

Сорбент для гидроксиапатитовой хроматографии
Pleiad СНТ

Инструкция по применению

Оглавление

01. О продукте	01
02. Параметры хроматографического сорбента	01
03. Химическая устойчивость	01
04. Способы наполнения колонок	01
05. Способы применения	02
06. Очистка и повторная переработка	03
07. Дезинфекция	03
08. Хранение	03
09. Сжигание и утилизация	03
10. Информация для заказа	04

01. О продукте

Гидроксипатит $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ представляет собой неорганический хроматографический сорбент с чистой фазой, прокаленный при высокой температуре до состояния сферы. Его кристаллическая структура идентична биогенному гидроксипатиту, сферическая структура стабильна, а размер частиц однороден. Существует несколько способов взаимодействия между гидроксипатитом и биомолекулами, позволяющими осуществлять одновременное разделение методом катионного обмена и химического сродства кальция к металлу. Катионный обмен, как правило, зависит от отрицательно заряженных фосфатных групп гидроксипатита, в то же время карбоксильные кластерные соединения и фосфорные кластерные соединения на биомолекулах могут образовывать более прочную связь с кальцием на гидроксипатите за счет сродства к металлу. Благодаря таким уникальным механизмам разделения гидроксипатит является незаменимым хроматографическим сорбентом при использовании современных технологий переработки и сбыта с чрезвычайно высокими требованиями и играет важную роль в сфере производства биофармацевтических препаратов, например, препаратов с антителами, вакцин (бактериальные полисахариды, пневмококковые полисахариды, вирусы и т. д.), нуклеиновых кислот, ферментов и рекомбинантных белков.

02. Параметры хроматографического сорбента

Таблица 1. Таблица параметров Pleiad СНТ

Название	Описание
Тип хроматографического сорбента	Сорбент для мультимодальной хроматографии: катионный обмен, сродство кальция
Лиганд	Ca^{2+} , PO_4^{3-} , $-OH$
Средний размер частиц (D50)	40 мкм (доступны разные размеры частиц: 20, 40, 60, 80 мкм)
Динамическая нагрузка	>25–60 мг мАб/мл хроматографического сорбента (тип I) >15–25 мг мАб/мл хроматографического сорбента (тип II)
Рекомендуемая рабочая скорость потока	50–400 см/ч
Сопrotивляемость давлению	Тип I – 3 МПа, тип II – 4 МПа

03. Химическая устойчивость

Таблица 2. Химическая устойчивость Pleiad СНТ

Название	Описание
Стабильность pH*	6,5–14
Устойчивость к растворителям	Обычный водный раствор, гидроксид натрия 1М, гидрохлорид гуанидина 6М, мочевина 8М, этанол, метанол, ацетонитрил 100 % Прим.: pH водных растворов гидрохлорида гуанидина может достигать 4,6 для разных концентраций. Водный раствор мочевины также может быть кислым из-за примесей и должен использоваться при $pH \geq 6,5$

04. Способы наполнения колонок

Следующие способы наполнения подходят для лабораторных хроматографических колонок, для получения информации о способах наполнения промышленных хроматографических колонок обратитесь в местную службу технической поддержки.

4.1 Инструменты для наполнения колонок

- 1) Хроматографический сорбент: Pleiad СНТ
- 2) Пустые хроматографические колонки: пустые хроматографические колонки для использования в лабораториях и прибор для наполнения колонок
- 3) Растворы:
 - а. Раствор для наполнения колонок: 0,02М PBS, натрий хлорид 0,15М с pH 7,2–8,0, ортофосфат натрия 0,2–0,4М или ортофосфат калия с pH 6,8–10.
 - б. Раствор для выпуска воздуха: 20 %-й этанол (примечание: данный продукт может выдерживать более высокие концентрации этанола)
- 4) Инструменты для наполнения колонок: палочки для перемешивания, мензурки и др.

4.2 Подготовительные работы перед наполнением колонок

- 1) Рассчитайте объем хроматографического сорбента V_m , необходимый для заполнения колонки (объем хроматографического сорбента после полной седиментации) по следующей формуле:

$V_m =$ площадь поперечного сечения хроматографической колонки \times расчетная высота колонки

Примечание: Pleiad СНТ практически не разбухает, поэтому коэффициент сжатия можно не учитывать.

- 2) Подготовьте коллоидную суспензию хроматографического сорбента.

Хроматографический сорбент Pleiad СНТ выполнен в форме сухого порошка. При диаметре хроматографической колонки ≤ 20 см расчет выполняется в соответствии с 0,63 г/1 мл; при диаметре хроматографической колонки > 20 см расчет выполняется в соответствии с 0,60 г/1 мл. Рекомендуемая пропорция коллоидной суспензии составляет 30 % - 50 % по об/об. Типичный пример расчета выглядит следующим образом: для приготовления 1 л коллоидной суспензии 50 % об/об (объем колонки 500 мл):

Требуемая масса сухого порошка хроматографического сорбента Pleiad СНТ: 315 г (500 мл * 0,63 г/мл).

Требуемый объем загрузочного раствора: 500 мл + 450 мл (90 % от 500 мл).

- 3) Проверьте пустые хроматографические колонки и убедитесь, что они чистые и не протекают.

4.3 Наполнение колонок

- 1) Выпустите воздух из мембранного фильтра (сетки) в нижней части колонок с помощью 20 %-го этанола. Размер пор сетки должен составлять ≤ 10 мкм.
- 2) После полного выпуска завинтите заглушку или закройте клапан в нижней части колонки и продолжайте вводить небольшое количество 20 %-го этанола до тех пор, пока не будет покрыто дно колонки.
- 3) Установите хроматографическую колонку в вертикальное положение.
- 4) Подсоедините головку колонки к хроматографической системе и установите низкую скорость потока 5 мл/мин, выпустите воздух из мембранного фильтра (сетки) головки колонки с помощью 20 %-го этанола.

5) Хорошо перемешайте подготовленную коллоидную суспензию хроматографического сорбента палочкой для перемешивания, затем медленно влейте ее в приготовленную пустую хроматографическую колонку за один раз.

Прим.: если объем коллоидной суспензии превышает объем пустой колонки, колонку необходимо удлинить путем соединения с другой пустой колонкой с помощью прибора для наполнения колонок или специальным разъемом.

6) Поместите головку колонки после удаления воздуха в хроматографическую колонку, плотно прижмите к поверхности коллоидной суспензии и удалите все пузырьки воздуха, после чего затяните уплотнительное кольцо на головке колонки.

7) Откройте клапан в нижней части колонки, запустите системный насос, отрегулируйте скорость потока до 300 см/ч и сжимайте колонку с помощью потока жидкости. В течение этого времени давление не должно превышать 3 МПа. В случае превышения давления скорость потока необходимо снизить.

Таблица 3. Таблица преобразования скорости потока разных хроматографических колонок

Внутренний диаметр колонки Объемная скорость потока Линейная скорость потока	10 мм	16 мм	26 мм	50 мм
	60 см/ч мл/мин	0,8 мл/мин	2,0 мл/мин	5,3 мл/мин
100 см/ч мл/мин	1,3 мл/мин	3,3 мл/мин	8,8 мл/мин	32,7 мл/мин
150 см/ч мл/мин	2,0 мл/мин	5,0 мл/мин	13,3 мл/мин	49,1 мл/мин
200 см/ч мл/мин	2,6 мл/мин	6,7 мл/мин	17,7 мл/мин	65,4 мл/мин
300 см/ч мл/мин	3,9 мл/мин	10,0 мл/мин	26,5 мл/мин	98,1 мл/мин

8) После того, как колонка стабилизируется (поверхность раствора перестала опускаться), отметьте уровень поверхности раствора. Остановите насос и продавите головку колонки на 1-5 мм выше отмеченного уровня. Следите за тем, чтобы головка колонки не прижималась к хроматографическому сорбенту и не раздавила его.

9) Повторно настройте скорость потока как описано в пункте 7. Если поверхность раствора больше не опускается, значит наполнение колонки завершено; если поверхность раствора продолжает опускаться, повторите шаги 8-9.

Прим.: рекомендуемая рабочая скорость потока не должна превышать 75 % от скорости потока наполнения колонок.

4.4 Определение эффективности колонки

Выберите один из двух методов тестирования, показанных в таблице 4, для проверки эффективности колонки. Выравнивайте колонку с помощью подвижной фазы до устойчивой базовой линии, загрузите образец в колонку, продолжайте промывать подвижной фазой. После завершения появления хроматографических пиков и возвращения их к базовой линии операцию прекращают, хроматографические пики интегрируют для оценки эффективности наполнения колонок.

Таблица 4. Методы оценки эффективности колонок

Образец	Метод использования ацетона Водный раствор ацетона 2 % (об/об)	Метод использования натрия хлорида 0,02М PBS, натрий хлорид 1М с рН 7,2-8,0
Объем образца	1-5 % от объема колонки	
Подвижная фаза	0,02М PBS, натрий хлорид 0,15М с рН 7,2-8,0	
Скорость потока	75-150 см/ч	
Детектор	UV 280 нм	Удельная электропроводность

Основными критериями для оценки эффективности наполнения колонок принимаются N/m (число тарелок на метр) и As (коэффициент симметрии), которые рассчитываются по следующей формуле:

$$N/m = 5,54 \times (V_R/W_h)^2 \times L$$

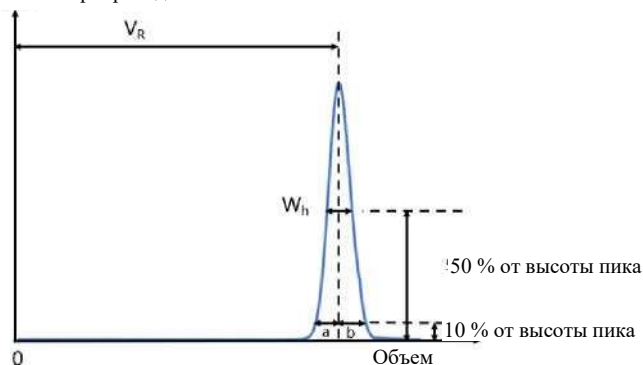
$$A_s = b/a$$

Критерий приемлемой эффективности колонок:

$$N/m > 6300$$

$$0,8 < A_s < 1,5$$

UV или величина реакции
удельной электропроводности



L = высота колонки

V_R = удерживаемый объем

W_h = ширина пика на высоте 50 %

a = ширина полуширины слева на высоте пика 10 %

b = ширина полуширины справа на высоте пика 10 %

05. Способы применения

5.1 Условия хроматографического сорбента

1) Выбор буферного раствора: следует выбирать буферные соли, которые не взаимодействуют с хроматографическим сорбентом. При использовании режима связывающего элюирования, для облегчения связывания целевых молекул предпочтительно использовать буферный раствор с низким содержанием солей и низким уровнем pH (как правило на 1 единицу pH ниже изоэлектрической точки целевой молекулы, но pH не может быть ниже 6,5), при этом важно учитывать стабильность образца в буферном растворе. Буферный раствор для элюирования как правило представляет собой уравнивающий раствор с высоким содержанием соли (например, натрий хлорид 1М).

2) Скорость потока: в зависимости от высоты колонки как правило устанавливается линейная скорость потока 50-400 см/ч.

3) Подготовка образцов: для предотвращения засорения колонки образец перед загрузкой необходимо отфильтровать с помощью микропористой мембраны 0,45 мкм. Рекомендуется отрегулировать pH и электропроводность образцов, чтобы они соответствовали уравнивающему буферному раствору (pH и электропроводность образца можно отрегулировать методом разбавления, ультрафильтрации и обессоливания).

5.2 Этапы хроматографии

1) Предварительное уравнивание: используйте буферный раствор для предварительного уравнивания (например: ортофосфат натрия 0,4М с pH 6,8), чтобы быстро и полностью уравновесить колонку до соответствующего pH. На данном этапе обычно требуется увеличение объема колонки в 3-4 раза.

2) Уравнивание: полностью уравновесьте колонку уравнивающим буферным раствором (например, ортофосфат натрия 0,005М, натрий хлорид 0,1М с pH 6,8), пока pH и электропроводность не станут стабильными и сравняются с показателями уравнивающего буферного раствора. На данном этапе обычно требуется увеличение объема колонки в 10 раз.

3) Загрузка образца*: определите объем и количество загружаемых образцов на Pleiad СНТ на основе связанной нагрузки, измеренной в ходе предварительного испытания.

4) Промывка*: с помощью уравнивающего буферного раствора или другого подходящего буфера промойте хроматографическую колонку до тех пор, пока УФ-излучение не стабилизируется и не вернется к исходному уровню.

4) Элюирование*: элюирование достигается за счет увеличения концентрации ионов соли. Молекулы с различной силой связывания можно элюировать путем постепенного увеличения концентрации ионов соли в элюенте с помощью линейного градиента или ступенчатого градиента (например, линейный градиент 0–100 %, ортофосфат натрия 0,005М, натрий хлорид 1М с pH 6,8). Сбор фракций проводится с элюированного образца.

4) Повторная переработка: промойте колонку высококонцентрированным фосфатным раствором (например, ортофосфат натрия 0,4М). На данном этапе обычно требуется увеличение объема колонки в 5 раз.

5) Очистка: промойте колонку с помощью ddH₂O. Уменьшите концентрацию фосфатов для предотвращения образования отложений.

* При использовании проточного режима этап «загрузка образца» следует настроить на сбор; на этапе «промывки» сбор можно будет остановить после завершения прохождения всех целевых молекул; на этапе «элюирования» примеси можно элюировать буферным раствором с высоким содержанием солей.

06. Очистка и повторная переработка

По мере увеличения частоты использования хроматографического сорбента загрязняющие вещества (такие как липиды, эндотоксины, белки и т. д.) накапливаются на колонке. Регулярная очистка необходима для поддержания стабильного рабочего состояния колонки. Частоту очистки можно определить в зависимости от степени загрязнения хроматографического сорбента (если загрязнения серьезные, рекомендуется проводить очистку на месте после каждого

использования для обеспечения воспроизводимости результатов и продления срока службы хроматографического сорбента).

Рекомендуемые условия очистки от разных видов примесей и загрязнений:

- Удаление белков с большой силой сцепления: очистить раствором натрия хлорида 2М в объеме в 5 раз больше объема колонки.
- Удаление белков с сильными гидрофобными свойствами, осажденных белков: сначала очистить раствором гидроксида натрия 1М в объеме в 5 раз больше объема колонки, после чего чистой водой в объеме в 5-10 раз больше объема колонки для удаления щелочи.
- Удаление липопротеинов и липидов: сначала промыть 70 %-ым этанолом или 30 %-ым изопропиловым спиртом в объеме в 5 раз больше объема колонки, затем промыть чистой водой в объеме в 5-10 раз больше объема колонки.

Прим.: перед использованием 70 %-ный этанол или 30 %-ый изопропиловый спирт следует дегазировать; при очистке на месте можно выбрать скорость потока 30-60 см/ч, при серьезном засоре можно использовать обратную очистку.

07. Дезинфекция

Для уменьшения микробной нагрузки рекомендуется использовать раствор гидроксида натрия 1М для обработки хроматографического сорбента, время обработки составляет 15-30 мин. Также можно использовать метод сухой или влажной дезинфекции для того, чтобы раствор оставался щелочным при высоких температурах.

08. Хранение

Неоткрытый хроматографический сорбент хранить в оригинальной упаковке; наполненную хроматографическую колонку следует хранить в 20 %-ном растворе этанола или растворе гидроксида натрия 1М. Температура хранения 4–30 °С.

09. Сжигание и утилизация

Хроматографический сорбент Pleiad СНТ плохо разлагается в природе, но поскольку он имеет общее происхождение с костями, то не оказывает влияния на окружающую среду. Перед уничтожением или утилизацией хроматографических сорбентов, которые контактировали с биологически активными образцами, такими как вирусы и кровь, внимательно ознакомьтесь с местными требованиями биологической безопасности.

10. Информация для заказа

Название товара	Средний размер частиц	Артикул товара	Объем	Название товара	Средний размер частиц	Артикул товара	Объем
Pleiad СНТ тип 1	20 мкм	800-00010	10 г	Pleiad СНТ тип 2	20 мкм	805-00010	10 г
		800-00025	25 г			805-00025	25 г
		800-00100	100 г			805-00100	100 г
		800-01000	1 кг			805-01000	1 кг
		800-05000	5 кг			805-05000	5 кг
	40 мкм	802-00010	10 г		40 мкм	806-00010	10 г
		802-00025	25 г			806-00025	25 г
		802-00100	100 г			806-00100	100 г
		802-01000	1 кг			806-01000	1 кг
		802-05000	5 кг			806-05000	5 кг
	60 мкм	803-00010	10 г		60 мкм	807-00010	10 г
		803-00025	25 г			807-00025	25 г
		803-00100	100 г			807-00100	100 г
		803-01000	1 кг			807-01000	1 кг
		803-05000	5 кг			807-05000	5 кг
	80 мкм	804-00010	10 г		80 мкм	808-00010	10 г
		804-00025	25 г			808-00025	25 г
		804-00100	100 г			808-00100	100 г
		804-01000	1 кг			808-01000	1 кг
		804-05000	5 кг			808-05000	5 кг