



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

SRT-C SEC 柱使用说明

色谱柱信息

SRT-C SEC 键合固定相是采用专利的表面修饰技术和 5 μm 的粒径，通过在高纯度具有良好机械稳定性的硅胶基质上键合均匀的纳米厚度的亲水涂层而制备得到。独有的化学修饰技术可精确控制亲水涂层的厚度，从而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 SRT-C SEC 柱具有优异的稳定性和重现性。均匀的表面涂层保证了分离的高效性。SRT-C SEC-100、SEC-150、SEC-300、SEC-500、SEC-1000 和 SEC-2000 填料为窄粒径分布的球形颗粒，孔径分别为 100 \AA 、150 \AA 、300 \AA 、500 \AA 、1000 \AA 和 2000 \AA 。精心设计的大孔体积（SRT-C SEC-150、300、500 孔体积约为 1.35 mL/g，SRT-C SEC-100、1000、2000 孔体积约为 1.0 mL/g）保证了高的分离容量，从而具有优异的分辨率。通过运用独有的匀浆装填技术装填得到的 SRT-C SEC 柱柱床密度均一稳定，因此可保证具有最高的柱效。

由于采用创新的表面化学技术，以及拥有多种孔径规格（从 100 \AA 到 2000 \AA ），SRT-C SEC 柱可为各种分离应用提供最高分辨率和最大回收率。应用领域覆盖了大分子量的生物分子（如蛋白质、核酸）、小分子量的生物分子（如多肽、寡核苷酸）、天然聚合物（如多糖）、合成聚合物、生物细胞（如细菌和病毒）、纳米材料（如纳米颗粒）等。SRT-C SEC 柱一般在缓冲溶液中进行样品的分离和检测。

稳定性和性能

SRT-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 7.0，流动相为 150 mM 磷酸盐缓冲液环境下，对 SRT-C SEC 柱进样 100 次或使用 1 个月，其分离性能几乎没有发生改变。

SRT-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。SRT-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 是蛋白混合样在 7.8x300 mm SRT-C SEC-300 柱上的分离色谱图。

色谱柱特征参数

硅胶：球形、高纯度（金属含量 < 10ppm）

粒径：5 μm

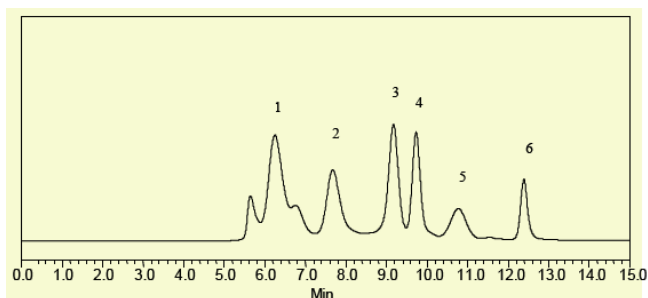


图 1. 蛋白混合样在 SRT-C SEC-300 柱上的分离色谱图。

色谱柱：SRT-C SEC-300 (7.8x300 mm, 5 μm);

流动相：150 mM 磷酸盐缓冲盐, pH 7.0;

流速：1.0 mL/min;

检测波长：UV 214 nm;

温度：室温 (23 $^{\circ}\text{C}$);

进样量：10 μL ;

蛋白混合物：1) 甲状腺球蛋白, 670 kD; 2) γ -球蛋白, 158 kD; 3) 卵清蛋白, 44 kD; 4) 肌球蛋白, 17.6 kD; 5) 聚丙氨酸, 1-5 kD; 6) 尿酸, 120D。

孔径：

100 \AA 适用蛋白分子量范围 100 ~ 100,000

150 \AA 适用蛋白分子量范围 500 ~ 150,000

300 \AA 适用蛋白分子量范围 5,000 ~ 1,250,000

500 \AA 适用蛋白分子量范围 15,000 ~ 5,000,000

1000 \AA 适用蛋白分子量范围 50,000 ~ 7,500,000

2000 \AA 适用蛋白分子量范围 > 10,000,000

安全注意事项

SRT-C 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 μ m 或 0.2 μ m 的滤膜过滤。

SRT-C 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 SRT-C SEC 柱中的液相是含 0.05%NaN₃ 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 SRT-C 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%NaN₃ 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 多次使用后某些样品可能会吸附到入口筛板或填料上。当积累至一定程度时会出现压力升高并伴随峰形展宽的现象。出现这种情况需要清洗色谱柱，一般清洗流程如下：

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，可降低流速或更换低粘度的缓冲液作为冲洗溶剂；
4. 一般用清洗溶液冲洗 10-15 倍柱体积即可。更换溶液时请用 3-5 倍柱体积的经过蒸馏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。