

## Nanofilm SEC 色谱柱使用手册

### 色谱柱信息

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，确保柱与柱之间的批间重现性。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。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 100 m<sup>2</sup>/g、86 m<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 柱一般在水溶性缓冲溶液中进行生物分子的分离。

### 色谱柱特征参数

硅胶：球形、高纯度（金属含量<10ppm）

粒径：5μm

孔径及分子量分离范围：

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。

### 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。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 柱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 是采用 Nanofilm SEC 柱（4.6×250 mm）进行测试得到的典型色谱图。

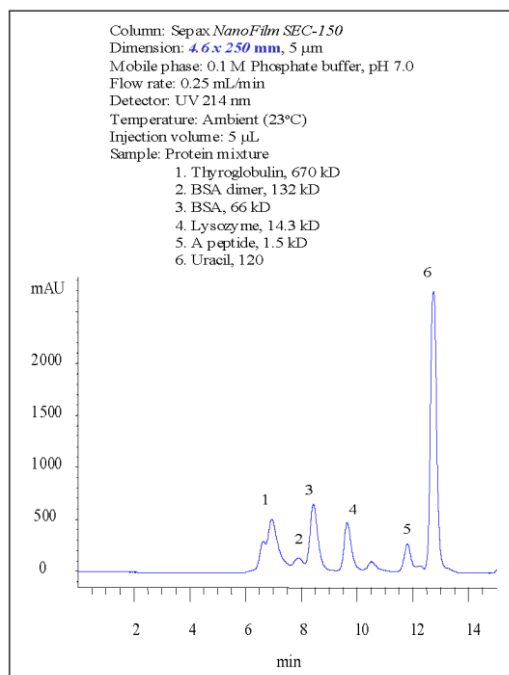


图 1. 用 Nanofilm SEC-150 柱（4.6×250 mm）分离标准蛋白样品

### 安全注意事项

色谱柱通常在中压环境下运行。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

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。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的操作。

## 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 μm 或 0.2 μm 的滤膜过滤。Nanofilm SEC 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。常用脱气方法是将流动相超声处理 5 min。

## 色谱柱的保养

频繁更换有机相和水相缓冲液将会影响色谱填料性能以及色谱柱的使用寿命。由于流动相的粘度会影响色谱柱的反压，请根据流动相溶剂的粘度大小对流速进行适当调整。这样可以确保色谱柱分离性能的稳定性，不会出现色谱柱压力不稳定或者压力过高的情况。当从水相切换到有机相时，在其间运行至少 2-5 CV 的纯水，这样可以防止出现盐析/沉淀，避免色谱柱塌陷。此外，建议将色谱柱在纯水中的保留时间减至 5 CV，不建议将色谱柱长期保存于纯水中。色谱柱需充分平衡后再进样，建议将色谱柱中液体置换成流动相后放置过夜或者使用测试流动相低流速过夜冲洗色谱柱。

Solvent	Viscosity at 20°C
Acetone	0.32
Acetonitrile	0.37
Methanol	0.55
Water	1.00
Ethanol	1.20
2-propanol	2.40

除了对样品和流动相进行过滤处理，更好的保护方式是在色谱柱前安装一个柱前过滤器（或保护柱）。在绝大部分情况下，柱前过滤器可以帮助去除样品、流动相或者从液相系统（如泵或者进样密封圈）中浸出的残留颗粒。赛分科技的柱前过滤器不含填料，因此不会改变分析物的保留时间，也不需要单独平衡。过滤器包含可更换的滤芯，压力升高表明应更换滤芯。

## 色谱柱操作

色谱柱在没有使用时，两端用堵头进行密封。当色谱柱接入色谱仪器系统时，首先确保系统干净，并用流动相冲洗在色谱柱连接之前，将系统用高流速流动相排除系统气泡，使基线平稳。如果基线未平，在系统稳定之前不建议安装色谱柱。这样可以一定程度上保证色谱柱的使用寿命。系统清理干净后，可以用流动相冲洗，当显示基线平稳，停止流速，确保流动相仍在管线中。然后去掉色谱柱两端堵头，连接色谱柱，保证没有气泡进入。除了客户有特别的要求需要反接色谱柱，比如去除入口堵塞问题，通常根据色谱柱上标示的流动相方向进行使用。如果套圈过度拧紧、未正确设置或不适用于接头，则可能会发生泄漏。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的操作。

当色谱柱连接成功后，开始用流动相低流速运行，并监控系统压力确保无泄漏问题。

**色谱柱活化** 在储存和运输中色谱柱填料可能会变干。为了活化新的的色谱柱，推荐采用 10-20 倍柱体积的流动相用低流速冲洗色谱柱，再逐渐升高至预计的操作流速。下表中提供参考活化程序。如果您的流动相中含有超过 20% 的有机相，请先用 2-5 倍柱体积纯水以低流速冲洗色谱柱再转换为含有机溶液流动相，以预防出现沉淀的情况。需要注意的是部分有机溶剂粘度/背压更高，如 IPA, EtOH, 这时需要采用更低的流速。对于使用超过 20% 有机溶剂流动相，在平衡时，推荐采用低流速或者让流动相在色谱柱中过夜保存可以让填料更好的适应。对于水相使用，用流动相冲洗色谱柱，同时逐渐将流速增加到操作流速，使色谱柱压力平衡，并且基线稳定。

下表中提供推荐起始流速。建议初始流速为 1/5 正常流速，每两到三分钟以 1/5 递增。监测基线和压力，每次增加流速后保证基线和压力稳定几分钟，再逐渐提高流速。如果加入有机溶剂，如 IPA，则需要减小增加的幅度。

Column Dimension (mm)	Column Volume (mL)	New Column Flow rate (mL/min)	Ramp up Increments (mL/min)	Running flow rate (mL/min)
2.1×300	1.04	0.01	0.01	0.07
4.6×300	4.99	0.05	0.05	0.35
7.8×300	14.34	0.1	0.1	1.0
10×300	24	0.3	0.1	1.65
21.2×300	105	1.4	0.5	7.5
30×300	212	2.8	1.2	15
50×300	490	7.8	3.5	41

**首次使用** 请首先按照色谱柱出厂 QC 方法对色谱柱进行检测，理论塔板数和拖尾因子等应与 QC 报告相符。（因为仪器和实验条件的差异，实际检测结果与 QC 报告可能存在偏差，如偏差超过±20%请及时与厂家或色谱柱供应商联系）。

**流速范围** 在常温环境下使用磷酸盐缓冲液作为流动相时，可以在上表中找到正常的操作流速。在低温环境中运行仪器或添加任何粘度高于水的溶剂可能会导致背压增加。应调整流速以确保背压不超过限值。流动相组成改变时也需要逐渐调整流速，这样色谱柱的压力变化较小，减小色谱柱的损害。

**运输溶剂** 新色谱柱的运输溶剂为含 0.02% NaN<sub>3</sub> (w/v) 的 50 mM 磷酸盐缓冲液。

**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 2-7.6 范围内的流动相。最高可使用 pH 为 8.5，只能短时间内使用以获得最佳色谱柱寿命。建议在高或低 pH 条件下使用色谱柱后用中性 pH 缓冲液冲洗色谱柱。

**压力** Nanofilm SEC 柱可在高至 3,500 PSI (孔径为 150-250 Å) 压力和 2,000 PSI (孔径为 500-1000 Å) 的压力下使用，但正常的操作压力应当低于 2,000 PSI。长时间在高压下运行会损坏色谱柱和输液泵。突然改变系统/泵压力也可能导致不可逆转的损坏。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

别明显。

**样品溶剂** 建议采用流动相溶解样品，以免出现溶剂效应。保证待测样品与流动相有很好的溶解性，以免样品析出导致柱压升高和系统污染，如出现此情况，可对色谱柱进行低流速反向冲洗，以除去堵塞柱头的杂质。

**关机程序** 在工作日结束时，柱子平衡到适当的缓冲存储溶液中后，应逐渐降低流速。当流速和压力降至零，就可以将色谱柱从系统中取出。每根色谱柱都附带两个可拆卸的端塞。为防止柱床干燥，使用提供的端塞将两端密封。

**储存** 当色谱柱几天不使用时，应将其储存在低盐、pH 中性缓冲液中，例如 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.0。（如果计划将色谱柱储存在有机溶液中，例如 10% EtOH，请务必先用纯水缓慢冲洗色谱柱以防止盐析，然后切换到较低流速的储存溶液，例如运行流速的一半速度。）

当色谱柱长时间不使用时，建议添加抑菌剂，例如 0.02% 叠氮化钠 (NaN<sub>3</sub>) 或 20% 乙醇：

• 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.0，含 0.02% 叠氮化钠

或

• 50 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.0，含 20% 乙醇

**日常预防性护理** 对于日常预防性护理，在正常运行条件和流动相下进样 6 M 盐酸胍，可以在储存前去除任何可能粘在色谱柱上的残留成分，以延长色谱柱的使用寿命并抑制残留物与色谱柱填料的不可逆结合。请参阅下表，了解特定色谱柱尺寸的盐酸胍进样量参考。进样后，继续运行关机程序和保存色谱柱。

Column Dimension (mm)	Column Volume (mL)	Guanidine HCl injection volume (μL)
4.6×300	4.98	20-50
7.8×300	14.3	100
10×300	23.5	240
21.2×300	106	1000
30×300	212	2200
50×300	490	4900

**保护柱/柱前过滤器** 建议使用保护柱或柱前过滤器以延长色谱柱寿命。如果您发现色谱柱压力增加，请立即更换保护柱/柱前过滤器。

PN	Description	Part size
102002-5UMKIT	Pre-column filter Kit for 5 μm & 10 μm	2.0 μm PEEK

\*Include column coupler

**清洗** 正确和定期的系统维护和清洁与色谱柱保养一样重

要。在使用过程中，部分样品可能会吸附到入口筛板或填料上。当吸附积累到一定程度时，通常表现为背压升高并伴随峰形展宽。如果使用保护柱，请确保断开连接，单独清洗分析柱或制备柱。

通用的色谱柱清洗流程如下：

1. 断开色谱柱与检测器。
2. 对不锈钢色谱柱，将色谱柱反接后冲洗。
3. 逐渐增加流速进行冲洗，注意不要超过最大推荐流速的50%。对于粘度较高的有机溶剂，如 IPA 和 EtOH，建议至少使用 1/3 的运行流速。监测背压，确保在切换缓冲溶液时，压力读数增加不超过 15 bar。如果你看到压力差远远高于正常的操作条件，降低流速，以避免压力峰值对色谱柱造成更大的损害。
4. 通常情况下，用清洗溶液冲洗 5 倍柱体积即可。为了防止盐析或不同溶剂不能混溶的情况，需要在每次切换之间用 2-3 倍柱体积的蒸馏水、去离子水缓慢地冲洗柱子。
5. 当使用的流动相中有三氟乙酸时，使用完毕，应尽快用 20% 乙醇将色谱柱冲洗干净，避免三氟乙酸对色谱柱造成损伤

**清洗溶液** 低 pH 盐溶液有助于去除碱性蛋白质。有机物有助于去除疏水性蛋白质。离液盐有助于去除强烈吸附的物质（通过破坏氢键作用力）。只有在中性盐或有机物不能提高分辨率的情况下，才会使用离液盐。所有硅胶 SEC 柱，都容易受到腐蚀破坏；因而对于硅胶 SEC 色谱柱不应使用 NaOH 等溶剂。以下为推荐的两种清洗溶液：

- 低 pH 值（eg. pH 3.0）的浓缩中性盐（eg. 0.5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）。（适用于静电相互作用）
- 或
- 含有机溶剂（eg. 10-20%的甲醇、乙腈、乙醇等）的缓冲溶液（eg. 50 mM 磷酸盐缓冲液，pH 7.0）去除疏水性杂质。

\*在清洗前、后用去离子水过渡。

### Nanofilm SEC 产品规格

（粒径 5 μm）

产品	内径×长度 mm×mm	孔径 Å	货号
Nanofilm SEC-150	7.8×300	150	201150-7830
	4.6×300		201150-4630
Nanofilm SEC-250	7.8×300	250	201250-7830
	4.6×300		201250-4630
Nanofilm SEC-500	7.8×300	450	201500-7830
	4.6×300		201500-4630
Nanofilm SEC-1000	7.8×300	950	201950-7830
	4.6×300		201950-4630

\*其他规格色谱柱产品及任何问题可致电：400-636-8880  
或联系 [marketing@sepax-tech.com.cn](mailto:marketing@sepax-tech.com.cn)。