超高效分子排阻及离子交换色谱系统的日常使用与维护指南

目的

概述超高效液相系统的日常维护与使用的操作规范，当其配合在分子排阻及离子交换色谱中所采用的高离子强度、100%水流动相的典型流动相时。

背景

鉴于生物药物的复杂性，对其充分表征通常需要各种正交性方法。许多色谱技术都是在反相条件下进行的，而其他技术都是在自然的分离条件下进行，要求高离子强度100%的水溶液洗脱。对于高效液相系统，这些条件就可能发生问题：在没有杀菌剂的情况下，缺乏正确维护会导致在几个小时内就发生细菌污染。高盐浓度的存在会增加流动相含有颗粒的可能性。LC系统中存在细菌和颗粒会影响色谱质量和色谱柱的使用寿命。

色谱系统的各部件都同等重要。如果色谱系统不是惰性的或生物兼容性的，就会形成金属蛋白加合物或发生所不希望发生的蛋白质相互作用。长期使用高离子强度100%水流动相，如果色谱系统中的浸润通路中含有钢部件，还会导致生锈。然而，通过正确的色谱系统安装与维护，能够获得稳定的、可重现的色谱分离，而停机时间最少化。[1,2]

ACQUITY UPLC系统的正确安装与维护，提供稳定可靠的SEC与IEX分离。

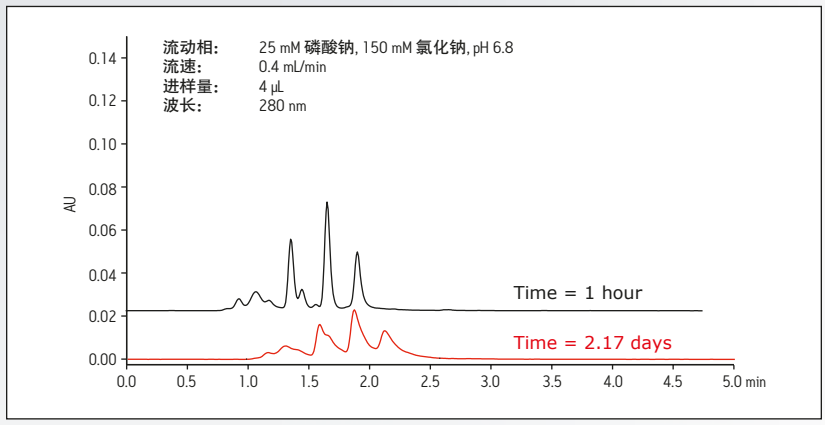

图1. 微生物生长对蛋白质混合物的SEC色谱的影响。通过对色谱柱筛板的分析确认污染。

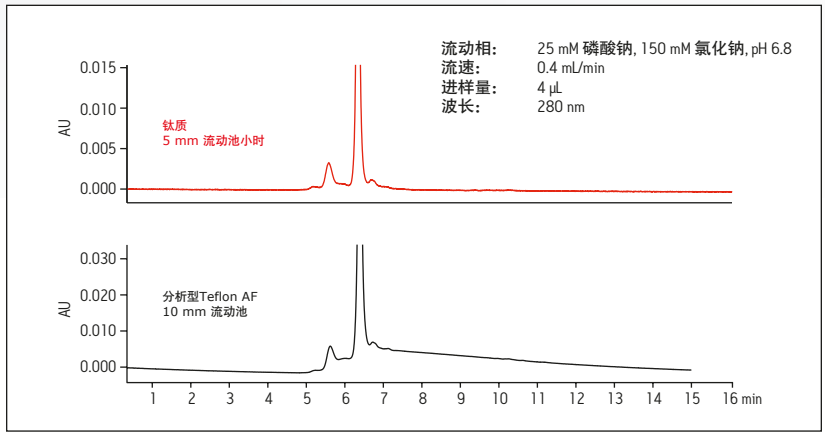

图2. 牛血清白蛋白 (BSA) (5 mg/mL溶于水中)的SEC-PDA色谱图，显示流动池材质对峰形的影响。BSA单体呈现过度的峰拖尾。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

解决方案

分子排阻和/或离子交换色谱系统的维护与使用，需要许多与其他系统一样的标准操作规范。然而，对于高盐水流动相，还需要一些额外的流程。虽然本文概述的规范是针对ACQUITY UPLC®系统描述的，这些原则同样适用于任何色谱系统。总体系统建议包括：

- 如果使用钢质系统，请按照厂商的建议调整。用于沃特世UPLC®系统，可获得详细指南。
- 正确清洗实验室玻璃器具。
- 如果灌洗液缓慢损失，请检查阀问题，观察到保留时间再现性问题、压力或定量重现性问题，请按照标准程序清洗系统。[3]
- 如果可能，请使用含有抑菌剂的流动相(即：0.02%的叠氮化钠)，以防止微生物生长。
- 保留时间或压力的波动可能提示泵有问题。
- 面积或峰值变化而保留时间不变，可能提示进样器有问题。

其他建议按仪器部件列示如下。这些考虑事项针对微生物生长、系统适用性和/或蛋白质稳定性。

溶剂输送系统：

SEC和IEX中使用的缓冲液会有利于微生物的生长，从而导致色谱柱和系统的污染(图1)。建议包括：

- 始终过滤水流动相，用可兼容的 0.22 µm或更小的过滤膜。还建议使用无菌过滤膜和容器。
- 只使用高纯度水(18.2 MΩ cm)。若使用瓶装水，应于使用之日打开。
- 切勿只是更换流动相而不更换溶剂瓶。当更换流动相时总是也更换溶剂瓶。
- 高离子强度洗脱液(> 100 mM)应每二个星期更换一次。
- 低离子强度洗脱液(< 100 mM)应每2-3天更换一次。
- 水(100%)瓶应每天更换。
- 较高的盐浓度，因其可抑制微生物的生长，可减少更换溶剂的频率。更换流动相并不总是方便操作，使用四元溶剂混合系统结合以高浓度缓冲液(> 100 mM)来获得SEC和IEX流动相也可以起到同样的效果。[5]
- 所有洗脱液瓶应于每天进行目视检查，看是否有微生物生长和/或颗粒。微生物生长可以是在瓶壁上形成一层薄膜，或者可以通过摇晃瓶子观察到。
- 如果洗脱液瓶中已经发生微生物生长，则更换流动相过滤器或用70%的异丙醇溶液冲洗。微生物会污染流动相过滤器。
- 使用兼容的流动相过滤器，如钛。每周清洗一次流动相过滤器，以减少微生物污染。使用70%的异丙醇溶液超声或冲洗。
- 推荐的密封件清洗循环时间为0.10分钟(6秒)。
- 密封件清洗建议用90/10的水/甲醇。
- 溶剂管理器永远不得闲置在高盐流动相或100%的水中。
  - 若要短期储存，保持0.1 mL/min的速度从所有在用管中吸取相同比例的流动相。
  - 如果系统将闲置2天以上，请用高纯度水灌洗每根管子10分钟。彻底冲洗系统。用90/10的水/甲醇重复各步骤。

样品管理器：

SEC和IEX条件通常需要样品管理器清洗管路(清洗/清除，强/弱针清洗)中有高离子强度溶液。然而，这些洗脱液可能会对样品注射器和/或针有不利影响。对于可变流通针式系统，要定期除盐，以最大限度减少维护与维修。其他建议包括：

- 确保样品可溶于流动相和样品管理器清洗溶液。
- 遵循厂商的清洗溶剂建议。 例如，建议ACQUITY UPLC H-CLASS Bio系统使用的清洗溶液含盐不得超过500 mM。
- 如果能看到盐沉淀，请清洗表面。如果再次发生盐沉淀，请检查连接及系统是否有问题。[4]
- 如果样品管理器闲置2天以上，请用高纯度水冲洗针和/或清洗管路(最少20个循环或200秒)。用90/10的水/甲醇重复该步骤。一定不能使样品管理器的任何管路闲置于高盐清洗液(>100 mM)超过2天。

UV检测器：

在水相条件下进行SEC或IEX分离时，沃特世推荐使用钛或不锈钢光学流动池。标准的ACQUITY®光学流动池在流经路径中含有Teflon AF。而某些蛋白质，在自然条件下，可能会与流动池表面相互作用，导致峰拖尾和基线倾斜(图2)。对于检测器的建议包括：

- 使用钛或不锈钢流动池，以减少与蛋白质的表面相互作用。其他流动池材料(即Teflon)可能导致峰拖尾。
- 切勿让检测器闲置于高盐洗脱液中。用水彻底冲洗(以0.2 mL/min的速度冲洗60分钟)，然后用90/10的水/甲醇或更高比例有机相冲洗。

色谱柱的储存：

为了保持较长的色谱柱使用寿命并将微生物污染的风险降到最低，应遵循下列建议：

- 色谱柱永远不得储存于高盐水流动相或100%的水中。
- 在切换到推荐的储存条件之前，用10-20倍柱体积的水冲洗色谱柱。
- 按照厂商的建议冲洗和储存色谱柱。典型建议为10-20%的甲醇，或者用杀菌剂(即0.1%的叠氮化钠)。
- 考虑使用保护柱来延长色谱柱的使用寿命。可能需要定期更换。保护柱的更换频率可能取决于样品的清洁度。
- 分子排阻色谱柱典型储存于4-8℃的温度下，以减少微生物生长。离子交换色谱柱通常储存于室温下。详情请查阅厂商的建议。

总结

SEC 和 IEX 色谱分析在蛋白的自然条件下进行，需要高离子强度100%水相洗脱液。为了最大限度减少蛋白质表面相互作用，这些条件会需要使用为这些应用专门设计的生物相容性色谱系统。必须采取预防措施，以预防和最大程度减少细菌污染。这类污染可发生于数个小时内，其迹象包括：峰形恶化、分辨率和色谱柱寿命都变差。不幸的是，一旦色谱柱被污染，将难以再生。为减少系统污染和维修的频率，我们列举出一系列的步骤，用于维护和保养进行生物分子分析的色谱系统和色谱柱。这些建议包括对溶剂管理器、样品管理器、检测器和色谱柱的维护。使用这些操作程序，并结合以良好的实验室操作规范，可确保有一个稳定、再现的超高效分子排阻与离子交换色谱系统。

参考文献

1.“使用ACQUITY UPLC 系统进行体积排阻和离子交换色谱分析蛋白质”，沃特世用户手册 [2010年], Rev A, 文献号 715002147。

2.“使用ACQUITY UPLC H-Class系统进行体积排阻和离子交换色谱分析蛋白质”, 沃特世用户手册 [2010年], Rev A, 文献号715002909。

3.“控制LC/MS和HPLC/MS系统中的污染”, 沃特世用户手册, 文献号 715001307。

4.“ACQUITY UPLC H-Class样品管理器流通针，操作者综述及维护信息”, 沃特世用户手册 [2010年], Rev B, 支持号 USRM10144216。

5.沃特世公司(出品) (2011年). Auto•Blend Plus 技术辅导 [录像]. 可从以下网址获取 http://www.waters.com/waters/nav. htm?cid=134623262。

6.Hong P., Fountain K.J., Wheat T. E., Morrison D. “IEX方法开发，分离某单克隆抗体及其带电荷变体”, 沃特世应用文献[2011年], 索引号 720003836EN。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

沃特世、UltraPerformance LC、ACQUITY UPLC、UPLC和ACQUITY是沃特世公司的注册商标。The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2012年 沃特世公司 中国印刷

January 2012 720004182ZH IH-PDF

沃特世科技（上海）有限公司
北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

001