

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 1.7 µm Oligo	键合 C18 固定相的有机硅胶核-壳颗粒。	100	200	11	1-12	乙腈/水 (60:40 v/v)	15,000/1,050	60	反相
Biozen 2.6 µm Oligo							8,700/600		
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，保留效果理想，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)	15,000/1,030	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，保留效果理想，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)	15,000/1,050	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	25	—			12,500		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	—	—	2.5-7.5	0.1 M 磷酸盐缓冲液，pH 6.8 w/ 0.025% NaN ₃	7,000/480	50	SEC/GFC
Biozen 1.8 µm SEC-3	惰性强、高密度的全多孔颗粒，高柱效，10 - 700 kDa 高分子量分离范围。	300	—	—			7,000/480	50	SEC/GFC
Biozen 1.8 µm dSEC-2	惰性，高强度多孔颗粒，用于单克隆抗体的分离和定量，生物类似物和生物医药聚集物和片段分析。	200	—	—	2.5-7.5	0.1 M 磷酸钠，pH 6.8 w/ 0.025% NaN ₃	8,000/550	50	SEC
Biozen 3 µm dSEC-2							4,000/275	50	SEC
Biozen 3 µm dSEC-7	惰性，高强度多孔颗粒，用于 aav, IgMs 等大型生物药聚集体和片段分析的分离和定量。	700	—	—	—	—	6,500/450	50	SEC
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/碱性变体分离。	—	—	—	2-12	20 mM 磷酸钠 + 150 mM NaCl 4 mM NaN ₃ , pH 6.5	6,000	60	离子交换
Biozen 3 µm Native RP-1	无孔疏水性颗粒，专为在反相条件下保持完整生物大分子的天然结构而设计。适用于分析低至中等疏水性抗体药物偶联物 (ADC) 的完整 DAR (药物抗体比) 及异构体表征。	—	0.75	0.03	1.5-8.5	乙腈/水 (60:40 v/v)	15,000/1,034	35****	Native RP
Biozen 3 µm Native RP-5									

* 温度限制取决于方法运行参数。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。

**** 在 35°C 条件下进行了寿命稳定性测试。在 50°C 条件下寿命较短。

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:

- 仅使用 HPLC 及以上级别的溶剂, 以最大限度地提高色谱柱性能。
- 检查所有溶剂是否可混溶。
- 确保所有流动相已经混合均匀、脱气、应尽可能现配现用。
- 用于 SEC 的流动相可能会受到微生物生长的影响, 应避免用过的流动相瓶重新灌装流动相。请使用新溶剂瓶准备流动相。
- 用于 SEC 的流动相请避免在流动相入口使用过滤器, 以减少微生物生长的来源。
- 含水缓冲液应用 0.2 µm 过滤器过滤。
- 检查洗针液和流动相容器是否已经灌装了足够且适当体积的溶剂。

色谱柱安装:

- 首先将色谱柱的入口端连接到进样器出口。
- 设置初始流速为 0.1 mL/min。
- 逐渐增加流速至 0.2 mL/min。使流动相流入一个小烧杯中并保持 5 min。
- 确保柱出口流量恒定, 然后擦拭两端。
- 暂停流动相, 将色谱柱出口端连接至检测器。
- 将流量增加到方法流速, 并确保在进入下一步之前背压和基线保持稳定。

色谱条件/平衡:

- 以 10-20 个柱体积的流动相平衡色谱柱。
- HILIC 色谱柱以至少 20-30 个柱体积的流动相平衡色谱柱
- 平衡完成的标志是观察到背压和基线可以保持稳定
- 为了避免流动相缓冲液的沉淀, 建议先用5柱体积的非缓冲起始条件冲洗色谱柱(例如, 如果起始条件是50/50缓冲液/乙腈, 建议先以 50/50 水/乙腈开始)
- 建议在分析之前至少进行一次空白样, 以确保系统和流动相中没有污染物。

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 d-SEC2/d-SEC7/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
- Biozen RP: 0.3-0.8 mL/min
- Biozen HILIC: 0.5-2.0 mL/min
- Biozen Native RP: 0.1-1.0 mL/min

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:	CQA 条件
Biozen 1.7/2.6 µm Oligo	AL0-3045	稀释液: 乙腈/水 (75:25) 进样体积: 1 µL 流动相: 乙腈/水 (65:35) 流速: 0.75 mL/min* UV: 254 nm
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 1.6/3 µm Peptide PS-C18	AL0-3045	稀释液: 乙腈/水 (75:25) 进样体积: 1 µL 流动相: 乙腈/水 (65:35) 流速: 0.75 mL/min * UV: 254 nm
Biozen 1.7/2.6 µm Peptide XB-C18	AL0-3045	稀释液: 乙腈/水 (75:25) 进样体积: 1 µL 流动相: 乙腈/水 (65:35) 流速: 0.75 mL/min * UV: 254 nm
Biozen 3.6 µm Intact 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
Biozen 1.8/3 µm dSEC-2	AL0-9253	稀释液: 100 mM 磷酸钠, pH 6.8 进样体积: 1.40 µL
Biozen 3 µm dSEC-7		流动相: 100mM 磷酸钠, pH 6.8 流速: 0.35 mL/min UV: 280 nm
Biozen 6 um WCX	Equine Cytochrome C**	稀释液: 20 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠, 4 mM 叠氮化钠, pH 6.5 进样体积: 5 µL 流动相: 20 mM 磷酸钠, 150 mM 氯化钠, 4 mM 叠氮化钠, pH 6.5 流速: 1.3 mL/min UV: 280 nm
Biozen Native RP-1	AL0-8931	稀释液: 乙腈/水 (75:25 v/v) 进样体积: 1 µL
Biozen Native RP-5		流动相: 乙腈/水 (65:35 v/v) 流速: 0.2 mL/min (内径 2.1 mm); 0.95 mL/min (内径 4.6 mm)

* 请仔细检查您的 CQA 条件, 因为流速会随粒径变化。



色谱柱清洗

请选用与您的应用中可能的污染物或分析物性质最接近的清洗程序。

Intact 反相系列：

一般清洗程序：

- 1. 用50:50乙腈/水冲洗至少20个色谱柱体积，或直到观察到背压恢复正常。
- 2. 在清洗程序前后进行空白进样，以确保系统和流动相中没有污染物。

可选的清洗程序：

- 1. 如果需要进一步清洗，从色谱运行结束时的条件开始，逐步增加有机溶剂的量。建议使用非缓冲溶液，以避免高浓度有机物的沉淀。
- 2. 对于疏水性强的污染物，可以使用IPA。当使用IPA时，确保使用低流速，以防止溶剂年度较高而导致背压升高。

Peptide 反相系列：

一般清洗程序：

- 1. 50:50 的乙腈/水，至少冲洗20 个柱体积或直到观察到压力正常为止。
- 2. 在清洗程序前后进行空白进样，以确保系统和流动相中没有污染物。

可选的清洗程序：

- 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，至少冲洗20 个柱体积或直到观察到压力正常为止。
- 2. 如果背压不稳定或怀疑有极性污染物，请用 5:95 乙腈/水溶液冲洗。

Oligo：

一般清洗程序：

- 1. 从最后一次色谱运行结束时的条件开始，逐步增加有机溶剂的量。建议使用非缓冲液体系，以避免高盐浓度下有机物的析出。
- 2. 对于疏水性强的残留物，可以使用IPA。当使用IPA时，应设置较低的流速，以防止由于较高的溶剂粘度而引起的背压升高。
- 3. 当怀疑有高度疏水的残留物时，也可以使用THF。但请确保您的系统管路可以耐受THF，并适当降低流速和温度。
- 4. 如果是使用离子对试剂的方法(如烷基胺)，在清洗后可能需要重新平衡下色谱柱。建议使用 30-40 倍柱体积的溶剂来平衡。如果使用的离子对浓度较低 (< 2 mM) 时，可能需要更多的柱体积来平衡。

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 1.7/2.6 μm Oligo	乙腈/水 (50:50 v/v)	可以使用甲醇代替乙腈，但平衡需要更长的时间。
Biozen 2.6 μm Glycan	乙腈/水 (80:20 v/v)	不推荐使用甲醇用于储存。
Biozen 1.6/3 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 1.7/2.6 μm Peptide XB-C18		
Biozen 3.6 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	乙腈/水 (20:80 v/v)	
Biozen 1.8 μm SEC-2	HPLC 级水	为了延长储存时间，可以使用 0.1M NaH ₂ PO ₄ /0.025% Na ₃ 水溶液或 20% 甲醇水溶液。
Biozen 1.8 μm SEC-3	HPLC 级水	
Biozen 1.8/3 μm dSEC-2	低流速流动相冲洗过夜	为了延长储存时间，可以使用0.1 M NaH ₂ PO ₄ / 0.025% Na ₃ 水溶液或 20% 甲醇水溶液。在流动相和存储溶剂之间切换之前，用大约5柱体积的100%水冲洗柱。
Biozen 3 μm dSEC-7		
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。
Biozen Native RP-1	乙腈/水 (50:50 v/v)	异丙醇可以替代乙腈使用。
Biozen Native RP-5		

小贴士：

如果已尝试上述清洗程序，但仍然观察到背压较高，或怀疑筛板堵塞，您可以尝试用以下所示低流速反向冲洗色谱柱：

- 1. 0.1 mL/min (2.1 mm 直径色谱柱)。
- 2. 0.3 mL/min (3.0 mm 直径色谱柱)。
- 3. 0.5 mL/min (4.6 mm 直径色谱柱)。

SEC/GFC：

一般清洗程序：

- 1. 从 10 个柱体积的 0.1M NaH₂PO₄ 缓冲液开始，pH 3.0。随后加入至少 10 个柱体积的 100% HPLC 级水。
- 2. 除了 dSEC-2 和 dSEC-7 以外，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。

去除强吸附蛋白质：

- 1. 用 30 mL 0.5% SDS、6 M 硫氰酸胍或 10% DMSO 低流速下清洗 10-20 柱体积。
- 2. 立即用低流速水冲洗过夜。

弱阳离子交换：

一般清洗程序：

- 1. 用 10-20 柱体积的高离子强度溶液(如 1 M NaCl 缓冲液)清洗色谱柱，以去除任何强保留的化合物。如果需要，请持续检测背压并降低流速以适应不同的柱规格。

可选的清洗程序：

- 1. 对于高离子强度清洗程序后仍残留在色谱中的蛋白质污染物，用 5-10 柱体积 0.1 M HCl 冲洗。在 20 mM MES, pH 6.5 或起始流动相条件下平衡。
- 2. 如果需要进一步清洗，用 5-10 个柱体积为 20 mm 的 NaOH 冲洗。在 20 mM MES, pH 6.5 或起始流动相条件下平衡。
- 3. 对于疏水性强的化合物，用 5-10 柱体积的 50% 乙腈冲洗。在 20 mM MES, pH 6.5 或起始流动相条件下平衡。
- 4. 避免使用质子溶剂 (如甲醇等醇类)、阳离子洗涤剂 and 极端pH值和温度条件。



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%

色谱柱保修

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。

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 (V₀) 可由以下公式估算:
色谱柱死体积 (mL) = V₀ = 0.487 x d² x L
式中: L = 柱长 (cm); 15 cm (150 mm) 用于计算。
d = 柱内径 (cm, 不是 mm)

** 最大允许进样体积 (V_i) 可估算如下:
$$V_i = \frac{V_r}{2\sqrt{N}}$$

式中: V_r = 第一个峰的保留体积 (mL)
N = 每个柱的理论塔板数

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
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

