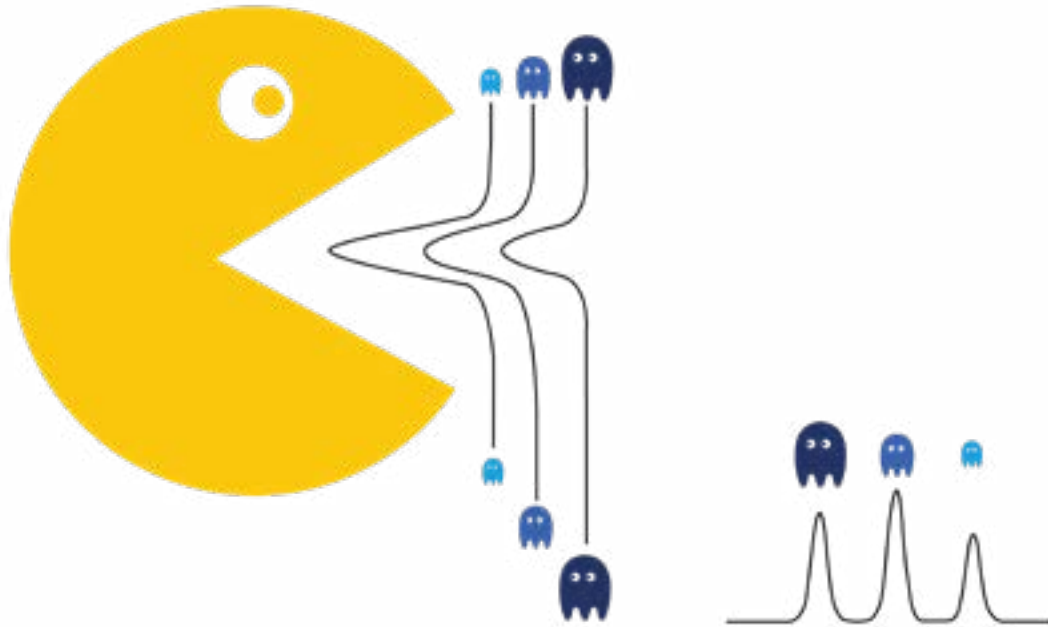


# Dr. Maisch

Any Column, Any Size, Any Media



## SEC 色谱柱

用于生物分子的水相分析

MADE BY DR. MAISCH

## CONTENT

- P 4 - 8 尺寸排阻色谱法 ( SEC )  
孔径大小  
色谱柱尺寸规格  
基质填料, 粒径大小
- P 9 - 15 凝胶过滤色谱 ( GFC )  
REPROSILSEC  
ReproSil 50 SEC  
ReproSil 125 SEC  
ReproSil 200 SEC & ReproSil 200 SEC-2  
ReproSil 300 SEC  
ReproSil 4000 SEC  
ReproSil 5000 SEC
- P 16 GFC方法优化
- P 17 订购信息 - REPROSIL SEC色谱柱
- P 18 色谱柱维护信息 - REPROSIL SEC 色谱柱
- P 19 对应其他厂商参考图
- P 20 水溶液用再聚物oh (sec) gfc ( 聚合物基 )
- P 21 水性条件下用于GFC的REPROMEROH(SEC)(聚合物基质)
- P 22 色谱柱维护信息 -REPROMEROHSEC柱子
- P 23 对应其他厂商参考图

SEC COLUMNS  
MADE BY DR. MAISCH

来自欧洲最大的高效液相色谱柱 ( HPLC )  
和 ( UHPLC ) 制造商之一。



## ReproSil SEC柱的关键特性

- 稳定性  
7000 psi 的填充压力下可实现高流速、缩短平衡时间并缩短分析时间。
- 高柱效  
5 μm 介质柱效可达100,000 plates/m
- 灵活性  
从毛细管到制备尺寸，具有不同的硬件选项。
- 高回收率  
无蛋白质丢失。碱性蛋白质的低吸附性。
- 价格  
高性价比。

体积排阻色谱法 (SEC) 是指通过凝胶过滤，根据分子的大小来分离分子。凝胶由含有特定大小孔的球形珠子组成。

SEC通常被用户按照以下术语进行划分：

凝胶过滤色谱法 (GFC) 在水溶液中的分离。

凝胶渗透色谱法 (GPC) 在有机溶剂中的分离。

最近的研究表明，ReproSil SEC柱可用于分析和制备规模下聚乙二醇 (PEG) 的超临界流体色谱 (SFC) 分离和纯化。在这种情况下，流动相是超临界二氧化碳。(Dr. Maisch HPLC应用0007)。

孔径是SEC柱的关键标准。当流动相流过并穿过这些颗粒时，它携带着样品，样品可以根据颗粒大小进出孔洞。

这些分子将根据它们的大小差异进行分离，或者更准确地说：根据它们的流体动力学体积（斯托克斯-爱因斯坦半径）的差异。流体动力学体积受其形状和它们的分子量的影响。

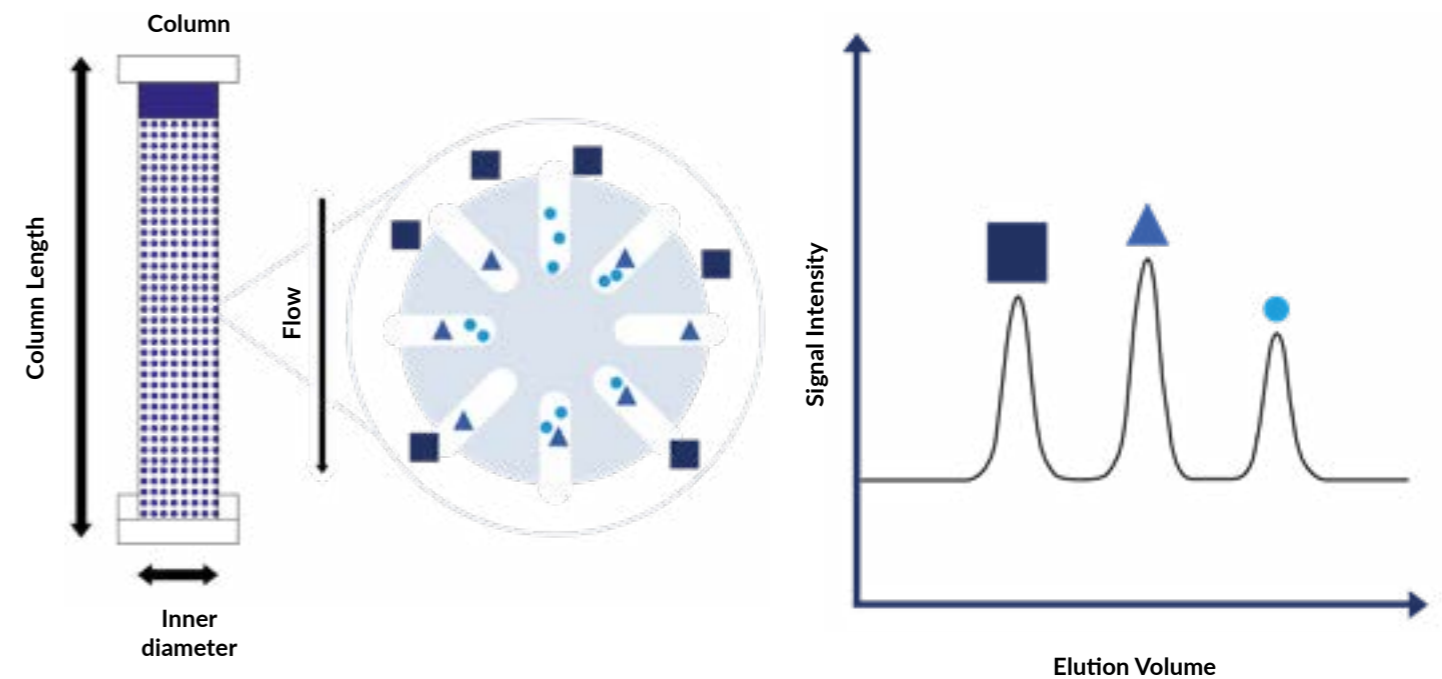


图1：显示了分子在 SEC 色谱柱上相对于其流体动力学体积的分离方式。。

根据经验，孔隙应比最大的分析物大 2-3 倍。分子在通过色谱柱时根据其大小进行分离，并按流体动力学体积递减的顺序洗脱。

SEC 常见分离类型是分馏、脱盐或缓冲液置换。

SEC 色谱柱的校准曲线通常用于说明 SEC 色谱柱适合的分子量 (MW) 范围。

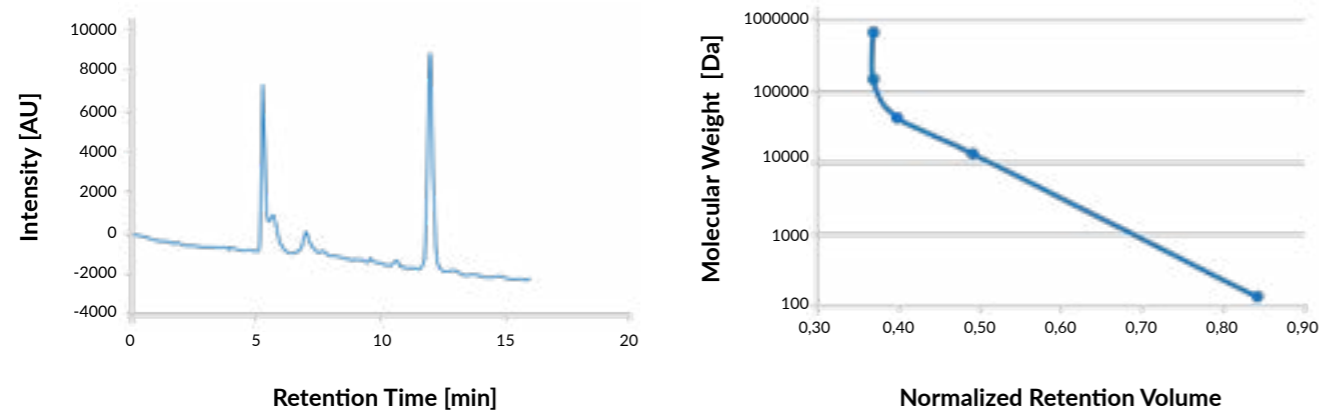


图2: ReproSil 125 SEC 上蛋白质混合物的校准曲线，100 mM 磷酸盐缓冲液，pH 值 6.8。

在图2中，分子量与不同大小的标准物质的相应保留时间（或保留体积）进行了对比绘制。

对于非常高或非常低的分子量，所得曲线大多具有陡峭的部分。那意味着该区域的保留时间/体积没有变化，因此尽管分子量不同，但不会分离。校准曲线的浅部分显示保留时间和分子量之间呈近线性相关性。因此，该色谱柱可用于分离该分子量范围内的分子。

校准的标准物应与分析物相同或至少相似；

- 对于蛋白质分析，校准曲线应该使用蛋白质进行（理想情况下使用形状或表面结构相似的蛋白质）。
- 对于多糖分析，校准曲线应该使用葡聚糖进行。

SEC 应用的常见列尺寸：

Type of Analysis	Length [mm]	Inner Diameter [mm]
HPLC	300	7.8 (8)
UHPLC	300	4.6 / 2.0
Fast Analysis High Throughput	≤ 150	≤ 4.6
Very Low Concentrated Samples	≤ 150	0.05 - 2
Prep Applications	300	≥ 20

表1：根据分析类型选择。

尺寸排阻色谱法通常使用长柱子，因为理论塔板数和分离效率与柱子长度成正比。然而，长柱子也会导致分析时间过长，因此，在运行时间和分离性能之间达成平衡，可得出最优的柱子长度。

SEC 柱子的内径越小，所需的溶剂量就越少，总适用注射量也越小，这有利于低样品量的分析。这些色谱柱也可以串联使用以提高分离度，或作为具有不同孔径的偶联 SEC 色谱柱使用，但随之色谱系统的背压也会大大增加！

许多生物分子（如蛋白质、肽、寡核苷酸等）会发生次级相互作用，对色谱分离和这些分子的回收性能产生负面影响。

为了避免这种不好的相互作用，Maisch博士提供了2种惰性硬件选择：

1. 聚醚醚酮 (PEEK) 硬件。
2. 生物惰性涂层硬件 (柱体和滤网的表面涂层)。

Biointert 硬件是寡核苷酸、磷脂和金属螯合小分子等具有挑战性的物质的首选和推荐。这种硬件的成本较高，但峰形、灵敏度和重现性会得到改善。消除了样品残留，不再需要样品调节。

Dr. Maisch的GFC柱子提供两种不同的基质：

Product Name	Base Material	Advantages	Disadvantages	Applications
ReproSil-SEC	Silica	High pressure stability High flow rates Highest efficiency & resolution < 2 µm porous particles available	pH stability: 2-7	mAbs proteins peptides at physiological pH
Repromer-OH	Polymethacrylate	High pH stability	Secondary interactions (Hydrophobicity)	SEC at high pH

Table 2: Base materials from Dr. Maisch available for GFC columns.

颗粒大小影响分离效率：较小的颗粒分辨率更高，因为它们的传质阻力比大颗粒小。然而，小颗粒尺寸会增加柱子的背压。亚2微米的柱子需要使用UHPLC设备 (液相色谱系统的背压高达1000bar)

Dr. Maisch提供多种孔径大小 (50 Å – 800 Å) 的SEC分离柱，允许在500 Da – 1,250,000 Da范围内进行分离。硅胶基质的SEC柱通过亲水性表面键合进行改性，以最小化蛋白质和其他分析物上电荷基团的静电相互作用。

Dr. Maisch提供两种不同的SEC柱版本 (PEG和Diol)，这导致了显著不同的分离效果。

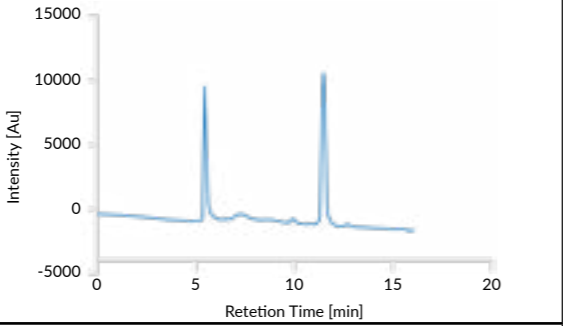
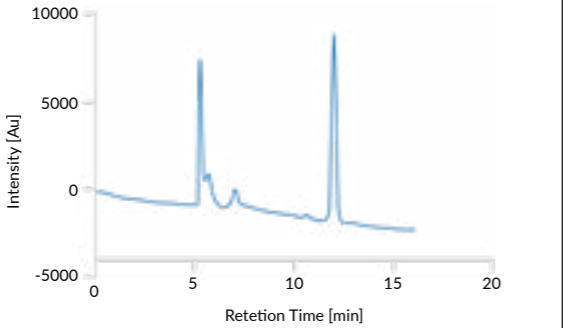
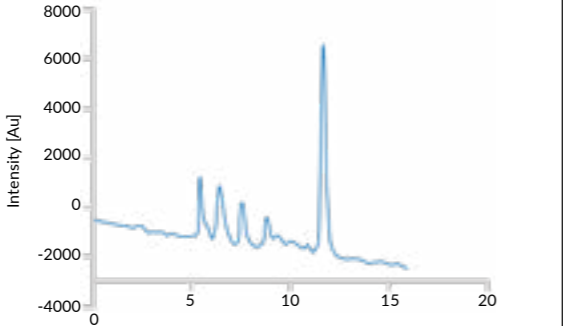

Product Name	Pore Size [Å]	Hydrophilic Modification	MW Range [Da] <sup>1</sup>		Part Number (PN)			
			Minimum	Maximum	1.9 µm	3 µm	5 µm	10 µm
ReproSil 50 SEC	50	DIOL	500	10,000	N/A	N/A	r05.sec	r00.sec
ReproSil 125 SEC	125	DIOL	5000	100,000	N/A	r13.sec	r15.sec	r10.sec
ReproSil 200 SEC	250	PEG	10,000	500,000	r219.sec	on request	r25.sec	on request
ReproSil 200 SEC-2	200	DIOL	10,000	500,000	r219.sec2	r23.sec2	r25.sec2	r20.sec2
ReproSil 300 SEC	300	PEG	10,000	1,000,000	N/A	r33.sec	r35.sec	on request
ReproSil 4000 SEC	400	PEG	20,000	500,000	N/A	N/A	r45.sec	on request
ReproSil 5000 SEC	800	PEG	150,000	1,250,000	N/A	N/A	r55.sec	on request

1) MW range is based on "linear" molecules.

Table 3: 基于二氧化硅的Dr. Maisch GFC介质。

# GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY (GFC) COLUMNS FOR AQUEOUS CONDITIONS – REPROSIL SEC

# GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY (GFC) COLUMNS FOR AQUEOUS CONDITIONS – REPROSIL SEC

Pore Size [Å]	Chromatogram	Product Name
50		ReproSil SEC 50
100		ReproSil SEC 100
250		ReproSil SEC 200
800		ReproSil SEC 5000

Analytes	Retention Time [min]	Molecular Weight [Da]
1. Thyroglobulin bovine	~11	670,000
2. Gamma-Globuline	~11	150,000
3. Albumine chicken egg	~11	44,300
4. Ribonuclease A	~6	13,700
5. 4-Aminobenzoic acid	~6	137

Column Dimension: 300 x 4.6 mm, 5 µm  
 Mobile Phase: 100 mM Na-Phosphate pH 6.8  
 Flow Rate: 0.35 ml/min  
 Detection: UV 254 nm

Table 4: 孔径大小对标准蛋白质混合物的SEC分离的影响。

## ReproSil 50 SEC

适合对非常小的肽和蛋白质进行SEC分析 (分子量: 500 Da – 10,000 Da)。

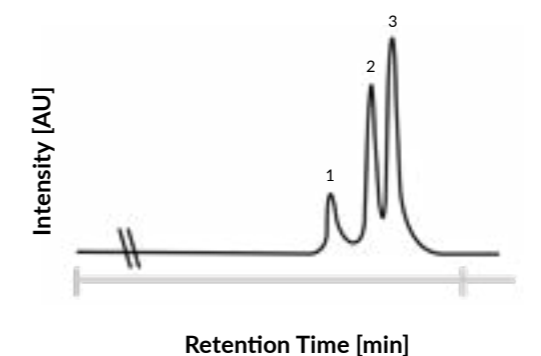


Fig. 3: ReproSil SEC 50, 5 µm, 300 x 8 mm (PN: r05.sec.s3008). 洗脱液: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 100 mM KCl (pH 6.5) 流速: 0.5 ml/min, 样品: 肽标准品: 1. 肽分子量 3.894 Da 2. 肽分子量 1.593 Da 3. 肽分子量 826 Da.

## ReproSil 125 SEC

适合对中等分子量蛋白 (5,000 Da – 100,000 Da) 进行SEC分析。

# GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY (GFC) COLUMNS FOR AQUEOUS CONDITIONS – REPROSIL SEC

# GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY (GFC) COLUMNS FOR AQUEOUS CONDITIONS – REPROSIL SEC

## ReproSil 200 SEC & ReproSil 200 SEC-2

适合对较大蛋白质进行SEC分析 (分子量: 10,000 Da – 500,000 Da)。

SEC 中最常用的孔径, 用于分析具有两种不同亲水修饰 (200 SEC = PEG 和 200 SEC-2 = Diol) 的大生物分子。

可用于UHPLC-SEC应用的亚2微米介质。

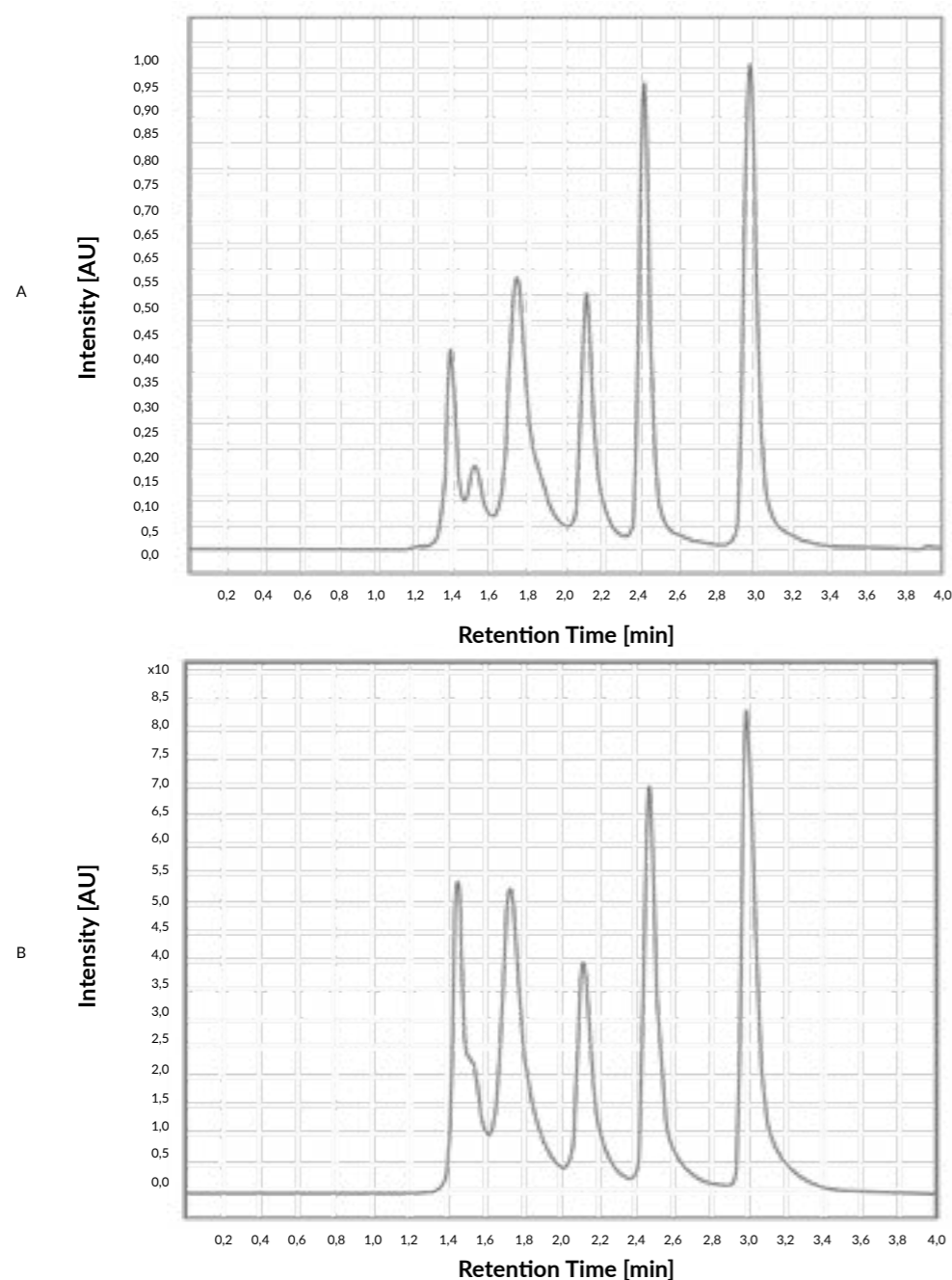


Fig. 4: Comparison of 75 x 4.6 mm UHPLC-SEC columns. Both packed from Dr. Maisch.  
 A: ACQUITY<sup>1</sup> UHPLC Protein BEH SEC column, 200 Å, 1.7 μm, 75 x 4.6 mm.  
 B: ReproSil 200 SEC-2, 1.9 μm (r219.sec2.s0746).

## ReproSil 300 SEC, ReproSil 4000 SEC, ReproSil 5000 SEC

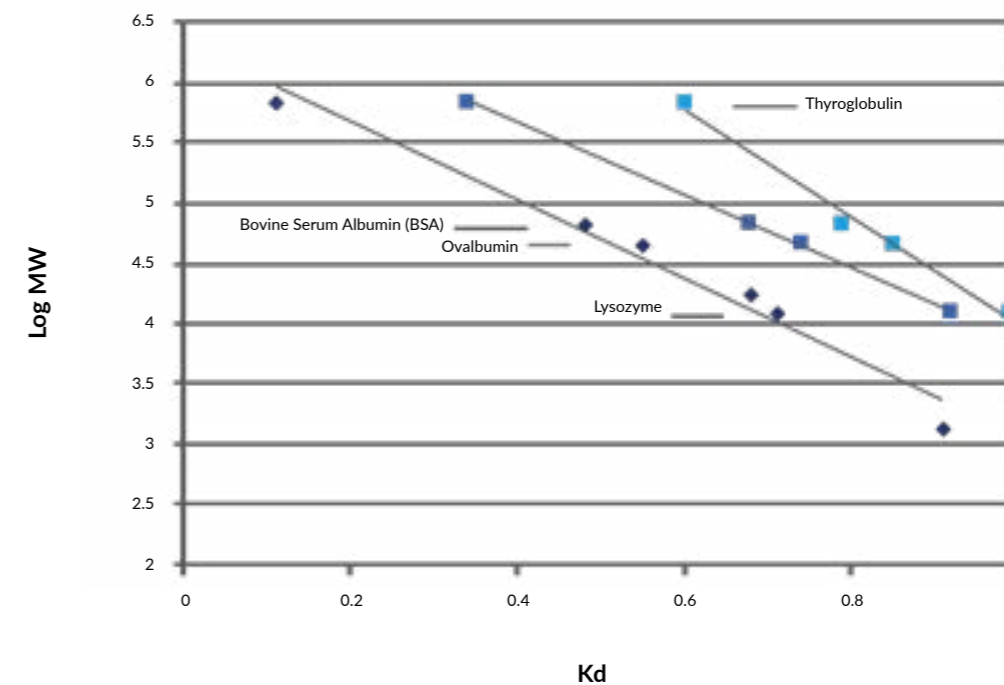


Fig. 5: 蛋白质凝胶过滤色谱 (GFC) 显示, 与 ReproSil 300 SEC 和 ReproSil 4000 SEC 相比, ReproSil 5000 SEC 将蛋白质保留的 Kd 值提高到更高

1) ACQUITY is a registered trade mark® of Waters Technologies Corporation.

# GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY (GFC) COLUMNS FOR AQUEOUS CONDITIONS – REPOSIL SEC

# GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY (GFC) COLUMNS FOR AQUEOUS CONDITIONS – REPOSIL SEC

## ReproSil 300 SEC

适用于大蛋白质的SEC分析（分子量：10,000 Da – 1,000,000 Da）。TSK G3000SWxl 1的优秀替代品。

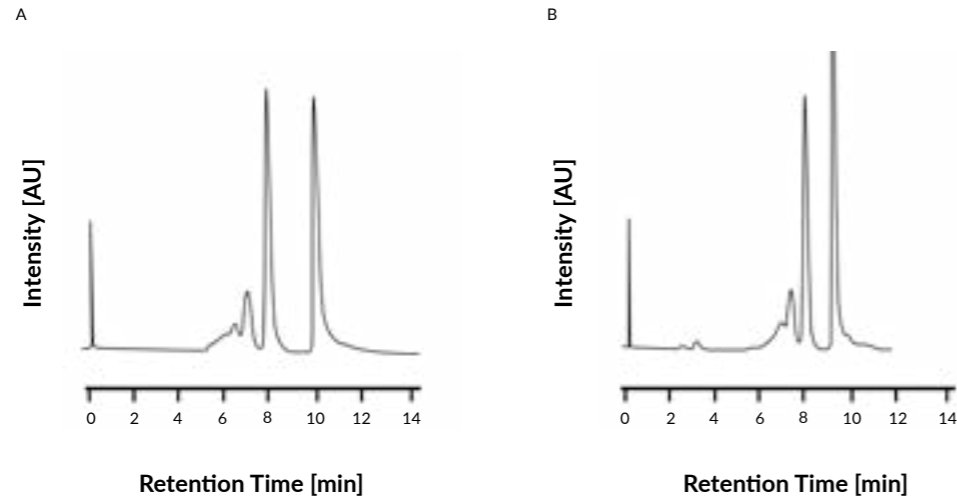


图6：在A) 300 x 7.8毫米TSK G3000SWxl 1和B) 300 x 8毫米ReproSil SEC 300柱上使用50mM磷酸钾pH 7/150 mM氯化钠洗脱液以1.0 ml/min的流速分离牛血清白蛋白和细胞色素C。

## ReproSil 5000 SEC

高效性能的超大分子量蛋白质的尺寸排阻分离。

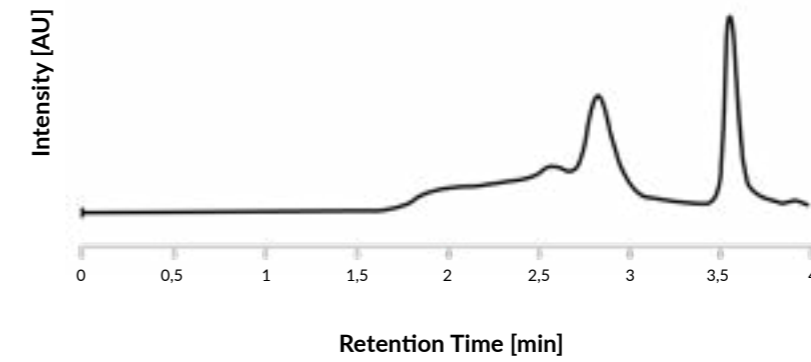


图8：在使用50 mM磷酸钾（pH 7）/150 mM氯化钠洗脱液，以1 ml/分钟的流速下，通过250 x 4.6 mm

ReproSil SEC 5000分离甲状腺球蛋白和核黄素。

## ReproSil 4000 SEC

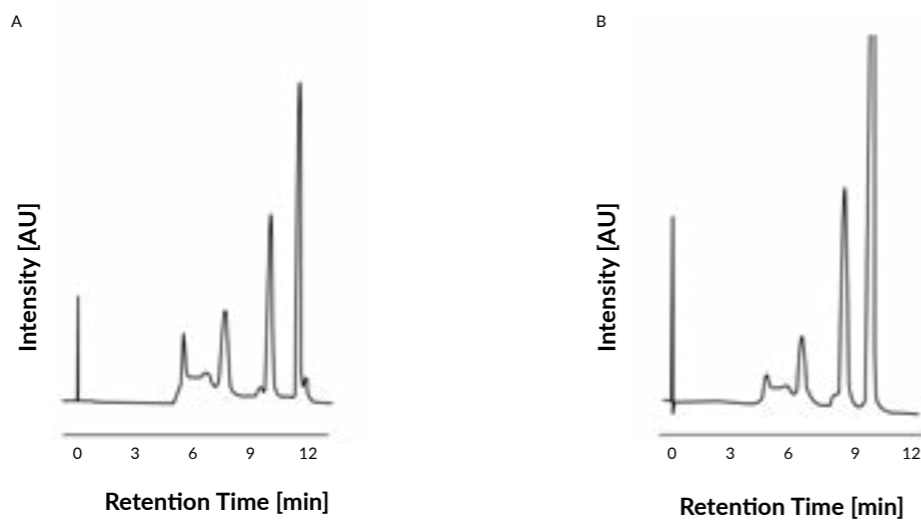
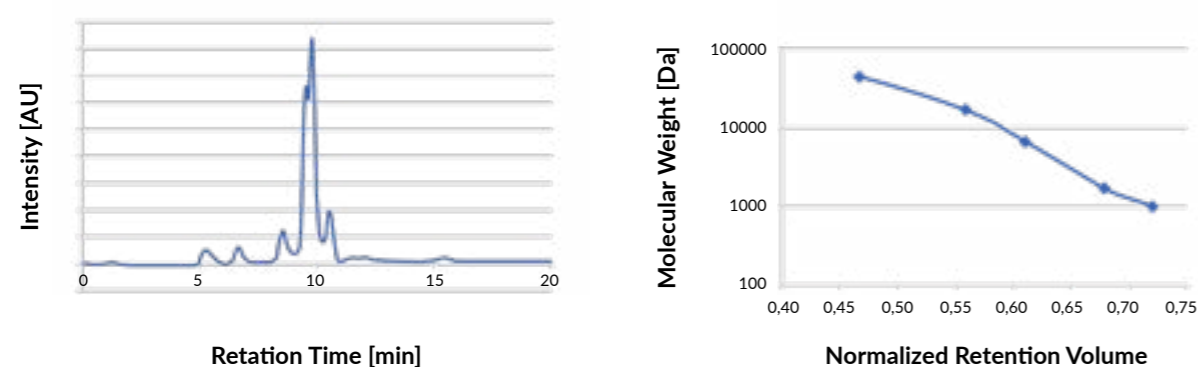


图7：在 ReproSil 4000 SEC 柱上分离甲状腺球蛋白、卵清蛋白和苯丙氨酸A) 300 x 8 毫米和 B) 250 x 4.6 毫米 条件：50mM磷酸钾pH7/150mM氯化钠洗脱液1ml/min (8mm) 和0.33 ml/min (4.6 mm)

洗脱液在凝胶过滤色谱 (GFC) 分离中扮演着重要角色。当使用改性剂时, 蛋白质的排斥极限会变小, 因为它们失去了紧凑的球形结构。选择合适的洗脱条件是必要的, 以最大化分子筛分机制并最小化次级效应, 例如样品与固定相之间的离子和疏水相互作用。

缓冲液的选择和缓冲液浓度对分离性能有巨大影响。

1) buffer 25mM NH<sub>4</sub> Ac/MeCN = 80:20 v/v



2) buffer 100mM Phosphate - buffer, pH 6.8

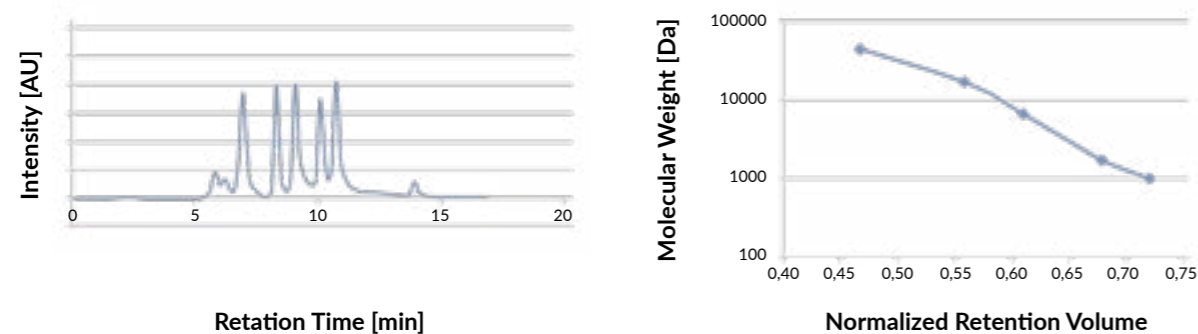


图9: 蛋白质混合物的分离 (Sigma-Aldrich; 目录号 69385; 1. 牛甲状腺球蛋白 (670k Da)  
表5: ReproSil SEC柱的订购信息。2. 牛-球蛋白 (150 kDa) 3. 鸡蛋清蛋白 (44.3 kDa) 4. 牛核糖核酸酶A 1-A型 (13.7 kDa) 5. 对氨基苯甲酸

ReproSil SEC	Particle Size [μm]	Column Dimension [mm]	Part Number (PN)
ReproSil 50 SEC	5	300 x 4.6	r05.sec.s3046
	5	300 x 8	r05.sec.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r05.sec.s0208
ReproSil 125 SEC	3	300 x 4.6	r13.sec.s3046
	5	300 x 4.6	r15.sec.s3046
	3	300 x 8	r13.sec.s3008
	5	300 x 8	r15.sec.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r15.sec.s0208
	10	300 x 8	r10.sec.s3008
ReproSil 200 SEC	Guard, 10	20 x 8	r10.sec.s0208
	1.9	300 x 4.6	r219.sec.s3046
	5	300 x 4.6	r25.sec.s3046
ReproSil 200 SEC-2	5	300 x 8	r25.sec.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r25.sec.s0208
	1.9	300 x 4.6	r219.sec2.s3046
	3	300 x 4.6	r23.sec2.s3046
	3	300 x 8	r23.sec2.s3008
	5	300 x 4.6	r25.sec2.s3046
	5	300 x 8	r25.sec2.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r25.sec2.s0208
	10	300 x 8	r20.sec2.s3008
ReproSil 300 SEC	Guard, 10	20 x 8	r20.sec2.s0208
	5	300 x 4.6	r35.sec.s3046
	3	300 x 4.6	r33.sec.s3046
	5	300 x 8	r35.sec.s3008
	3	300 x 8	r33.sec.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r35.sec.s0208
ReproSil 4000 SEC	5	300 x 4.6	r45.sec.s3046
	5	300 x 8	r45.sec.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r45.sec.s0208
ReproSil 5000 SEC	5	300 x 4.6	r55.sec.s3046
	5	300 x 8	r55.sec.s3008
	Guard, 5	20 x 8	r55.sec.s0208

表5:reprosil SEC色谱柱信息。

注: 毛细管 (50μm- 800μm ID) 和制备尺寸可根据要求提供。

ReproSil SEC	300 x 4.6 mm	300 x 8 mm
样品加载	Max.: 100 µg Optimal: 10 - 40 µg	Max.: 200 - 300 µg Optimal: 20 - 100 µg sample
进样体积	< 10 µl	1-20 µl
正常流速	0.4 ml/min	1 ml/min
温度	Max.: 50°C	
最大流速	Max.: 1.5 ml/min (if back pressure is < packing pressure).	
pH范围	2.5 - 7.5	
柱压力	柱压不得超过最大填充压力（参见QC表）。	
有机改性剂	Up to 100 % MeCN 10 % DMSO 500 mM-mercaptoethanol	
缓冲液浓度	大多数蛋白质应用推荐使用高离子强度缓冲液。通常会添加一种中性盐以增加离子强度。最大盐浓度：1 M	
洗涤剂	一般而言：洗涤剂会附着在SEC介质表面，影响柱子的使用寿命和未来的使用。如果SEC方法需要改性条件（如SDS）或配方洗涤剂（如Tween 20，Triton）：ReproSil SEC柱可以在这类条件下操作，但使用寿命会缩短。推荐使用保护柱。与改性试剂接触过的SEC柱子，之后应仅使用含有洗涤剂的洗脱液	
精氨酸	在极少数情况下，蛋白质会与SEC介质结合，导致蛋白质洗脱和峰分辨率受损，这会导致错误地确定洗脱蛋白质的大小和聚集物种的数量。在这些情况下，可以向流动相中添加精氨酸（例如0.2 M精氨酸-HCl）。这种流动相减少了非特异性蛋白质结合，同时不影响蛋白质结构。	
清洗程序	一般蛋白质去除。	用30毫升0.1M的NaH2PO4，pH值为3.0进行冲洗
	疏水化合物。	使用乙腈梯度。
	带电污染物。	0.5 mol/l salt（氯化钠或硫酸钠）
	强吸收蛋白质	Wash with 6 M 硫氰酸胍 or 10 % DMSO.
色谱柱保存	过夜：以0.2毫升/分钟的速度运行流动相。 长期储存：使用含0.05%叠氮化钠的水溶液或含20%甲醇的水溶液。	

Table 6: Column Care Information for ReproSil SEC columns.

Pore Size [Å]	Dr. Maisch	TSK	Phenomenex	Waters	Agilent	Sepax	YMC
50	ReproSil 50 SEC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	YMC-Pack Diol-60
125	ReproSil 125 SEC	TSKgel G2000SW TSKgel G2000SWxl	BioSep SEC-s2000 Yarra 2000	BioSuite Diol (OH) 125Å	ZORBAX GF-250	SRT SEC-100 SRT SEC-150	YMC-Pack Diol-120
250	ReproSil 200 SEC	TSKgel G3000SW TSKgel G3000SWxl	BioSep SEC-s3000 Yarra 3000 Biozen dSEC-2 <sup>1</sup>	N/A	ZORBAX GF-450	SRT SEC-300	YMC-Pack Diol-200
200	ReproSil 200 SEC-2	TSKgel G3000SW TSKgel G3000SWxl	BioSep SEC-s3000 Yarra 3000 Biozen dSEC-2 <sup>1</sup>	BioSuite Diol (OH) 250Å	N/A	N/A	YMC-Pack Diol-200
300	ReproSil 300 SEC	TSKgel G3000SW TSKgel G3000SWxl	BioSep SEC-s3000 Yarra 3000 Biozen dSEC-3 <sup>1</sup>	N/A	ZORBAX GF-450	SRT SEC-300	YMC-Pack Diol-300
400	ReproSil 4000 SEC	TSKgel G4000SW TSKgel G4000SWxl	BioSep SEC-s4000 Yarra 4000	BioSuite Diol (OH) 450Å	N/A	SRT SEC-500	N/A
800	ReproSil 5000 SEC	N/A	Biozen dSEC-7 <sup>1</sup>	N/A	N/A	N/A	N/A

表7:SEC对比参照图。

1)需要生物惰性硬件。

## Repromer OH柱的关键特性

- 高性能

四种不同的孔径大小，适用于从<20,000-1,000,000 Da的范围。具有高分辨率的大孔体积。低柱流失，低检测器噪声。

- 灵活性

从毛细管到制备尺寸有不同的硬件选择。

- 价格

价格合理的SEC柱系列，品质优良。

Repromer OH (SEC)系列基于甲基丙烯酸酯，适用于中性或阴离子聚合物的水性尺寸排阻色谱法。典型样品包括中性聚合物和阴离子聚合物（聚乙烯氧化物（PEO）、聚乙二醇（PEG）、普鲁兰、透明质酸、聚丙烯酸、葡聚糖硫酸酯、肝素、果胶、聚乙烯醇等）。

Product Name	Min. Molecular Weight [Da]	Max. Molecular Weight [Da]	Part Number (PN) for 10 µm media
Repromer OH-2500	N/A	<20,000	rm0.oh25
Repromer OH-3000	N/A	<80,000	rm0.oh3
Repromer OH-4000	1,000	300,000	rm0.oh4
Repromer OH-5000	2,500	1,000,000	rm0.oh5

Table 8: 基于聚合物的Dr. Maisch SEC介质。

Product Name	Exclusion Limit [Da]	Column Dimension [mm]	Part Number (PN)
Repromer OH-2500	<20,000	300 x 8	rm0.oh25.s3008
		250 x 8	rm0.oh25.s2508
		30 x 8	rm0.oh25.s0308
Repromer OH-3000 (=Repromer Aqua 100 OH, rm10.aqua.)	<80,000	300 x 8	rm0.oh3.s3008
		250 x 8	rm0.oh3.s2508
		30 x 8	rm0.oh3.s0308
Repromer OH-4000	1,000 - 300,000	300 x 8	rm0.oh4.s3008
		250 x 8	rm0.oh4.s2508
		30 x 8	rm0.oh4.s0308
Repromer OH-5000	2,500 - 1,000,000	300 x 8	rm0.oh5.s3008
		250 x 8	rm0.oh5.s2508
		30 x 8	rm0.oh5.s0308

Table 9: Repromer OH SEC柱子的订购信息。

注：毛细管（50µm- 800µm ID）和制备尺寸可根据要求提供。

Repromer OH	Column Dimension: 300 x 8 mm	
进样体积	10-20 µl (typical)	
流速	Max. 1 ml/min (if back pressure is < max. packing pressure)	
温度	Max.: 80°C	
pH-范围	2 - 10	
最大背压范围	50 - 80 bar	
流动相	含盐/缓冲液的水。 最大缓冲液浓度0.5M。	
有机改性剂	MeOH, MeCN if necessary (<70%).	
保存	过夜：以 0.2 毫升/分钟的速度运行水相。 长期储存：使用 0.025 %叠氮化钠的水溶液或 10% 甲醇的水溶液。	
避免	冷冻和干燥.	
色谱柱清洗	常规.	高达 70 % 的 MeCN 用于清洁程序。 清洁时最大 45 bar压力。
	强吸收蛋白质.	0.5% SDS或者6 M硫氰酸胍。
色谱柱耦合	首先：小孔径柱。 第二：大孔径柱.	

Table 10: Column Care Information for Repromer OH SEC column 300 x 8 mm.

MW Range	Dr. Maisch	Agilent	Waters	Shodex	TSK	PSS (Agilent)	Tessek	Phenomenex
Very Low	Repromer OH-2000	PL aquagel-OH 20	N/A	OHpak SB-802	TSKgel G1000PW	N/A	N/A	Polysep GFC-P2000
Low	Repromer OH-3000	PL aquagel-OH 30	Ultrahydrogel 120	OHpak SB-802.5	TSKgel G3000PW	Suprema 30A	HEMA-BIO 40	Polysep-GFC-P3000
Middle	Repromer OH-4000	PL-aquagel OH-40	Ultrahydrogel 250	OHpak SB-803	TSKgel G4000PW TSKgel G4000PWxl	Suprema 100A	HEMA-BIO 100	Polysep-GFC-P3000 Polysep-GFC-P4000
Large	Repromer OH-5000	PL-aquagel OH-50	Ultrahydrogel 500 Ultrahydrogel 1000	OHpak SB-804	TSKgel G5000PWxl	Suprema 300A / Suprema 1000A	HEMA-BIO 300	Polysep GFC-4000 Polysep GFC-P5000

Table 11: Cross Reference Chart for SEC columns.

# Dr. Maisch

Any Column, Any Size, Any Media

Distributor:



Dr. Maisch HPLC GmbH  
Beim Brückle 14  
D-72119 Ammerbuch  
T: +49 (0) 7073 50357  
F: +49 (0) 7073 4216  
[www.dr-maisch.com](http://www.dr-maisch.com)  
[www.modcol.com](http://www.modcol.com)  
[info@dr-maisch.com](mailto:info@dr-maisch.com)



PDF brochure  
for download