

## Bonnasil-HS 系列色谱填料使用说明书

### 产品简介

Bonnasil-HS系列色谱填料采用自主研发并生产的高纯硅胶进行键合,硅胶采用了特殊的孔道优化技术和独特的表面处理技术,保证了该系列填料具有均匀一致的孔径和优异的载样量。在此基础上,天津博蕴凭借多年的生产和研发经验,采用独有技术对硅胶进行键合和封端,确保了其具有优异的选择性和化学稳定性。

Bonnasil-HS系列填料可满足包括胰岛素在内的各种多肽、寡核酸和相关中间体、天然有机物以及大多数有机合成物质的精细纯化需求。且由于其粒径均一、机械强度高、耐压性能好等特点,可满足客户反复装填的使用需要。

### 产品参数一览

键合相	C18	AQ C18	Polar C18	C8	Silica	.....
粒径 $\mu\text{m}$	10	10	10	10	10	
孔径 $\text{\AA}$	100	100	100	100	100	
碳载量 %	17	14	15	10	/	
比表面积 $\text{m}^2/\text{g}$	300	300	300	300	300	
pH 适用范围	2-9	1.5-8.5	2-8.5	2-9	2-8.5	
耐压 MPa	40	40	40	40	40	
常用流动相	水,甲醇,乙醇,乙腈	水,甲醇,乙醇,乙腈	水,甲醇,乙醇,乙腈	水,甲醇,乙醇,乙腈	正己烷,乙酸乙酯,异丙醇	
常用流速范围 mL/min (50 mm DAC, 其它柱径的流量与截面积成正比)	50-80	50-80	50-80	50-80	50-80	

### 使用注意事项

- 制备时的使用压力应低于装填压力。
- Bonnasil-HS 硅胶具有卓越的化学稳定性,可在较宽pH范围内使用。但若长期使用强碱高盐条件,会降低填料使用寿命。
- 填料的寿命除和流动相中盐浓度及pH相关外,还与样品或试剂中的强吸附物质或大分子在填料上的残留污染相关。填料需要使用后及时清洗;如果样品或试剂中含有过多对填料会产生污染的物质(如蛋白、多糖等胶体,强吸附物质等),建议上柱进行色谱分离之前,先用其它方法尽可能去除这些会污染填料的物质。
- 反相制备中使用的常规流动相、缓冲盐均可使用,也可以加入TFA、乙酸、三乙胺等离子对试剂来改善分离效果。
- 对于含杂质较多的样品,可先进行过滤等预处理或使用保护柱。

### 填料储存

- 未使用的填料:请直接使用出厂时的容器储存,并避免在高温潮湿的条件下放置,保质期为5年。
- 使用后的填料:制备过程完成后,请按色谱柱的清洗方法对色谱柱进行清洗,一定要先将色谱柱上残留的缓冲盐用低浓度的有机相水体系淋洗干净,推荐使用的流动相有异丙醇/水、乙醇/水或甲醇/水,然后过渡到高浓度的有机相冲洗,清洗后可在溶剂中湿法保存也可以干法保存。如果要在溶剂中湿法保存旧硅胶填料,建议在保存在无水和中性的有机溶剂中。若需干燥保存,请使用甲醇、乙醇、异丙醇(IPA)等有机溶剂置换后,再将填料从柱内打出,用烘箱烘干(温度不超过90°C),然后室温下密封保存。

## 动态轴向压缩柱 (DAC) 的填充及评价

### 1. 装填方法

#### ◇ 填料量确定:

填料量=填料密度×柱体积 (注: 为保证柱床质量, 建议称取的填料为理论量的1.05-1.10倍)

#### ◇ 选用适宜的匀浆试剂:

正相硅胶填料可使用异丙醇匀浆, 对于反相C18填料通常可选用异丙醇或乙醇匀浆, 匀浆试剂与填料的比例约为2ml/1g。

#### ◇ 匀浆:

根据计算后的体积选用适当的容器, 向其中加入称量好的填料, 边搅拌边缓缓地向填料中加入匀浆试剂 (不要急于将试剂一次全部倒入), 搅拌10-20分钟, 期间如有条件可以同时加热匀浆液至35至40°C, 使匀浆液混合更加充分以增大其柱效和拖尾因子表现, 使填料在溶剂中均匀分散, 直到填料与试剂混合为均匀的悬浊液(注意: 容器内不要有任何干料的残留)。若悬浊液保持在5分钟内不沉降, 并具有足够的流动性, 即匀浆完成。最后再对匀浆完成的料液超声5min, 排除料液内的气体。

#### ◇ 装填:

- (1) 使用甲醇淋洗柱管, 随后使用气枪吹干其中溶剂, 确保无水分残留;
- (2) 将液压缸升降开关拨至“升”的位置, 将气源开关拨动至“开”, 缓慢调节压力调节阀, 使压力上升, 柱塞杆缓慢上升, 使活塞头距离柱管口20cm以上, 以使后续操作方便;
- (3) 将压力调节阀调至最小, 并将气源开关拨动至“关”, 液压缸升降开关拨至“降”的位置;
- (4) 使用丝堵堵住柱管下端, 将匀浆好的填料迅速加入柱管中, 加入异丙醇清洗烧杯中残余填料, 并将其倒入柱管中, 同时以异丙醇淋洗管壁, 直至管壁无填料残余;
- (5) 将气源开关拨动至“开”, 调节压力调节阀, 使压力逐渐上升, 柱塞杆尽快下降至柱头;
- (6) 在活塞头靠近柱上端口时放慢下降速度, 使用洗瓶向活塞头边缘滴加入许异丙醇 (起润滑作用), 可以辅助活塞头使之正对柱管口, 随后下压进入管内, 待活塞头进入上端口后调节气压调节阀, 使气压表示数保持在0.2MPa左右, 观察柱内液体沿柱头管路返流出时, 迅速关闭气源开关 (将气源开关波动至“关”), 并快速将柱管下端丝堵拆下, 重新堵住柱头管路;
- (7) 重新打开气源开关, 调节压力调节阀, 柱塞杆继续以匀速下降, 此时保证气压表压力不高于0.3MPa, 挤压匀浆液从柱下端出口流出, 待液体不再流出后, 活塞头也将停止下降, 此过程时间控制在40s至1min范围内, 随后调节气压调节阀, 将实际装柱压力调节至合适的压力范围内, 静置30min使体系稳定;
- (8) 静置30min后, 使用流动相 (如甲醇等) 冲洗体系, 流速从使用流速的1/5逐渐升至使用流速, 期间压力不超过装填的压力, 待压力稳定后连接检测器, 使用流动相测试柱效;
- (9) 控制压力调节阀, 使液压表压力保持在规定压力下, 此时液压表示数与实际柱装填压力的关系为:

$$P_{\text{液压表}} = \left( \frac{D_{\text{柱管}}}{D_{\text{液压缸}}} \right)^2 P_{\text{柱}}$$

#### ◇ 装填压力: 10um C18填料一般在6-8Mpa, 10um 硅胶柱一般在5-7Mpa。

#### ◇ 卸柱

- (1) 将压力调节阀调至最小, 液压缸升降开关拨至“升”的位置, 缓慢调节压力调节阀, 使活塞头不再紧密压在填料上端, 随后将压力调至最小;
- (2) 取一个合适大小的容器置于柱下端, 将柱底螺丝或坦克链拆下, 取下柱底, 将液压缸升降开关拨至“降”的位置, 缓慢打开压力调节阀(此时可以向上活塞头上部加入少量甲醇润滑活塞头), 使柱内填料缓慢下降至容器内, 此时若填料下降不顺畅, 则可以从上端进液口缓慢加入甲醇或其它溶液, 使之能完全进入容器中且无残留在柱内, 关闭压力调节阀。注意: 此时严禁将上活塞头打出柱体, 如打出则有可能产生不可逆损伤!
- (3) 将液压缸升降开关拨至“升”的位置, 缓慢开启压力调节阀, 使柱头匀速上升, 待柱头升至柱上端

20cm后关闭压力调节阀。卸下上活塞头进行清洗及保存。

## 2. 色谱柱性能评价

装填后, 一般使用液相系统对色谱柱装填效果进行评价, 包括理论塔板数(N)及峰形状况的确认, 如柱效评价结果未达预期, 可对装填工艺进行适当的调整, 以寻求最佳效果。

## 样品和上样

动态轴向压缩柱(DAC)的样品上样体积一般不超过装填后的柱子死体积的10%; 上样样品通常会事先溶解再进行上样, 样品溶解最好使用色谱柱平衡时所使用的流动相, 溶解性较差时可适当加入DMSO或其他易溶试剂。上样量需要根据分离效果和需求来确定, 过度上样会无法满足纯度要求或回收率下降。

对于中试及工业生产中的DAC样品, 我们通常采用手动上样或泵上样两种方式。使用手动上样时需要向定量环中打入3倍定量环体积的样品, 以保证上样量的准确性; 使用泵上样时需要将样品液通过上样泵完全进入色谱柱头后, 使用流动相清洗样品瓶及上样泵管路后再进行纯化洗脱。

## 填料清洗

色谱填料经过长时间使用后, 可能会因为样品中一些强保留物质累积吸附在填料表面难以洗脱, 这会严重影响色谱填料的性能和后续填料的使用效果。为了对填料进行清洗(可在线清洗, 也可转到容器中处理), 推荐使用极性更低的流动相进行反复洗脱, 如可选用乙腈、甲醇或25%的丙酮/水溶液。若清洗效果不佳, 可采用溶解性更强的DMSO或二甲基酰胺在低流速下洗脱, 注意在切换不同极性溶剂清洗时, 应使用与上次清洗溶剂互溶的溶剂进行替换。

- 对于多肽和一些发酵产物中蛋白造成污染的填料的清洗方法建议:

1-酸洗法: 0.5%的磷酸水溶液:异丙醇(4:1,v/v) → 水:异丙醇(1:2,v/v,内含0.1%磷酸) → 水:异丙醇(1:4,v/v), 分别冲洗10~20倍柱体积

2-碱洗法: 0.1M的NaOH水溶液:乙腈(1:1,v/v, pH约12-13), → 水: 异丙醇(1:4, v/v), 分别冲洗10~20倍柱体积。

碱洗法若使用得当, 通常可以达到8次以上清洗寿命”

## 包装及运输

天津博蕴根据大多数客户的需求, 提供1Kg和5Kg两种标准规格的包装, 如您希望获取更多规格的产品, 请联系我们的销售代表。

## 售后服务

天津博蕴配备专业的应用及纯化工艺支持部门, 为你提供专业的指导和服务, 更多问题, 请拨打我们的售后服务电话**400-800-6028**, 我们的客服代表将协同专业人员为您详细解答。