

## 在 DAC ( 动态轴向压缩柱 ) 内装填 Kromasil 填料的指导说明

### 目的:

所有工艺开发通常都在内径为 4.6mm 的预装分析柱或内径为 10 毫米的预装半制备柱上进行, 因为这样做除去节约溶剂和宝贵的样品外, 还相对省时省力。Kromasil 的填料及预装柱产品由于批次生产的大规模性以及批次之间极好的稳定性, 在小口径预装柱上优化的条件完全可以在大口径柱或 DAC 柱上重现, 所以完全不需要在大的预装柱上进行工艺开发。然而, 如果需要将色谱规模放大到非常可观的纯化制备上, 则建议在中等大小的色谱柱或 DAC 柱上进行条件验证, 以确保在大规格设备上能复制整个纯化过程。当规模放大到内径为80-100 厘米的色谱柱级别, 相信没有人想要有意外发生!

### 关键点:

- 1. 装柱速度:** 在一定的柱压下进行装柱, 迅速的装柱速度是确保获得高柱效的一个重要因素。经过观察和实践, 控制整个柱床在 30 秒到 1 分钟之内完成压缩, 通常能获得最高的柱效。装柱的速度通常和溶剂的粘度相关, 因此, 我们不建议使用高粘度的溶剂 ( 纯的 IPA ) 等来装柱, 而一般会使用乙醇或者乙醇/异丙醇的混合溶剂, 这样能达到较好的效果。
- 2. 筛板:** 另外一个非常重要的方面是筛板。最理想的筛板是编织的, 它非常容易清洗, 并且能够提供理想的流体分布。烧结的筛板容易堵, 流体分布不均匀, 不易清洗。如果使用的不是新的筛板, 请务必确认是否清洗干净。

## 推荐用于填料匀浆的溶剂

下表是装填 DAC 柱子时候推荐使用的溶剂

Packing solvent → Packing material	EtOH, anhydrous	IPA, anhydrous	Acetone/IPA (1:1)	Tol/IPA (1:1); →(9:1)*	THF/IPA (1:1); →(9:1)	Hep/IPA (1:1)
Silica (60 Å, 100 Å)			X	X		X
Diol				X		X
NH <sub>2</sub>				X		
C4/C8 (100 Å, 300 Å)	X	X	X		X	
C18 (100 Å, 300 Å)		X		X	X	
Phenyl					X	
CN	X			X*		
CelluCoat/AmyCoat						X

### 填料匀浆:

对于给定的柱长，我们可以通过装填密度计算出所需要的填料量，然后根据填料量计算出所需的溶剂，匀浆时，一般每 Kg 填料至少需要 2L 溶剂，实际计算时候需要考虑填料的总孔隙率和余量。

匀浆时最好使用 DAC 厂家配备的专用设备来进行，当然也可以使用烧杯、搅拌器等来进行。请务必必要缓缓地向溶剂中添加填料，以使得硅胶填料在溶剂中分散，搅拌 5-10 分钟后，填料分散均匀即可装柱。

### 色谱柱装填:

在装填开始前，需确保传输管的直径足够大。以内径为 5cm 的色谱柱为例，至少使用 2mm 内径（1/8 外径）的出口管，而实际运行时则选用小号的溶剂传输管（1mm 内径）。如果使用更大规格的色谱柱，则需按比例放大。

充分均匀后的填料匀浆倒入或泵入色谱柱腔，快速拧紧柱盖（不让硅胶层静置太久。硅

胶填料沉降引发的问题在大尺寸微球上表现得更为突出)。一旦柱盖就位，柱床开始加压，通常在 70–100 巴之间进行柱床的压缩，整个柱床的压缩过程应控制在 30 秒至 1 分钟内完成（匀浆粘度在 1cP 时候）。

#### **色谱柱柱效测试：**

柱子在使用前务必进行柱效测试，测试时，请确保色谱系统已经得到很好的优化（非常小的死体积），推荐使用定量环进样，对于 10 微米填料的 DAC 柱子，其柱效至少应该达到 40000 理论塔板数/米。

测试的标准样品，推荐用苯乙酮，甲苯（反相柱）。

## Kromasil 填料的拆装

### 旧填料的储存和保养:

Kromasil 硅胶基质填料的机械强度和化学稳定性在同类产品中独占鳌头，大多数情况下填料可以多次重复使用。拆装下的填料可以保存在溶剂中，也可以以干粉形式保存。保存在溶剂中时候，建议使用日后的装填溶剂卸柱和保存。如需干法保存填料，在以上基础上，再将柱内的溶剂换成丙酮或者四氢呋喃，并用烘箱在 90°C 的条件下将填料烤干。

### Kromasil 反相填料的拆装:

在拆装反相硅胶基质填料时，首先将色谱柱上原先遗留的所有缓冲溶液成分淋洗干净（推荐使用异丙醇/水、乙醇/水，或甲醇/水），然后使用 100%与水互溶的溶剂去除柱内的水（推荐使用异丙醇、乙醇、甲醇），当然在拆装柱子前还需要将溶剂切换到日后装柱用的溶剂。举个例子，如使用甲苯/异丙醇时做装柱溶剂时候，需要先用纯的异丙醇冲洗（至少 3 个柱体积），然后再使用甲苯/异丙醇替换后拆装柱子。

## Kromasil 色谱填料使用的注意事项

### 色谱溶剂:

采用色谱级溶剂和新鲜配制的缓冲水溶液以避免细菌的滋生，并在进柱前使用过滤装置用以去除外来颗粒。

### 流动相 pH:

预装 Kromasil C8 填料的色谱柱的工作时，建议将移动相的 pH 值控制在 2-9.5 之间。这样可以最大限度地延长色谱柱使用寿命。

### 工作压力:

色谱柱经受反压的快速波动，或者承受超过 400 巴/6000psi 的压力可能会缩短色谱柱的使用寿命。

### 机械损伤:

保护色谱柱免受机械力冲击，跌落或敲击会对损失色谱性能。

## 色谱柱的清洗和再生

反压升高、保留时间改变、柱效下降，这些现象可能是表明柱子内部的死吸附在增多或者有沉淀生成，大多数时候，可以按照正确的清洗步骤来解决以上问题，越早动手清洗（再生）效果越好。

强吸附性物质总是会停留在色谱柱的溶剂导入端，许多情况下反向冲洗会有助于色谱柱的清洗。

在反相色谱中，对于不同类型的杂质可采用的冲洗溶剂详见下表：

潜在可能的杂质	推荐溶剂类型	推荐溶剂举例
亲油性分子	强亲油性溶剂	烷烃，甲苯
极性（小肽）	多种溶剂	二氯甲烷，四氢呋喃，二甲基甲酰胺
强极性/离子水溶液	水性溶剂	50: 50 二甲基甲酰胺/水，四氢呋喃/水
带正电荷的极性（胺类）	离子交换抑制溶剂	二甲基甲酰胺/乙酸或三氯乙酸（1%）
大分子沉积（蛋白多肽沉淀）	强去结合剂	二甲基甲酰胺或乙腈/1%十二烷基磺酸钠，乙醇/乙酸，乙醇/0.1%三乙胺，乙醇/10-100mM 氢氧化钠水溶液*
盐/缓冲物沉淀	高含水性混合溶液	10%乙醇/水

### 再生操作步骤：

1. 针对杂质选择合适的混合比，在杂质成分未知时，权当强极性/离子物质情况处理以防止沉淀的进一步产生。
2. 降低移动相流速（正常流速的 10%），尽可能用反相工作模式并略微提高一点工作温度（<40℃），冲洗量上限为 10 倍柱体积。
3. 反压出现异常时，选择在常用流速下查看反压的变化情况。
4. 如果问题没有好转，使用针对带正电荷极性和/或大分子沉积物的冲洗条件。如果使用十二烷基磺酸钠作为冲洗液，事后需用纯四氢呋喃，二甲基甲酰胺或者乙腈对色谱柱做彻底冲洗。
5. 如果问题仍然存在，请联系我方技术支持寻求进一步帮助。