

## Generik MC-HIC Butyl 填料产品说明书

### 一、产品简介

赛分科技疏水层析产品 Generik MC-HIC Butyl，是以聚甲基丙烯酸酯微球为基质，通过专有的化学修饰键合上丁基（Butyl）为其活性官能团，具有良好的物理、化学稳定性。填料的平均粒径有 30  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$  和 80  $\mu\text{m}$  三种规格。

#### 层析介质特点

- 📖 刚性基质可耐受高压和高流速
- 📖 高分辨率、高柱效和高回收率
- 📖 宽 pH 耐受范围
- 📖 高批间重现性、易于放大
- 📖 常规装柱条件下，体积变化小
- 📖 产品供应能力：> 100 L

### 二、安全

有关本产品安全使用的信息，请参阅安全数据书(SDS)。

### 三、产品性质及特征参数

#### 3.1 层析介质化学结构与技术参数

Generik MC-HIC Butyl 疏水填料以丁基（Butyl）为官能团。结构示意图如图 1 所示，具体产品技术参数见表 1。

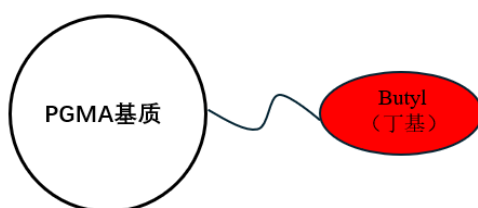


图 1. Generik MC-HIC Butyl 层析介质配基结构示意图

表 1. Generik MC-HIC Butyl 层析介质技术参数

产品名称	Generik MC-HIC Butyl		
官能团	Butyl (丁基)		
平均粒径 ( $\mu\text{m}$ )	~30	~60	~80
动态载量* (/mL 填料)	$\geq 50$ mg Lysozyme	$\geq 40$ mg Lysozyme	$\geq 30$ mg Lysozyme
pH 稳定性 (操作)	2-13		
pH 稳定性 (CIP)	1-14		

流速/压力关系*	—	600 cm/hr (运行压力 2 bar)	—
工作温度	4-35°C		
耐受压力	≤ 3.0 MPa (30 bar)		
化学稳定性*	兼容于水与乙醇、乙腈、丙酮等的混合液。常用缓冲液体系：Tris、磷酸盐、醋酸盐缓冲液等。其它试剂：2% SDS、1% tween 20、H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2)		
保存条件	具体见“八、产品储存”内容		
运输条件	4-35°C，保存于 20% 乙醇		
典型应用方向	发酵 GLP-1、胰岛素类、重组蛋白		

\*注：1. DBC 测试方法：溶菌酶(Lysozyme, 1 mg/mL)溶于 25 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7) + 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 线性流速 360 cm/h, 检测波长 280 nm, 监测 10%流穿的值;

2. 流速测试方法：柱高为 200 mm, 柱压为 2 bar 条件下;

3. 化学稳定性测试条件：填料分别在表中其它试剂中 40°C 浸泡一周后测试, 结果：载量是原载量的 90% 以上。

### 3.2 纯化应用

#### 3.2.1 Generik MC60-HIC Butyl 纯化应用方案

层析柱柱信息：Generik MC60-HIC Butyl (10 × 200 mm, 15.7 mL)

检测器：UV 280 nm

样品：大肠杆菌破菌上清 GLP-1 前体

上样量：30 mg/mL 填料

纯化步骤	流动相	驻留时间	冲洗体积
		min	CV
平衡	弱碱性体系, 0.5 M NaCl	5	3
上样	上样液	5	—
后平衡	弱碱性体系, 0.5 M NaCl	5	3
洗脱	纯水	5	3
CIP1	1 M NaOH	5	3
CIP2	纯水	5	3

#### 3.2.2 Generik MC60-HIC Butyl 纯化图谱及实验结果

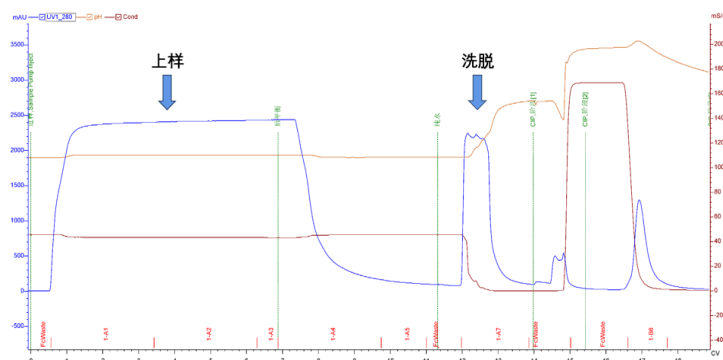


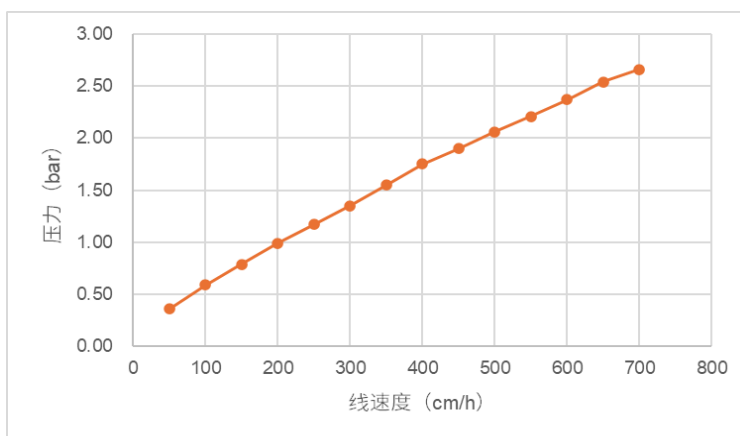
图 2. Generik MC60-HIC Butyl 纯化 GLP-1 前体图谱

采用 Generik MC60-HIC Butyl 捕获破菌上清液纯化图谱见图 2, 疏水层析工艺开发简单, 高盐

上样一步纯水洗脱，洗脱体积仅有 1.8 CV，便于后续操作。在高载量上样的前提下，原样纯度 70%左右，经过一步纯化后纯度可达 92.6%，收率可达 91.8%。

#### 四、层析柱装柱

层析介质在不同场景下适用不同装柱方法，实验室装柱方法与规模化生产用装柱有较大差异，不同规格层析柱装柱方法有较大差异，下文介绍不同情况下的装柱方法，同时装柱时也需注意压力变化，图 3 为 Generik MC60-HIC Butyl 压力流速曲线图。



(Column: 100 × 240 mm; Mobile phase: water)

图 3. Generik MC60-HIC Butyl 填料压力流速曲线

#### 4.1 实验室用装柱方法（内径 ID 6.6 mm -25 mm 实验室用层析柱）

##### 4.1.1 准备工作

装柱设备及层析柱：检查蛋白纯化仪是否正常，特别是压力检测模块和电导检测模块；  
配制足量装柱用缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液；1.0 M NaCl 水溶液。

##### 4.1.2 置换保存溶剂

Generik MC-HIC Butyl 填料出厂时保存在 20%乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20%乙醇置换为 0.1 M NaCl。快速置换方法：将填料混合后取所需匀浆液倒入柱管中，安装好柱头并用纯水冲 1-2 CV，将填料打出至广口瓶中，添加纯水至填料体积比为 50-70%之间，也可采用沉降的方法置换保存溶剂。

##### 4.1.3 填料匀浆比测算

将置换好的填料混匀，取 20 mL 加入到玻璃柱管中，如 Generik FPLC 10 × 400 mm 玻璃柱管，打开下堵头，让水漏出，直至填料沉降高度不再变化，用直尺测量柱床高度，计算填料体积，例如柱床高度为 14 cm，填料体积则为 14 × 0.7854=10.9956 mL，匀浆比则为 54.98%。也可用在量筒中沉降过夜的方式测算匀浆比，沉降时间要保持在 14-16 h。

##### 4.1.4 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / P = S \times H \times F / P$$

V: 目标柱体积

P: 匀浆比

H: 目标装柱高度

S: 柱管横截面积

F: 压缩系数

H: 装柱高度

例如：内径为 10 mm 的手动柱横截面积为  $0.7854 \text{ cm}^2$ ，装柱目标高度为 20 cm，则填料的需求量为  $V_{\text{slurry}} = 0.7854 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm} \times 1.15/54.98\% = 32.9 \text{ mL}$

\*注：实验室规模、用盐水装柱条件下，填料的用量按照 1.15 压缩系数计算。

#### 4.1.5 具体操作步骤

4.1.5.1 用移液器吸取 32.9 mL 匀浆液，加入到 Generik FPLC 10 × 250 mm-AF 层析柱管中（使用装柱连接环）；

4.1.5.2 开启 100 cm/h 流速，将上柱头拧紧至柱管上，以 100 cm/h、200 cm/h、300 cm/h...线流速压缩填料，每级流速保持 3.0 min，直到柱压达到 3.0 bar 后保持 15 min，关闭层析系统，然后以 1: 1.04 的压缩系数（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成。

## 4.2 中试装柱方法（内径 ID 100 mm -300 mm 手动柱填装）

### 4.2.1 准备工作

4.2.1.1 场所：装柱场所应清洁、无尘，室温 18°C-35°C，湿度 45%-65%；

4.2.1.2 装柱设备及管道：蛋白纯化设备及层析柱管路冲洗干净，管道连接完毕，检查设备管路是否漏液，必要时试漏，压力等各参数显示正常；

4.2.1.3 层析柱排气泡：层析柱清洗干净，排除上下筛板处气泡待用；

4.2.1.4 QC 检测设备：低压层析系统；

4.2.1.5 配制足量装柱用缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液；1.0 M NaCl 水溶液。

### 4.2.2 置换保存溶剂

Generik MC-HIC Butyl 填料出厂时保存在 20% 乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20% 乙醇置换为纯水。对于直径为 100 mm-300 mm 内径手动柱置换方式可以为：将填料混合后取所需匀浆液倒入柱管中，打开出口阀，使液体漏出，用纯水置换三次。

### 4.2.3 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / 50\% = S \times H \times F / 50\%$$

V: 目标柱体积

H: 目标装柱高度

S: 柱管横截面积

F: 压缩系数

H: 装柱高度

例如：内径为 200 mm 的手动柱横截面积为  $314 \text{ cm}^2$ ，装柱目标高度为 18 cm，则填料的需求量为  $V_{\text{slurry}} = 314 \text{ cm}^2 \times 18 \text{ cm} \times 1.20/50\% = 13.6 \text{ L}$

\*注：填料保存在 20% 乙醇水中，填料的用量按照 1.20 压缩系数计算。

### 4.2.4 具体操作步骤

4.2.4.1 匀浆：用纯水重新匀浆后关好底阀使填料自然沉降。

4.2.4.2 预压：待液面下降距离大于 5.0 cm 后安装排好气泡的柱头，拧紧密封圈，打开底阀，开启低压层析系统，以纯水为流动相、100 cm/h 线速度加速填料沉降，柱床沉降稳定后标

记柱床高度：

4.2.4.3 关闭层析系统，等柱压降为零后关闭底阀，旋转柱头上的四通阀至排液管，然后以 1:1.13 的压缩系数（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成。

### 4.3 生产层析柱装柱（内径 ID 300 mm – 1200 mm 生产装柱）

#### 4.3.1 准备工作

4.3.1.1 场所：装柱场所应清洁、无尘，室温 18°C-35°C，湿度 45%-65%；

4.3.1.2 装柱设备及管道：蛋白纯化设备及层析柱管路冲洗干净，管道连接完毕，检查设备管路是否漏液，必要时试漏，压力等各参数显示正常；

4.3.1.3 层析柱排气泡：层析柱清洗干净，排除上下筛板处气泡待用；

4.3.1.4 QC 检测设备：低压层析系统；

4.3.1.5 配制足量装柱用缓冲液 0.1 M NaCl 水溶液；1.0 M NaCl 水溶液。

#### 4.3.2 置换保存溶剂

Generik MC-HIC Butyl 填料出厂时保存在 20% 乙醇中，体积比为 50%，装柱前需将 20% 乙醇置换为纯水。在匀浆罐中置换，如果没有就需要沉降一夜，去掉上清液，加等体积的纯水置换，重复 3 次。

#### 4.3.3 填料需求量计算

$$V_{\text{slurry}} = V / 50\% = S \times H \times F / 50\%$$

V：目标柱体积

H：目标装柱高度

S：柱管横截面积

F：压缩系数

H：装柱高度

例如：内径为 600 mm 的自动柱横截面积为 2827 cm<sup>2</sup>，装柱目标高度为 18 cm，则填料的需求量为  $V_{\text{slurry}} = 2827 \text{ cm}^2 \times 18 \text{ cm} \times 1.20 / 50\% = 122.145 \text{ L}$

\*注：填料保存在 20% 乙醇水中，填料的用量按照 1.20 压缩系数计算。

#### 4.3.4 具体操作步骤

4.3.4.1 匀浆：纯水匀浆，先将如置换保存溶剂过程中所述，用匀浆罐重新匀浆 1-2 小时

4.3.4.2 吸胶：以 200-300 cm/h 的线速度吸入柱桶内。

4.3.4.3 压胶：吸胶完成后，以 60 cm/h 的线速度压胶，观察实胶面和虚胶面，当两个胶面重合时，记下柱床高度，然后以 1:1.13 的压缩系数（标记的柱床高度为基准）下降柱头至目标高度，装柱完成。

### 4.4 柱效测试及评价参考标准

Generik MC-HIC Butyl 填料装柱后，层析柱柱效测试方法及评价标准可参考表 2 操作。不同粒径填料柱效合格标准不同，表格中为参考合格标准。

表 2.柱效测试方法及评价参考标准

样品	1.0 M NaCl		
样品体积	1.0-2.0% CV		
流动相	0.1-0.5 M NaCl		
流速	60-180 cm/h		
检测	Cond.		
合格标准	30 μm	60 μm	80 μm
	拖尾因子: 0.8-1.8 柱效: ≥ 5000 /m	拖尾因子: 0.8-1.8 柱效: ≥ 2000 /m	拖尾因子: 0.8-1.8 柱效: ≥1500 /m

#### 4.5 非理想柱效的解决办法

4.5.1 出现拖尾峰时，解决方法包括：

降低浆液浓度：降低填料占匀浆液的总体积比

提高装填流速：增加装柱最高压力

4.5.2 出现前沿峰时，解决方法与拖尾峰相反。

4.5.3 柱效低：重装层析柱，降低测试流速。

4.5.4 峰分裂：清洗更换滤片，检查测试样品。

4.5.5 层析柱裂开：装柱时提高装柱压力，检查流动相是否脱气，连接柱头时充分排除气泡。

## 五、纯化方法优化简介

以发酵多肽为例介绍纯化方案的优化思路：

### 5.1 样品稳定性评估

1) 选择 buffer 缓冲液体系：尽可能选择中性或弱碱性的 buffer 缓冲液体系，需注意尽可能避免样品 PI 的 pH 值。

2) 样品稳定性评估：在确定 buffer 缓冲液体系后，需要对样品进行盐浓度稳定性评估。取少量样品分成多份，分别在该缓冲 buffer 体系里补加 NaCl，使样品最终 NaCl 浓度为 0.2 M, 0.3 M...1.0 M 九个样品（需要保证九个样品补盐后样品浓度保持一致）室温放置 3 h，观察样品，选择稳定性好且盐浓度最高的体系作为纯化体系。

### 5.2 载量测试

确定好 pH 及盐浓度体系后，可按照该条件过载上样，同时测定 DBC。

### 5.3 洗脱条件探索

1) DBC 测试上样结束后，可使用线性洗脱方式进行洗脱，B 相可直接使用纯水（比例可从 0-100% 洗脱 20 CV），期间切峰收集，按照每 1/3 柱体积收集一管进行检测分析，确定每个杂质出峰位置所对应的盐浓度。

2) 根据测定的 DBC 上样及线性洗脱结果，得到洗杂所需要的盐浓度条件。根据后杂出峰盐浓度得到洗脱对应的盐浓度。

3) 若纯度达到要求，但收率偏低，可观察是在洗杂还是再生阶段损失样品，若洗杂损失较多可降低洗

杂比例，若再生损失较多，可提高洗脱比例。

4) 若收率很高，但纯度不达标，需要分析对于纯化来说是前杂还是后杂偏大，前杂偏大可适当增加洗杂比例，后杂偏大可适当降低洗脱力度。

## 六、在位清洗 (CIP)

CIP 的目的是去除柱子上和系统中的顽固结合的杂质、沉淀物或者变性蛋白。这些杂质的累积会影响层析柱的性能，污染填料。严重的话，会导致柱子堵塞，增加背压。常规 CIP 程序可以防止这些杂质在柱子上残留，从而保持色谱柱的载量和分离性能。具体在线清洗方法应视杂质的特性而定：

### 常规 CIP 流程：

- 1) 1.0 M NaOH 溶液冲洗 2 CV；
- 2) 去离子水冲洗 2 CV；
- 3) 1.0 M NaOH 溶液冲洗 2 CV；
- 4) 去离子水冲洗 2 CV；
- 5) 最后保存在 20% 乙醇或 10 mM NaOH 溶液中。

\*注：以上 CIP 流程仅作为参考，需结合样品性质和工艺进行适当优化。

### 难清洗的杂质残留清洗：

建议 7-10 cycle 后用 1.0 M NaOH+30% 异丙醇清洗 3 CV。

## 七、灭菌

由于 20% 乙醇或 10 mM NaOH 保存液不具有杀菌、除热原作用，建议 Generik MC-HIC Butyl 在使用前及使用过程中，可以采用 0.5-1.0 M NaOH 处理 0.5~1.0 h 以减少微生物污染风险。

## 八、产品储存

Generik MC-HIC Butyl 产品用 20% 乙醇为保存液进行销售。收到填料后请按以下条件进行保存：

未拆封填料：4-35°C，整个包装桶密闭保存，有效期 60 个月；

使用后填料：

1) 层析柱保存：4-35°C，20% 乙醇或 10 mM NaOH 冲洗 3-5 CV 后密闭保存，为了防止乙醇挥发以及微生物滋生，建议每二个月更换一次新鲜的保存液。因有机溶剂、碱、纯化水等对层析柱管材质可能存在影响且层析柱长期保存柱床容易干裂，不建议长期将填料放在层析柱中保存；

2) 层析柱拆卸后填料：拆卸前层析柱需经过常规的再生及灭菌处理步骤，无菌注射用水冲洗 3-5 CV，用保存溶液 20% 乙醇冲洗 3-5 CV，取出层析填料置于已经清洗干净并消毒后的包装容器中，加入保存液 20% 乙醇使保存液体积与填料体积接近，4-35°C 密闭保存。

## 九、销毁及回收

由于 Generik MC-HIC Butyl 在自然界很难降解，为了保护环境建议采用焚烧处理或者第三方委外处理。



## 十、产品订购信息

产品名称	类型	粒径	订货号
Generik MC30-HIC Butyl	疏水	30 $\mu\text{m}$	181430800
Generik MC60-HIC Butyl	疏水	60 $\mu\text{m}$	181460800
Generik MC80-HIC Butyl	疏水	80 $\mu\text{m}$	181480800

预装柱规格：4.2 mL、5.0 mL；层析介质包装规格：1 L、5 L、10 L、50 L。



扫码关注公众号

### 公司信息：

苏州赛分科技股份有限公司

联系电话：400-636-8880

官网网站：<http://www.sepax-tech.com.cn/>