

## Unix-C SEC-300 色谱柱使用手册

### 色谱柱信息

Unix™-C SEC-300 固定相采用独有创新的表面修饰技术，通过在粒径为 1.8 $\mu\text{m}$  高纯硅胶表面键合均匀纳米厚度的中性亲水薄膜而制备得到。结合小粒径和大孔体积，Unix™-C SEC-300 提供了对分析物的高分辨率检测。采用可控的化学修饰技术，确保了批次间良好的重现性。高键合密度结合独一无二的化学键合技术使得 Unix™-C SEC-300 具有高稳定和极低的非特异性吸附。

Unix™-C SEC-300 色谱柱典型样品分析包括，抗体药物偶联物 (ADCs)、疏水性 mAb 及其片段、双特异性 mAb (BsMAb)、聚乙二醇化蛋白、糖蛋白、融合蛋白、膜蛋白和寡核苷酸等。

### 色谱柱特征参数

硅胶：球形、高纯度（金属含量 < 10ppm）

粒径：1.8  $\mu\text{m}$

孔径：300  $\text{\AA}$

### 稳定性和性能

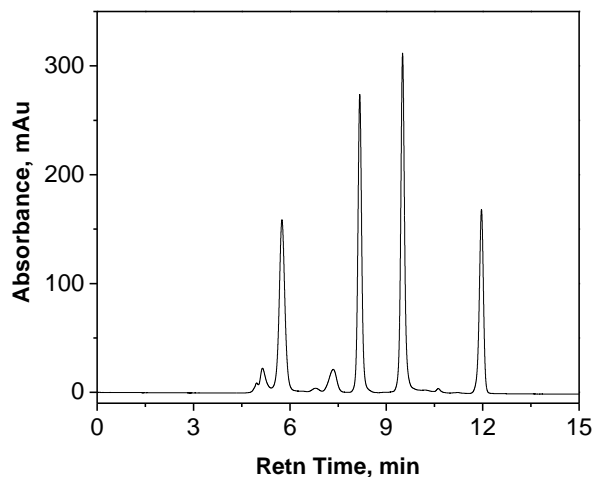
Unix™-C SEC 柱使用的是被完全覆盖的键合硅胶填料，因此具有优异的稳定性。它与大多数缓冲液相容，如醋酸铵、磷酸盐、Tris 等。Unix™-C SEC 固定相具有中性、亲水的特点，与生物分子特别是蛋白质之间的非特异性相互作用非常小。Unix™-C SEC 柱还具有高容量的特点，因此能保证高的分离效率和回收率。

图1是4.6 x 300 mm Unix™-C SEC-300柱的质量控制色谱图。

### 安全注意事项

色谱柱在适宜高压下运行。如果管路连接不紧，将会导致溶剂和注入样品的泄漏，从而对操作人员的健康产生影响。一旦发生泄漏，应佩戴适当的手套进行处理。另外当打开色谱柱时还应采取适当的保护措施，以防止微小的硅胶颗粒进入呼吸道。

图1： Unix™-C SEC-300 4.6 x 300 mm 1.8 $\mu\text{m}$  色谱柱对混合蛋白样品的检测



Column: Unix-C SEC-300, 1.8  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 4.6 x 300 mm

Mobile phase: 150 mM Sodium Phosphate Buffer, pH 7.0

Flow rate: 0.35 mL/min

Temperature: Room temperature

Detection: UV 214 nm

Injection: 1  $\mu\text{L}$

Sample: 1) Thyroglobulin aggregate; 2) Thyroglobulin (1.0 mg/mL), 670 kD; 3) BSA dimer, 132 kD; 4) BSA (1.0 mg/mL), 66 kD; 5) Ribonuclease A (1.0 mg/mL), 14 kD, and 6) Uracil (0.1 mg/mL), 120 D.

### 色谱柱安装与操作

色谱柱在运输过程中或在没有使用时，它的两端总是用堵头进行密封。当将色谱柱接入色谱仪器系统时，首先移去两端的堵头。请注意将流动相流动的方向与柱上标记的方向保持一致。除非出于特殊考虑，例如为了清除堵在色谱柱入口端的脏污等而需要将色谱柱反接以进行冲洗时，建议用户在接上色谱柱时一定要遵循柱上标记的方向。由于色谱柱的连接是整个色谱操作过程的一部分，如果密封卡套过紧，或安装不合适，或者密封卡套与色谱柱端口不匹配，都有可能造成溶液的泄漏。请按照下面步骤将色谱柱与密封卡套相连接，从而将色谱柱接入 HPLC 系统：

(a) 第一次使用的管线，请依次将管线接头和密封卡套装在外径 1/16" 的管线上。密封卡套的宽口端应朝向管线接头。

(b) 将管线紧紧插入色谱柱的接口，向前滑动密封卡套和管线接头，并使管线接头的螺纹与色谱柱端口的螺纹相互衔接，然后拧紧管线接头。

(c) 对色谱柱的另一端采用上述方法进行操作。

### 样品与流动相

为避免色谱柱的堵塞，所有样品和溶剂，都必须在使用前用0.45  $\mu\text{m}$ 或0.22  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。

Unix™-C SEC柱可以使用水（推荐盐浓度 < 0.5M）或有机溶剂和水的混合物，如甲醇（或乙腈）的水溶液等作为流动相。流动相在使用前需要脱气，一个简单的脱气方法是将流动相在由水泵形成的真空下超声 5 min。

### 色谱柱的保养

**运输溶剂** 新柱中的液相是 150 mM 磷酸钠缓冲液（pH 7.0）。在储存和运输过程中，硅胶填料可能会干涸。这时推荐用 10-20 倍柱体积的 150 mM 磷酸钠缓冲液（pH 7.0）进行冲洗以活化色谱柱。

**色谱柱安装** 用用户自己选择的流动相冲洗色谱柱，流速由 0.1 mL/min 逐渐升至所需的操作条件，直至基线稳定为止。

**压力** 尽管色谱柱可在高至 4500 psi 的压力下使用。长时间在高压下运行会损坏色谱柱。由于压力来源于流速，因此最大流速将受制于系统所能承受的压力。一般而言，柱压会随着色谱柱使用时间的增加而逐渐增加。压力突然增加预示色谱柱入口端的筛板发生了堵塞。在这种情况下，建议将色谱柱反接后用适宜的溶剂进行冲洗。

**流速** 最大使用寿命下推荐的流速0.1~0.35mL/min

**pH** 为了获得最佳的分离效果和延长柱的使用寿命，请尽量使用 pH 在 2.0-8.5 范围内的流动相。

**温度** 最高操作温度为 80℃。为了获得最长的使用时间，最佳操作温度为 10-30℃。长时间在高温（>30℃）下操作可能会损坏色谱柱，这种情形在高的 pH（>8）条件下特别突出。为避免色谱柱压力过高，可适当放低流速。

**储藏** 长期不用时，需要将色谱柱贮存在 0.02% 叠氮化钠水溶液或者 10% 甲醇水溶液中。每根色谱柱在运输过程中均会附有两个可拆卸的堵头。为了防止柱床干涸，请用堵头塞紧色谱柱的两端。

**色谱柱清洗** 多次使用后样品中的某些杂质可能会吸附到入口筛板或填料上。当积累到一定程度时会

出现压力升高并伴随峰形展宽的现象。出现这种情况时，推荐的清洗流程如下：

1. 将色谱柱反接于系统，并断开检测器；
2. 用检测样品用流动相，在低于 50 % 最大推荐流速的条件下冲洗色谱柱。注意柱压的变化。如果柱压超出正常水平许多，可降低流速进行并改变清洗流动相。
3. 典型的，冲洗 10~15 倍柱体积的溶液已经足够，在不同的清洗体系间，可用 3~5 倍柱体积的超纯水过渡。

**清洗溶液** 低 pH 的盐溶液有助于移除碱性蛋白。有机溶剂有助于移除疏水蛋白。助溶剂有助于去除在固定相上强吸附的物质（如通过氢键作用等）。应注意只有在使用中性盐溶液或添加有机溶剂没有明显改善效果的情况下使用助溶剂。这里推荐两种常用的清洗溶液：

1. 具有低 pH 值的高浓度中性盐溶液（如 0.5M 硫酸钠溶液，pH3.0）。
2. 含有机溶剂（如 10~20% 的甲醇、乙腈、乙醇等）的缓冲溶液（如 50mM 磷酸盐缓冲液，pH 7.0）。

如果以上两种清洗溶剂均无效果，可使用 6M 尿素（使用前过滤）溶液清洗：

- a. 2 倍柱体积 6M 尿素以 0.35mL/min (监控压力) 清洗
- b. 3 倍柱体积超纯水以 0.35mL/min 过渡
- c. 7 倍柱体积流动相以 0.35mL/min 平衡

**色谱柱保护** 除需要过滤样品和流动相外，保护色谱柱的最佳方法是在柱前连接保护柱或过滤器。柱前过滤器可以除去样品或流动相中的残留颗粒，以及从 HPLC 系统，如泵或进样器垫圈上脱离下来的颗粒。更为有效的方法是使用保护柱，因为它可以除去样品、流动相或者来自于 HPLC/UPLC 系统中的具有强吸附能力的样品组分和残留颗粒。

### Unix-C SEC-300 产品规格

内径×长度	粒径	孔径	型号
4.6×300 mm	1.8 $\mu\text{m}$	300 Å	231300-4630
4.6×150 mm	1.8 $\mu\text{m}$	300 Å	231300-4615