

bioZen HPLC/UHPLC 色谱柱维护和使用技巧

感谢您购买 bioZen 色谱柱。以下是 bioZen 分析柱维护和使用的推荐说明。

基本信息

Phenomenex 生产的每个 bioZen 色谱柱均经过独立生产和测试。每个色谱柱均附有质量保证证书 (CQA), 用于说明检测条件、操作参数和色谱柱详细信息。包括规格和性能测试结果在内的色谱柱详细信息应输入信息管理系统, 以便于跟踪和参考。您还可以通过 www.phenomenex.com.cn/mysupport 获取色谱柱质量文件的电子副本。

检查

收到色谱柱后, 请确认收到的是您订购的色谱柱 (即规格、粒径、填料)。此外, 请检查色谱柱是否存在运输过程中可能造成的任何物理损坏。请立即测试色谱柱以验证其性能, 并在色谱柱信息管理系统中记录测试结果

固定相	描述	孔径 (Å)	比表面积 (m ² /g)	碳载量 (%)	pH 稳定范围	运输溶剂	最大压力 (psi/bar)	温度 (°C)	分析模式			
bioZen 2.6 µm Glycan	针对已释放聚糖提供高柱效和高选择性的结合, 适用于 HPLC 和 UHPLC。	100	200	-	2-7.5	乙腈 / 0.1 M 甲酸铵, pH 3.2 (90:10)	8,700/600	60	HILIC			
bioZen 1.6 µm Peptide PS-C18	通过将带正电的表面配体与 C18 配体结合起来, 保留效果出众, 同时正电荷修饰基团可排斥碱性离子, 适用于 UHPLC。	100	260	9	1.5-8.5 ***	乙腈 / 水 (65:35 v/v)	15,000/1030	90*	反相			
bioZen 3 µm Peptide PS-C18	通过将带正电的表面配体与 C18 配体结合起来, 保留效果佳, 同时正电荷修饰基团可排斥碱性离子, 适用于 HPLC。						5,000/340	90*	反相			
bioZen 1.7 µm Peptide XB-C18	通过带有二异丁基侧链的 C18 固定相提高对酸性和碱性肽类的总体保留, 适用于 UHPLC。	100	200	10	1.5-9 **	乙腈 / 水 (65:35 v/v)	15,000/1050	90*	反相			
bioZen 2.6 µm Peptide XB-C18	通过带有二异丁基侧链的 C18 固定相提高对酸性和碱性肽类的总体保留, 适用于 HPLC 和 UHPLC。						8,700/600		反相			
bioZen 2.6 µm WidePore C4	丁基固定相核 - 壳颗粒, 优化的宽孔径分布有助于更好地分离大分子生物制剂, 包括单克隆抗体和亚基分析。						400		20	-	12500	反相
bioZen 3.6 µm Intact XB-C8	大孔径核 - 壳颗粒, 可实现完整生物制品的快速传质 C8 具备非常有效的中度疏水选择性						200		20	-	8,700/600	反相
bioZen 1.8 µm SEC-2	惰性超强、高密度的全多孔颗粒, 高柱效, 1-450 kDa 低分子量分离范围。	150	-	-	1.5-8.5	0.1 M 磷酸盐缓冲液, pH 6.8 w/ 0.025% NaN ₃	7000/480	50	SEC/GFC			
bioZen 1.8 µm SEC-3	惰性超强、高密度的全多孔颗粒, 高柱效, 10-700 kDa 高分子量分离范围。	300	-	-			7000/480	50	SEC/GFC			
bioZen 6 µm WCX	使用线性聚羧酸链键合的均一颗粒, 可以包覆蛋白质并将其与酸性 / 碱性异构体分离	-	-	-	2-12	20 mM 磷酸钠 + 150 mM NaCl 4 mM NaN ₃ , pH 6.5	6000	60	离子交换			

* 温度限制解决方法运行参数。例如, 在高 pH 下, 固定相的温度极限约为 60 °C。

** 在梯度条件下, pH 值范围为 1.5 - 9。等度条件下 pH 值范围为 1.5 - 10。

*** 在梯度条件下, pH 值范围为 1.5 - 8.5。等度条件下 pH 值范围为 1.5 - 10。

流动相兼容性

使用 bioZen® 色谱柱 (HPLC 和 UHPLC) 时, 只能使用 HPLC 级溶剂。不要使用不混溶的溶剂和缓冲液。

此外, 强烈建议使用溶剂过滤, 以从您选择的流动相中去除痕量杂质。

色谱柱安装

系统检查:

LC 系统的初始设置对于确保色谱柱性能非常重要:

确保系统准备就绪:

- 密封件、衬垫、进样器洁净
- 系统脱气 (检查以确保没有气泡)
- 基线稳定
- 系统压力一致

流动相/溶剂检查:

- 检查所有溶剂是否可混溶
- 检查洗针瓶和流动相溶剂瓶/样品瓶中是否充满适当溶剂并处于良好液位
- 流动相应充分混合、过滤、脱气, 如果可能, 现配现用

典型/最大流速:

流速取决于内径、粒径和系统压力限制

- bioZen WCX:
 - 50 mm 不高于 0.5 mL/min
 - 100 mm 不高于 0.4 mL/min
 - 150 mm 不高于 0.3 mL/min
 - 250 mm 不高于 0.2 mL/min
- bioZen SEC-2/SEC-3:
 - 100 mm 不高于 0.6 mL/min
 - 150 mm 不高于 0.5 mL/min
 - 300 mm 不高于 0.4 mL/min
 - RP 亚-2 μm : 0.3-0.8 mL/min (典型流速)
 - RP HILIC 2 μm 及以上: 0.5-2.0 mL/min

色谱柱安装:

- 记住压力限制, 将流速设为 0.1 mL/min
- 将流速升至 0.2 mL/min。使流入一个小烧杯中 5 分钟
- 用小烧杯收集并检查流动情况, 然后擦拭两端
- 暂停流动。安装另一个管路 (至检测器)
- 将流速升至方法流速

平衡及活化:

- 以 10-20 个柱体积的流动相平衡色谱柱
- 监测压力: 稳定的压力表明流速恒定, 而压力波动则说明系统中存在空气
- 压力波动过大可能会使色谱柱受到震动并损坏
- 监测压力以及来自检测器和系统的信号。当两者都稳定时, 色谱柱即可使用
- 对于所有梯度方法 (RP 和 HILIC), 在分析之前至少进一个空白样

色谱柱性能测试

可设定一些标准用来检查色谱柱的性能。以下列出了一些条件。

固定相	部件编号:	QQA 条件
bioZen 2.6 μm Glycan	AL0-8317	稀释液: 乙腈/水 (85:15) 进样体积: 1 μL 流动相: 乙腈/100 mM 甲酸铵, pH 3.2 (90:10) 流速: 0.5 mL/min UV: 254 nm
bioZen 1.6 μm Peptide PS-C18	AL0-3045	稀释液: 乙腈/水 (75:25) 进样体积: 1 μL
bioZen 3 μm Peptide PS-C18		流动相: 乙腈/水 (65:35) 流速: 0.75 mL/min * UV: 254 nm
bioZen 1.7 μm Peptide XB-C18	AL0-3045	稀释液: 乙腈/水 (75:25) 进样体积: 1 μL
bioZen 2.6 μm Peptide XB-C18		流动相: 乙腈/水 (65:35) 流速: 0.75 mL/min * UV: 254 nm
bioZen 2.6 μm WidePore C4	AL0-8931	稀释液: 乙腈/水 (50:50) 进样体积: 0.1 μL
bioZen 3.6 μm Intact XB-C8		流动相: 乙腈/水 (55:45) 流速: 0.25 mL/min UV: 254 nm
bioZen 1.8 μm SEC-2	AL0-9253	稀释液: 100 mM 磷酸钠, pH 6.8 进样体积: 0.7 μL
bioZen 1.8 μm SEC-3		流动相: 100 mM 磷酸钠, pH 6.8 流速: 0.35 mL/min UV: 280 nm

* 请仔细检查您的 QQA 条件, 因为流速会随粒径变化。

色谱柱清洗

Intact 反相系列:

一般清洗程序:

1. 50:50 的乙腈/水, 至少 20 个柱体积或当观察到压力正常时。
2. 反向冲洗可以清理堵塞的筛板 (将柱子颠倒过来进行冲洗)。
3. 在进样前始终使用空白进样检查色谱柱。清洗之后采取空白进样也是个办法。

替代清洗程序:

1. 例如, 如果最后一次进样以缓冲液/乙腈 (75:25) 结束, 则更适合以 95:5 的水/乙腈开始, 然后根据需要逐步增加有机相比例 (例如 75:25 的水/乙腈、50:50 的水/乙腈、5:95 的水/乙腈)。
2. 对于疏水或油性物质, 请尝试用 IPA 冲洗。使用 IPA 时, 确保使用低流速, 以防止溶剂粘度较高而导致较高的反压。

Peptide反相系列:

一般清洗程序:

1. 50:50 的乙腈/水, 至少 20 个柱体积或当观察到压力正常时。
2. 反向冲洗可以清理堵塞的筛板 (将柱子颠倒过来进行冲洗)。
3. 在进样前始终使用空白进样检查色谱柱。虽然不是必需的, 清洗之后采取空白进样也是个办法。Alternative Cleaning Procedure:

替代清洗程序:

1. 在进行肽分析时疏水性通常不是问题, 但您可以使用 IPA 去除较大的链和其他疏水性组分。

HILIC:

一般清洗程序:

1. 50:50 的乙腈/水, 至少 20 个柱体积或当观察到压力正常时。

SEC/GFC:

一般清洗程序:

1. 从 10 个柱体积的 0.1M NaH_2PO_4 缓冲液开始, pH 3.0。随后加入至少 10 个柱体积的 100% HPLC 级水。

反冲是可以接受的, 但请将流降低 (例如 1 mL/min 方法流速降低到 0.5 mL/min)。疏水性分析物: 在低流速下, 从 100% 水至 100% 乙腈设置梯度运行 30 分钟。然后在低流速下, 从 100% 乙腈到 100% 水梯度运行 30 分钟。

2. 用 100% 水冲洗 12 小时。

去除强吸附蛋白质:

1. 用 30mL 0.5% SDS、6M 硫氰酸胍或 10% DMSO 低流速下清洗 30 分钟。
2. 立即用低流速水冲洗过夜。

色谱柱再生:

1. 暴露于变性剂 (SDS、硫代硫酸胍、尿素) 后, 在低流速下用水冲洗过夜。
2. 使用变性剂后用水溶性 SEC 制造标准物质对色谱柱进行测试, 以验证色谱柱性能。然后尝试进样标准物质进一步确认。

弱阳离子交换:

一般清洗程序:

使用 10-20 倍柱体积的高盐洗脱液 (例如: 含 1 M NaCl 的缓冲液) 清洗色谱柱, 以去除强保留的化合物。确保背压在色谱柱的限制范围内; 适当降低流速。

替代清洗程序:

对于在使用高盐洗脱液清洗后仍然保留的蛋白质, 请用 5-10 倍柱体积的 0.1 N HCl 清洗色谱柱。使用 20 mM MES, pH 6.5, 或初始流动相条件进行平衡。

使用 5-10 倍柱体积的 20 mM NaOH 清洗色谱柱。使用 20 mM MES, pH 6.5 或初始流动相条件下达到平衡。

对于疏水保留的化合物, 用 5-10 倍柱体积的 50% 乙腈清洗柱。在 20 mM MES, pH 6.5, 或起始流动相条件进行平衡。

避免接触质子传递溶剂 (如甲醇等醇类)、阳离子去污剂、高 pH 值或高温环境。

色谱柱储存

储存前确保色谱柱清洁非常重要。包括去除缓冲液、盐、样品和离子对试剂。建议的储存条件是:

固定相	储存条件	注释
bioZen® 2.6 μm Glycan	乙腈 / 水 (80:20 v/v)	不推荐使用甲醇用于储存。
bioZen 1.6 μm Peptide PS-C18	乙腈 / 水 (50:50 v/v)	可以使用甲醇代替乙腈, 但需要更长的平衡时间。
bioZen 3 μm Peptide PS-C18		
bioZen 1.7 μm Peptide XB-C18		
bioZen 2.6 μm Peptide XB-C18		
bioZen 2.6 μm WidePore C4	乙腈 / 水 (20:80 v/v)	可以使用甲醇代替乙腈用于储存, 但需要更长的平衡时间。
bioZen 3.6 μm Intact XB-C8		
bioZen 1.8 μm SEC-2	HPLC 级水	为了延长储存时间, 可以使用 0.1M NaH_2PO_4 /0.025% NaN_3 水溶液或 20% 甲醇水溶液。
bioZen 1.8 μm SEC-3		
bioZen 6 μm WCX		
	20 mM MES 缓冲液, pH 6.5	长时间存储前使用 20 mM MES 缓冲液, pH 6.5+0.05% 叠氮化钠。

延长色谱柱寿命的技巧

适当的样品制备有助于维持系统和色谱柱的使用寿命。

- 在适当的时候过滤样品(即 Phenex™ 针头过滤器)
- 使用适当的保护柱和保护柱系统
- 在适当的样品水平下工作, 不要使色谱柱过载
- 在色谱柱的适当分离模式下工作, 在分析前检查色谱柱特性以了解允许的参数
- 将色谱柱存放在适当的溶剂中
- 对于 SEC, 典型载量为色谱柱体积的 0.1% 至 0.5%

可以分离的样品数量

色谱柱类型	内径 (mm)	一般死体积 (mL)*	典型流速 (mL)	典型和 (最大) 进样量 (mg)	典型和 (最大) 进样体积 (μL)**
分析型	4.6	1.5	0.5 - 2.0	0.1 (2.5)	10 (200)

* 色谱柱死体积 (Vo) 可由以下公式估算:

$$\text{色谱柱死体积 (mL)} = V_o = 0.487 \times d^2 \times L$$

式中: L = 柱长 (cm); 15 cm (150 mm) 用于计算。

d = 柱内径 (cm, not mm)

** 最大允许进样体积 (Vi) 可估算如下:

$$\text{最大进样体积} = V_i = \frac{V_r}{2\sqrt{N}}$$

式中: Vr = 第一个峰的保留体积 (mL)

N = 每个柱的理论塔板数

色谱柱质量保证

Phenomenex HPLC 色谱柱保证符合规定的性能和质量, 并且无材料和工艺缺陷。如果您因任何原因不满意, 请致电您的 Phenomenex 技术代表。我们会尽全力解决问题, 令您满意。如果需要退回色谱柱, 必须首先从 Phenomenex 获得退货授权编号。

免责声明

应使用制造商推荐的测试组合对新色谱柱进行测试, 以前使用的色谱柱应使用相同或适合的分析测试混合物进行测试。在更换溶剂时, 切记重新平衡系统。切勿从一种溶剂改变为另一种不混溶的溶剂, 除非经过一种可与两种溶剂混溶的过渡溶剂。这会损坏色谱柱。切勿改变(或更换)缓冲液/盐溶液, 假如缓冲液/盐不溶于第二溶剂。这同样会损坏色谱柱。切勿尝试拆下色谱柱柱头。这将使保修无效。

色谱柱受到震动

小心使用色谱柱。不要跌落或产生物理冲击。不要在高流速下启动泵, 而应在几分钟内逐渐升高。设置泵的压力限制, 防止色谱柱在堵塞情况下运行。这可能会产生空隙, 对色谱柱的性能产生不利影响。

有关其他问题, 请访问:

[Phenomenex.com.cn/chatcn](https://www.phenomenex.com.cn/chatcn)

或将问题提交至以下地址:

support.phxtechnical@zendesk.com

有关 bioZen® HPLC 和 UHPLC

色谱柱的更多信息, 请访问

www.phenomenex.com.cn/biozen