

Proteomix 复合模式 (mix-mode)

离子交换色谱柱使用手册

色谱柱信息

复合模式离子交换色谱柱 (Proteomix MMSCX/SAX) 采用专利的设计, 通过将离子交换特性与其他色谱柱特性 (如: 疏水性) 相结合, 为大分子及小分子生物提供特殊选择性。MMSCX和MMSAX的填料基质都以苯乙烯/二乙烯基苯为材料 (PS/DVB) 高度交联制备的坚硬球状颗粒。PS/DVB表面键合均匀的纳米厚度亲水中性聚合物薄膜。通过专利化学修饰技术, 在亲水层表面键合密集的离子交换基团和具有中性疏水功能的基团。待测物与离子交换基团和疏水基团同时作用在基质表面, 进而通过复合离子交换模式分离待测样品。

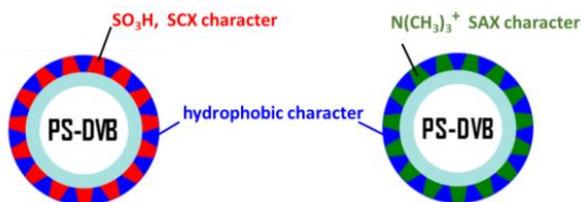


图1. Proteomix MMSCX/SAX色谱柱化学结构示意图

如图1所示, MMSCX色谱柱是由SCX和SAX及疏水基团构成。MMSCX色谱柱为强阳离子交换剂, 亲水层表面键合磺酸基团。同时MMSAX色谱柱为强阴离子交换剂, 表面键合季铵基团。

安全注意事项

Proteomix MM 离子交换色谱柱通常在高压下运行。如果管路连接不紧, 将会导致缓冲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, 以防止微小的聚合物颗粒进入呼吸道。

稳定性和性能

Proteomix MM离子交换色谱柱是以PS/DVB涂层为基础, 所有的表面涂层都通过化学修饰粘合在PS/DVB涂层表面, 这使它具备卓越的稳定性以及高压下可操作性。它与大多数水溶性缓冲剂及有机改性剂的混合流动相兼容, 如: 醋酸铵、磷酸盐、Tris等。在pH值为2.5时, 流动相为10 mM磷酸钠缓冲液, 或在pH值为8.0时, 流动相为20 mM的Tris缓冲液环境下, MMSCX色谱柱进样超过200次, 色

谱柱分离性能几乎没有发生改变。

图2是腺苷5'-单磷酸钠 (AMP) 和腺苷5'-二磷酸腺苷钠盐 (ADP) 在Proteomix MMSAX-NP5 (5 μm) 4.6×50 mm色谱柱上的分析色谱图。

AMP and ADP Analysis on MMSAXNP5

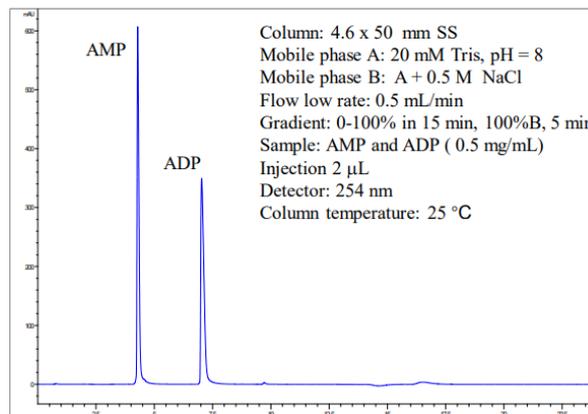
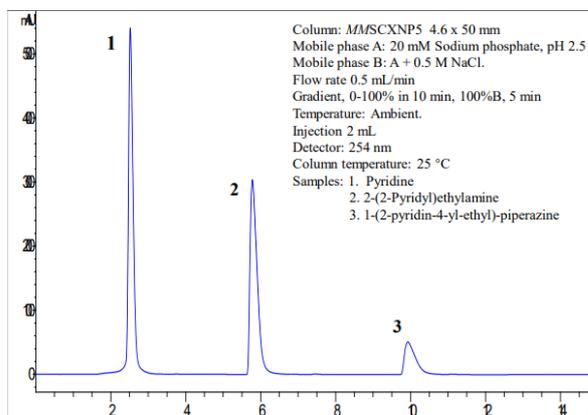


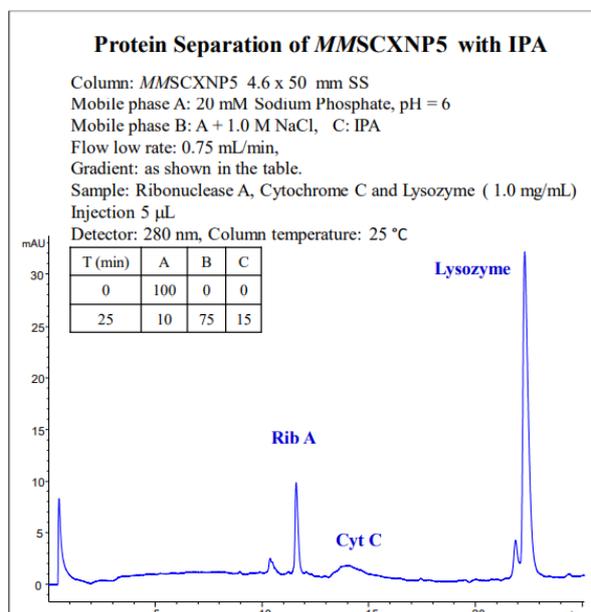
图3是在MMSCX-NP5 (5 μm) 4.6 x 50 mm色谱柱上三类胺的分析色谱图。

Amine Separation on MMSCXNP5



MMSCX和MMSAX色谱柱是离子交换与疏水色谱分析的复合模式, 离子交换的特性反映在保留带有相反电荷的分析能力上, 而疏水特性体现在含有机改性剂的样品洗脱过程中, 减少了分析物与涂层表面间疏水作用。图2显示了AMP和ADP根据电荷密度在MMSAX色谱柱上的分离情况。图3显示了根据分析物上的正电荷密度, 三种吡啶衍生物的分析情况。图4是核糖核苷酸酶A、细胞色素C和溶菌酶在MMSCX-NP5色谱柱上使用有机改性剂异丙醇得到的蛋白质分离色谱图。溶菌酶具有极强的疏水性, 能够在没有添加有机改性剂的情况下被保留在色谱柱上。随着加入IPA (异丙醇) 剂量的增多, 溶菌酶被逐渐洗脱。细胞色素C由于涂层表面的疏水特性被洗脱后仍有较宽的峰度。

图4是在MMSCX-NP5色谱柱上使用有机改性剂IPA后的分析色谱图。



色谱柱安装及操作

色谱柱在没有使用时，它的两端应用堵头进行密封。当将色谱柱接入色谱仪器系统时，首先移去两端的堵头。除非出于特殊考虑，例如为了清除堵在色谱柱入口端的堵塞物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：

- 请依次将管线接头和密封卡套装在外径 1/16" 的管线上。确保密封卡套的宽口端应朝向管线接头。
- 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。
- 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。
- 对色谱柱的另一端采用上述方法进行的操作。

产品参数

MMIEX Phases	Proteomix MMSCX-NP5 Proteomix MMSAX-NP5
Packing	高度交联的 PS/DVB 涂层表面粘了一个密集的纳米亲水涂层，并通过化学修饰结合了

	均匀疏水的离子交换层。
Particle size	5 μ m
Pore structure	无孔
Dynamic Binding Capacity	MMSCX-NP5 用~45mg/mL 的溶菌酶溶液 MMSAX-NP5 用~25mg/mL 的 BSA 溶液
pH stability	2-12
Operating temperature limit	40 $^{\circ}$ C
Operating pressure limit	8000 psi
Mobile phase compatibility	与水溶液、水和乙腈的混合液、丙酮和甲醇兼容。典型缓冲液：磷酸盐、tris 和乙酸盐
Flow rate	4.6 mm 内径经典色谱柱，缓冲液流速在 0.1-1.0 mL/min

样品与流动相

为了避免色谱柱的堵塞，所有样品和溶剂都必须在使用前用 0.22 μ m 的滤膜过滤。建议使用柱前过滤器 (0.5 μ m frit) 或保护柱来保护色谱柱。MMSCX/SAX 离子交换色谱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。典型的洗脱剂包括钠盐、磷酸钾盐、氯化物、乙酸盐或 Tris。流动相在使用前需要使用在线脱气机脱气。常用脱气方法是将流动相超声处理 5 min。

MMSCX 色谱柱与非离子型和两性离子型洗涤剂兼容。**MMSCX 色谱柱与阳离子洗涤剂不兼容，而 MMSAX 色谱柱与阴离子洗涤剂不兼容。**

MMIEX 色谱柱具有疏水特性。与一些疏水性蛋白质或样品可能在涂层表面发生比普通 IEX 亲水色谱柱更强的交互作用，因此常需要在流动相中加入一些有机改性剂。含有有机改性剂的混合流动相会增加色谱柱的背压，因此在应用中建议首先使用长度为 5 cm 的短柱。在操作过程中，建议避免突然更换无机缓冲液与有机改性剂。缓冲液与有机改性剂的更换应缓慢进行，避免无机盐在有机溶剂中沉淀。

色谱柱的保养

为了延长色谱柱寿命，可以每次用 0.2 μ m 的过滤器过滤样品和流动相。为了进一步减少样品或流动相的颗粒残留进入色谱柱，建议采取以下两种附加措施之一：

第一个建议是安装一个 2.0 \times 10 mm 或 4.0 \times 10 mm 的保护柱。这将会帮助更加有效的在流动相或 HPLC 系统

中捕获高吸附性样品成分和样品残余的颗粒物。在使用保护柱后的一段时间，建议每次用 1 M 的 NaCl 高盐溶液对保护柱反向冲洗 10 次。

第二个建议是安装一个切口 $\leq 0.3 \mu\text{m}$ 的柱前过滤器。一旦出现背压增大或色谱柱性能下降的情况，就需要更换过滤器。同时建议每次清洗或更换柱前过滤器时，用 1 M 的 NaCl 高盐溶液对保护柱反向冲洗柱子 10 次。

色谱柱的护理

运输溶剂 MMSCX 和 SAX 新色谱柱在发货时使用的运输溶剂为去离子水。

初次使用 在储存和运输过程中，包装可能会变干。建议使用 10-20 倍柱体积的流动相来激活色谱柱。用流动相冲洗柱子，流速从 0.1 mL/min 逐渐增加至一般操作条件，直到基线稳定。如果系统背压和基线有波动，可能是由于系统中残留的气泡。需要断开色谱柱，并用更高的流速冲洗系统，如：3 mL/min，直到压力和基线保持稳定。

pH 为了获得最佳的分离效果、延长柱的使用寿命，请尽量使用 pH 在 2-12 范围内的流动相。

压力 无孔 MM 离子交换色谱柱可以在 8,000 psi 的高压下运行，但正常操作通常需要在 3,500 psi 的压力下。在高压下连续使用可能会缩短色谱柱的使用寿命。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。压力突然增大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。等待压力下降至零，在测试结束后安全的断开色谱柱与测试仪器的连接。

MMIEX 色谱柱常需要在流动相中加入有机改性剂。含有有机改性剂的混合流动相会增大柱压力，需要特别注意，操作过程中不要超过柱子能承受的最大压力。

温度 最高操作温度为 40°C。为了获得最长的使用时间，最佳操作温度在 10-30°C。长时间在高温 (>40°C) 下操作也会损坏色谱柱，特别是在 pH 值 (>12 or <2.0) 极端的情况下。

流速范围 使用 4.6 mm 内径色谱柱时，正常操作流速范围在 0.1-1.0 mL/min。

储存 当色谱柱长时间不使用时，应将 MMSCX 和 SAX 色谱柱储存在 0.02% NaN₃ 溶液中，冲洗色谱柱至少 15CV，然后用可拆卸的端塞密封两端，防止柱床干燥。

色谱柱清洁 (1) 如果在分离色谱柱前使用了柱前过滤器或保护柱，请先用洗脱液反向冲洗柱前过滤器或保护柱 15-30 分钟，如果清洗不能提升色谱柱的性能，则需要更

换柱前过滤器或保护柱。

(2) 如果样品被吸附在色谱柱入口端的筛板或填料上，当吸附物累计到一定程度时，通常表现为压力增加，峰变宽。当这种情况发生时，需要清洁色谱柱。色谱柱清洁的一般准则如下：

1. 断开色谱柱与检测器的连接。
2. 将色谱柱反接后冲洗。
3. 以不超过最大推荐流速的 50% 运行色谱柱，监测压力，如果压力差远远高于正常的操作条件，你需要降低流速或更换用于清洗的缓冲液，因为不同清洗液的粘性不同。

4. 通常情况下，10-15CV 的清洗液即可。这里推荐一些选择清洗液的一般准则，较低 pH 值的盐溶液有助于去除碱性蛋白质；高 pH 值的盐溶液有助于去除酸性蛋白质；有机物有助于去除疏水性蛋白质，尤其是 MMIEX 色谱柱。

一般建议使用两种清洁液进行清洗：

在 pH 值为 2 (用盐酸调节 pH 值) 时，150 mM 硝酸钾在 75% 浓度乙腈缓冲液用于 MMSAX 色谱柱；

在 pH 值为 10 时，50 mM 磷酸盐在 1.0 M 的 NaCl 缓冲液用于 MMSCX 色谱柱。

*有机溶剂如乙醇或 IPA 可用于清除疏水性沉积物。

Proteomix MMIEX 产品规格

产品	内径×长度 mm×mm	粒径 μm	货号
Proteomix MMSCX-NP5	4.6×150	5	410105-4615
Proteomix MMSCX-NP5	4.6×50	5	410105-4605
Proteomix MMSAX-NP5	4.6×150	5	410305-4615
Proteomix MMSAX-NP5	4.6×50	5	410305-4605

*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。