mm (P/N: 186009439)
柱温:	室温
流动相:	50 mM磷酸钠, pH 7.0, 200 mM KCl
流速:	0.575 mL/min
样品管理器	
温度:	8 °C
UV检测:	280 nm, 10 Hz, 不使用滤光器
密封清洗液:	10% HPLC级甲醇/90% 18.2 M Ω 水(v/v)
样品管理器清洗:	18.2 M Ω 水
复溶:	70 µL 18.2 M Ω 水
样品:	2.28 mg/mL Waters mAb分子大小变异体标准品
进样体积:	10 µL Waters mAb分子大小变异体标准品

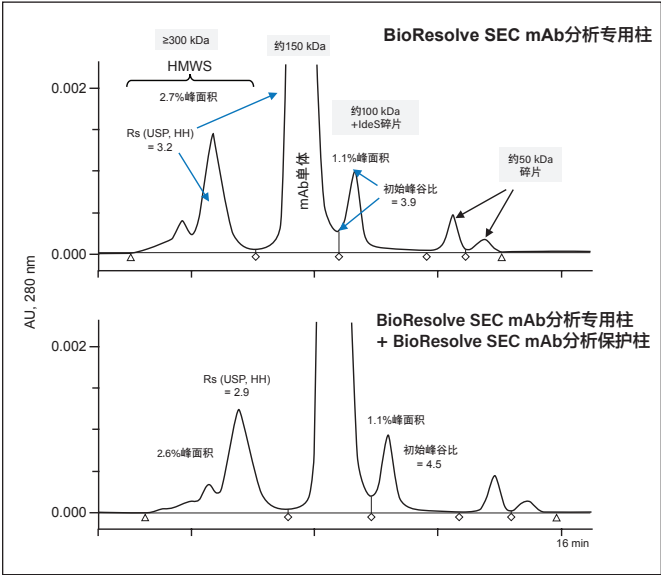


图8.在使用(下方谱图)和不使用(上方谱图) BioResolve SEC mAb 分析保护柱, 4.6 x 30 mm的条件下, 使用BioResolve SEC mAb分析 专用柱, 7.8 x 300 mm分离Waters mAb分子大小变异体标准品。

IV. 色谱柱性能范围

- 出厂溶剂：BioResolve SEC mAb分析专用柱, 200 Å, 2.5 µm出厂时保存于含有10%乙腈/90% 25 mM磷酸钠(pH 7.0) + 100 mM氯化钾的溶液中。
- pH范围：2.5-8.0。
- 温度范围：4-60 °C。
- 在低温下（例如，10 °C）运行时请降低流速，避免柱压过高。
- 建议使用的盐溶液浓度：100-500 mM KCl或NaCl。
- 建议使用的缓冲液浓度：25-200 mM。
- 有机溶液浓度：乙腈< 10%，甲醇< 20%。

注：换用其他流动相时，请务必确保流动相与样品的兼容性。添加有机溶剂可能会对蛋白质溶解性造成不良影响。

- 建议的进样体积和载样量上限：

色谱柱柱长	4.6 x 150 mm	4.6 x 300 mm	7.8 x 150 mm	7.8 x 300 mm
载样体积	<10 µL	<20 µL	<30 µL	<60 µL
载样量	<100 µg	<200 µg	<300 µg	<600 µg

上面所列的进样体积和载样量反映了传统方法导致色谱柱和系统长时间大量损失蛋白质样品的事实。如今，采用比这低得多的进样体积和载样量就能更好地分离以前难以分离的色谱峰。对于分离良好的峰，逐渐增大进样体积执行一系列进样，仍能获得等效的表征数据，进一步证实了这一点。得益于光程达10 mm的生物惰性流通池，在ACQUITY UPLC H-Class Bio系统上配合使用2489 UV/Vis检测器和7.8 mm内径色谱柱获得了更好的灵敏度和信噪比。然而，增大流通池体积会影响4.6 x 150 mm色谱柱的分离度。请牢记，并非所有10 mm流通池都等效。沃特世标准分析型流通池采用Teflon浸湿部件，用于分析蛋白质时会产生拖尾峰。在可能的情况下，请务必为您的系统选用生物惰性或生物相容的部件。

- 建议流速和背压：

色谱柱柱长	4.6 x 150 mm	4.6 x 300 mm	7.8 x 150 mm	7.8 x 300 mm
流速范围	≤0.5 mL/min	≤0.5 mL/min	≤1.0 mL/min	≤1.0 mL/min
柱压上限*	≤4500 psi	≤6500 psi	≤4500 psi	≤6500 psi

*建议的色谱柱压降上限仅适用于色谱柱本身，未考虑LC系统造成的压力增加。要确定色谱柱的压降：用零死体积接头替换色谱柱，在运行条件下测定系统压力，然后从装有色谱柱时测得的系统背压中减去该值。

柱压受温度和缓冲液/盐溶液浓度的影响。为了尽可能延长色谱柱使用寿命，选用的流速不得使柱压超过其上限。

沃特世提供了色谱柱的建议压降上限作为指南，旨在尽可能延长色谱柱使用寿命。本指南中的数值不应视为绝对压力上限。例如，某些方法可能导致压力超过建议的上限值，尽管这样会缩短色谱柱使用寿命，但却能达到所需的SEC分离性能。

在压力、pH和/或温度限值下运行可能会导致色谱柱使用寿命缩短。

V. 故障排除

系统故障排除的第一步是比较当前状态下的色谱柱性能与正常运行时的色谱柱性能。使用蛋白质混合物进行功能测试有助于发现表面填料中影响应用性能的微小变化。

下面列出了色谱柱发生变化的几个常见征兆。

1. 应用中压力增大通常与性能降低有关。诊断的第一步是确保增大的压力源于色谱柱而不是系统的其他地方。通过断开每个连接的出口端到入口端并监测系统压力来确定这一点。如果系统出现堵塞，应确定堵塞物并将其清除。如果压力增加源于色谱柱，则有必要了解此问题与单次进样相关还是发生在一系列进样中。如果压力逐渐增加，可以使用第VI节所述的方法清洗色谱柱。如果仅当某一个样品进样时压力增大，表明此问题可能是颗粒物质或不溶性组分（如脂类或高级聚集体）造成的。在这种情况下也可以清洗色谱柱，但需要使用更强劲的清洗方法。如果样品浑浊或有絮凝物，不得进样，因为这会导致压力增加。可以进行过滤或离心等样品前处理，但首先应确认这是不是影响结果的因素。
2. 微生物污染可能导致分离度损失和峰拖尾加剧。请务必遵守防止微生物污染的良好实验室规范，具体包括：经常更换缓冲液储液瓶、使用高纯度水、使用无菌过滤装置，以及采用推荐条件储存系统和色谱柱。如果发现微生物污染，清洗色谱柱不会对性能造成任何影响。更改流速时，请以0.1 mL/min的增量增加，避免流速以超过0.1 mL/min的增量剧烈增加。

3. 管路接头故障或色谱柱入口筛板有物质积聚可能导致峰拖尾加剧。进行诊断性或纠正性测量前，请检查所有连接，确保流动相已正确配制，并且选择了正确的方法。然后重复执行蛋白质标准品测试。如果蛋白质测试结果显示峰拖尾加剧，表明色谱柱入口处很可能有大量物质积聚，需要更换色谱柱。

4. 残留定义为某个样品的组分出现在下一次分析中。在体积排阻色谱分析中，残留通常是系统组件或不适用的清洗溶剂造成的。运行一次空白进样。如果蛋白质峰仅在进样后出现，表明残留可能来源于系统组件或不适用的清洗溶剂。系统组件上的吸附很有可能发生在定量环或进样针上。在这些情况下，可能需要更换组件。

注：有关色谱柱故障排除的实用信息，可参阅HPLC Columns Theory, Technology and Practice (《HPLC色谱柱理论、技术与实践》)，U.D.Neue (Wiley-VCH, 1997)、Waters HPLC Troubleshooting Guide (《沃特世HPLC故障排除指南》，P/N: [wa20769](#))，或者访问www.waters.com。

VI. 色谱柱清洗和储存

a. 色谱柱清洗

1. 使用常用流速的二分之一进行冲洗。可能需要使用以下一种或多种溶液：

- 25–200 mM缓冲溶液(pH 3.0) + 0.5 M NaCl或KCl
- 添加25–100 mM缓冲溶液的10%乙腈或20%甲醇+ 100 mM NaCl或KCl
- 有机溶剂浓度不得超过20%
- 不得使用离子表面活性剂或其他表面活性剂

可以尝试反冲色谱柱，但这有可能进一步损坏色谱柱，或者只能短暂地改善色谱柱性能。

b. 色谱柱储存

注：不建议使用100%水或100%缓冲液储存色谱柱，此类溶液可能会降低色谱柱性能并滋生微生物。

1. 推荐的保存方法是使用出厂溶剂灌注色谱柱。
 - 10%乙腈/90% 25 mM磷酸钠(pH 7.0) + 100 mM KCl
 - 至少使用五倍柱体积的溶液进行灌注
2. 也可使用其他缓冲液组合。
 - 缓冲液应含浓度为50–100 mM的盐（KCl或NaCl）和浓度不超过50 mM的磷酸盐
 - 应添加10%乙腈、20%甲醇或0.05%叠氮化钠，以避免滋生微生物
 - 不得使用100%水储存色谱柱

短期储存期间，储存于4 °C下也有助于尽量避免细菌滋生。

BioResolve SEC色谱柱及标准品

部件编号	描述
186009435	BioResolve SEC色谱柱, 200 Å, 2.5 µm, 4.6 x 150 mm
186009437	BioResolve SEC色谱柱, 200 Å, 2.5 µm, 4.6 x 300 mm
186009439	BioResolve SEC色谱柱, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 x 150 mm
186009441	BioResolve SEC色谱柱, 200 Å, 2.5 µm, 7.8 x 300 mm
186009443	BioResolve SEC保护柱, 200 Å, 2.5 µm, 4.6 x 30 mm w/ 含连接管
186009429	SEC抗体标准品, 160 µg (用于配制1 mg/mL溶液)

仅供研究使用，不适用于IVD。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、The Science of What's Possible、BioResolve、UPLC、ACQUITY、Alliance、XBridge和Arc是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

VII. 注意事项

根据用户应用不同，这些产品在使用后可能被归类为危险品，因此应当由经过培训、有能力处理此类物质的专业实验室人员使用。产品的安全使用与处置由采购方和用户全权负责。如需本产品的安全数据表(SDS)，请访问www.waters.com/sds。



扫一扫，关注沃特世微信

沃特世科技(上海)有限公司

上海办公室：021 - 6156 2666

北京办公室：010 - 5769 0500

广州办公室：020 - 2829 6555

Waters China Limited

香港办公室：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676

www.waters.com