

Schritt-für-Schritt zur gepackten Pilotglassäule

Packen von YMC Pilot^{PLUS}
Säulen mit Softgelen



Einleitung

In dieser Anleitung werden alle Schritte und Parameter zum erfolgreichen Säulenpacken der Pilotglassäulen der Serie YMC Pilot^{PLUS} vorgestellt.

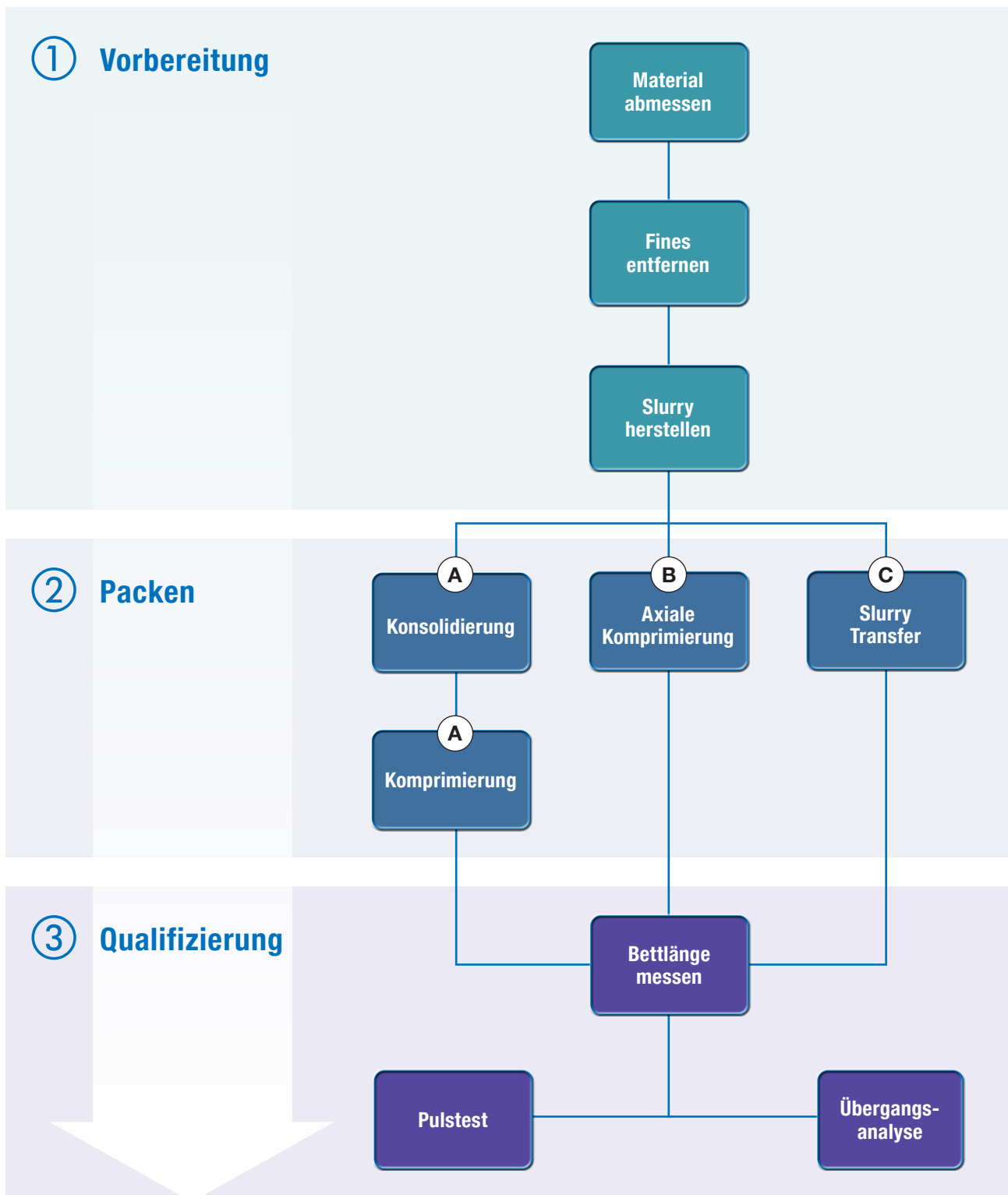
Zum Packen von Glassäulen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Auswahl der richtigen Packmethode ist dabei abhängig von der Säulenhardware, dem Packungsmaterial und dem zur Verfügung stehenden Packsystem.

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 Pilotsäulen 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 13 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:

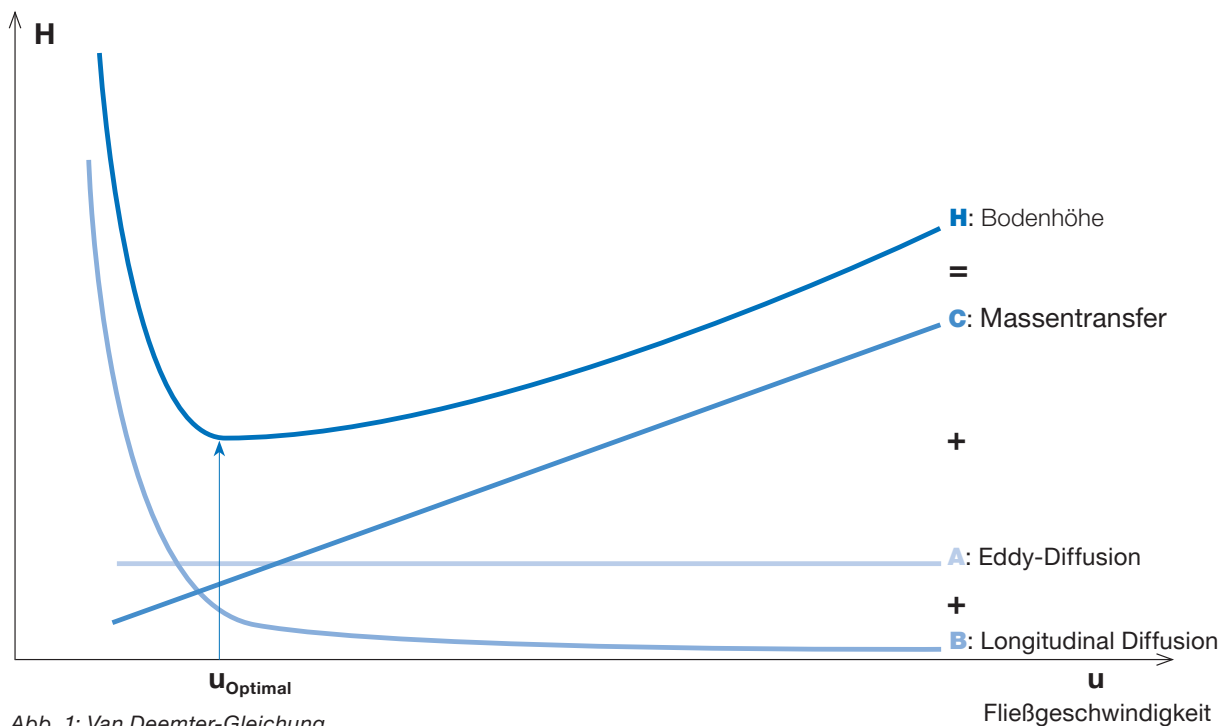


Abb. 1: Van Deemter-Gleichung

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

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.

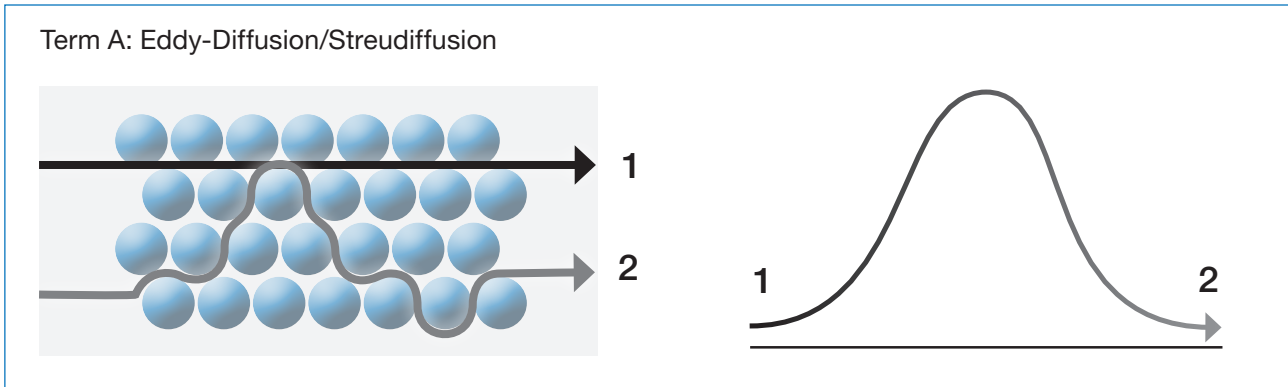


Abb. 2: Graphische Darstellung Term A Eddy-Diffusion

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.

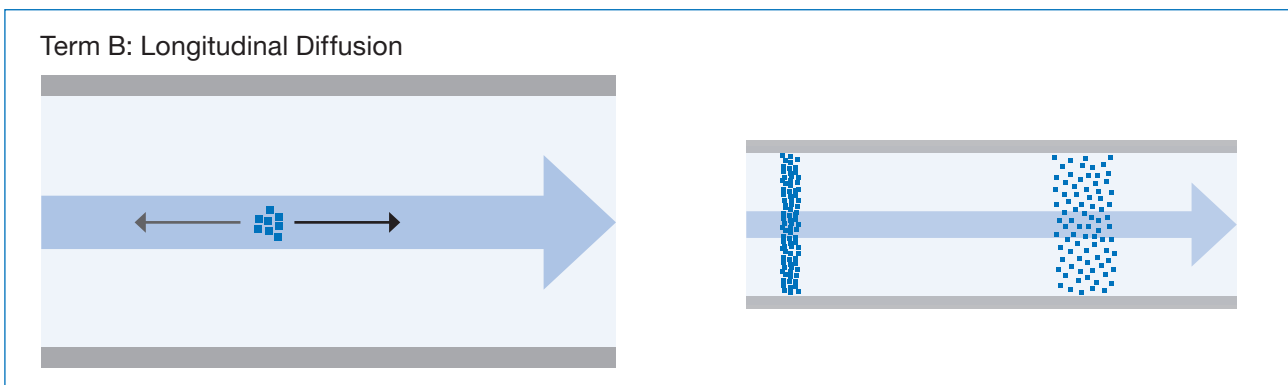


Abb. 3: Graphische Darstellung Term B Longitudinal Diffusion

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

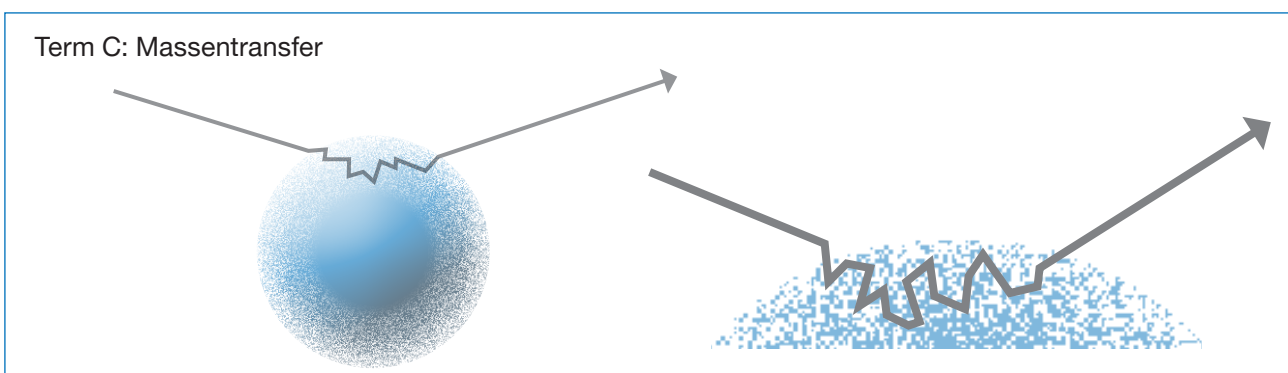


Abb. 4: Graphische Darstellung Term C Massentransfer

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 Magnetprüher zum Homogenisieren einsetzen!

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

Keinen Magnetprüher zum Homogenisieren einsetzen!

Softgele nicht trocken laufen lassen!

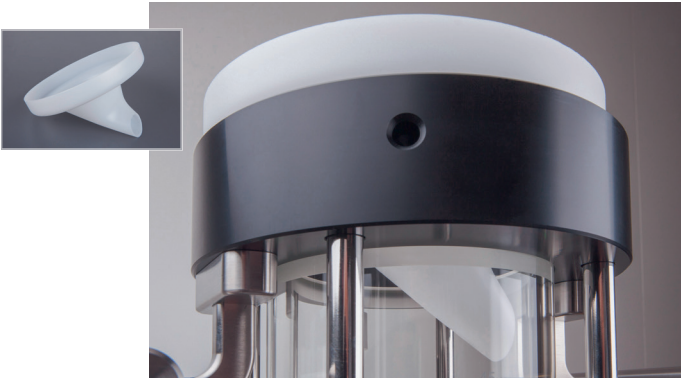
Vorbereitung

1.4. System und Säule

1. Packsystem mit Packlösungsmittel äquilibrieren.
2. Säulenbauteile auf Sauberkeit und Funktionstüchtigkeit prüfen.
3. Bewegliches Endstück entfernen.
4. Ablaufschlauch an der Ablauffunktion montieren und in ein Ablaufgefäß führen.
5. Pumpe am Schlauch des Säulenkörpers anschließen.
6. Pumpe einschalten.
7. Benetzen der Fritte mit Lösungsmittel oder Puffer. Der Lösungsmittelstand sollte bis zu einer Höhe von ca. 2-3 cm oberhalb der Fritte des Säulenkörpers sein (von unten).
*So wird die Luft aus der unteren Fritte entfernt.
Darauf achten, dass der Flüssigkeitsstand und der Profildichtung frei von Luftblasen sind.*
8. Pumpe stoppen und vom Säulenkörper trennen.
9. Ventil am Schlauch des Säulenkörpers schließen.
10. Säule mit Hilfe einer Wasserwaage ausrichten.
Die Ausrichtung der Säule ist entscheidend für das spätere Packergebnis.
11. Pumpe am beweglichen Endstück anschließen.
12. Bewegliches Endstück mit Flüssigkeit spülen.
So wird die Luft aus dem Stempel und der Fritte entfernt.
13. Pumpe stoppen und bewegliches Endstück von der Pumpe trennen.

2 Packen

1. Einfüllhilfe auf dem Säulenkörper positionieren.



2. Ablaufschlauch an der Ablauffunktion montieren und in ein Ablaufgefäß führen.

3. 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.

4. Homogenisierten Slurry in die geöffnete Säule gießen.

Slurry zügig durch die Einfüllhilfe eingießen.

Falls keine Einfüllhilfe genutzt wird, Slurry an der gegenüberliegenden Glaswand herunterlaufen lassen, um den Eintrag von Luft zu vermeiden.

5. Ist das Material vollständig eingefüllt, den Glasrand mit Packlösungsmittel spülen, um Partikelrückstände zu entfernen.

Nur so ist ein optimales Abdichten der Profildichtung gewährleistet.

6. Säule bis zum Rand des Überlaufs mit Slurrylösungsmittel befüllen.

7. Abschlussplatte des beweglichen Endstücks in UP-Richtung bis zum Anschlag und anschließend wieder eine halbe Umdrehung in DOWN-Richtung drehen.

Das bewegliche Endstück ist jetzt zum Einsetzen in die Säule bereit.

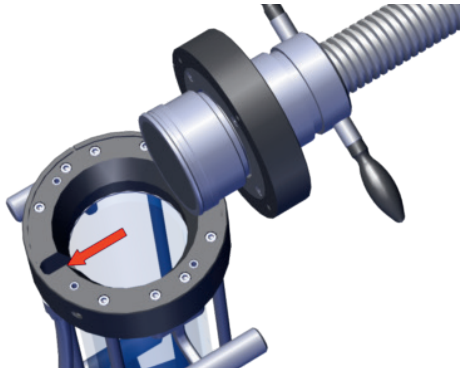
Packen

**Luft eintrag vermeiden.
Schritt 2–15 möglichst schnell durchführen, um ein erneutes sedimentieren des Materials zu vermeiden.**

Besonders wichtig bei Säulen mit Permanentdichtung.

Packen

8. Stempel des beweglichen Endstücks in 180° zum Ablauf schräg am Säulenkörper ansetzen.



9. Stempel langsam in die vertikale Position bringen.
So ist sichergestellt, dass keine Luft unterhalb der Fritte verbleibt.
Das verdrängte Slurrylösungsmittel läuft durch den Ablaufschlauch ab.
10. Sternschrauben eindrehen und Säule so verschließen.
11. Oberen Stempel herunter drehen, bis dieser vollständig mit Packlösungsmittel gefüllt ist.
Am oberen Stempel tritt dann Flüssigkeit aus.
12. Luft aus den Schlauchverbindungen entfernen.
13. Pumpe am Schlauch des beweglichen Endstücks anschließen.
14. Ventil am Schlauch des Säulenkörpers öffnen.
Der untere Schlauch kann in das Vorratsgefäß mit dem Packlösungsmittel zurückgeführt werden, sodass das Packlösungsmittel im Kreis geführt wird.
15. 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.
16. Warten, bis sich das Säulenbett ausgebildet hat und sich die Bettlänge nicht mehr verändert.
Zur Überprüfung die Bettlänge unter Fluss markieren.
17. Flussrate schrittweise verringern, bis die Pumpe gestoppt werden kann.
18. Ventil am Säulenkörper verschließen.
19. Pumpe vom beweglichen Endstück trennen.

Packen

20. Oberen Stempel auf das Säulenbett herunterdrehen.
Darauf achten, dass der obere Stempel vollständig mit Packlösungsmittel gefüllt ist und am oberen Stempel Flüssigkeit austritt.
21. Luft aus der Schlauchverbindung vom System entfernen.
22. Pumpe mit dem beweglichen Endstück verbinden.
23. Ventil am Schlauch des Säulenkörpers öffnen.
24. Flussrate schrittweise erhöhen, bis der erforderliche Fluss und Packdruck erreicht ist.
25. Warten, bis sich die Bettlänge nicht mehr verändert.
Hat sich das Säulenbett weiter komprimiert, neue Bettposition unter Fluss markieren. Anschließend mit den Schritten 26–34 fortfahren.
Hat sich das Säulenbett nicht weiter komprimiert, mit den Schritten 26–28 und anschließend mit Schritt 35 fortfahren.
26. Flussrate schrittweise verringern, bis die Pumpe gestoppt werden kann.
27. Ventil am Schlauch des Säulenkörpers schließen.
28. Pumpe vom oberen Stempel trennen.
29. Oberen Stempel bis auf das Säulenbett herunterdrehen.
Darauf achten, dass der obere Stempel vollständig mit Packlösungsmittel gefüllt ist und am oberen Stempel Flüssigkeit austritt.
30. Luft aus der Schlauchverbindung am System entfernen.
31. Bewegliches Endstück mit der Pumpe verbinden.
32. Ventil am Säulenkörper öffnen.
33. Flussrate schrittweise erhöhen, bis der erforderliche Fluss und Packdruck erreicht ist.
34. Zurück zu Schritt 25.
35. Oberen Stempel bis zur letzten Markierung (Markierung unter Fluss) herunterdrehen.
36. Die Säule ist nun fertig gepackt.
37. Säule für die Qualifizierung am System anschließen.

3 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 den 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.

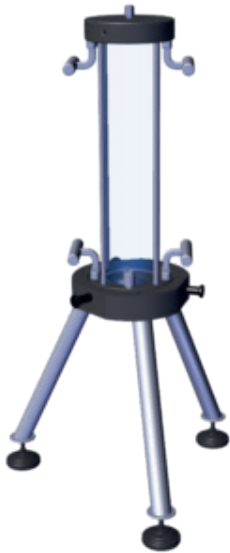
Qualifizierung



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. Säule am Säulenkörper verschließen.
3. Stempel ganz hochdrehen.
4. Bewegliches Endstück aus dem Säulenkörper entnehmen.
5. Rastbolzen am Säulenfuß lösen.
6. Säulenkörper aus dem Säulenfuß heben.



7. Säule umdrehen und wieder im Säulenfuß fixieren.
8. System am Säulenkörper anschließen.
9. Flussrate schrittweise erhöhen.
Das Säulenbett wird aus der Säule gedrückt.
10. Sobald das Material im Auffanggefäß ist, Fluss stoppen.
11. Säule reinigen und für das nächste Packen oder die Lagerung vorbereiten.
12. Material entsprechend der Herstellerangaben für das Packen oder die Lagerung vorbereiten.

Entpacken

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. |

