

Сорбент для мультимодальной хроматографии

Lepta MMA HR

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	03

01. О продукте

Lepta MMA HR – это сорбент для мультимодальной хроматографии с улучшенной основой из агарозы. В отличие от традиционных сорбентов для ионообменной хроматографии, данный сорбент состоит из нескольких функциональных групп с разными свойствами: аминогрупп, водородных связей и гидрофобных групп. С помощью данного хроматографического сорбента можно удалять основные примеси, такие как нуклеиновые кислоты, белки организма носителя, агрегаты, вирусы и т. д. Широко используется в сфере полисахаридов, антител, вирусных векторов или вакцин.

Lepta MMA HR демонстрирует превосходные характеристики по сравнению с традиционными одинарными хроматографическими сорбентами:

- 1) Высокая динамическая производительность, объединение большого количества примесей за один шаг, экономия времени и издержек.
- 2) Усовершенствованная основа Lepta обладает повышенной жесткостью, что обеспечивает более высокую скорость потока при низком обратном давлении и повышает эффективность процесса.
- 2) Небольшой коэффициент частиц, высокий коэффициент разрешения.
- 3) Широкий диапазон pH и электропроводности, что позволяет подбирать наиболее оптимальные технологические условия.

02. Параметры хроматографического сорбента

Таблица 1. Таблица параметров Lepta MMA HR

Название	Описание
Тип хроматографического сорбента	Мультимодальный
Лиганд	Аминогруппы, водородная связь и гидрофобные группы
Основа	Агароза с сильными межмолекулярными связями
Средний размер частиц	40 мкм
Ионная нагрузка	0,08-0,11 ммоль Cl-/мл хроматографического наполнителя
Рекомендуемая рабочая скорость потока	90-500 см/ч
Максимальная скорость потока	600 см/ч
Сопrotивляемость давлению	0,3 МПа
Рабочая температура	4-30 °C

03. Химическая устойчивость

Таблица 2. Химическая устойчивость Lepta MMA HR

Название	Описание
Стабильность pH*	2-14
Устойчивость к растворителям	Простой водный раствор, изопропиловый спирт 30 %**, этанол 75 %**, пропанол-1 5 %**, гидроксид натрия 1М, уксусная кислота 1М, гуанидин гидрохлорид 6М, мочевины 8М, натрия хлорид 2М
Не устойчив	Окислители, анионные детергенты

* Физико-химические свойства и функции хроматографического сорбента существенно не изменились после выдержки при температуре 40 °C и pH 2-14 в течение 7 дней.

** об/об, объемное соотношение

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: Lepta MMA HR
- 2) Пустые хроматографические колонки: пустые хроматографические колонки для использования в лабораториях и прибор для наполнения колонок
- 3) Растворы:
 - а. Раствор для наполнения колонок: раствор натрия хлорида 10 мМ
 - б. Раствор для выпуска воздуха: раствор натрия хлорида 10 мМ
- 4) Инструменты для наполнения колонок: фильтрующая воронка, 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:

$V_m = \text{площадь поперечного сечения хроматографической колонки} \times \text{расчетная высота колонки} \times \text{коэффициент сжатия хроматографического сорбента}$

Примечание: коэффициент сжатия Lepta MMA HR равен 1,12.

- 2) Поместите хроматографический сорбент в фильтрующую воронку, промойте и отфильтруйте загрузочным раствором, объем которого примерно в 3 раза превышает объем хроматографического сорбента, и замените хроматографический сорбент для загрузки колонок на загрузочный раствор.

- 3) Подготовьте коллоидную суспензию хроматографического сорбента для загрузки колонок, подходящее соотношение суспензии хроматографического сорбента Lepta MMA HR составляет 50 %-60 %. Для получения точного объема хроматографического сорбента можно поместить сорбент в мензурку для отстаивания в течение ночи или использовать метод низкоскоростного центрифугирования (3000 об/мин в течение 5 мин) для имитации естественного эффекта седиментации хроматографического сорбента, после чего отмерить необходимое количество.

- 4) 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 раствора для выпуска воздуха.
- 2) После полного выпуска завинтите заглушку или закройте клапан в нижней части колонки и продолжайте вводить небольшое количество раствора для выпуска воздуха 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 раствора для выпуска воздуха.
- 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) Запустите системный насос, отрегулируйте скорость потока до 600 см/ч и сжимайте колонку с помощью потока жидкости. В течение этого времени давление не должно превышать 0,3 МПа. В случае превышения давления скорость потока необходимо снизить.

Таблица 3. Таблица преобразования скорости потока разных хроматографических колонок

Внутренний диаметр колонки	10 мм	16 мм	26 мм	50 мм
Объемная скорость потока				
60 см/ч	0,8 мл/мин	2,0 мл/мин	5,3 мл/мин	19,6 мл/мин
100 см/ч	1,3 мл/мин	3,3 мл/мин	8,8 мл/мин	32,7 мл/мин
150 см/ч	2,0 мл/мин	5,0 мл/мин	13,3 мл/мин	49,1 мл/мин
200 см/ч	2,6 мл/мин	6,7 мл/мин	17,7 мл/мин	65,4 мл/мин
300 см/ч	3,9 мл/мин	10,0 мл/мин	26,5 мл/мин	98,1 мл/мин
600 см/ч	7,9 мл/мин	20,1 мл/мин	53,1 мл/мин	196,3 мл/мин
Линейная скорость потока				

8) После того, как колонка стабилизируется (поверхность раствора перестала опускаться), отметьте уровень поверхности раствора. Остановите насос и продавите головку колонки на 2-3 мм ниже отмеченного уровня.

9) Повторно настройте скорость потока 600 см/ч. 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	Метод использования натрия хлорида
	Водный раствор ацетона 1 % (об/об)	Водный раствор натрия хлорида 2М
Объем образца	1 % от объема колонки	
Подвижная фаза	Вода	Водный раствор натрия хлорида 0,2М
Скорость потока	30 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:

$$N/m = 5,54 \times (V_R/W_b)^2 \times 1/L$$

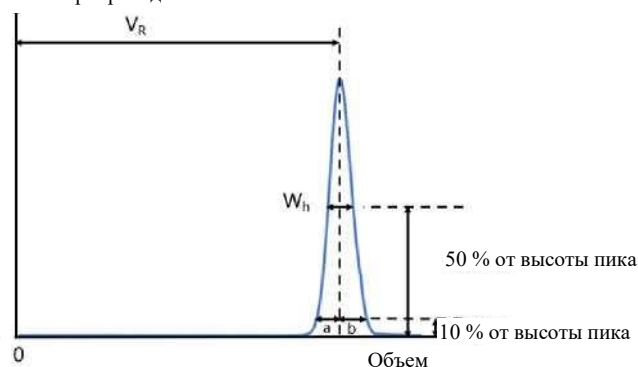
$$A_s = b/a$$

Критерий приемлемой эффективности колонок:

N/m > 5000

$$0.8 < A_s < 1.5$$

UV или величина реакции удельной электропроводности



L = высота колонки

V_R = удерживаемый объем

W_b = 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 высоким уровнем pH (как правило на 1 единицу pH выше изоэлектрической точки целевой молекулы), 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).

При использовании проточного режима для уравнивающего буферного раствора должны быть созданы условия, благоприятные для связывания примесей. После полного протекания целевые молекулы сразу же промываются высококонцентрированным соевым раствором.

2) Скорость потока: в зависимости от высоты колонки как правило устанавливается линейная скорость потока 90-500 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) Уравнивание: полностью уравниваете колонку уравнивающим буферным раствором, пока pH и электропроводность не станут стабильными и сравнятся с показателями уравнивающего буферного раствора. На данном этапе обычно требуется увеличение объема колонки в 3-5 раз.

Инструкция по применению

2) Загрузка образца*: определите объем и количество загружаемых образцов на Lepta MMA HR на основе связанной нагрузки, измеренной в ходе предварительного испытания.

3) Промывка*: с помощью уравнивающего буферного раствора или другого подходящего буфера промывайте 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. Сбор фракций проводится с элюированного образца. Можно также проводить градиентное элюирование pH или смешанное элюирование.

5) Повторная переработка: промойте колонку буферным раствором с высоким содержанием солей (например, натрий хлорид 2M).

6) Повторное уравнивание: используйте уравнивающий буферный раствор для повторного уравнивания хроматографической колонки.

* Прим.: 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 2M в объеме в 5 раз больше

объема колонки, также можно использовать буферный раствор с pH не ниже 2, например, натрий ацетат 1M.

- Удаление белков с сильными гидрофобными свойствами, осажденных белков: сначала очистить раствором гидроксида натрия 1M 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 0,5-1M для обработки хроматографического сорбента, время обработки составляет 15-30 мин.

08. Хранение

Неоткрытый хроматографический сорбент хранить в оригинальной упаковке; наполненную хроматографическую колонку следует сначала замочить в 20 %-ном растворе этанола, после чего закрыть верхнюю и нижнюю головки колонки. Температура хранения 4-30 °C.

09. Сжигание и утилизация

Поскольку хроматографический сорбент Lepta MMA HR плохо разлагается в природе, рекомендуется использовать метод сжигания для защиты окружающей среды.

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 о заказе

Название товара	Артикул товара	Объем
	613-00025	25 мл
	613-00100	100 мл
	613-00500	500 мл
Lepta MMA HR	613-01000	1 л
	613-05000	5 л
	613-10000	10 л
	613-20000	20 л

Все хроматографические сорбенты в бутылках или баках следует хранить в 20 %-ом растворе этанола с соотношением коллоидной суспензии примерно 75 %.