

Schritt-für-Schritt zur gepackten Laborglassäule

Packen von ECO und ECO^{PLUS}
Säulen mit Softgelen



Einleitung

In dieser Anleitung werden alle Schritte und Parameter zum erfolgreichen Säulenpacken der Laborglassäulen ECO und ECO^{PLUS} vorgestellt.

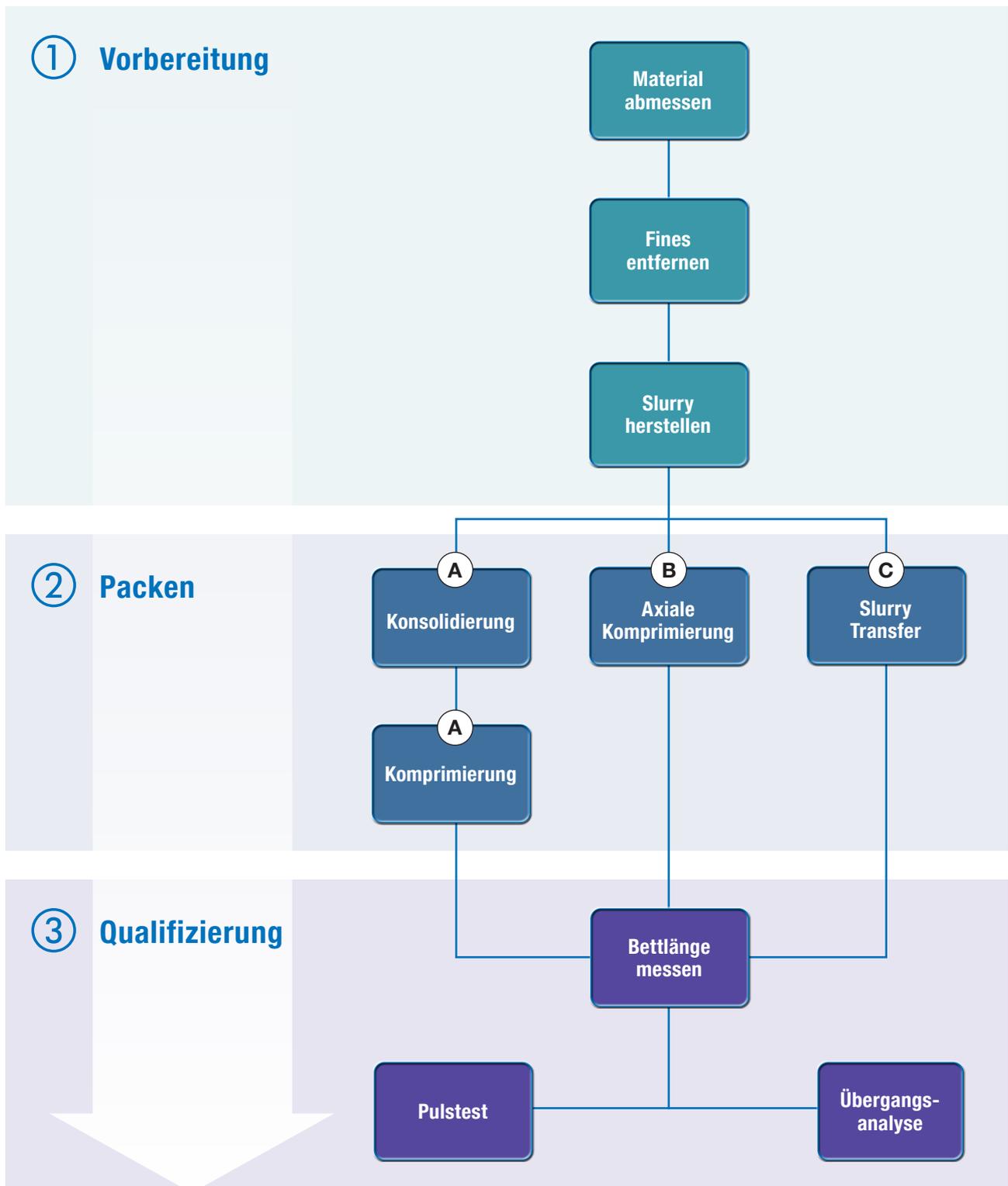
Zum Packen von Glassäulen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Auswahl der richtigen Packmethode ist dabei abhängig von der Säulenhardware, dem Packungsmaterial und dem zur Verfügung stehenden Packsystem.

Unabhängig von den ausgewählten Materialien sind es drei aufeinander aufbauende Prozesse, die zum Packen einer Glassäule notwendig sind:

- ① **Im ersten Schritt werden Säule, System und Gel vorbereitet.**
- ② **Der zweite Schritt ist das Packen.**
- ③ **Der Abschluss ist die Säulenqualifizierung.**

In dieser Anleitung wird das Flussverfahren zum Packen von Laborglassäulen Schritt-für-Schritt beschrieben. Das Flussverfahren ist in der Abbildung auf Seite 3 unter Weg A gezeigt und besteht damit aus der Konsolidierung und der Komprimierung beim Packen.

Die drei aufeinanderfolgenden Prozesse sind in der nachfolgenden Abbildung als Fließschema dargestellt:



- Ⓐ = Flussverfahren
- Ⓑ = Axiale Komprimierung
- Ⓒ = Slurry Transfer

Alle weiteren Begriffe werden auf Seite 14 beschrieben.

Welchen Einfluss hat die Säulenpackung auf die chromatographischen Ergebnisse?

Die Basis einer jeden chromatographischen Trennung ist eine geeignete stationäre Phase, da nur so eine optimale Auflösung erzielt werden kann. Um robuste und reproduzierbare Ergebnisse zu erreichen, muss die Stationärphase selbstverständlich sehr gut in die Säule gepackt werden.

Die Wichtigkeit einer optimalen Säulenpackung ergibt sich aus der van Deemter-Gleichung:

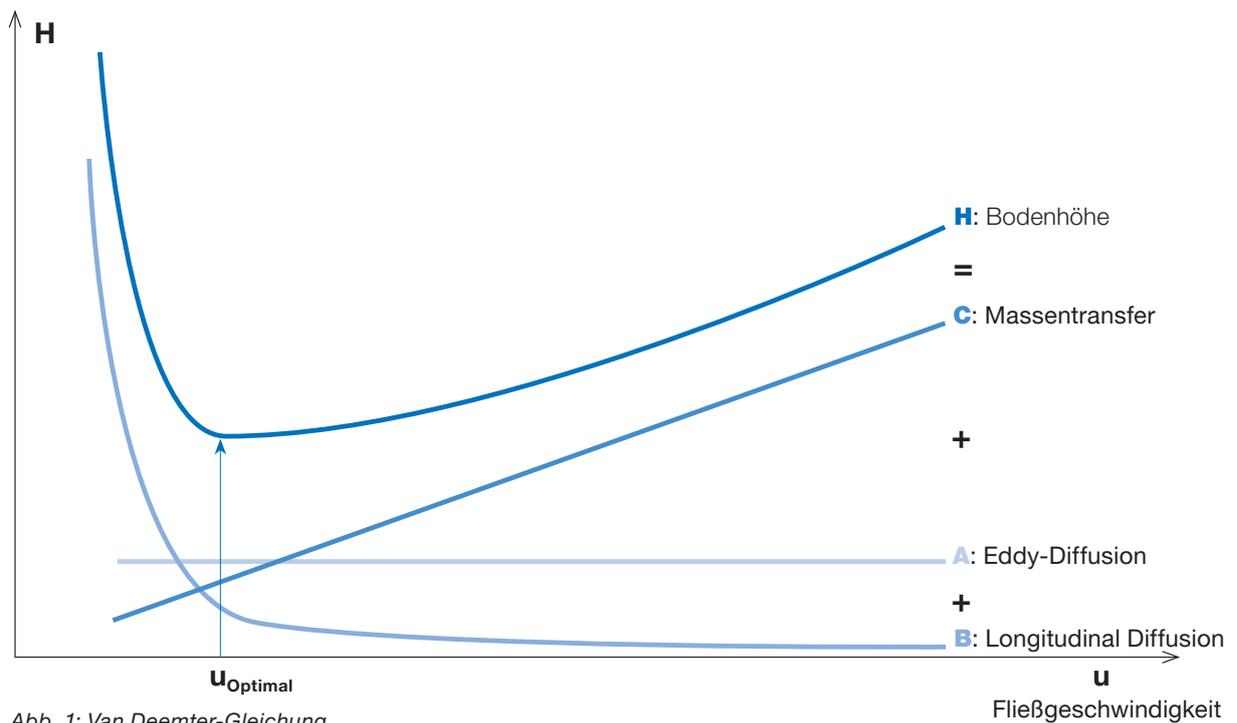


Abb. 1: Van Deemter-Gleichung

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

Mit

H = Bodenhöhe

A = Eddy-Diffusion

B = Longitudinal Diffusion

C = Massentransfer

u = Fließgeschwindigkeit

Term A stellt dabei die sogenannte Eddy-Diffusion dar. Diese beschreibt die Abhängigkeit der Bodenhöhe (H) von dem Partikeldurchmesser. Die Analytenmoleküle durchlaufen auf unterschiedlichen Wegen die Säulenpackung und benötigen dazu unterschiedlich viel Zeit. So entsteht Peakverbreiterung.

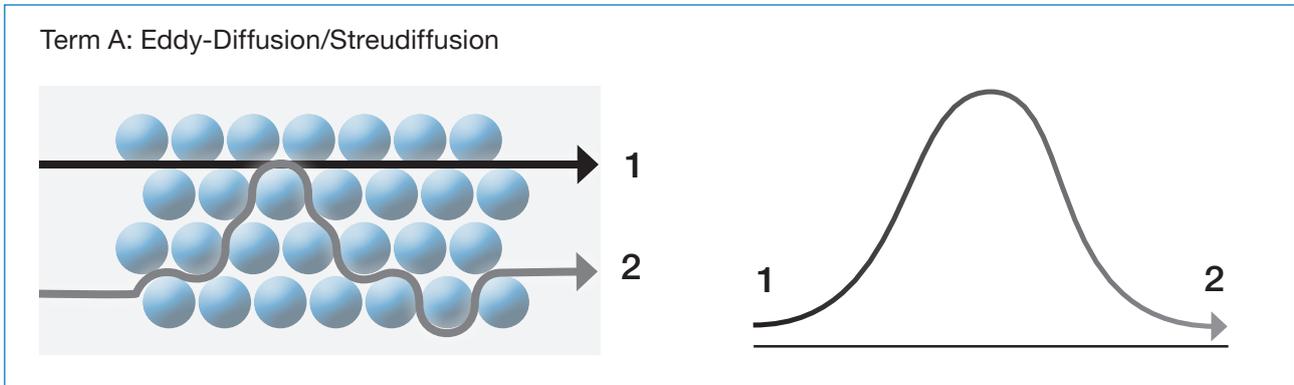


Abb. 2: Graphische Darstellung Term A Eddy-Diffusion

Durch eine sehr homogene Säulenpackung verringert sich die Peakverbreiterung. Die Eddy-Diffusion ist damit ein direktes Maß für die Packqualität einer Säule.

Term B beschreibt die longitudinale Diffusion. Er ist abhängig von der Viskosität und der Temperatur der mobilen Phasen. Dieser wird kleiner bei höheren Flussgeschwindigkeiten.

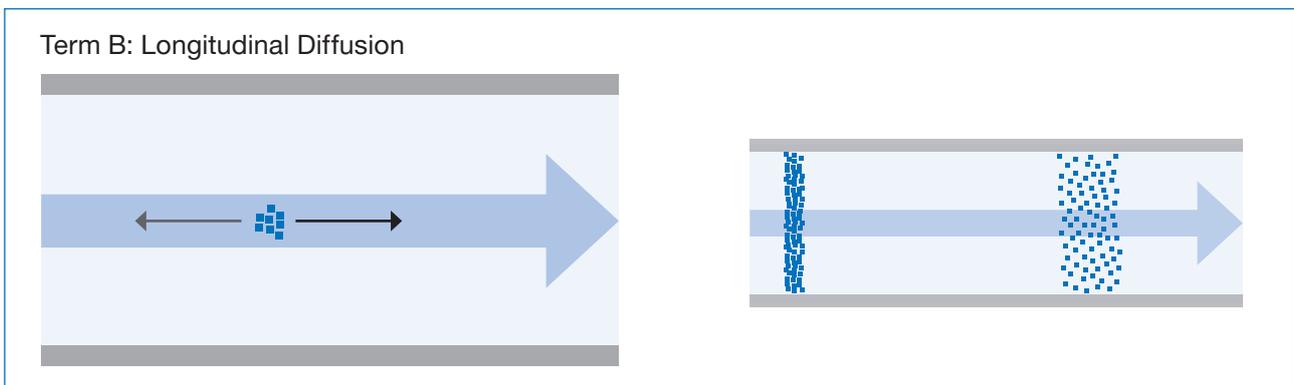


Abb. 3: Graphische Darstellung Term B Longitudinal Diffusion

Term C beschreibt den Massentransfer und damit die Gleichgewichtseinstellung zwischen der mobilen und der stationären Phase. Dieser Term wird durch die Porosität der stationären Phase und Säulengeometrie beeinflusst.

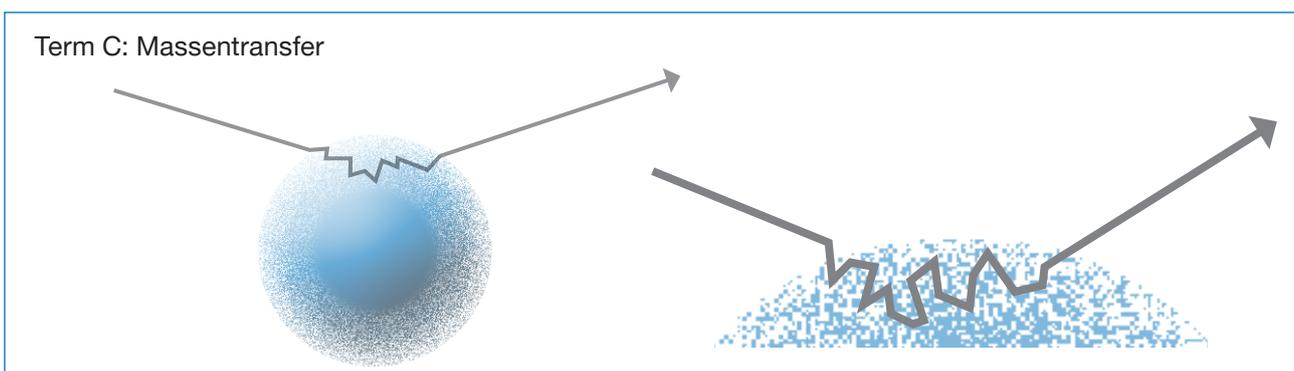


Abb. 4: Graphische Darstellung Term C Massentransfer

1 Vorbereitung Säulenpacken

1.1. Vorbereitung stationäre Phase

1. Berechnung Volumen Säulenbett:

$$V_{\text{Bett}} = \frac{\pi d^2}{4} * l$$

2. Berechnung Volumen unkomprimiertes Gel:

$$V_{\text{Material}} = V_{\text{Bett}} * f_{\text{Kompression}}$$

3. Verhältnis von sedimentierter stationärer Phase zu Lösungsmittelüberstand im Vorratsgefäß notieren.

4. Gel und Lösungsmittel im Vorratsgefäß homogenisieren.

5. Benötigte Menge stationäre Phase in einen Messzylinder füllen.

Verhältnis aus 3. einhalten.

Behältnis so wählen, dass vierfaches Volumen Lösungsmittel noch zugesetzt werden kann!

$$\text{Menge}_{\text{Material}} = V_{\text{Material}} + \text{Lösungsmittel}$$

6. Gel über Nacht sedimentieren lassen.
7. Anschließend sedimentierte stationäre Phase überprüfen.

Ggf. Gel hinzufügen oder entfernen.

1.2. Fines entfernen

1. Vierfaches Volumen Lösungsmittel zum Gel geben.

Auswahl des Lösungsmittels entsprechend der Herstellerangaben.

2. Stationäre Phase und Lösungsmittel homogenisieren.

3. Überstand dekantieren.

4. Schritt 1–3 wiederholen, bis ein geklärter Überstand erreicht ist.

Ggf. Fines mit einer Spritze von der Oberfläche entfernen.

1.3. Slurry herstellen

1. Gel mit mindestens dreifachem Volumen Packlösungsmittel waschen.

Zum Waschen die stationäre Phase am besten in eine Säule überführen!

2. Stationäre Phase in einem Messbecher auffangen.

3. Gel mit Packlösungsmittel auffüllen, bis die gewünschte Slurrykonzentration erreicht ist.

Vorbereitung

Nutzen Sie den „YMC Glass and Pilot Column Packing Calculator“!

Keinen Magnetrührer zum Homogenisieren einsetzen!

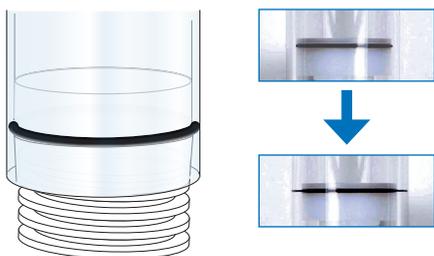
Die Dauer der Sedimentation hängt von der Partikelgröße ab: größere Partikel sedimentieren schneller als kleine.

Keinen Magnetrührer zum Homogenisieren einsetzen!

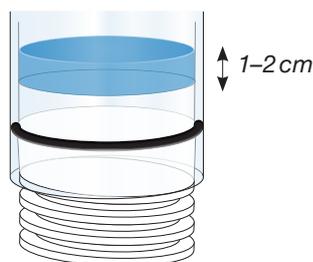
Softgele nicht trocken laufen lassen!

1.4. System und Säule

1. Packsystem mit Packlösungsmittel äquilibrieren.
2. Säulenbauteile auf Sauberkeit und Funktionstüchtigkeit prüfen.
3. Unteren Stempel in den Glaskörper einsetzen.
Stempellänge so anpassen, dass die gewünschte Bettlänge erreicht werden kann.
O-Ring anziehen (entfällt bei ECO^{PLUS}).



4. Vormontierte Säule am Packstand oder am Stativ befestigen.
5. Packadapter montieren. Bei kurzen Bettlängen kann darauf verzichtet werden.
6. Pumpe mit dem unteren Stempel verbinden.
7. Mit geringem Fluss die Fritte benetzen. Es ist ausreichend 1–2 cm Flüssigkeitsstand zu erreichen.
So wird die Luft aus der unteren Fritte entfernt. Darauf achten, dass der Flüssigkeitsstand und der O-Ring frei von Luftblasen sind.



8. Pumpe stoppen und vom unteren Stempel trennen.
9. Unteren Stempel mit einem Stopfen verschließen.
10. Säule mit Hilfe einer Wasserwaage ausrichten.
Die Ausrichtung der Säule ist entscheidend für das spätere Packergebnis.
11. Oberen Stempel (außerhalb der Säule) mit der Pumpe verbinden.
12. Oberen Stempel mit Flüssigkeit spülen.
So wird die Luft aus dem oberen Stempel und der Fritte entfernt.
13. Pumpe stoppen und Stempel von der Pumpe trennen.

Vorbereitung

ECO und ECO^{PLUS} Glassäulen:
O-Ring dichtet, wenn eine durchgehende Linie am Glas zu erkennen ist.

In der Bedienungsanleitung Ihrer Säule finden Sie weitere Hinweise zur Montage des Packadapters.

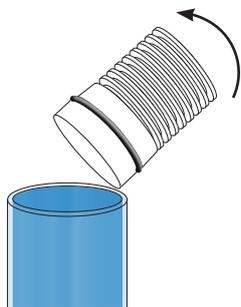
Hierzu K.P316 verwenden.

2 Packen

1. Slurry homogenisieren.
Gleichmäßig in eine Richtung ohne Richtungswechsel rühren, um den Eintrag von Luft zu vermeiden.
Eine Rührdauer von 5 Minuten ist üblich.
Zur Entfernung von Luft kann der Slurry auch im Ultraschallbad für 5 Minuten entgast werden.
Danach ist eine erneute Homogenisierung erforderlich.
2. Homogenisierten Slurry in die geöffnete Säule gießen.
Slurry an der gegenüberliegenden Glaswand herunterlaufen lassen, um den Eintrag von Luft zu vermeiden.



3. Ist das Material vollständig eingefüllt, den Glasrand mit Packlösungsmittel spülen, um Partikelrückstände zu entfernen.
Nur so ist ein optimales Abdichten des O-Rings gewährleistet.
4. Säule bis zum oberen Rand mit Packlösungsmittel auffüllen.
5. Oberen Stempel in einem Winkel am oberen Glasrand des Packadapters ansetzen.



6. Stempel langsam in die vertikale Position bringen.
So ist sichergestellt, dass keine Luft unterhalb der Fritte verbleibt.
7. Konterverschraubung schließen und O-Ring anziehen.
O-Ring anziehen entfällt bei ECO^{PLUS}.

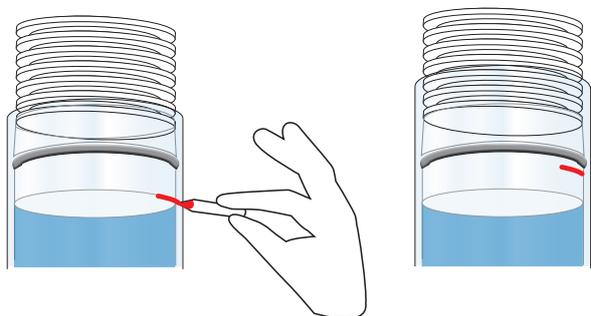
Packen

**Luft eintrag vermeiden.
Schritt 2–13 möglichst schnell durchführen, um ein erneutes sedimentieren des Materials zu vermeiden.**

Besonders wichtig bei Säulen mit Permanentdichtung.

O-Ring dichtet, wenn eine durchgehende Linie am Glas zu erkennen ist.

8. Oberen Stempel herunterdrehen, bis dieser vollständig mit Packlösungsmittel gefüllt ist.
Am oberen Stempel tritt dann Flüssigkeit aus.
9. Luft aus den Schlauchverbindungen entfernen.
10. Schlauch am oberen Stempel anschließen.
11. Stopfen am unteren Stempel entfernen.
12. Schlauch am unteren Stempel anschließen.
Der untere Schlauch kann in das Vorratsgefäß mit dem Packlösungsmittel zurückgeführt werden, sodass das Packlösungsmittel im Kreis geführt wird.
13. Flussrate schrittweise steigern, bis der erforderliche Fluss und Packdruck erreicht ist.
Bei jeder Steigerung der Flussrate warten, bis sich ein konstanter Druck eingestellt hat. Erst dann die Flussrate weiter erhöhen.
14. Warten, bis sich das Säulenbett ausgebildet hat und sich die Bettlänge nicht mehr verändert.
Zur Überprüfung die Bettlänge unter Fluss markieren.



15. Flussrate schrittweise verringern, bis die Pumpe gestoppt werden kann.
16. Schlauch am unteren Stempel entfernen.
17. Unteren Stempel mit einem Stopfen verschließen.
18. Oberen Stempel vom Packadapter entfernen.
19. Flüssigkeit im Packadapter mit einer Spritze entfernen.
20. Packadapter entfernen.
21. Säule bis zum oberen Rand mit Packlösungsmittel füllen.
22. Oberen Stempel in einem Winkel am oberen Glasrand der Säule ansetzen.

Packen

Hierzu K.P316 verwenden.

Entfällt, wenn kein Packadapter verwendet wurde.

Packen

23. Oberen Stempel langsam in eine vertikale Position bringen.
So ist sichergestellt, dass keine Luft unter der oberen Fritte verbleibt.
24. Konterverschraubung schließen und O-Ring anziehen.
O-Ring anziehen entfällt bei ECO^{PLUS}.
25. Oberen Stempel auf das Säulenbett herunterdrehen.
Darauf achten, dass der obere Stempel vollständig mit Packlösungsmittel gefüllt ist und am oberen Stempel Flüssigkeit austritt.
26. Luft aus der Schlauchverbindung vom System entfernen.
27. Schlauch am oberen Stempel anschließen.
28. Stopfen am unteren Stempel entfernen.
29. Schlauch am unteren Stempel anschließen.
30. Flussrate schrittweise erhöhen, bis der erforderliche Fluss und Packdruck erreicht ist.
31. Warten, bis sich die Bettlänge nicht mehr verändert.
Hat sich das Säulenbett weiter komprimiert, neue Bettposition unter Fluss markieren. Anschließend mit den Schritten 32–42 fortfahren.
- ☐ *Hat sich das Säulenbett nicht weiter komprimiert, mit den Schritten 32–36 und anschließend mit Schritt 43 fortfahren.*
32. Flussrate schrittweise verringern, bis die Pumpe gestoppt werden kann.
33. Schlauch am unteren Stempel entfernen.
34. Unteren Stempel mit einem Stopfen verschließen.
35. Pumpe vom oberen Stempel trennen.
36. Oberen Stempel bis auf das Säulenbett herumdrehen.
☐ *Darauf achten, dass der obere Stempel vollständig mit Packlösungsmittel gefüllt ist und am oberen Stempel Flüssigkeit austritt.*
37. Luft aus der Schlauchverbindung am System entfernen.
38. Schlauch am oberen Stempel anschließen.
39. Stopfen vom unteren Stempel entfernen.

O-Ring dichtet, wenn eine durchgehende Linie am Glas zu erkennen ist.

Hierzu K.P316 verwenden.

Packen

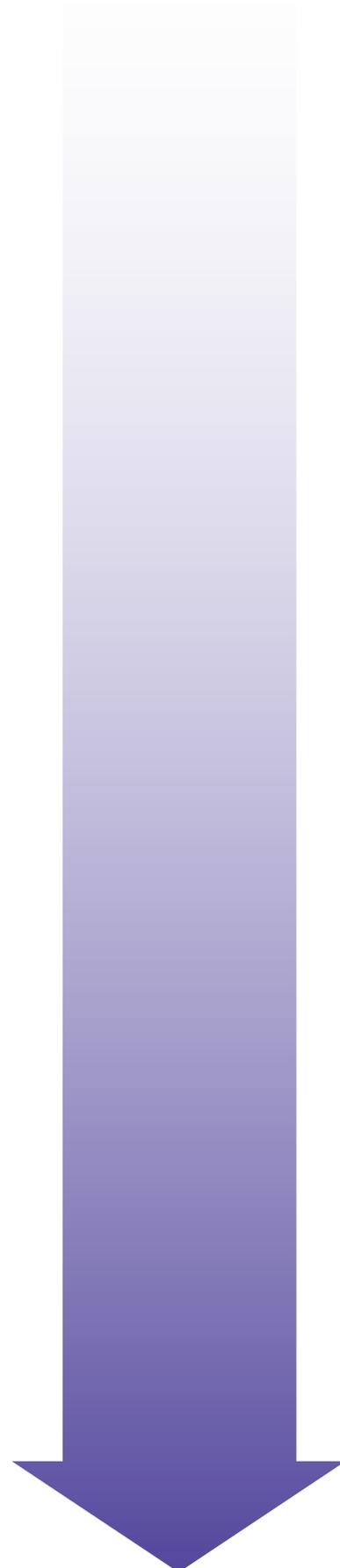
40. Schlauch am unteren Stempel anschließen.
41. Flussrate schrittweise erhöhen, bis der erforderliche Fluss und Packdruck erreicht ist.
42. Zurück zu Schritt 31.
43. Oberen Stempel bis zur letzten Markierung (Markierung unter Fluss) herunter drehen.
Die Säule ist nun fertig gepackt.
44. Säule für die Qualifizierung am System anschließen.



3 Qualifizierung

Qualifizierung

1. Bettlänge messen.
2. Säule mit 5 Säulenvolumina des vorgeschriebenen Laufmittels äquilibrieren.
 *Herstellerangaben des Packungsmaterials beachten.
Die Flussrate entspricht dabei der späteren Flussrate für die Qualifizierung.*
3. Qualifizierung entsprechend der Herstellerangaben oder eigenen Vorgaben durchführen.
4. Qualitätskontrolle 3 x durchführen.
 So wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.
5. Qualifizierung auswerten.
 Falls die geforderten Spezifikationen erzielt wurden, ist die Säule nun einsatzbereit.
 Falls die geforderten Spezifikationen nicht erzielt wurden, Säule und System wieder auf das Packlösungsmittel stellen, Säule entpacken und den Packprozess wiederholen.



4 Entpacken

Das Entpacken der Säule erfolgt, falls die geforderten Spezifikationen während der Qualifizierung nicht erzielt werden konnten oder aber die Säulenpackung gewechselt bzw. erneuert werden soll.

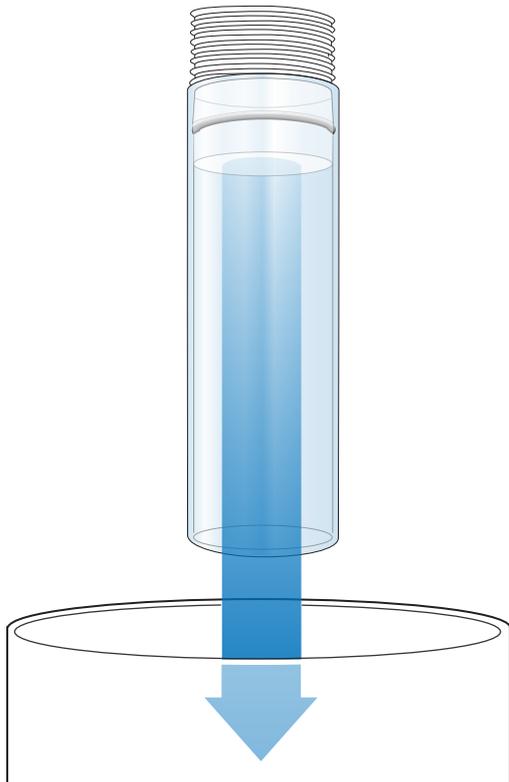
1. Auffanggefäß unter der Säule platzieren.
2. Unteren Stempel vom System trennen.

☐ *Der obere Stempel bleibt mit dem System verbunden.*

3. O-Ring des unteren Stempels lösen.

☐ *Entfällt bei ECO^{PLUS}.*

4. Unteren Stempel entfernen.



5. Flussrate schrittweise erhöhen.

☐ *Das Säulenbett wird aus der Säule gedrückt.*

6. Sobald das Gel im Auffanggefäß ist, Fluss stoppen.

7. Säule reinigen und für das nächste Packen oder die Lagerung vorbereiten.

8. Gel entsprechend der Herstellerangaben für das Packen oder die Lagerung vorbereiten.

Entpacken

O-Ring und Fritte abspülen, um Partikelrückstände zu entfernen.

Glossar

Axiale Komprimierung	Das Material wird im 1-Schritt-Verfahren komprimiert, indem der Stempel auf das Säulenbett herabgestellt wird. Die Stempelbewegung stoppt bei einem definierten Druck.
Entpacken	Entfernen des Packungsmaterials aus der Säule.
Fines	Gebrochene Partikel, die auf der Oberfläche des Slurrys schwimmen. Diese müssen unbedingt aus dem Slurry entfernt werden, um eine möglichst homogene Säulenpackung zu erzielen.
Kompression	Softgele sind durch ihre Polymerbasis komprimierbar. Dies muss beim Säulenpacken berücksichtigt werden.
Komprimierung	Das konsolidierte Bett wird unter Fluss und/oder manuell komprimiert, um die finale Säulenpackung zu erzielen.
Konsolidierung	Erster Schritt im Flussverfahren, in dem sich das lose geformte Säulenbett ausbildet.
Pulstest	Auswertung des Detektorsignals nach Injektionen einer definierten Substanz.
Slurry	Suspension aus Pack-/Slurrylösungsmittel und Packungsmaterial.
Slurrykonzentration	Konzentration des Packungsmaterials in dem Pack-/Slurrylösungsmittel. Meistens handelt es sich dabei um einen Konzentrationsbereich. Dieser ist in den Herstellerangaben des Packungsmaterials angegeben.
Slurry Transfer	Auch bekannt als Pack-In-Place. Der Stempel ist bereits voreingestellt. Der Slurry wird bis zu einem bestimmten Druck eingefüllt.
Übergangsanalyse	Auswertung des Detektorsignals eines Stufengradienten.

