



Sepax Technologies, Inc.

Delaware Technology Park

5 Innovation Way, Suite 100 Newark DE 19711 USA

Phone: (302) 366-1101; Fax: (302) 366-1151

Toll Free: (877) SEPAX-US; www.sepax-tech.com

## 赛分 Nanofilm SEC 柱使用手册

### 色谱柱信息

赛分 Nanofilm SEC 键合固定相采用独特的创新设计，以高纯度具有良好机械稳定性的硅胶为基质，通过采用高纯度键合试剂和赛分独有的表面修饰技术，可确保在蛋白、核酸、多肽等生物大分子分离中获得最高分辨率和最大回收率。Nanofilm SEC 是将纳米厚度的有机涂层共价键合在硅胶基质上。这种涂层具有中性、亲水、均匀的特点。独有的化学修饰技术可以精确控制亲水涂层的厚度，确保柱与柱之间有着可靠的重现性。由于采用化学键合技术，且涂层覆盖完全，因此 Nanofilm SEC 具有优异的稳定性和重现性。Nanofilm SEC-150、SEC-250、SEC-500 和 SEC-1000 填料为均匀的球形颗粒，孔径分别为 150 Å、250 Å、450 Å 和 950 Å，比表面积分别为 100m<sup>2</sup>/g、86m<sup>2</sup>/g、70 m<sup>2</sup>/g 和 25 m<sup>2</sup>/g。通过运用独有的匀浆装填技术装填得到的 Nanofilm SEC 柱柱床密度均一稳定，因此可保证具有最高的柱效。Nanofilm SEC 柱一般在缓冲溶液中进行生物分子的分离。

### 稳定性和性能

Nanofilm 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和重现性。它与大多数缓冲液相容，如醋酸铵、磷酸盐、Tris 等。在 pH 7.2，流动相为 150 mM 磷酸盐缓冲液环境下，对 Nanofilm SEC 柱进样 500 次或使用 3 个月，色谱柱的分离性能几乎不会发生改变。

Nanofilm SEC 填料采用独特的表面化学技术合成均匀的聚合物链并将其共价键合在硅胶基质上。这种均匀的固定相具有中性、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。这种独特的涂层技术使分离具有高选择性、高效率和高回收率的特点。图 1 是对 4.6×250mm Nanofilm SEC 柱进行测试得到的色谱图。

### 色谱柱特征参数

硅胶：球形、高纯度（金属含量<10ppm）

粒径：5µm

孔径：150 Å，适用样品分子量范围 200 ~ 500,000；250 Å，适用样品分子量范围 1500 ~ 700,000；450 Å，适用样品分子量范围 15,000 ~ 2,500,000；950 Å，适用样品分子量范围 50,000 ~ 5,000,000。

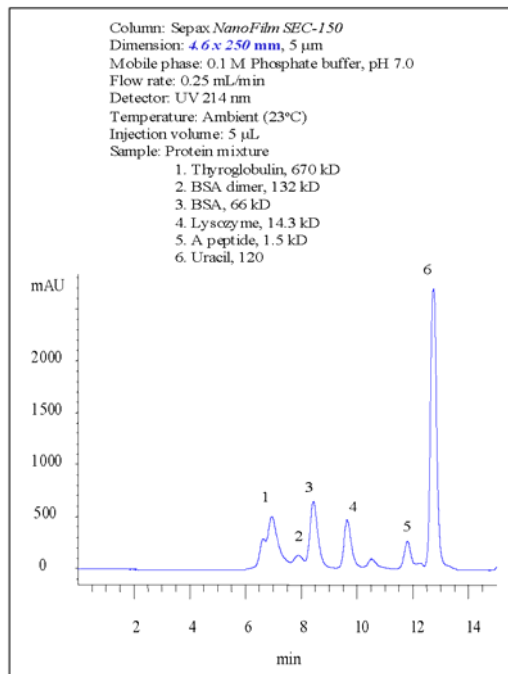


图 1. 用 4.6×250mm Nanofilm SEC-150 柱分离 4 种蛋白和一个多肽。

### 安全注意事项

Nanofilm SEC 柱通常在中压下运行。如果管路连接不紧，将会导致有机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。

### 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，都可能导致溶液的泄漏。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。如果管线为高分子材料，请转到步

骤 (d); 如果是金属管线, 请继续 (c)。

(c) 在用力将管线压入柱端接口之后, 用 1/4" 扳手将已拧紧的螺帽再进一步紧固。

(d) 对色谱柱的另一端采用上述方法进行操作。

## 样品与流动相

为了避免色谱柱的堵塞, 所有样品和溶剂, 包括缓冲溶液在内, 都必须在使用前用 0.45 $\mu$ m 或 0.2 $\mu$ m 的滤膜过滤。Nanofilm SEC 柱可以使用水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 5min。

## 色谱柱的保养

**运输溶剂** 新的 Nanofilm SEC 柱中的液相是含 0.05%NaN<sub>3</sub> 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (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 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 进行冲洗以活化色谱柱。接着可用用户自己选择的流动相冲洗色谱柱。流速由 0.1mL/min 逐渐升至所需的操作条件, 直至基线稳定为止。如果柱压和基线波动较大, 这可能是气泡进入了色谱柱中。这时可用较高流速冲洗色谱柱 2-5 分钟, 例如对于 4.6 $\times$ 300mm 的色谱柱可采用流速 0.5mL/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 2-8.5 范围内的流动相。

**压力** 尽管 Nanofilm SEC 柱可在高至 3500psi 的压力下使用, 但正常的操作压力应当低于 2000psi。长时间在高压下运行会损坏色谱柱和输液泵。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。

**温度** 最高操作温度为 80°C。为了获得最长的使用时间, 最佳操作温度为 10-30°C。长时间在高温 (>80°C) 下操作也会损坏色谱柱, 这种情形在高的 pH (>8) 条件下特别突出。

**流速范围** 内径为 4.6mm 和 7.8mm 的色谱柱, 其正常操作流速分别为 0.1-0.4 和 0.1-1.25mL/min。

**储藏** 长期不用时, 需要将色谱柱贮存在 0.05%NaN<sub>3</sub> 或 20% 乙醇的流动相中。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。

**清洗** 在使用过程中, 样品经常会被吸附在柱入口端的筛板

或者填料上。当样品吸附累积到一定程度时, 柱压将会升高并伴随峰形展宽。这时就需要清洗色谱柱了。下面是色谱柱清洗的基本步骤。

1. 将色谱柱与检测器断开;
2. 将色谱柱反接后进行冲洗;
3. 在流速低于 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, 则需要降低流速, 或选用低粘度的清洗溶液;
4. 通常 10-15 倍柱体积的清洗溶液就足够了。更换溶剂时请用 3-5 倍柱体积的去离子水将色谱柱冲洗干净。

**清洗溶液** 这里介绍清洗溶液选择的基本原则。低 pH 的盐溶液有助于去除碱性蛋白。有机溶剂有助于去除疏水蛋白。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)。应注意只有在中性盐溶液或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 0.5 M 硫酸钠溶液, pH 3.0)。
2. 含有机溶剂 (如 10-20% 的甲醇、乙腈、乙醇等) 的缓冲溶液 (如 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.0)。

## 色谱柱的保护

除了需要过滤样品和流动相外, 保护色谱柱的最佳方法是在色谱柱前连接保护柱或预柱滤片。预柱滤片可以去除样品或流动相中的残留颗粒, 或者从 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 系统中的具有强吸附能力的样品组分和残留颗粒。

## 赛分 Nanofilm SEC 产品规格

产品	内径 $\times$ 长度 (mm $\times$ mm)	粒径	孔径	型号
Nanofilm SEC-150	7.8 $\times$ 300 4.6 $\times$ 300	5 $\mu$ m	150Å	201150-7830 201150-4630
Nanofilm SEC-250	7.8 $\times$ 300 4.6 $\times$ 300	5 $\mu$ m	250Å	201250-7830 201250-4630
Nanofilm SEC-500	7.8 $\times$ 300 4.6 $\times$ 300	5 $\mu$ m	450Å	201500-7830 201500-4630